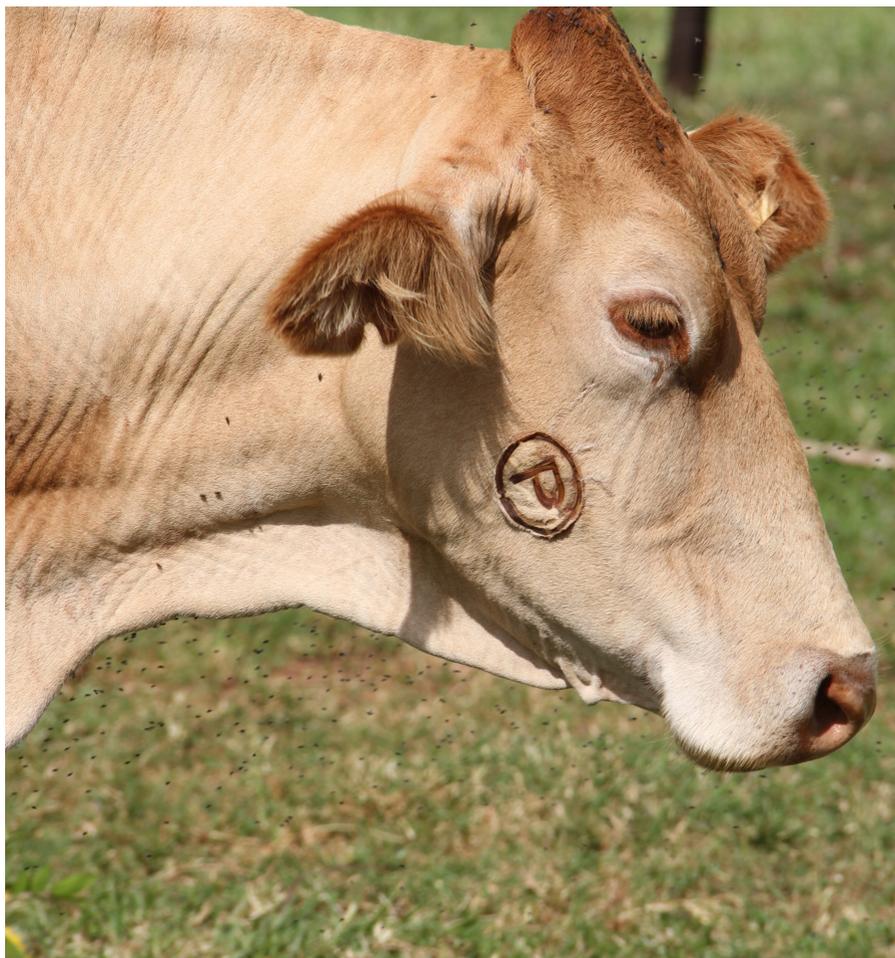


Comparação de genes de virulência de duas cepas de *Mycobacterium bovis* com perfis patogênicos contrastantes



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 33

**Comparação de genes de virulência
de duas cepas de *Mycobacterium
bovis* com perfis patogênicos
contrastantes**

Ana Beatriz Canevari Castelão

Christiane Nishibe

Martín José Zumárraga

Angel Cataldi

Fabiana Bigi

Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Nalvo Franco Almeida

Flávio Ribeiro Araújo

Embrapa
Brasília, DF
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Av. Rádio Maia, 830 Vila Popular, CEP 79106-550

Campo Grande, MS

Fone: (67) 3368 2000

Fax: (67) 3368 2180

<http://www.embrapa.br/gado-de-corte>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Ronney Robson Mamede*

Secretário-Executivo: *Rodrigo Carvalho Alva*

Membros: *Elane de Souza Salles, Lucimara Chiari, Davi José Bungenstab, Andréa Alves do Egito, Roberto Giolo de Almeida, Guilherme Cunha Malafaia*

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto e Editoração Eletrônica: *Rodrigo Carvalho Alva*

Foto da capa: Flávio Ribeiro Araújo

1ª edição

Versão online (2015)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Gado de Corte.**

Comparação de genes de virulência de duas cepas de *Mycobacterium bovis* com perfis patogênicos contrastantes [recurso eletrônico] / Ana Beatriz Canevari Castelhão...

[et al]. – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2012.

26 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN1983-974X ; 33).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/bp/BP33.pdf>>

Título da página da Web (acesso em 15 de outubro de 2015).

Outros autores: Christiane Nishibe; Martín José Zumárraga; Angel Cataldi; Fabiana Bigi; Carlos Alberto do Nascimento Ramos; Nalvo Franco Almeida; Flávio Ribeiro Araújo.

1. *Mycobacterium bovis*. 2. genes de virulência 3. genoma. I. Castelhão, Ana Beatriz Canevari. II. Nishibe, Christiane. III. Zumárraga, Martín José. IV. Cataldi, Angel. V. Bigi, Fabiana. VI. Ramos, Carlos Alberto do Nascimento. VII. Almeida, Nalvo Franco. VIII. Araújo, Flávio Ribeiro.

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	6
Introdução.....	8
Material e métodos.....	10
Resultados	12
Discussão	14
Conclusão	20
Financiamento	21
Referências bibliográficas	21

Comparação de genes de virulência de duas cepas de *Mycobacterium bovis* com perfis patogênicos contrastantes

Ana Beatriz Canevari Castelão¹

Christiane Nishibe²

Martín José Zumárraga³

Angel Cataldi³

Fabiana Bigi³

Carlos Alberto do Nascimento Ramos¹

Nalvo Franco Almeida²

Flávio Ribeiro Araújo^{4*}

Resumo

Mycobacterium bovis é o agente causador da tuberculose bovina, uma doença infecciosa crônica que pode afetar gado, outras espécies domésticas, animais selvagens e seres humanos, com prejuízos econômicos expressivos em escala mundial. Duas cepas de *M. bovis* foram sequenciadas recentemente utilizando plataformas WGS de última geração. Uma das cepas foi isolada a partir de um javali (04-303) e a outra foi isolada a partir de um bovino (534), ambas na Argentina. Estudos anteriores demonstraram que o isolado 04-303 induziu 100% de mortalidade em camundongos 6 semanas após a infecção, ao passo que o isolado 534 não induziu alto percentual de mortalidade mesmo após 4 meses de infecção, com danos teciduais limitados. Objetivou-se neste trabalho comparar um repertório de genes de virulência presentes nesses genomas. Trezentos e quarenta e cinco genes de virulência foram analisados por Blastn e Blastx,

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

² Faculdade de Computação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, CP 549, Brasil

³ Instituto de Biotecnología, CICVyA/INTA, Los Reseros y las Cabañas, 1712 Castellar, Argentina

⁴ Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79106-550, Brasil flabio.araujo@embrapa.br (autor para correspondência)

utilizando o genoma *M. bovis* AF2122/97 como genoma de referência. Mutações nucleotídicas foram encontrados em 11 genes de virulência no isolado 04-303: 3 mutações *synonymous* ou silenciosas (ausência de alteração de aminoácido) e 8 mutações *non-synonymous missense* (troca de aminoácidos). Em relação ao isolado 534, mutações nucleotídicas foram encontrados em 15 genes de virulência: 6 mutações *synonymous* e 9 mutações *non-synonymous missense*. Cinco destas mutações foram comuns em ambos os genomas. Sete genes apresentaram mutações nucleotídicas com substituição preditiva da classe de aminoácidos: *hrcA*, *hpx* e *esat6* em *M. bovis* 04-303; *irtA*, *pks10*, *clgR* e *tetR* em *M. bovis* 534. As mutações encontradas nos genes de virulência estão em concordância com o fenótipo atenuado do isolado *M. bovis* 534. Estas mutações são apenas parcialmente em consonância com o fenótipo virulento do isolado 04-303.

Termos para indexação: *Mycobacterium bovis*; genes de virulência; genoma.

Comparison of Virulence Genes of Two Strains of Mycobacterium bovis with Contrasting Pathogenic Profiles

Ana Beatriz Canevari Castelão

Christiane Nishibe

Martín José Zumárraga

Angel Cataldi

Fabiana Bigi

Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Nalvo Franco Almeida

Flávio Ribeiro Araújo

Abstract

Mycobacterium bovis is the causative agent of bovine tuberculosis, a chronic infectious disease that can affect cattle, other domesticated species, wild animals and humans, with expressive economic losses on a worldwide scale. Two M. bovis strains have been recently sequenced using next-generation WGS platforms. One of the strains was isolated from a wild boar (04-303) and the other was isolated from cattle (534), in Argentina. Previous studies have shown that 04-303 strain induced 100% mortality in mice 6 weeks after infection, whereas 534 strain led to a higher survival after 4 months of infection, with limited tissue damage. The aim of the present study was to compare a repertoire of virulence-related genes present in these genomes. Three hundred and forty-five virulence genes were analyzed by Blastn and Blastx, using AF2122/97 as a reference genome. Nucleotide mutations were found in 11 genes of 04-303: 3 silent mutations (no amino acid changes) and 8 missense mutations (amino acid replacement). Concerning the 534 strain, nucleotide mutations were found in 15 genes: 6 silent and 9 missense mutations. Five of these mutations were common in both genomes. Seven genes exhibited nucleotide mutations with a predictive replacement of amino acid class: hrcA, hpx and esat6 were detected for M. bovis 04-303; irtA, pks10, clgR and tetR were detected for M.

bovis 534. Mutations found in virulence genes are in concordance with the attenuated phenotype of the M. bovis strain 534. These mutations are only partially in consonance with the hyper-virulent phenotype of the 04-303 strain.

Index terms: *Mycobacterium bovis*; virulence genes; genome.

Introdução

Mycobacterium bovis (*M. bovis*) é o agente causador da tuberculose bovina (TB), uma doença infecciosa crônica que está disseminada em todo o mundo e que afeta principalmente bovinos, embora possa afetar também outras espécies domésticas, animais selvagens e seres humanos (GUTIÉRREZ et al., 1998; WOBESER, 2009; MICHEL et al., 2011). *M. bovis* pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), tradicionalmente composto por *M. tuberculosis*, o principal agente da tuberculose humana, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *M. bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, e recentemente incorporado às espécies *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium mungi* e *Mycobacterium orygis* (FABRE et al., 2004; SMITH et al., 2006; ALEXANDER et al., 2010, VAN INGEN et al., 2012; PARSONS et al., 2013). Todas estas espécies são geneticamente muito semelhantes (FORRELLAD et al., 2013). Tem sido sugerido que os membros do MTBC evoluíram a partir de um ancestral comum por meio de sucessivas deleções/inserções de DNA, resultando na presente especiação e em suas diferenças de patogenicidade (FABRE et al., 2004).

Apesar da elevada relação genética global, as espécies do MTBC exibem uma grande variedade de fenótipos e gama de hospedeiros. A deleção da informação genética, juntamente com a presença de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) ao longo do cromossoma das espécies do MTBC, provavelmente explica a diferença na gama de hospedeiros, virulência e imunopatologia encontrados entre estas espécies.

A cepa *M. bovis* 04-303 foi isolada de um javali na província de La Pampa, Argentina em 2004. Esta cepa foi caracterizada com o espoligotipo SB0140 e padrão de MIRU 232224263322. A cepa *M. bovis* 534 foi isolada de um bovino de leite na província de Santa Fé, Argentina em 1997 e foi caracterizada com o espoligotipo SB0140, e padrão de MIRU 232224163322. Estas cepas foram utilizadas no modelo murino experimental BALB/c de tuberculose pulmonar progressiva, tal como descrito por Aguilar León et al. (2009). Neste estudo, os camundongos infectados com o isolado 04-303

apresentaram mortalidade elevada. Esses animais desenvolveram uma resposta inflamatória leve seguida de pneumonia súbita, com extensa necrose pulmonar. Camundongos infectados com o isolado 534 apresentaram taxa de sobrevivência elevada e dano tecidual limitado. Este isolado induziu expressão progressiva de INF- γ , bem como elevada expressão de IL-4, TNF- α e iNOS. Por outro lado, o isolado 04-303 induziu uma expressão significativamente mais baixa e estável destas citocinas. Com base nestes resultados, o isolado *M. bovis* 04-303 foi caracterizado como um isolado virulento enquanto o isolado 534 foi caracterizado como um isolado atenuado.

Blanco et al. (2009) definiu as diferenças de transcriptoma entre *M. bovis* 04-303 e *M. bovis* 534. Um total de 49 genes foram diferencialmente expressos entre ambas as estirpes, 35 deles em níveis mais elevados em *M. bovis* 04-303, enquanto que 14 genes tiveram uma expressão mais elevada para *M. bovis* 534. Resultados de *microarray* e RT-qPCR mostraram a expressão acentuada dos genes *mce4D*, *Mb2607/Mb2608* na estirpe virulenta 04-303 enquanto *alkB*, *Mb3277c* e *Mb1077* foram expressos em níveis mais elevados na estirpe atenuada 534. Em relação aos 35 genes diferencialmente expressos, a expressão desses mudou drasticamente entre ambas as estirpes durante o cultivo *in vitro*, exibindo um comportamento semelhante aos macrófagos em bovinos. A análise em nível de nucleotídeos revelou que estes genes foram conservados em ambas as estirpes, sugerindo que a diferença de expressão pode ser atribuída a alterações tais como deleções ou mutações em regiões de regulação da expressão gênica.

Um conhecimento mais aprofundado dos fatores de virulência pode ser essencial para o desenvolvimento de novas vacinas e medicamentos para ajudar a controlar a doença e avançar para um mundo livre de tuberculose. Tendo em conta os fenótipos extremos patogênicos atribuídos aos isolados *M. bovis* 04-303 e *M. bovis* 534, lançamos a hipótese de que as diferenças de virulência entre esses isolados podem ser atribuídas a mutações nos genes de virulência. Com base nos diferentes fenótipos de expressão gênica e de virulência observados, a análise genômica comparativa foi realizada a fim de identificar um repertório de genes que podem desempenhar papel na virulência.

Material e métodos

Isolados bacterianos analisados

Os isolados *M. bovis* 04-303 e *M. bovis* 534 foram obtidos de um javali em um campo aberto e em um bovino, gado de leite, na região úmida dos Pampas, respectivamente, ambos na Argentina. Em um estudo anterior, estes isolados foram caracterizados em modelo murino de tuberculose pulmonar progressiva, concluindo que 04-303 foi mais letal, causando pneumonia repentina com extensa área de necrose pulmonar. Em contraste, o isolado 534 foi menos virulento, com taxas de sobrevivência elevadas mesmo após 4 meses de infecção e ocasionando danos teciduais limitados (AGUILAR LEON et al., 2009).

Purificação de DNA genômico

O DNA dos isolados foi purificado, tal como descrito por Van Embden et al. (1992).

Sequenciamento do genoma e anotação

Os genomas de *M. bovis* 04-303 (NISHIBE et al., 2013) e 534 foram sequenciados utilizando *MiSeq (Illumina)* e/ou tecnologia de *Ion Torrent (Applied Biosystems)*. Esses projetos de sequenciamento, montagem e anotação de todo o genoma foram depositados no *DDBJ/EMBL/GenBank*, sob os números de acesso GenBank: AVSW01000000 e GenBank: JQEM00000000, respectivamente. A montagem do genoma apontou um total de 169 contigs (cobertura média de 27,3 x) para o isolado *M. bovis* 04-303 e 72 contigs (cobertura média de 50,5 x) para o isolado *M. bovis* 534.

A fim de avaliar a qualidade dos sequenciamentos genômicos realizados, utilizamos o programa CheckM, um método automatizado que utiliza um conjunto amplo de genes marcadores específicos para determinada posição dentro de um genoma de uma árvore genômica

de referência e também informações sobre a colocação destes genes. De acordo com os limites descritos no CheckM, ambos os conjuntos apresentam boa qualidade. Codificação de densidade de ambos os genomas estão dentro da faixa esperada em genomas bacterianos.

Tabela 1. Qualidade das montagens dos genomas, usando o programa CheckM

Genoma	Bases ambi- guas	Contigs	Genes predi- tos	Sca- ffolds	Densi- dade dos contigs	GC	Tamanho do genoma	Contig mais longo	Tamanho médio dos contigs	N50
M.bovis ARG_04- 303	0	169	4,158	169	0.905	0.655	4,313,075	329,090	25,521.15	85,558
M.bovis ARG_534	0	72	4,083	72	0.905	0.655	4,325,986	333,163	60,083.13	178,004

Genes de virulência analisados

Trezentos e quarenta e cinco genes de virulência do MTBC, como revisto por Forrellad et al. (2013) e/ou listados no banco de dados *TubercuList* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>), foram analisados por *Blastn* e *Blastx*, utilizando os isolados *M. bovis* 04-303 e *M. bovis* 534 em comparação com o genoma de referência *M. bovis* AF2122/97 (número de acesso NC_002945). Os SNPs foram classificados como *synonymous* ou *non-synonymous* (*missense* ou *non-sense*).

Resultados

Mutações nucleotídicas foram encontradas em 11 genes de virulência para o isolado *M. bovis* 04-303 (Tabela 1), quando comparado com o genoma referência *M. bovis* AF2122/97. Mutações *synonymous* foram encontradas em três genes: *PE-19* (Mb1819), *mmpL7* (Mb2967) e *dppD* (Mb3687c). E ainda, oito genes apresentaram mutações *non-synonymous missense*: *pknE* (Mb1772), *eccD5* (Mb1823), *uppP* (Mb2160c), *hrcA* (Mb2395c), *hpx* (Mb3196c), *bphC* (Mb3599c), *mmpL8* (Mb3853c) e *esat6* (Mb3905).

Para o isolado *M. bovis* 534, foram encontradas mutações nucleotídicas em 15 genes de virulência (Tabela 1), quando comparado com o genoma referência *M. bovis* AF2122/97. Mutações *synonymous* em seis genes: *yrbE1B* (Mb0174), *vapB2* (Mb0308), *PE-19*, *usp* (Mb2019), *mmpL7* (Mb2967), e *mce4D* (Mb3526c); e mutações *non-synonymous missense* em nove genes: *vapC29* (Mb0634), *irtA* (Mb1383), *pks10* (Mb1688), *pknE*, *eccD5*, *uppP*, *clgR* (Mb2765), *tetR* (Mb3277c) e *bphc*.

Cinco mutações foram idênticas em ambos os isolados, *M. bovis* 04-303 e 534, localizadas nos genes *pknE*, *PE-19*, *eccD5*, *uppP* e *bphc* (Figura 1).

Tabela 2. Genes de virulência com mutações nos isolados de *M. bovis* 04-303 e 534 utilizando genoma *M. bovis* AF2122/97 como referência

Gene	Proteína				<i>M. bovis</i> 04-303				<i>M. bovis</i> 534			
	AF 2122/97	Função	Posição	Mutação	AA	Tipo	Posição	Mutação	AA	Tipo	Referência	
H37Rv	AF 2122/97											
Rv0168	Mb0174	yrbE1B	proteína conservada integral de membrana YrbE1B	-	-	-	480	G-A	-	SM	Gioffré et al. 2005	
Rv0300	Mb0308	vapB2	possível antitoxina VapB2	-	-	-	66	A-G	-	SM	Ramage et al. 2009	
Rv0617	Mb0634	vapC29	Possível toxina VapC29.	-	-	-	69	T-C	Val-Met	NSMS	Ahijou et al. 2011	
Rv1348	Mb1383	irtA	proteína transmembrana de transporte	-	-	-	1685	G-T	Arg-Leu	NSMS	Rodriguez et al. 2006	
Rv1660	Mb1688	pks10	poliketideo sintase	-	-	-	988	A-G	Ser-Gly	NSMS	Sirakova et al. 2003	
Rv1743	Mb1772	pknE	Ser/Thr proteína quinase	167	A-T	Asp-Val	167	A-T	Asp-Val	NSMS	Jayakumar et al. 2008	
Rv1791	Mb1819	PE19	proteína da família PE: PE19	123	T-C	-	123	T-C	-	SM	Bottai et al. 2012	
Rv1795	Mb1823	eccD5	provável proteína de membrana, proteína do sistema de sec	766	G-A	Ala-Thr	766	G-A	Ala-Thr	NSMS	Bottai et al. 2012	
Rv1996	Mb2019	usp	proteína relacionada ao stress	-	-	-	379	C-G	-	SM	Park et al. 2003	
Rv2136c	Mb2160c	uppP	Undecaprenyl pirofosfato fosfatase	211	G-T	Val-Leu	211	G-T	Val-Leu	NSMM	Vandal et al. 2009	
Rv2374c	Mb2395c	hrcA	provável proteína repressora do choque térmico (hrcA)	232	G-A	Asp-Asn	-	-	-	-	Stewart et al. 2002	
Rv2745c	Mb2785	clgR	proteína regulatória da transcrição de ClgR	-	-	-	457	C-A	Gln-Lys	NSMS	Cox et al. 1999	
Rv2942	Mb2987	mmpL7	proteína conservada transmembrana de transporte	1220	T-C	-	1569	C-T	-	SM	Reed et al. 2004	
Rv3171c	Mb3196c	hpx	possível non-heme haloperoxidase hpx	20	A-G	Asp-Gly	-	-	-	-	Murphy et al. 2005	
Rv3249c	Mb3277c	TetR	possível proteína regulatória da transcrição de TetR	-	-	-	396	T-C	Ser-Pro	NSMS	Griffin et al. 2011	
Rv3498c	Mb3526c	mce4D	proteína da família mce	-	-	-	339	G-A	-	SM	Yam et al. 2009	
Rv3568c	Mb3599c	bphC	Biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxigenase BPHC	530	G-A	Arg-Gln	530	G-A	Arg-Gln	NSMM	Flores-Valdez et al. 2009	
Rv3663c	Mb3687c	dppD	proteína transportadora de peptídeo	1443	T-G	-	-	-	-	-	Converse et al. 2003	
Rv3823c	Mb3853c	mmpL8	proteína conservada integral de membrana MmpL8	1351	C-G	Leu-Val	-	-	-	-	Wardis et al. 2000	
Rv3875	Mb3905	esat-6	proteína secretora e estimulante antígeno	187	A-G	Thr-Ala	-	-	-	-	de Jonge et al. 2007	

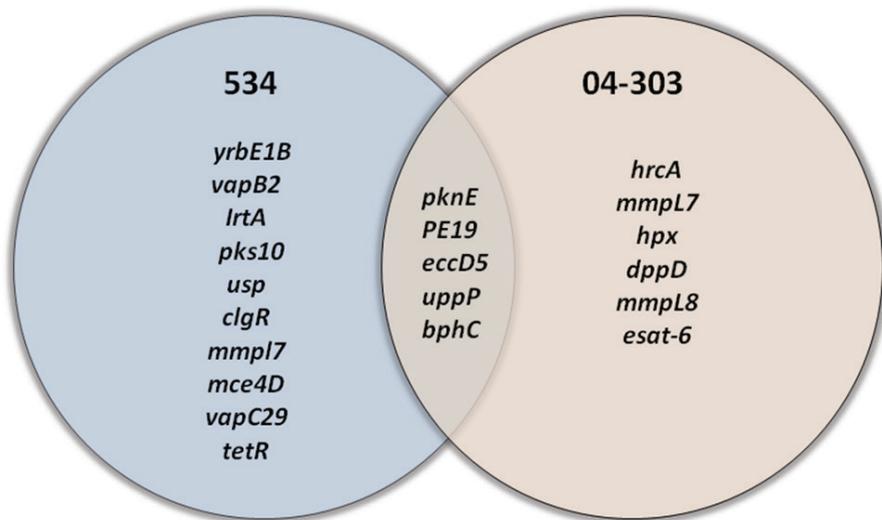


Figura 1: Diagrama de Venn ilustrando os genes de virulência compartilhados e exclusivos apresentando mutações nos isolados de *M. bovis* cepas 534 e 04-303 utilizando o genoma *M. bovis* AF2122/97 como referência.

Discussão

Como mostrado anteriormente, *M. bovis* 04-303 é uma cepa virulenta, ao passo que *M. bovis* 534 é uma cepa atenuada (AGUILAR LEON et al., 2009, BLANCO et al., 2009). Tendo em conta estes fenótipos extremos, hipotetiza-se que as diferenças de virulência entre essas duas cepas pode ser atribuída a mutações presentes em genes de virulência. Neste contexto, a discussão é focada sobre os genes que exibiram mutações non-synonymous em *M. bovis* 04-303 ou em *M. bovis* 534, quando em comparação com o genoma referência *M. bovis* AF2122/97.

Considerando *M. bovis* 04-303, três genes exibiram mutações non-synonymous exclusivas com mudança preditiva de aminoácidos: *hrcA*, *hpx* e *esat6*. No que diz respeito a *M. bovis* 534, os genes *irtA*, *pks10*, *clgR* e *tetR* exibiram mutações non-synonymous, com mudança preditiva de aminoácido.

Um importante conjunto de proteínas que tem sido classificado entre os membros do MTBC é a família de proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*). Estas proteínas são altamente conservadas e são induzidas tanto no patógeno quanto no hospedeiro durante o processo de infecção, ajudando a manter a integridade celular, contribuindo para a sinalização imune (ASEA et al., 2000) e o reconhecimento do patógeno (CASTELLINO et al., 2000). O gene Rv2374c (*hrcA*) codifica a proteína de choque térmico *hrcA*, que atua como repressor transcripcional para membros envolvidos na resposta Hsp60 (GroE) em *M. tuberculosis* (STEWART et al., 2002).

Stewart et al. (2001) demonstraram que a ruptura parcial da regulação do choque térmico em *M. tuberculosis* tem um impacto importante na virulência, prejudicando a capacidade da bactéria de persistir durante a fase crônica da infecção. Além disso, as proteínas de choque térmico desempenham um papel importante na apoptose (STUART et al., 1998; LANG et al., 2000; WANG et al., 2002); e no mecanismo implicado na patogênese dos granulomas da tuberculose (RUTHERFORD et al., 2001; STRIDH et al., 2002; XAUS et al., 2003). Postulou-se que o equilíbrio entre fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos influenciam na resolução do processo inflamatório ou no desenvolvimento da doença (DUBANIEWICZ et al., 2006). No presente estudo, o isolado virulento *M. bovis* 04-303 apresentou uma mutação non-synonymous missense em *hrcA* (G por A, posição 232), quando comparado com o seu gene ortólogo em AF2122/97 (Mb2395c), com uma alteração preditiva desfavorável de aminoácido na posição 78. Esta alteração ocorreu a partir de um aspartato, um aminoácido polar de cadeia lateral negativa, por uma asparagina, um aminoácido polar de cadeia lateral neutra (não carregada). A mutação no gene *hrcA* encontrada em *M. bovis* 04-303, um repressor da transcrição de proteínas de choque térmico, poderia conduzir a uma super expressão dessas proteínas que consequentemente estão associadas a virulência.

A família de proteína ESAT-6 compreende 23 proteínas pequenas (aproximadamente 100 aminoácidos). Os primeiros membros desta

família a serem descritos são codificadas pelos genes adjacentes *esxA* e *esxB*, que estão localizadas no locus *esx-1* (SORENSEN et al., 1995). ESAT-6 (Mb3905) de *M. bovis* tem sido descrita junto a outras pequenas proteínas denominadas CFP-10 (Mb3904) como forte estimulador da imunidade mediada por células (JONES et al., 2010) e uma vez que estão ausentes nas micobactérias não patogênicas (WATERS et al., 2004), incluindo a cepa vacinal *M. bovis* BCG, elas são consideradas antígenos específicos para o diagnóstico da tuberculose bovina (POLLOCK et al., 1997; VORDERMEIER et al., 2001).

Recentemente, a regulação da resposta imune foi descrita em *M. tuberculosis* com a participação de ESAT-6, isolada ou no complexo com a proteína chaperona CFP-10 (ESAT-6:CFP-10). Verificou-se que ESAT-6/ESAT-6:CFP-10 pode sequestrar a proteína do hospedeiro beta-2-microglobulina (b2M) inibindo a expressão na superfície celular de MHC-I-b2M, prejudicando assim a reposta imune adaptativa do hospedeiro e consequentemente levando ao estabelecimento de uma infecção bem sucedida (SREEJIT et al., 2014). Foi também demonstrado que ESAT-6 provoca lise celular através da formação de poros na membrana (SMITH et al., 2008).

No presente estudo, uma única mutação (A por G) foi encontrada no gene *esat6* (*esxA*) para o isolado *M. bovis* 04-303, resultando na substituição preditiva de uma treonina, um aminoácido polar com cadeias laterais neutras, por uma alanina, um aminoácido com uma cadeia lateral hidrofóbica (neutra). Uma vez que o papel de ESAT-6 na interação patógeno-hospedeiro durante a infecção por *M. tuberculosis* foi claramente estabelecida, é possível que alterações em determinados domínios da proteína ESAT-6 possa aumentar sua propriedade de virulência. Na verdade, a principal causa da atenuação da cepa BCG é a ausência dos genes codificadores de CFP10 e ESAT6. Assim, dada a relevância de ESAT-6 na patogênese da infecção, uma mutação desfavorável como esta que foi detectada no isolado 04-303 poderia ter implicações para o fenótipo virulento.

O gene *hpx* é uma possível não-heme haloperoxidase necessária para o crescimento de micobactérias em colesterol (GRIFFIN et al., 2011). No gene *hpx*, uma única mutação (A por G, na posição 20, *non-synonymous missense*) foi detectada para o isolado *M. bovis* 04-303, quando comparado com o seu ortólogo em AF2122/97 (Mb3196c). Esta mutação resulta na substituição preditiva de um aspartato (aminoácido polar carregado negativamente) por uma glicina (aminoácido não polar, alifático). Mais estudos são necessários para entender a relevância desta mutação, dado que poucos estudos têm abordado o papel de *hpx* na virulência desta micobactéria.

Mmp18 é necessário para a completa montagem dos sulfoglicolipídeos tetra-acilados (Ac4SGL) (LAYRE 2011), que representa um importante lipídeo de parede celular de micobactérias patogênicas. Brodin et al. (2010) sugeriram que Ac4SGL aceleram a maturação do fagossoma, favorecendo o tráfico interno do fagossoma que contém a micobactéria *M. tuberculosis* para compartimentos mais ácidos. Relatou-se também que a formação de fagolisossomas ácidos facilita o aparecimento de antígenos de *M. tuberculosis* e a eliminação da bactéria. Portanto, pode-se especular que a mutação do gene *mmp18* afeta negativamente a produção de Ac4SGL no isolado *M. bovis* 04-303, aumentando assim a persistência da cepa no interior de macrófagos do hospedeiro e evitando assim a apresentação antigênica pelo sistema imune.

O genoma de *M. bovis* revelou uma variedade notável de policetídeos sintases (PKS). A maioria dos genes *pks* estão implicados na biossíntese de lipídeos complexos, especialmente no ácido mycocerosídeo, que é encontrado no envelope de *M. bovis* (ROUSSEAU et al., 2003). No presente estudo, o gene *pks10* exibiu uma única mutação (A por G, posição 988, *non-synonymous missense*) para o isolado *M. bovis* 534, quando comparado com o seu ortólogo em AF2122/97 (Mb1688). Esta mutação resultou na substituição preditiva desfavorável de uma serina (aminoácido polar não carregado) por uma glicina (aminoácido não polar, alifático). Um mutante *pks10* de *M. tuberculosis* foi detectado como defeituoso na síntese de *phthiocerol dimycocerosate* (PDIM), um

dos principais lipídeos de superfície de micobactérias patogênicas. Este mutante *pks10* também foi atenuado de forma significativa no crescimento em camundongos (SIRAKOVA et al., 2003). Assim, as enzimas envolvidas na biossíntese de PDIM representam alvos potenciais que podem afetar a patogênese de micobactérias e o fenótipo de virulência, parecendo ser compatível com o fenótipo atenuado do isolado 534.

TetR é uma grande família de reguladores da transcrição que servem muitas vezes como repressores e são largamente distribuídos entre as bactérias (YANG et al., 2012). Em *M. tuberculosis*, EthR regula a expressão de um gene de mono-oxigenase que catalisa a ativação da etionamida, um antibiótico utilizado no tratamento da TB (DOVER et al., 2004). Em *M. bovis*, a proteína TetR é um regulador transcricional putativo codificado pelo operon Mb3277c/Mb3280c (BLANCO et al., 2009; LIU et al., 2014.). No isolado *M. bovis* 534, uma mutação no gene *tetR* (T por C, posição 396, *non-synonymous missense*) foi detectada, em comparação com o seu ortólogo em AF2122/97 (Mb3277c), o que resulta na substituição desfavorável preditiva de uma serina, um aminoácido polar com cadeia lateral neutra, por uma prolina, um aminoácido não-polar. Blanco et al. (2009) demonstraram que os genes *mb1077c* e *mb3277c*, que codificam fatores reguladores putativos, foram regulados negativamente (supressão) no isolado virulento 04-303. Isto sugere que estes reguladores podem controlar negativamente a expressão de proteínas que são relevantes para a infecção de *M. bovis* em camundongos. Portanto, é possível especular que a mutação em *tetR* aqui encontrada pode ter interferido na expressão deste gene, contribuindo para a atenuação do isolado *M. bovis* 534.

Mb0634 ou vapC29 (Rv0617 em *M. tuberculosis*) é uma toxina-antitoxina (TA), que forma um operon com o gene Rv0616A. Genes que codificam TA são dispostos em um único operon (ANANTHARAMAN E ARAVIND, 2003), e codificam uma toxina estável e uma antitoxina lábil: os alvos da toxina podem ser diversos processos celulares enquanto a antitoxina restringe a ação da toxina (GERDES, 2000). Em condições de estresse e, ou privação de nutrientes, proteases celulares degradam antitoxinas e, assim, permitem que toxinas livres retardem o crescimento da

célula ou mesmo a destrua (HAYES, 2003). VapC29 contém um domínio PIN de ribonuclease. Ahidjo et al. (2011) demonstraram que a proteína codificada pelo gene Rv0617 exibe atividade de ribonuclease. Em contraste com o complexo *M. tuberculosis* que apresenta vários pares de TA, *Mycobacterium smegmatis*, uma cepa não patogênica, contém apenas um loci codificante. Além disso, demonstrou-se que a supressão das ribonucleases MazF, membro da família TA, reduz a virulência (TIWARI et al., 2015). O papel de vapC29 no complexo *M. tuberculosis* ainda não está claro e assim o impacto da mutação em vapC29 sobre o isolado atenuado *M. bovis* 534 merece maior investigação.

Um dos principais mecanismos através do qual as bactérias obtêm nutrientes essenciais a partir de seu hospedeiro é o mecanismo de aquisição de ferro. O ferro pode ser adquirido pelo contato direto entre as bactérias e as moléculas carreadoras de ferro do hospedeiro, seguida da sua remoção por redução e subsequente absorção. Alternativamente, as micobactérias liberam moléculas sequestrantes de ferro de baixo peso molecular chamadas de sideróforos. Neste método alternativo, três proteínas estão envolvidas na importação e exportação de sideróforos através da membrana e consequente absorção de ferro. IrtA é uma proteína exportadora de sideróforos enquanto as duas proteínas do sistema IrtB são importantes importadoras de sideróforos (FARHANA et al., 2008). Uma única mutação no gene *irtA* (G por T, posição 1685, *non-synonymous missense*) foi detectado para o isolado *M. bovis* 534, quando comparado com o seu ortólogo em AF2122/97 (Mb1383), conduzindo à substituição preditiva desfavorável de uma arginina (aminoácido polar carregado positivamente) por uma leucina (aminoácido não-polar, alifático). Farhana et al. (2008) demonstraram que mutação no complexo *irtA/irtB* em *Mycobacterium smegmatis* fez com que esta micobactéria apresentasse crescimento extremamente reduzido devido à absorção incompleta de ferro. Sabe-se que em agentes patogênicos intracelulares, a assimilação de ferro é essencial, a fim de contornar a sua escassez *in vivo* e, tal como fator determinante de virulência. Portanto, a mutação no gene *irtA* poderia ter contribuído para o fenótipo de atenuação do isolado *M. bovis* 534.

O gene *clgR* codifica uma proteína que desempenha um papel importante na resposta ao *stress redox*, e é um dos aproximadamente 100 genes que participam na resposta de reeração, o mecanismo pelo qual as micobactérias retornam a um estado de replicação após re-exposição a condições favoráveis (SHERRID et al., 2010, MCGILLIVRAY et al., 2014). Uma única mutação no gene *clgR* no isolado *M. bovis* 534 foi detectada (C por A, posição 457, *non-synonymous*), quando comparada com o seu ortólogo em AF2122/97 (Mb2765), conduzindo à substituição preditiva negativa de uma asparagina (aminoácido polar neutro) por um ácido aspártico (aminoácido polar com carga negativa). Sherrid et al. (2010) simularam um modelo *in vitro* para avaliar os mecanismos de reativação de *M. tuberculosis*. O estudo demonstrou que a protease ClgR é regulada positivamente durante a transição de *M. tuberculosis* a partir de bacteriostase para o crescimento. Além disso, como demonstrado por McGillivray et al. (2014), um mutante isogênico Mtb:vRv2745c se mostrou mais sensível ao *stress redox* no modelo *in vitro* gerado por diamida. Assim, a mutação detectada no gene *clgR* também pode ter contribuído para a atenuação do isolado *M. bovis* 534.

Conclusão

Diferentes tipos de mutações foram identificados nos dois isolados que diferem no fenótipo de virulência. Todas elas estão situadas em genes que haviam sido descritos anteriormente como codificadores de proteínas, com implicações na patogênese de *M. tuberculosis* ou *M. bovis*. No entanto, o impacto desses polimorfismos no fenótipo de virulência devem ainda ser estabelecido em uma demonstração experimental.

Nota: Neste artigo, focamos nossa atenção sobre as mutações *non-synonymous*, porque alteram a sequência primária de aminoácidos na proteína mutante. No entanto, mutações *synonymous* podem criar *codons* raros que podem conduzir a uma tradução inexpressiva de genes mutantes. Além disso, *codons* raros podem ser convertidos em *codons* mais frequentes, favorecendo assim a tradução proteica.

Financiamento

Esta pesquisa foi financiada pela Embrapa (03.14.00.054.00.00, 02.13.16.002.00.00), FUNDECT (TO0096 / 2012) e CNPq (443235 / 2014-7; 305857 / 2013-4).

Referências bibliográficas

AGUILAR LEÓN, D. et al. *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. **Clinical Experimental Immunology** v. 157, p. 139-147, 2009.

AHIDJO, B. A. et al. VapC toxins from *Mycobacterium tuberculosis* are ribonucleases that differentially inhibit growth and are neutralized by cognate VapB antitoxins. **PLoS One** v. 6, n. 6, e21738, 2011.

ALEXANDER, K. A. et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emergence Infection Disease** v.16, p. 1296–1299, 2010.

ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. **Genome Biology** v. 4, n. 12, R81, 2003

ASEA, A. et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Natural Medicine** v. 6, p. 435-442, 2000.

BLANCO, F. C. et al. Differential transcriptome profiles of attenuated and hypervirulent strains of *Mycobacterium bovis*. **Microbes Infection** v. 11, p. 956-963, 2009.

BRODIN, P. et al. High content phenotypic cell-based visual screen identifies *Mycobacterium tuberculosis* acyltrehalose-containing glycolipids involved in phagosome remodeling. **PLoS Pathogens** v. 9, n. 6(9), e1001100, 2010. doi: 10.1371/journal.ppat.1001100.

CASTELLINO, F. et al. Receptor-mediated uptake of antigen heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. **Journal Experimental Medicine** v. 191, p. 1957-1964, 2000.

DOVER, L. G. et al. Crystal structure of the TetR/CamR family repressor *Mycobacterium tuberculosis* EthR implicated in ethionamide resistance. **Journal Molecular Biology** v. 340,

p. 1095–1105, 2004.

DUBANIEWICZ, A. et al. Comparative analysis of mycobacterial heat shock proteins-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in sarcoidosis and tuberculosis. **Journal of Clinical Immunology** v. 26, n. 3, p. 243-50, 2006.

FABRE, M. et al. High genetic diversity revealed by variable-number tandem repeat genotyping and analysis of hsp65 gene polymorphism in a large collection of "*Mycobacterium canettii*" strains indicates that the *M. tuberculosis* complex is a recently emerged clone of "*M. canettii*". **Journal of Clinical Microbiology** v. 42, n. 7, p. 3248-3255, 2004.

FARHANA, A. et al. Mechanistic insights into a novel exporter-importer system of *Mycobacterium tuberculosis* unravel its role in trafficking of iron. **PLoS One** v. 3, n. 5, e2087, 2008.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium* complex. **Virulence** v. 4, n. 1, p. 3-66, 2013.

GERDES K. Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. **Journal of Bacteriology** v. 182, n. 3, p. 561-572, 2000. Review.

GRIFFIN, J. E. et al. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. **PLoS Pathogens** v. 7, n. 9, e1002251, 2011.

GUTIÉRREZ, M.; TELLECHEA, J.; GARCÍA MARÍN, J. F. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis* infected goats. **Veterinary Microbiology** v. 62, p. 281–290, 1998.

HAYES, C. S. & SAUER, R. T. Toxin-antitoxin pairs in bacteria: killers or stress regulators? **Cell** v. 10, p. 2-4, 2003.

JONES, G. J. et al. Screening of Predicted Secreted Antigens from *Mycobacterium bovis* Reveals the Immunodominance of the ESAT-6 Protein Family. **Infection and Immunity** v. 78, p. 1326-1332, 2010.

LANG, D. et al. Differential expression of heat shock protein 70 (hsp70) in human monocytes rendered apoptotic by IL-4 or serum deprivation. **Journal of Leukocyte Biology** v. 68, n. 5, p. 729-736, 2000.

LAYRE, E. et al. Deciphering sulfolipids of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Lipid Research** v. 52, n. 6, p. 1098-1110, 2011.

LIU, L.; HUANG, C.; HE, Z. G. A TetR family transcriptional factor directly regulates the expression of a 3-methyladenine DNA glycosylase and physically interacts with the enzyme to stimulate its base excision activity in *Mycobacterium bovis* BCG. **Journal of Biological Chemistry** v. 289, p. 9065-9075, 2014.

MCGILLIVRAY, A. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* Rv2745c plays an important role in responding to redox stress. **Plos One** v. 9, n. 4, e93604, 2014.

MICHEL, A. L. et al. Approaches towards optimising the gamma interferon assay for diagnosing *Mycobacterium bovis* infection in African buffalo (*Syncerus caffer*). **Preventive Veterinary Medicine** v. 98, p. 142-151, 2011.

NISHIBE, C. et al. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium bovis* 04-303, a highly virulent strain from Argentina. **Genome Announcements** v. 27, 1(6), 2013.

PARSONS, S. D. et al. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. **Emergence Infection Disease** v. 19, p. 2004-2007, 2013.

POLLOCK, J. M. & ANDERSEN, P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. **Infection and Immunity** v. 65, p. 2587-2592, 1997.

ROUSSEAU, C. et al. Virulence attenuation of two Mas-like polyketide synthase mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology** v. 149, p. 1837-1847, 2003.

RUTHERFORD, R. M. et al. Functional genomics in sarcoidosis--reduced or increased apoptosis? **Swiss Medical Weekly** v. 131, n. 31-32, p. 459-470, 2001.

SHERRID AM et al. Characterization of a Clp protease gene regulator and the reeration response in *Mycobacterium tuberculosis*. **PloS One** v. 5, n. 7, e11622, 2010.

SIRAKOVA, T. D. et al. Attenuation of *Mycobacterium tuberculosis* by disruption of a mas-like gene or a chalcone synthase-like gene, which causes deficiency in dimycoceroyl phthiocerol synthesis. **Journal of Bacteriology** v. 185, p. 2999-3008, 2003.

SMITH, J. et al. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. **Infection and Immunity** v. 76, p.5478-5487, 2008.

SMITH, N. H. et al. Bottleneck and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. **Nature** v. 4, p. 670-681, 2006.

SORENSEN, A. L. et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity** v. 63, p. 1710-1717, 1995.

SREEJIT, G. et al. The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with beta-2-microglobulin (β 2M) affecting antigen presentation function of macrophage. **PLoS Pathogens** v. 10, n. 10, e1004446, 2014.

STEWART, G. R.; SNEWIN, V. A.; WALZL, G. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. **Nature Medicine** v. 7, p. 732-737, 2001.

STEWART, G. R. et al. The heat shock response of *Mycobacterium tuberculosis*: linking gene expression, immunology and pathogenesis. **Comparative and Functional Genomics** v. 3, p. 348-351, 2002.

STRIDH, H. et al. Apoptosis resistant bronchoalveolar lavage (BAL) fluid lymphocytes in sarcoidosis. **Thorax** v. 57, n. 10, p. 897-901, 2002.

STUART, J. K. et al. Characterization of interactions between the anti-apoptotic protein BAG-1 and Hsc70 molecular chaperones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22506-22514, 1998.

TIWARI, P. et al. MazF ribonucleases promote *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and virulence in guinea pigs. **Nature Communications** v. 22; 6:6059, 2015. doi: 10.1038/ncomms7059.

VAN EMBDEN, J. D. et al. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. **Research Microbiology** v. 143, n. 4, p. 385-391, 1992.

VAN INGEN, J. et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emergence Infection Disease** v. 18, n. 4, p. 653-655, 2012.

VORDERMEIER, H. M. et al. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology** v. 8, p. 571-578, 2001.

WANG, Y. et al. Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. **Journal of Immunology** v. 169, n. 5, p. 2422-2429, 2002.

Waters, W. R. et al. Use of Recombinant ESAT-6:CFP-10 Fusion Protein for Differentiation of Infections of Cattle by *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

sís. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology** v. 11, p. 729-735, 2004.

WOBESER, G. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: an updated history. **Canadian Veterinary Journal** v. 50, p. 1169–1176, 2009.

XAUS, J. et al. High expression of p21 Waf1 in sarcoid granulomas: a putative role for long-lasting inflammation. **Journal of Leukocyte Biology** v. 74, n. 2, p. 295-301, 2003.

YANG, M. et al. A TetR-like regulator broadly affects the expressions of diverse genes in *Mycobacterium smegmatis*. **Nucleic Acids Research** v. 40, n. 3, p. 1009-1020, 2012.



Gado de Corte

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**

CGPE 12259