

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Construção de *Mycobacterium bovis* BCG Recombinante Expressando a
Proteína Verde Fluorescente**

Ana Carolina Peiter

Pelotas, 2014

ANA CAROLINA PEITER

**CONSTRUÇÃO DE *Mycobacterium bovis* BCG RECOMBINANTE
EXPRESSANDO A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE**

Trabalho apresentado ao Curso de
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Odir Antonio Dellagostin

Orientador do Estágio: Dra. Caroline Rizzi

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P377c Peiter, Ana Carolina

Construção de mycobacterium bovis bcg recombinante expressando a proteína verde fluorescente. / Ana Carolina Peiter ; Odir Antonio Dellagostin, orientador. — Pelotas, 2014.

34 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Bcg recombinante. 2. Gfp. 3. Citometria de fluxo. 4. Gene repórter. I. Dellagostin, Odir Antonio, orient. II. Título.

CDD : 636.40896

Banca examinadora:

Prof. Dr. Odir Antonio Dellagostin (Orientador)

Doutor em Biologia Molecular pela Universidade de Surrey

Profa. Dra. Daiane Drawanz Hartwig

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Augusto Schneider

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

M.Sc. Karine Begnini

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

À minha família.

Agradecimentos

À minha família: Jacinta, Albino, Aline e Jean, pelo carinho e incentivo.

À Caroline Rizzi, que me motivou e me guiou desde os primeiros passos no laboratório.

Ao professor Odir Dellagostin, pela orientação e pela oportunidade de aprendizado.

Aos amigos de laboratório: Sérgio, Charles, Natasha, Andressa e Silvana com quem trabalhei no grupo *Mycoplasma*.

Aos colegas do Laboratório 7 e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo ambiente de trabalho agradável e pelo carinho, pela ajuda e pelas dúvidas esclarecidas.

Às minhas amigas Karen, Carol, Renata, Maéve e Francielle pela lealdade, que me apoiaram e estiveram comigo durante toda a graduação.

Aos amigos que fiz durante a faculdade e aos amigos de Pelotas, que me fizeram amar esta cidade.

Aos professores da Biotecnologia pelo conhecimento que levarei para sempre.

Ao professor Antonio Sergio Varela, à Karine Begnini e ao Leonardo Garcia pela ajuda, disponibilidade e atenção.

Ao professor Vinicius Campos, muito obrigado pela paciência e atenção durante as análises estatísticas.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Eu não sei como eu posso parecer ao mundo, mas para mim, eu pareço ser apenas como uma criança brincando na beira do mar, divertindo-me e encontrando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita do que o ordinário, enquanto o grande oceano da verdade permanece desconhecido diante de mim.”

Isaac Newton

RESUMO

PEITER, Ana Carolina. **Construção de *Mycobacterium bovis* BCG recombinante expressando a proteína verde fluorescente**. 2014. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas. 2014.

O *Mycobacterium bovis* BCG tem sido utilizado em todo o mundo como uma vacina com um excelente histórico de segurança e apresenta características que o tornam um vetor promissor para a produção de vacinas polivalentes recombinantes. Além disso, modificações genéticas podem aprimorar suas propriedades adjuvantes e imunogênicas. No entanto, a eficácia da vacina BCG recombinante (rBCG) é comprometida por vários fatores que incluem a falta de padronização de estratégias de construção, o conhecimento incompleto dos efeitos de parâmetros tais como o nível de expressão gênica e carga metabólica. Estudos que empregam a proteína verde fluorescente como repórter são capazes de monitorar a expressão de antígenos recombinantes *in vitro* e *in vivo*, permitindo a avaliação de vetores de expressão bacterianos, a força e a regulação de promotores, entre outros parâmetros. Por outro lado, o comportamento intracelular desse bacilo em mamíferos pode ser estudado empregando GFP como proteína repórter. A fim de padronizar o método para avaliar a expressão da proteína GFP em micobactérias, foi produzida uma cepa de BCG transformada com um vetor micobacteriano contendo o gene *gfp* e sua expressão foi avaliada. A emissão de fluorescência da proteína GFP recombinante foi monitorada em 48h, 72h, 96h e 118h por citometria de fluxo, demonstrando que a expressão da proteína é tempo-dependente. Além disso, a expressão da GFP em células recombinantes também foi observada por microscopia de fluorescência. A cepa rBCG expressando GFP foi construída com sucesso e se manteve estável ao longo do tempo em meio 7H9 contendo canamicina. Embora seja útil analisar a expressão da GFP em BCG e outras bactérias, é ainda necessário fazer uma posterior avaliação em cultivo de células como macrófagos e células dendríticas para se obter respostas acerca de sua internalização e resposta gerada.

Palavras chaves: BCG recombinante, GFP, citometria de fluxo, gene repórter

ABSTRACT

PEITER, Ana Carolina. **Construction of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the green fluorescent protein**. 2014. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas. 2014.

Mycobacterium bovis BCG has been used worldwide as a vaccine with an outstanding safety record and presents features that make it a promising vector for production of recombinant multivalent vaccines. Furthermore, genetic modifications can improve its adjuvant and immunogenic features. However, the efficacy of recombinant BCG (rBCG) strains is compromised by several factors that include a lack of construction strategies standardization, and deficient knowledge of the effects of parameters such as gene expression level and metabolic burden. In addition, studies employing green fluorescent protein as reporter are capable of monitoring *in vitro* and *in vivo* recombinant antigen expression, allowing the evaluation of bacterial recombinant antigens, the strength and promoters regulation amongst other parameters. On the other hand, bacterial intracellular behavior within mammal cells can be evaluated by employing GFP as reporter protein. In order to standardize the method for evaluating gene expression in mycobacterial cells, we produced a BCG strain transformed with a mycobacterial vector containing the *gfp* gene and then we evaluated its expression. The fluorescence emission of green fluorescent protein was measured at 48h, 72h, 96h and 118h by flow cytometry, and it evidenced that the protein expression is time dependent. In addition, GFP reporter expression in recombinant cells was observed by fluorescence microscopy. The rBCG strain expressing GFP was constructed successfully and remained stable over time in 7H9 medium containing kanamycin. Although it is useful to analyze the expression of GFP in BCG and other bacteria, it is still necessary to make a further evaluation in cell cultures such as macrophages and dendritic cells to get answers about their internalization and responses that are generated.

Keywords: recombinant BCG, GFP, flow cytometry, reporter gene

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias marcadas com GFP	7
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores empregados para amplificar o gene egfp.....	8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Confirmação da amplificação da sequência que codifica para a eGFP.....	12
Figura 2. Esquema representativo demonstrando o fragmento egfp clonado no vetor pUS977	13
Figura 3. Fragmentos utilizados para a ligação do inserto eGFP com o vetor pUS977	14
Figura 4. Triagem das colônias transformadas	14
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da dupla digestão	15
Figura 6. Curva de crescimento dos clones GFP e controle negativo BCG Pasteur	16
Figura 7. Histograma de fluorescência da cepa BCG Pasteur	17
Figura 8. Histograma de fluorescência do clone 3 em 48h e clone 4 em 72h	18
Figura 9. Gráficos de intensidade de fluorescência e porcentagem de células <i>versus</i> tempo	19
Figura 10. Gráfico da MFI.....	20
Figura 11. Porcentagem de células fluorescentes	20
Figura 12. Microscopia de fluorescência.	21
Figura 13. Microscopia de fluorescência.	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Descoberta da proteína verde fluorescente: história e marcos científicos	2
2.2 Aplicações da GFP	2
2.3 BCG, o bacilo de Calmette e Guérin	4
2.4 BCG recombinante	5
2.5 BCG e sua utilização expressando eGFP	6
2.6 Objetivos	7
3. METODOLOGIA	8
3.1 Cepas e meios de cultivo	8
3.2 Amplificação das sequências do gene	8
3.3 Digestão com enzimas de restrição	9
3.4 Ligação do inserto (egfp) no vetor (pUS977)	9
3.5 Transformação da bactéria <i>E. coli</i> TOP10F com o produto de ligação e triagem dos clones recombinantes	9
3.6 Digestão confirmando a clonagem	10
3.7 Construção de rBCG	10
3.8 Avaliação da expressão da eGFP em BCG	10
4. RESULTADOS	12
4.1 Amplificação do fragmento <i>egfp</i> e clonagem no vetor pUS977	12
4.2 Transformação em <i>E. coli</i> TOP10F	14
4.3 Transformação em BCG Pasteur e avaliação da expressão da GFP por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência	15
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES	26
5 REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

A descoberta da proteína verde fluorescente por Shimomura e colaboradores em 1962 abriu caminhos para nova era de estudos em imagem de células, tecidos e até organismos por inteiro (Gurunathan et al., 2014; Shimomura et al., 1962). Propriedades como localização citoplasmática, baixa toxicidade e fácil visualização e quantificação (Chalfie et al., 1994) permitem seu uso como repórter, para assim investigar comportamento celular e marcar tecidos e embriões. Estes atributos tornaram o gene repórter mais utilizado em pesquisas biológicas, biomédicas e biotecnológicas (Viviani & Bechara, 2008).

O Bacilo de Calmette e Guérin é uma forma atenuada de *Mycobacterium bovis*, atenuada pelos pesquisadores do Instituto Pasteur da França, Albert Calmette e Camille Guérin no início do século XX (Calmette et al., 1927). BCG é atualmente a única vacina disponível para prevenção da tuberculose (TB), e é a vacina mais utilizada no mundo (Rowland & Mcshane, 2011), sendo incluída no Programa Expandido de Imunizações da Organização Mundial da Saúde.

Fatores como o baixo custo de produção, administração a qualquer momento após o nascimento e uma boa estabilidade térmica (Stover et al., 1991), fazem o BCG um bom candidato para a entrega eficaz de antígenos heterólogos (Rezende et al., 2005). Assim, cepas recombinantes de BCG garantem o desenvolvimento de vacinas contra doenças infecciosas que não a tuberculose (TB), incluindo doenças bacterianas, virais e parasitárias empregando-o como vetor (Bastos et al., 2009). Atualmente, BCG recombinante tem apresentado bons resultados como vacina contra TB em vários modelos animais (Hoft et al., 2008) e diversas cepas estão em estudos clínicos de fase I e II (Kaufmann et al., 2014).

A possibilidade de a atividade da GFP ser monitorada *in vivo* garante o acompanhamento da expressão de antígenos recombinantes ao longo do tempo e desenvolvimento do organismo em que foi empregada (Yang et al., 2014). Com o intuito de padronizar o método para avaliar a expressão do gene em diferentes vetores de expressão de micobactérias, o objetivo do trabalho foi produzir uma cepa de BCG transformada com um vetor micobacteriano contendo o gene eGFP e avaliar esta expressão por meios de detecção fluorescência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descoberta da proteína verde fluorescente: história e marcos científicos

A proteína verde fluorescente (GFP) é uma das estruturas mais vastamente estudadas e exploradas nos campos da Bioquímica, Biologia Celular e Biologia Molecular. Suas propriedades de gerar um fluoróforo visível são muito valiosas. Apesar de essa substância ter sido observada, porém não identificada, em hidromedusas por Davenport e Nicol (1955), a GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*, foi descoberta como proteína por Shimomura e colegas em 1961, com estudos sobre a medusa *Aequorea victoria*. A primeira evidência da existência de fluorescência em proteínas surgiu durante a purificação da proteína bioluminescente denominada aequorina, descrita no mesmo trabalho. A purificação da aequorina rendeu outra descoberta, uma proteína que fluorescia verde, uma estrutura que permanecera em desuso por quase 30 anos após ser visualizada. Proteína verde, assim chamada até 1971, quando Morin e Hastings denominaram-na GFP ao ser vista em microscopia de fluorescência.

Doze anos após sua primeira evidência, Morise, Shimomura e colaboradores descreveram sua cristalização em 1974. E apenas trinta anos após a descoberta, estudos de Prasher e colaboradores (1992) reportaram a clonagem original e sequenciamento da GFP de *A. victoria*, o que iniciou uma revolução nos métodos de fluorescência, fornecendo a sequência necessária para os primeiros indicadores fluorescentes codificados geneticamente (Prasher et al., 1992). Porém, as pesquisas levaram ainda dois anos para a obtenção do gene para produzi-la em células (Chalfie et al., 1994). O grande avanço para a utilização da GFP ocorreu em 1994, quando Chalfie e colaboradores isolaram por PCR apenas a região codificadora do gene *gfp*, sem sequências flangeadoras, colocaram-na em um vetor de expressão e produziram células com fluorescência verde sob luz ultravioleta. A partir disto, as aplicações da GFP foram sendo esclarecidas, quando, notavelmente em 1997, Tsien e colaboradores elucidaram o mecanismo de formação do fluoróforo, garantindo a ampliação de seu uso em processos biotecnológicos e biomédicos (Tsien, 1998).

2.2 Aplicações da GFP

A fluorescência da GFP tem sido utilizada para investigar uma gama de propriedades e comportamentos. Os principais motivos são i) o fato de o cromóforo GFP ser produzido intrinsecamente, sem a necessidade de cofatores ou substratos; ii) a fusão com outras proteínas raramente afeta a atividade ou motilidade da proteína conjugada, sendo atóxica na maioria dos casos (Zimmer, 2002); iii) e pode ser monitorado de modo não invasivo por técnicas como

microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (Chudakov et al., 2010). Além disso, é resistente ao calor, pH alcalino, detergentes, sais orgânicos e várias proteases, e também demonstrou resistência a altas pressões (Ehrmann et al., 2001).

A GFP possui várias propriedades favoráveis a seu uso como repórter, incluindo localização citoplasmática, baixa toxicidade e fácil visualização e quantificação (Chalfie et al., 1994). Com o auxílio desta proteína pode-se investigar o comportamento de células e marcar tecidos, embriões e células tronco, o que tornou-a o gene repórter mais utilizado em pesquisas biológicas, biomédicas e biotecnológicas (Viviani & Bechara, 2008).

O que desfavorece a sua utilização são algumas formações pós-traducionais (a formação de cromóforos pós-traducionais limita seu uso em processos rápidos de ativação de transcrição), a necessidade de oxigênio e a dificuldade em diferenciar GFP de fluorescência de fundo quando a GFP não é expressa em níveis altos (a não linearidade do sinal de fluorescência faz com que se necessite curvas de calibração em cada verificação de sinal) (Zimmer, 2002).

Se por um lado tende-se a pensar nas proteínas fluorescentes apenas como marcadores visíveis, outra forte aplicação é o seu uso como biosensores (Crone et al., 2013). Com as modificações apropriadas, podem demonstrar as condições do ambiente celular (Palmer et al., 2011), como a fusão com sequências alvo para destacar uma organela ou um domínio de interesse em células (Miyawaki, 2003) bem como indicadores de cálcio (Mank & Griesbeck, 2008) e de outros segundos mensageiros, de pH, da atividade de proteases e quinases e outras condições celulares (Haggle & Verkman, 2005). Além disso, podem ser empregadas em estudos de dinâmica de proteínas em células vivas, na atividade de espécies reativas de oxigênio, e em estudos *in vitro* de proteínas quiméricas, na vinculação de proteínas a *quantum dots* e na manipulação de sequências aminoacídicas (Crone et al., 2013).

Entretanto, a proteína selvagem é de difícil detecção em diversas células de mamíferos, tendo menor sensibilidade que outras proteínas repórter, como β -galactosidase, que faz amplificação enzimática (Stearns, 1995). A GFP nativa possui vários inconvenientes que reduzem sua eficácia como uma ferramenta de imagem. Sua eficiência em dobramento e conseqüentemente o sinal fluorescente caem quando em temperaturas fisiologicamente importantes como 37 °C; seu ritmo de maturação é lento, além de ter maior suscetibilidade a agregar (Arpino et al., 2012).

Para aprimorar a detecção de GFP em células, uma mutação na sequência cromóforo gerou uma variante com brilho intensificado 35 vezes. Os códons das proteínas foram otimizados para células de mamíferos, permitindo

maiores níveis de expressão (Cubitt et al., 1995; Zhang et al., 1996). A mudança na sua sequência codificadora levou a um aumento da sensibilidade da proteína repórter denominando-a eGFP, a GFP melhorada (eGFP do inglês *enhanced green fluorescent protein*) (Kimata et al., 1997). A eGFP possui melhor dobramento, bem como melhor fluorescência, devido a uma maior proporção da proteína dobrada corretamente a 37°C (Arpino et al., 2012).

O gene que codifica para a eGFP tem sido vastamente utilizado como marcador biológico em diversos organismos, tecidos e linhagens celulares (Gurunathan et al., 2014). Além disso, nenhum efeito danoso e toxicidade foram reportados, ou seja, é biologicamente inerte (Rafat et al., 2010).

2.3 BCG, o bacilo de Calmette e Guérin

Mycobacterium bovis é uma bactéria pertencente à família Mycobacteriaceae. Sua parede celular é composta majoritariamente por lipídeos, garantindo propriedades antigênicas, antitumorais e adjuvantes. Apesar de não secretarem toxinas, como diversas bactérias, as micobactérias mantêm sua sobrevivência intracelular por meio da inibição da fusão de fagossomo ao lisossomo, fazendo o escape do meio ácido (Parish & Stoker, 1998; Forrellad et al., 2013).

O Bacilo de Calmette e Guérin constitui uma cepa atenuada de *M. bovis*, atenuada pelos pesquisadores do Instituto Pasteur da França, Albert Calmette e Camille Guérin no início do século XX, após 13 anos de passagens (Calmette et al., 1927). BCG é atualmente a única vacina disponível para prevenção da TB, e é a vacina mais utilizada no mundo, sendo incluída no Programa Expandido de Imunizações da Organização Mundial da Saúde. Com quase 100 anos de uso, e enquanto protege contra formas severas da TB em crianças, sua eficácia contra TB pulmonar em adultos é altamente variável (World Health Organization, 2014).

O fato de ter um baixo custo de produção, a possibilidade de a vacina BCG ser administrada a qualquer momento após o nascimento e não ser afetada por anticorpos maternos, além de ter boa estabilidade ao calor (Stover et al., 1993), tornam o BCG um bom candidato para a entrega eficaz de antígenos heterólogos (Rezende et al., 2005). Sua preferência de replicação intracelular em células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, consolida esse potencial (Dietrich et al., 2003). O desenvolvimento de técnicas de manipulação genética de micobactérias, o completo sequenciamento do genoma de *M. tuberculosis* (Cole et al., 1998) e avanços na imunobiologia abriram caminhos para o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas que objetivam alcançar níveis superiores de impacto (World Health Organization, 2013).

2.4 BCG recombinante

O rBCG tem sido utilizado extensivamente no desenvolvimento de vacinas contra uma variedade de doenças infecciosas, incluindo doenças bacterianas, virais e parasitárias (Bastos et al., 2009). A indução de uma resposta imune contra antígenos heterólogos pela inoculação de rBCG e a primeira evidência de proteção foram descritas por Stover et al (1991).

O rBCG contém atrativos em relação a outros vetores vacinais, devido a sua garantida segurança em humanos, baixo custo de produção, estabilidade ao calor, indução de imunidade de células T-*helper* (Th1) duradoura, ativação de células T-CD8⁺, atividade adjuvante da parede celular, uso pediátrico e indução de imunidade de mucosa. Essas propriedades fazem do BCG uma perspectiva muito atrativa para o desenvolvimento de uma vacina recombinante viva (Matsuo & Yasutomi, 2011; Wang et al., 2007).

O conhecimento do seu genoma (Garnier et al., 2003), bem como o desenvolvimento de sistemas de expressão de antígenos heterólogos em BCG, fizeram com que essa bactéria se tornasse um excelente candidato a vetor de vacinas recombinantes, carreando combinados de antígenos heterólogos (Christy et al., 2012). Os avanços incluem o estabelecimento de protocolos de transformação, estabelecimento de sistemas de expressão e apresentação de antígenos (Ohara & Yamada, 2001). Atualmente, BCG recombinante tem demonstrado maior eficácia em relação ao BCG como vacina contra TB em vários modelos animais, apresentando melhores resultados que a vacina parental (Hoft et al., 2008) contra outras patologias empregando rBCG.

Entretanto, a expressão de proteínas heterólogas em BCG nem sempre é possível. A falta de sucesso nesse sentido pode estar relacionada a letalidade devido à superexpressão ou de outras formas de toxicidade de proteínas (Dennehy & Williamson, 2005). A expressão de antígenos heterólogos em cepas de BCG recombinante leva a uma sobrecarga metabólica, já que parte da energia da bactéria é necessária para manter o DNA exógeno (Andreu et al., 2010).

Por outro lado, novas cepas de BCG expressando lisinas celulares estão sendo produzidas e testadas. Estudos envolvendo o patógeno gastrointestinal *Listeria monocytogenes* mostraram que a listeriolisina O (LLO) codificada pelo gene *hly* possibilita a perfuração da membrana lipídica e proliferação bacteriana no citoplasma (Bielecki et al., 1990). Um sistema foi criado para expressar a LLO em um BCG mutante $\Delta ureC$: $\Delta ureC::hly$ se mostrou mais eficiente em induzir apoptose de macrófagos infectados (Grode et al., 2005). Um estudo recente mostrou que a BCG $\Delta ureC::hly$ oferece proteção superior contra a infecção por *M. tuberculosis*, aumentando respostas Th1 e Th17 (Desel et al., 2011). Em estudos de fase I, esta construção se mostrou segura e está em fase II, gerando

altos níveis de células Th1 secretoras de IFN- γ (Grode et al., 2013). A indução da apoptose das células infectadas é responsável pela maior reposta TH1 e indução de células TCD8+ e NK (Farinacci et al., 2012), mas a movimentação de BCGs recombinantes no interior das vesículas apoptóticas ainda não foi demonstrada.

Outra cepa recombinante de BCG testada como vacina faz uso da expressão de uma forma mutante da perfringolisina O (PFO_{G137Q}), derivada de *Clostridium perfringens*. Em associação com o aumento da expressão de vários antígenos de *M. tuberculosis*, tais como 85A, 85B e Rv3407, esta cepa é capaz de fazer o escape endossomal e permanecer no citoplasma (Magalhaes et al., 2008). A PFO_{G137Q} foi expressa sob controle do promotor e sequência sinal de Ag85B, e introduzida no BCG via troca alélica homóloga com o gene ureC (Sun et al., 2009).

Desta forma, se faz necessário o estudo da imunobiologia do BCG como vetor, e é importante salientar que tanto o antígeno como a sua expressão em um vetor adequado (o próprio BCG) são fundamentais para garantir boa proteção. É sabido que combinações de proteínas, bem como proteínas de fusão, e também sua expressão por diferentes vetores são estratégias imprescindíveis no desenvolvimento de vacinas BCG recombinantes com eficiência superior ao BCG parental.

2.5 BCG e sua utilização expressando eGFP

O comportamento do BCG dentro de células de mamíferos pode ser verificado *in vitro* empregando eGFP como proteína repórter, que pode auxiliar no entendimento e avaliação da resposta imune induzida por cepas BCG. Além disso, vetores utilizando eGFP como repórter permitem monitorar a expressão *in vivo* de antígenos recombinantes (Luo et al., 1996).

Promotores são o principal componente regulatório da expressão gênica em bactérias, que está relacionada ao crescimento e fisiologia dessas células. Cepas recombinantes carreando genes repórteres sob a influência de promotores fortes permitem a expressão e análise simultâneas do perfil e comportamento bacteriano (Singh et al., 2014).

A eGFP tem sido utilizada com sucesso para monitorar por exemplo a expressão transiente de transgenes, substituindo outros genes repórter como a β -glucoronidase ou a seleção com base em antibióticos (Lorang et al., 2001). A possibilidade de a atividade da GFP ser monitorada *in vivo* garante o acompanhamento da expressão de proteínas em estudo ao longo do tempo e desenvolvimento do organismo em que foi empregada (Yang et al., 2014).

A utilização como repórter em micobactérias foi reproduzida com sucesso (Dhandayuthapani et al., 1995) por não requerer um substrato exógeno para seu

sinal de fluorescência. Entretanto, seu sinal obtido por excitação tem vida curta. (Machowski et al., 2005). A GFP tem sido utilizada para visualizar micobactérias em microscopia, inicialmente em macrófagos e depois em tecidos murinos e modelos de granuloma em sapos, bem como em citometria de fluxo (Tyagi et al., 2000).

Os primeiros estudos que utilizaram a expressão de GFP como biomarcador em bactérias do gênero *Mycobacterium* estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Bactérias marcadas com GFP. Lista de bactérias do gênero *Mycobacterium* em que a GFP tem sido utilizada como proteína repórter. A tabela enumera a espécie empregada no estudo e o tipo de trabalho.

Microrganismo	Tipo de estudo	Referência
<i>Mycobacterium avium</i>	Observação da infecção em macrófagos e células epiteliais	(Parker & Bermudez, 1997)
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	Estudo em padrões de expressão de diferentes promotores em bactérias dentro de macrófagos	(Dhandayuthapani et al., 1995)
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	Utilizado para testar susceptibilidade a drogas, resposta a sinais ambientais e localização da bactéria in vivo	(Kremer et al., 1995)
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	Infecção de linhagens de células de camundongos	(Luo et al., 1996)
<i>Mycobacterium marinum</i>	Visualização da infecção e contagem de células infectadas por citometria de fluxo	(Valdivia & Falkow, 1998)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Estudo em padrões de expressão de diferentes promotores em bactérias dentro de macrófagos	(Dhandayuthapani et al., 1995)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Identificação de proteínas secretadas	(Cowley & Av-gay, 2001)

2.6 Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi clonar e expressar a proteína eGFP em *M. bovis* BCG Pasteur, obtida através da propagação em *E. coli*, e fazer a avaliação dos clones recombinantes por imagem de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, a fim de padronizar a técnica.

3. METODOLOGIA

3.1 Cepas e meios de cultivo

A cepa *M. bovis* BCG Pasteur foi cultivada em meio 7H9 Middlebrook (Difco) suplementado com 10% de OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Complex), 0,2% de Glicerol e 0,05% de Tween 80 ou em meio sólido 7H10 (Difco), contendo 10% de OADC e 0,2% de Glicerol. Quando necessário, as cepas bacterianas foram cultivadas com suplementação de canamicina a 25µg mL⁻¹. As transformações em *E. coli* foram feitas na cepa TOP10F, que foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) a 37°C utilizando o antibiótico canamicina a 50µg mL⁻¹.

3.2 Amplificação das sequências do gene

A sequência do gene alvo selecionado foi amplificada através da técnica de PCR, utilizando-se o mix PCR Master Mix (Promega), para posterior clonagem no vetor de expressão em micobactérias *pUS977*. Este plasmídeo contém uma origem de replicação em *E. coli* e micobactéria, um sítio de múltipla clonagem e um gene de resistência a canamicina. Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa *Vector NTI 11.0* (Invitrogen), com base na sequência do plasmídeo contendo o gene *egfp pRSET/EmGFP* (Invitrogen) para amplificar uma região correspondente a 738 pares de bases (Tabela 2).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores empregados para amplificar o gene egfp:

Denominação	Sequência*	Enzima de restrição	Temperatura de <i>melting</i>
<i>Primer Forward</i>	GCGGATCC GATGGTGAGCAAGG	<i>Bam</i> HI	68,3°C
<i>Primer Reverse</i>	CTGCTCGACATGTTCACT TTCGA ACCC	<i>Hind</i> III	67,6°C

*As sequências das enzimas de restrição estão em negrito

As concentrações dos componentes da reação da PCR que propiciaram a amplificação dos fragmentos descritos anteriormente foram: 12,5µL de *GoTaq®* Colorless Master Mix (Promega); 0,4µM de cada *primer*; 1,0µL de plasmídeo *pRSET/EmGFP* e água livre de nucleases em um volume final de

25µL. As condições de amplificação foram: um ciclo de desnaturação inicial (94°C - 4 min); 35 ciclos de amplificação envolvendo as etapas de desnaturação (94°C - 1min), anelamento (63°C - 1min) e extensão (74°C - 1min); extensão final (74°C - 4 min).

3.3 Digestão com enzimas de restrição

O fragmento amplificado pela reação de PCR foi digerido utilizando-se duas enzimas de restrição: *Bam*HI e *Hind*III. Para um volume final de 20µL de digestão foram utilizados: 10µL do produto de PCR, 2µL de tampão da enzima 10x, 1µL da enzima *Hind*III (Invitrogen), 1µL da enzima *Bam*HI (Invitrogen) e 6µL de água para completar o volume final. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C 16h. Após a incubação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, a amostra foi corada com Blue Green (LGC Biotecnologia) e o gel foi fotografado em transiluminador. O vetor pUS977 foi digerido sob as mesmas condições com as mesmas enzimas de restrição. As enzimas foram inativadas por 20 min a 60°C.

3.4 Ligação do inserto (egfp) no vetor (pUS977)

A sequência codificante do gene *egfp*, amplificada e digerida, foi inserida no vetor pUS977 através de uma reação de ligação. Cada mistura de ligação foi preparada empregando um volume final de 20µL constituídos de 1µL de vetor, 2µL de inserto, 1µL de enzima T4 DNA ligase, 2µL de tampão e 14 µL de água para completar o volume. Esta reação foi mantida a 4°C *overnight*. As misturas de ligação foram utilizadas na transformação por eletroporação de células competentes de *E. coli* TOP10F.

3.5 Transformação da bactéria *E. coli* TOP10F com o produto de ligação e triagem dos clones recombinantes

As transformações por eletroporação foram realizadas utilizando células competentes de *E. coli* TOP10F previamente preparadas. Para essas transformações se adicionou 2µL da reação de ligação e 100µL de células competentes produzidas no momento do uso. A reação foi eletroporada a uma voltagem de 2,45V e resistência de 200 Ohms. Após a eletroporação, as células foram colocadas em 500µL de caldo LB e então incubadas por 1h em agitação orbital à 37 °C. As células foram semeadas por espalhamento utilizando alça de Drigalski em placas de Petri descartáveis contendo LB sólido e 50µg/ml de canamicina, e posteriormente incubadas por 16h.

Colônias que cresceram na placa foram submetidas a uma triagem rápida pelo método Microprep utilizando fenol-clorofórmio. Em tubos de 1,5mL, foram adicionados 15µL de fenol clorofórmio e 15µL de tampão (100 µL de tampão de amostra 6x + 900 µL de água milli Q + 1µL de RNase). Inoculou-se a colônia

selecionada, vortexou-se e então foram centrifugadas a 14.000rpm durante 4 min. A fase superior (aproximadamente 15 μ L) foi aplicada em gel de agarose 1%. Clones que apresentavam inserto foram selecionados e cultivados em meio LB contendo 50 μ g/ml de canamicina, por 16h a 37°C em incubador com agitação orbital.

3.6 Digestão confirmando a clonagem

Dos clones selecionados e incubados por 16h, foi feita a extração plasmidial com illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare). A seleção definitiva dos recombinantes foi realizada através da análise de restrição com *Bam*HI e *Hind*III.

3.7 Construção de rBCG

Para produção de BCG recombinante, cepas eletrocompetentes de BCG Pasteur foram transformadas, por eletroporação, com a construção empregando o vetor de expressão em micobactérias pUS977 contendo a sequência do gene codificante para a eGFP e o promotor P_{AN} (pUS977::*egfp*). Todas as células transformadas foram selecionadas em meio seletivo (meio 7H10 contendo 25 μ g mL⁻¹ de canamicina) e cultivadas em meio líquido para avaliação da expressão.

3.8 Avaliação da expressão da eGFP em BCG

A avaliação da expressão da proteína eGFP foi realizada através de citometria de fluxo no equipamento Attune® Acoustic Focusing Cytometer, Blue/Violet (Applied Biosystems®) da seguinte maneira: os clones recombinantes foram crescidos em meio 7H9 com canamicina a 25 μ g mL⁻¹ até uma densidade óptica (D.O) de 0,6 em 600nm. Dessa cultura, alíquotas de 500 μ L foram adicionadas em 5mL de meio líquido 7H9 suplementado. Alíquotas preparadas com suspensão de 100-500 células/ μ L foram preparadas com 1mL de PBS estéril e 12,5 μ L de Tween 80 20% em *timepoints* de 48, 72, 96 e 118h após a inoculação, medindo-se a D.O. Um cultivo de BCG Pasteur não transformado foi utilizado como controle negativo da expressão. As amostras foram adquiridas em triplicata e as análises foram feitas a partir da média de MFI (intensidade mediana de fluorescência) comparando cada clone por *timepoint*.

Os resultados da citometria de fluxo foram comparados utilizando análise de variância (Two-way ANOVA) seguido de Teste de Tukey com auxílio do programa Statistix 8.0. Todas as análises estatísticas foram realizadas no nível de 5% de significância.

Para a microscopia de fluorescência, foram preparadas lâminas no tempo de 48h. Um volume de 500 μ L de cada cultivo foi adicionado a uma mesma quantidade de PBS estéril contendo Tween 80. Para evitar a formação de

agregados, essa mistura foi passada 40 vezes para homogeneização com agulha de 0,45x13mM (BD Biosciences). As culturas também foram submetidas ao processo de coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen (BAAR), a fim de confirmar a presença das micobactérias.

4. RESULTADOS

4.1 Amplificação do fragmento *egfp* e clonagem no vetor pUS977

Como mencionado anteriormente, os oligonucleotídeos utilizados na amplificação foram desenhados com base na sequência *pRSET/EmGFP* e tiveram sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Hind*III incorporados preservando seus códons originais de iniciação e terminação.

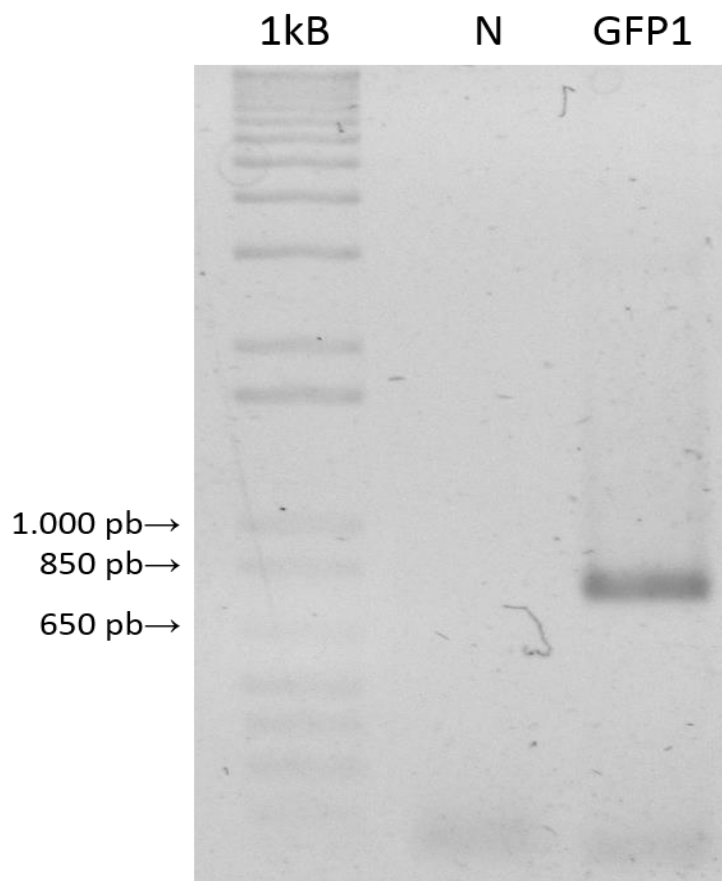


Figura 1. Confirmação da amplificação da sequência que codifica para a eGFP. Gel de agarose 1% empregando como corante Blue Green. Coluna 1, marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen); coluna 2, controle negativo da reação; Coluna 3, amplificação no tamanho esperado (738 pb).

Dessa forma foi possível a amplificação do fragmento correspondente ao gene que codifica para eGFP no tamanho esperado, conforme ilustrado na figura 1. O produto obtido pela reação teve o tamanho compatível ao previsto, sem bandas inespecíficas, o que indica o sucesso da amplificação que resultou em quantidades suficientes para o seguimento da clonagem.

A clonagem do gene foi reproduzida *in silico* com auxílio do programa *Vector NTI 11.0* (Invitrogen), para sua posterior clonagem no vetor pUS977. A Figura 2 mostra o mapa da ligação do fragmento eGFP no vetor de clonagem em micobactérias, *pUS977*, caracterizando o mapa da inserção *pUS977::egfp*.

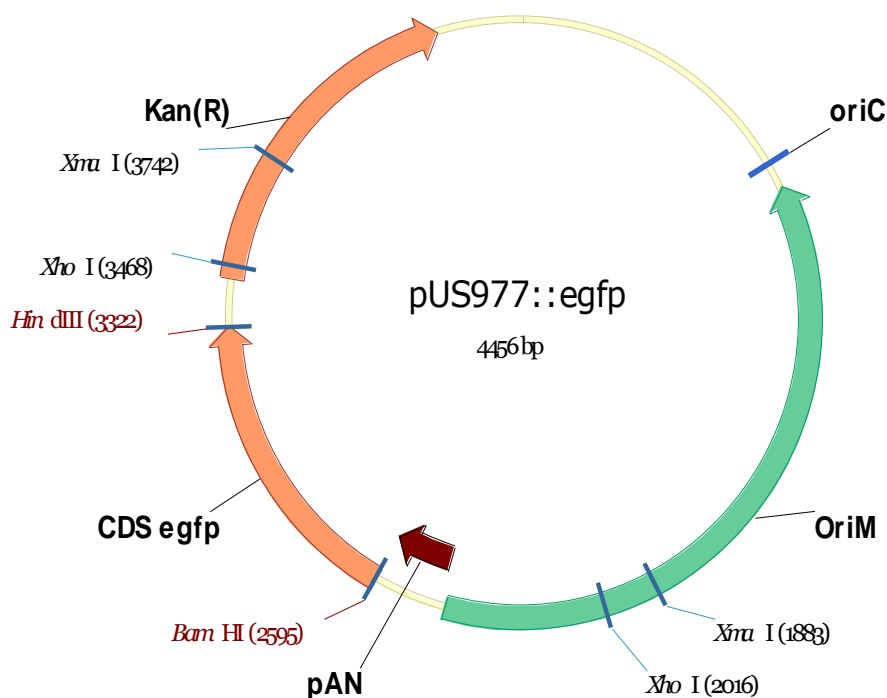


Figura 2. Esquema representativo demonstrando o fragmento *egfp* clonado no vetor *pUS977*. O mapa contém a porção da sequência *egfp*, indica a posição de clivagem das enzimas de restrição e a posição do promotor P_{AN}.

Com a amplificação de boa qualidade, o produto estava adequado para a digestão com enzimas de restrição. A análise de restrição empregando as enzimas *HindIII* e *BamHI* foi realizada a fim de confirmar o tamanho do produto gerado e para obtenção das extremidades coesivas. O vetor pUS977 também foi previamente digerido com as mesmas enzimas.

Após a confirmação da digestão, foi feita a ligação da sequência da *egfp* com o plasmídeo pUS977, de acordo com a proporção de DNA, exposto da Figura 3. A ligação foi calculada na proporção de 3 moléculas de inserto para 1 molécula de vetor.

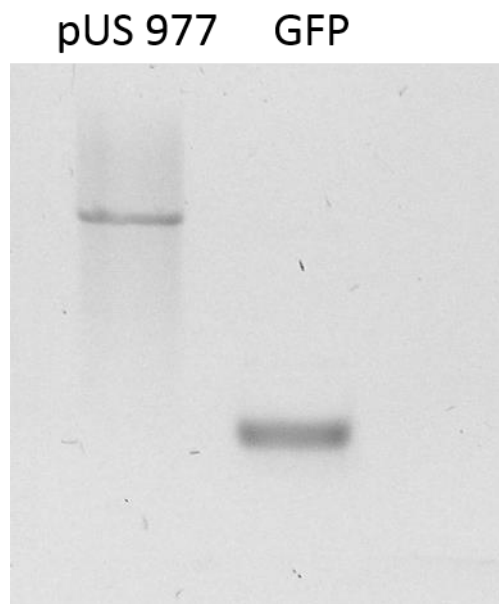


Figura 3. Fragmentos utilizados para a ligação do inserto eGFP com o vetor pUS977. A reação permaneceu *overnight* com T4 DNA ligase a 4°C. O volume utilizado foi de 3µL.

4.2 Transformação em *E. coli* TOP10F

O produto de ligação do plasmídeo *pUS977* e do produto de PCR foi inserido por eletroporação em bactérias *E. coli* TOP10F eletrocompetentes. A seleção dos transformantes foi realizada então pelo crescimento de algumas colônias em presença de antibiótico. Dentre as colônias resistentes, 8 foram submetidas à triagem por miniprep de colônia, representado na Figura 4.

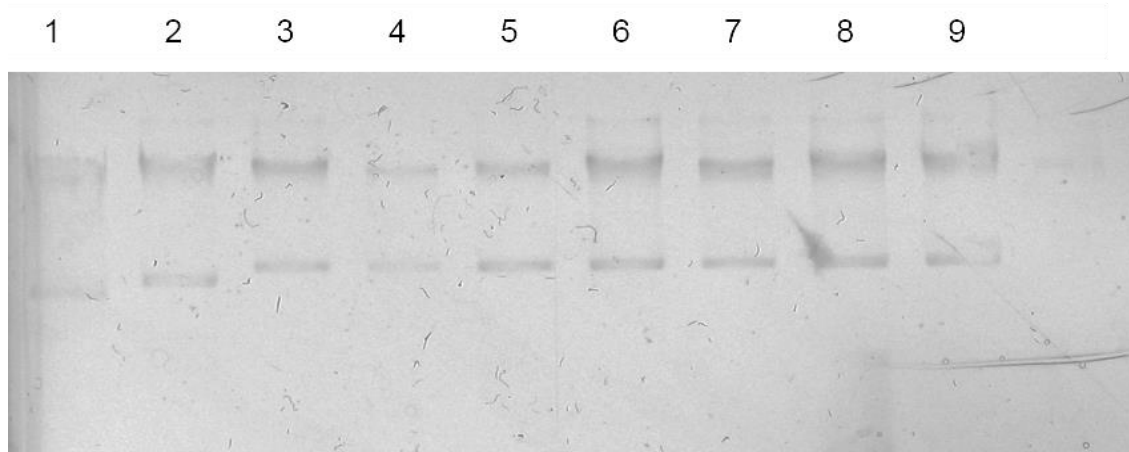


Figura 4. Triagem das colônias transformadas. Coluna 1, vetor pUS977 circular; colunas 2 até 9, colônias submetidas à triagem. Foram selecionadas as colônias 3, 4, 5 e 6, supostamente recombinantes.

Após o crescimento individual *overnight* em meio LB de cada colônia recombinante, foi feita a extração de DNA plasmidial utilizando-se os pré inóculos dos clones selecionados e então foi feita a digestão dupla com as enzimas correspondentes, sendo *Bam*HI e *Hind*III para checar a presença do inserto. Abaixo, a Figura 6 apresenta a confirmação da liberação do inserto nos tamanhos esperados de 738pb após a digestão.

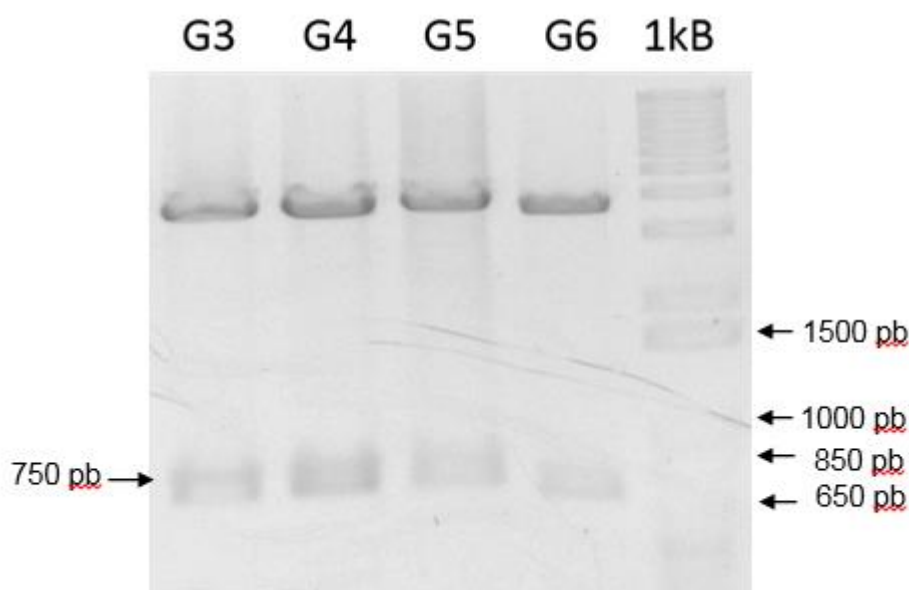


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da dupla digestão. Liberação do inserto na altura aproximada de 750pb. Colunas 1, 2, 3 e 4, colônias GFP 3, 4, 5 e 6 respectivamente; coluna 6, marcador de massa molecular 1kb DNA Ladder.

3.3 Transformação em BCG Pasteur e avaliação da expressão da GFP por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência

Após a confirmação da clonagem, o plasmídeo recombinante *pUS977::egfp* foi transformado na cepa BCG Pasteur para possível realização de testes para visualizar os níveis de expressão da proteína recombinante.

A estabilidade *in vitro* dos BCG recombinantes obtidos foi observada quando as colônias transformadas com o plasmídeo recombinante cresceram em meio 7H9 com canamicina, e mantiveram a expressão da GFP. Os clones tiveram seu crescimento em meio 7H9 monitorado em diferentes tempos como mostra a Figura 6.

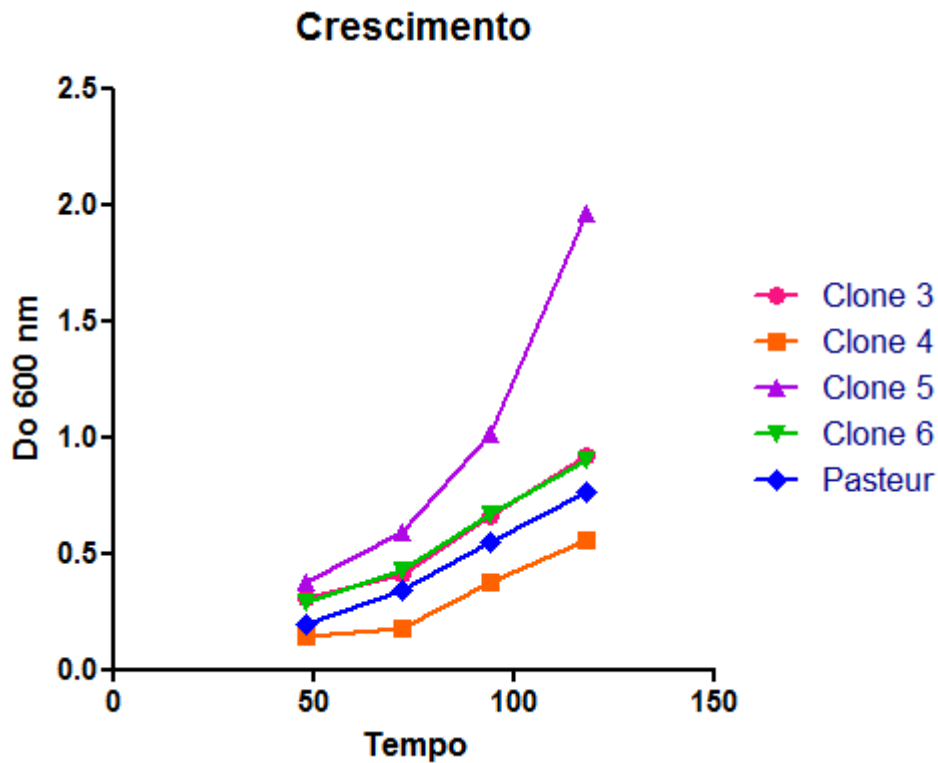


Figura 6. Curva de crescimento dos clones GFP e controle negativo BCG Pasteur. A densidade óptica foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600nm.

Os resultados obtidos com a citometria de fluxo podem indicar tanto a capacidade de cada clone em manter o vetor recombinante, quanto o nível de expressão da GFP, representado neste experimento pela MFI (intensidade mediana de fluorescência), da população positiva. A estratégia de *gating* (delimitação da região a ser estudada) foi feita a partir da cepa Pasteur, que teve uma única população de eventos e um único pico de intensidade no laser azul (BL1-H) (Figura 8). Já os clones recombinantes ficaram representados em duas populações distintas de células, como exemplifica a Figura 7.

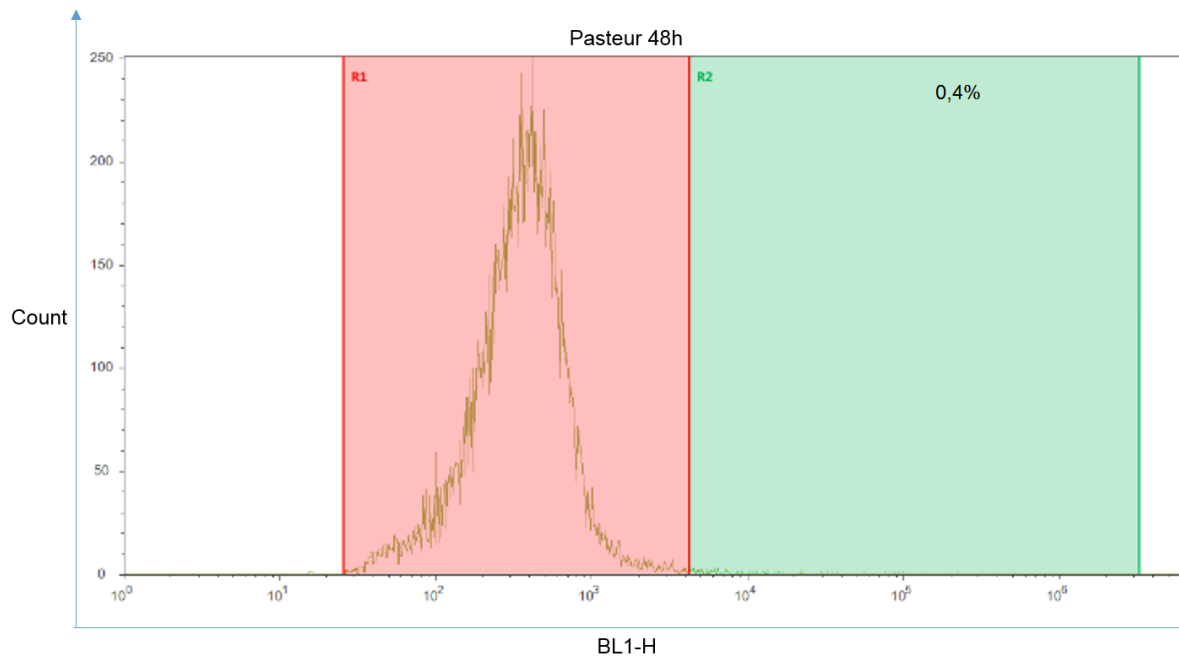


Figura 7. Histograma de fluorescência da cepa BCG Pasteur. O gate R1 indica a população negativa para expressão de GFP. O gate R2 foi definido a partir de R1 como a população positiva pela intensidade de fluorescência em BL1-H.

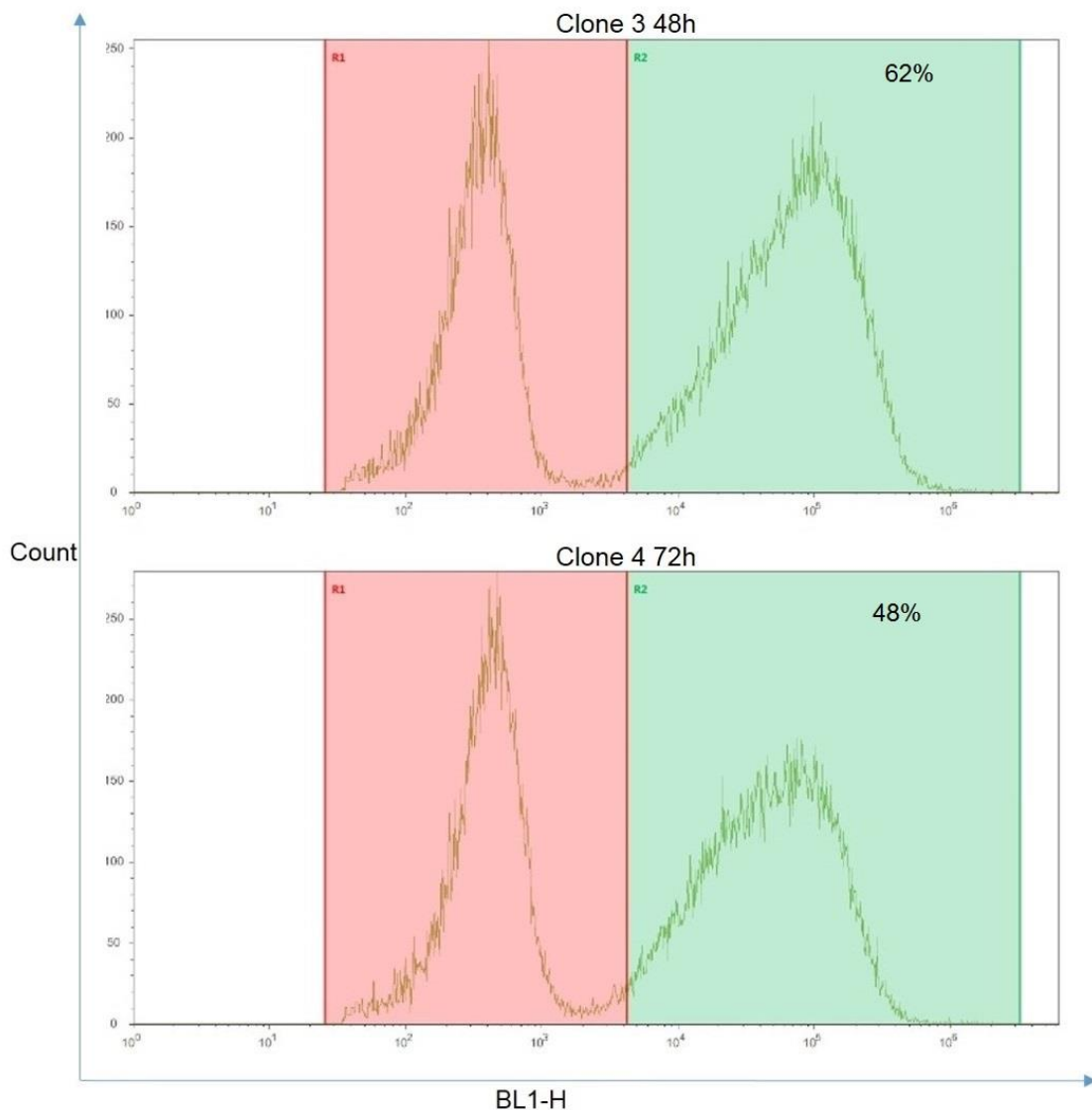


Figura 8. Histograma de fluorescência do clone 3 em 48h e clone 4 em 72h. O primeiro possui 62% das células expressando a proteína, enquanto o segundo tem 48% de células positivas com pico em 10^5 em BL1-H.

Os dados extraídos da citometria foram a percentagem de células positivas por amostra e a intensidade mediana de fluorescência. A média das triplicatas está representada na Figura 10. Para estabelecer uma relação entre o nível de expressão ao longo do tempo e a quantidade de bactérias que estão expressando a GFP, os gráficos foram plotados com um eixo Y secundário.



Figura 9. Gráficos de intensidade de fluorescência e porcentagem de células *versus* tempo. O tempo está representado no eixo X, a intensidade de fluorescência no eixo Y da esquerda. O eixo Y da direita representa a média da porcentagem da triplicata do clone em cada dia. A, BCG Pasteur; B, Clone 3; C, Clone 4; D, Clone 5; E, Clone 6.

A porcentagem de células expressando GFP e a intensidade de fluorescência (MFI) tiveram comparação por clones e por tempo separadas. A análise pelo Teste de Tukey está representada nas Figuras 11 e 12.

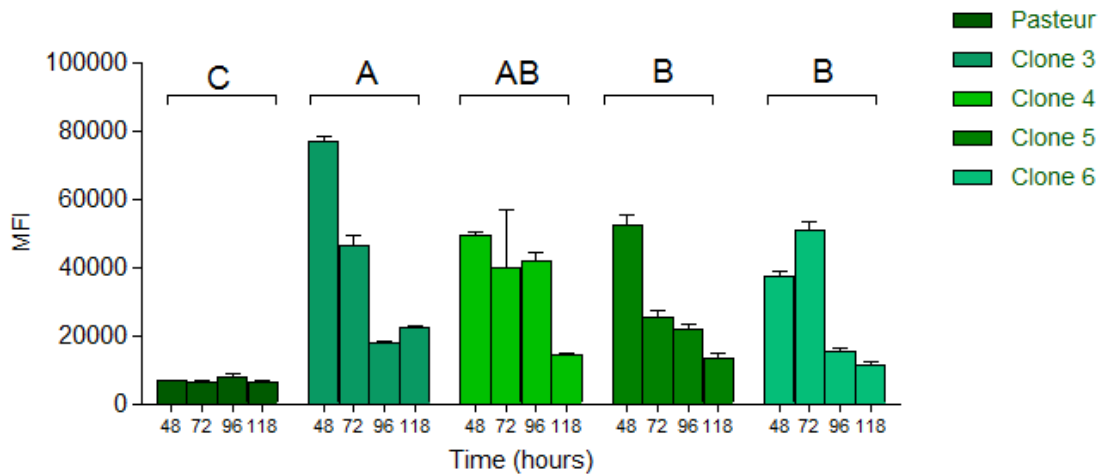


Figura 10. Gráfico da MFI. A análise da MFI em comparação com os clones gerou 3 grupos diferentes (A,B e C), porém sem diferença estatística entre a média deles. Além disso, nota-se uma tendência ao decréscimo da intensidade ao longo do tempo, sendo estes estatisticamente diferentes.

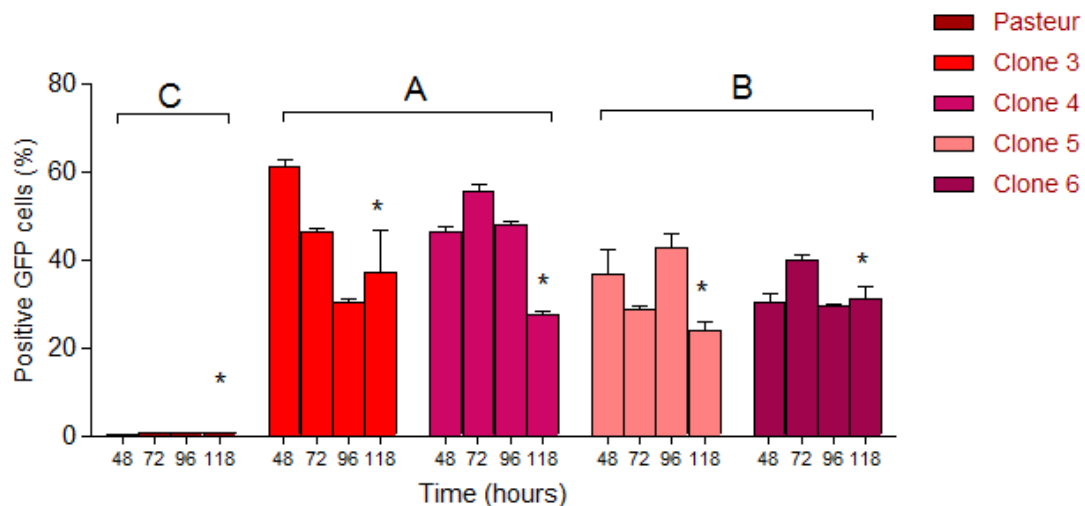


Figura 11. Porcentagem de células fluorescentes. A comparação da porcentagem *versus* clones gerou três grupos (A, B e C), o Clone 3 e clone 4 com semelhança entre si (A), bem como o clone 5 e clone 6 (B). O controle BCG Pasteur (C) diferiu dos outros grupos. Em relação ao tempo, houve diferença entre o percentual de células positivas entre o grupo 48, 72 e 96 (A) e o grupo 118 (B), mas essa diferença não é significativa estatisticamente. O símbolo “*” significa diferença estatística entre o tempo 118h e os outros tempos – $p < 0,05$.

Os clones foram então submetidos à microscopia de fluorescência, para verificar a presença de agregados e células individuais, objetivando não apenas analisar o brilho individual da proteína expressa, mas a funcionalidade das células, que mantiveram a seu aspecto morfológico.

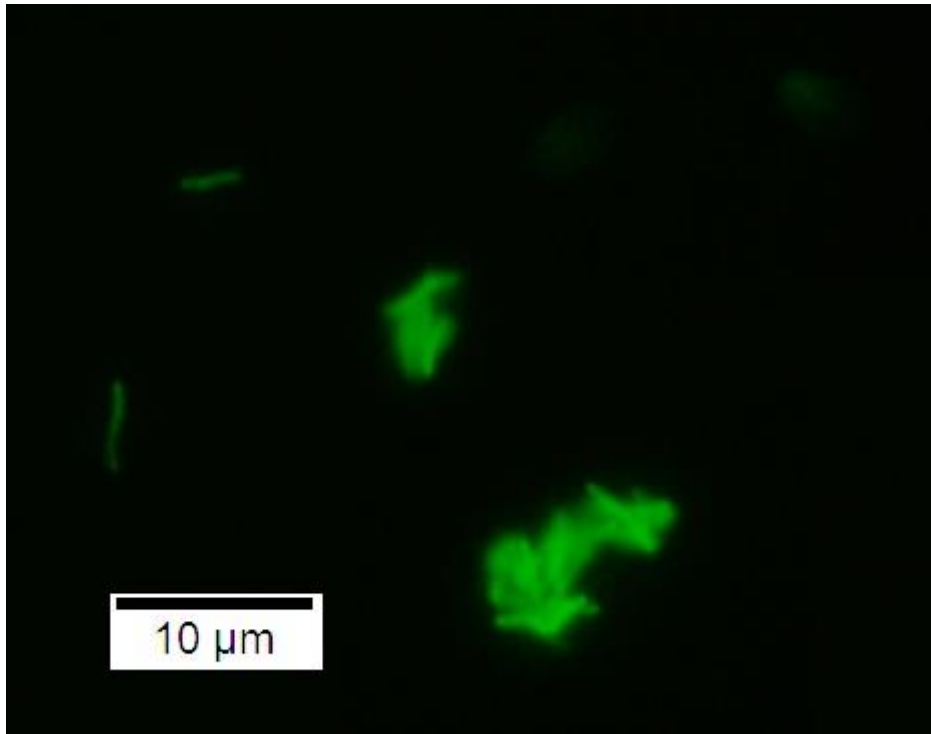


Figura 12. Microscopia de fluorescência. O clone 5 foi fotografado em aumento de 1000x. Pode-se observar a formação de agregados e também bacilos individuais.

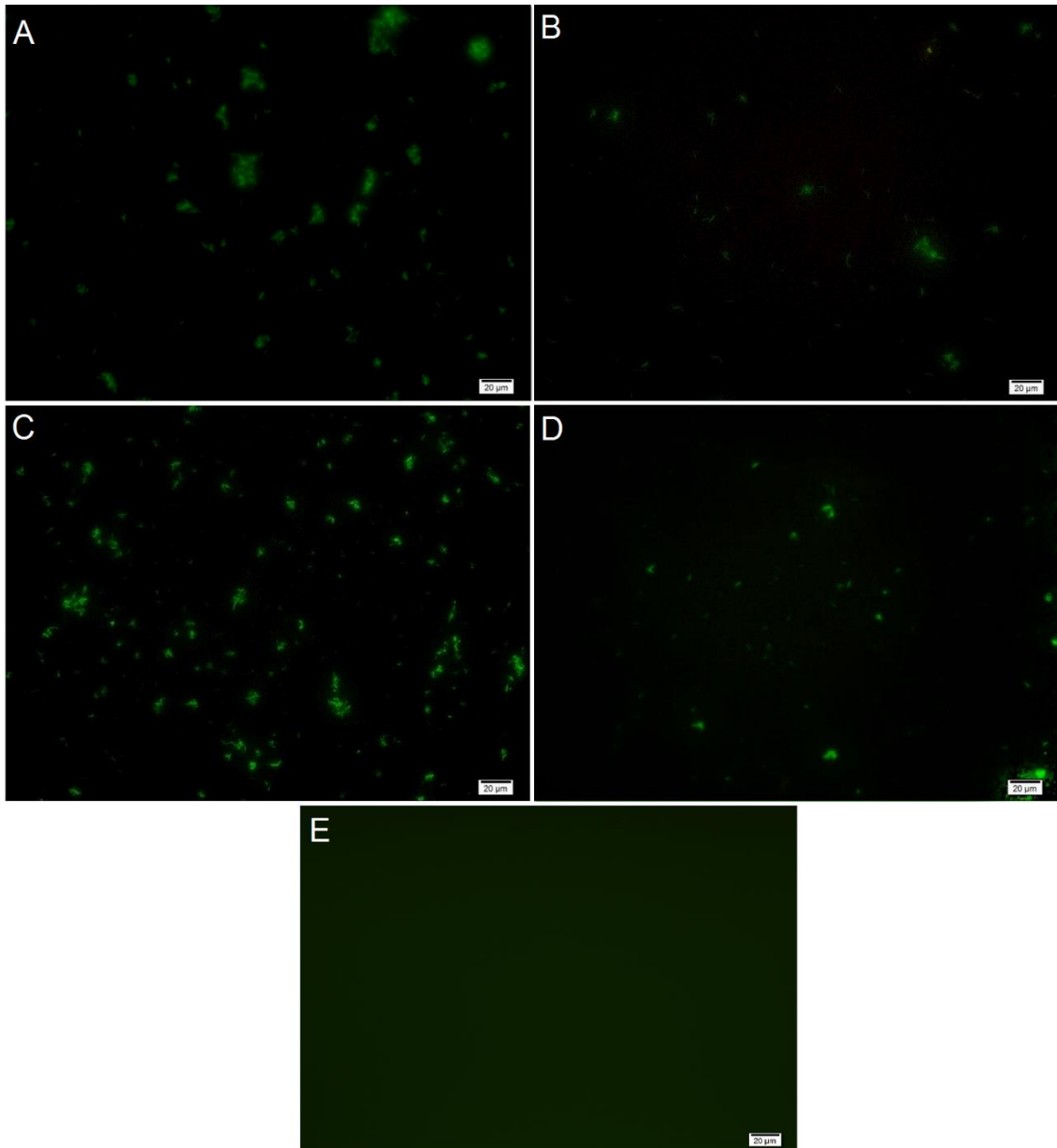


Figura 13. Microscopia de fluorescência. Aumento de 400x. A, clone 3; B, clone 4; C, clone 5; D, clone 6; E, BCG Pasteur.

A fluorescência indica que as células transformadas apresentam a expressão da proteína. O controle negativo não apresentou fluorescência sob o microscópio. Apesar da homogeneização com detergente Tween 80, bacilos como o BCG tem tendência em formar grumos, que foram observados em todas as imagens.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou a expressão da proteína verde fluorescente por rBCG utilizando o promotor micobacteriano P_{AN} , para dessa forma aprimorar estudos no emprego de vacinas utilizando o BCG como vetor. A construção foi confirmada por enzimas de restrição, o gene *egfp* foi incorporado pela cepa de BCG e sua expressão pôde ser visualizada por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

Cepas de rBCG geneticamente estáveis são imprescindíveis como vacinas, uma vez que a constante expressão do antígeno induz a respostas imunes maiores e duradouras (Himmelrich et al., 2000; Mederle et al., 2002). Proteínas heterólogas tem sido frequentemente expressas no citoplasma, ligadas à superfície ou secretadas por BCG (Rezende et al., 2005; Galen & Levine, 2001). Em um ambiente controlado, a perda da estabilidade clonal é uma das principais causas da redução da expressão de proteínas. Na ausência de pressão seletiva, as células tendem a perder o DNA exógeno ao longo das gerações, a menos que haja uma vantagem adaptativa. Falhas de estabilidade podem ser estruturais e segregacional. A primeira ocorre devido a recombinações, inserções ou deleções; já a segunda ocorre com a clivagem desigual de vetores episomais durante a divisão celular (Zhu et al., 2009). Instabilidades são causadas também por fatores indiretos que diminuem a capacidade metabólica da célula, que resultam numa baixa taxa de crescimento celular e desregulação de vias metabólicas durante a expressão de proteínas recombinantes (Silva, 2010).

Estudos de expressão de genes heterólogos em rBCG tem mostrado um número baixo de promotores micobacterianos, além de não se saber comprovadamente a atividade regulatória desses promotores *in vivo* e *in vitro*, bem como sua força (Seixas et al., 2007). Alguns promotores já utilizados são a proteína de choque térmico (*heat shock protein*) hsp60 ou hsp70, que podem aumentar a expressão proteica para até 10% das proteínas celulares totais (Stover et al., 1993). Também são utilizados outros tipos de promotores, derivados de fagos, sequências sinal micobacterianas e promotores de lipoproteínas de superfície (Winter et al., 1995). O vetor utilizado neste trabalho, pUS977, apresenta o promotor P_{AN} , derivado da sequência regulatória IS900 de *Mycobacterium paratuberculosis*, que foi primeiramente caracterizado e isolado por Murray et al. (1992) e utilizado para expressar o gene *lacZ* de *E. coli*. Desde então tem sido utilizado para expressar antígenos heterólogos de diferentes patógenos. Estudos o descreveram como exibindo um maior percentual de recuperação de micobactérias transformadas do que plasmídeos contendo outros promotores, como hsp60 (Medeiros et al., 2002).

A GFP e suas variantes são utilizadas como marcadores em sistemas recombinantes por conta de seu comportamento neutro em relação à fisiologia celular. Wiedenmann e colaboradores revisaram sua aplicação em diversos experimentos nos quais nenhum efeito adverso óbvio foi identificado, considerando que as condições experimentais por si só podem levar a variações nos resultados (Wiedenmann et al., 2009). Pecora e colaboradores (2009) empregam a expressão de GFP em BCG para analisar células apresentadoras de antígenos (APCs) de pulmão de camundongos, que foram infectados por aerossol por *M. bovis*-BCG expressando GFP para identificar tipos celulares que foram infectados em comparação com APCs infectadas e não infectadas. O vasto número de estudos que fazem uso da GFP como biomarcador demonstra o valor e a versatilidade desta proteína. Seu emprego em bactérias garante a possibilidade de visualização *in situ* ao longo do tempo em uma única célula ou em agregados. Além disso, os diversos meios de detecção como microscopia de fluorescência e citometria de fluxo permitem a quantificação de células em uma determinada população.

A citometria de fluxo tem tido impacto sobre a pesquisa em imunologia e estudos do ciclo celular devido à sua possibilidade de fornecer uma análise multiparamétrica rápida de uma única célula numa população estatisticamente grande de eventos. O sistema fluídico permite a entrega de partículas a uma zona luminosa que registra a dispersão da luz e emissão de fluorescência, captadas por sensores e convertidas em dados eletrônicos (Valdivia & Falkow, 1998; Parks et al., 1989). A técnica tem sido utilizada na análise de expressão de GFP em BCG em diversos estudos, como na investigação do efeito da infecção nas funções de células dendríticas derivadas de medula óssea em modelo murino (Satchidanandam et al., 2014); monitoramento da expressão gênica em micobactérias (Triccas et al., 2002); e estudos do tráfego de moléculas MCH de classe II em células infectadas por micobactérias patogênicas (Sendide et al., 2004; Pecora et al., 2009).

O uso de promotores constitutivos ou induzíveis para expressar GFP em células bacterianas permite a rastreabilidade de células no ambiente e a visualização de sua localização (Stoltzfus et al., 2000). Essa possibilidade de visualização levou a estudos de uma vacina para HIV utilizando BCG como vetor, desenvolvida como uma cepa recombinante estável de BCG expressando altos níveis de antígenos virais pela modificação de genes de HIV fusionados à GFP (Chapman et al., 2014). Além disso, estudos de vacinas que empregam rBCG como vetor contra diversos agentes infecciosos, incluindo vírus do sarampo (Fennelly et al., 1995), papiloma vírus (Govan et al., 2006), bactérias que causam listeriose (Grode et al., 2005), infecção pneumocócica (Langermann et al., 1994), coqueluche (Nascimento et al., 2008), doença de Lyme (Stover et al., 1993) e parasitas como os causadores de leishmaniose (Streit et al., 2000) e malária

(Matsumoto et al., 1998), bem como na utilização como imunoterapia contra câncer de bexiga (revisado por Asín et al., 2014) também podem se beneficiar da expressão de GFP.

6. CONCLUSÕES

- A cepa rBCG expressando GFP foi construída com sucesso e se manteve estável ao longo do tempo em meio seletivo.
- Os resultados da citometria de fluxo sugerem que a variação do tempo interfere na variação da MFI.
- Embora seja útil analisar a expressão da GFP em BCG e outras bactérias, é ainda necessário fazer uma posterior avaliação em cultivo de células, como macrófagos e células dendríticas, para se obter respostas acerca de sua internalização e resposta gerada.

5 REFERÊNCIAS

- ANDREU, N., ZELMER, A., FLETCHER, T., ELKINGTON, P.T., WARD, T.H., RIPOLL, J., PARISH, T., BANCROFT, G.J., SCHAIBLE, U., ROBERTSON, B.D. & WILES, S. (2010). Optimisation of Bioluminescent Reporters for Use with Mycobacteria. *PLoS ONE*. 5(5).
- ARPINO, J. A. J., RIZKALLAH, P.J. & JONES, D.D. (2012). Crystal Structure of Enhanced Green Fluorescent Protein to 1.35 Å Resolution Reveals Alternative Conformations for Glu222. *PLoS ONE*. 7(10).
- ASÍN, M.A.P.-J., FERNÁNDEZ-RUIZ, M., LÓPEZ-MEDRANO, F., LUMBRERAS, C., TEJIDO, A., JUAN, R.S., ARREBOLA-PAJARES, A., LIZASOAIN, M., PRIETO, S. & AGUADO, J.M. (2014). Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Infection Following Intravesical BCG Administration as Adjunctive Therapy For Bladder Cancer: Incidence, Risk Factors, and Outcome in a Single-Institution Series and Review of the Literature. *Medicine*. 93(17). p. 236–254.
- BASTOS, R.G., BORSUK, S., SEIXAS, F.K. & DELLAGOSTIN, O. A (2009). Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine*. 27(47). p. 6495–6503.
- BIELECKI, J., YOUNGMAN, P., CONNELLY, P. & PORTNOY, D.A. (1990). *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature*. 345. p. 175–176.
- CALMETTE, A., GUÉRIN, C., BOQUET, A. & NÈGRE, L. (1927). La Vaccination Préventive Contre La Tuberculose Par Le Bcg. *Masson Et Cie*.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W.W. & PRASHER, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263(5148). p. 802–805.
- CHAPMAN, R., BOURN, W.R., SHEPHARD, E., STUTZ, H., DOUGLASS, N., MGWEBI, T., MEYERS, A., CHIN'OMBE, N. & WILLIAMSON, A.-L. (2014). The use of directed evolution to create a stable and immunogenic recombinant BCG expressing a modified HIV-1 Gag antigen. *PLoS one*. 9(7).
- CHRISTY, A.J., DHARMAN, K., DHANDAPAANI, G., PALANIYANDI, K., GUPTA, U.D., GUPTA, P., IGNACIMUTHU, S. & NARAYANAN, S. (2012). Epitope based recombinant BCG vaccine elicits specific Th1 polarized immune responses in BALB/c mice. *Vaccine*. 30(7). p. 1364–1370.
- CHUDAKOV, D.M., MATZ, M. V, LUKYANOV, S. & LUKYANOV, K. A (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological reviews*. 90(3). p. 1103–63.

- COLE, S.T., BROSCHE, R., PARKHILL, J., GARNIER, T., CHURCHER, C., HARRIS, D., GORDON, S.V., EIGLMEIER, K., GAS, S., BARRY, C.E., TEKAIA, F., BADCOCK, K., BASHAM, D., BROWN, D., CHILLINGWORTH, T., CONNOR, R., DAVIES, R., DEVLIN, K., FELTWELL, T., ET AL. (1998). The Biology Of *Mycobacterium Tuberculosis* From The Complete Genome Sequence. *Nature*. 393(11).
- COWLEY, S.C. & AV-GAY, Y. (2001). Monitoring promoter activity and protein localization in *Mycobacterium* spp. using green fluorescent protein. *Gene*. 264. p. 225–231.
- CRONE, D.E., HUANG, Y., PITMAN, D.J., SCHENKELBERG, C., FRASER, K., MACARI, S. & BYSTROFF, C. (2013). GFP-Based Biosensors. In *State of the Art in Biosensors*.
- CUBITT, A., HEIM, R., ADAMS, S.R., AILEEN, E.B., GROSS, L.A. & TSIEN, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS*. 20(November). p. 2967–2971.
- DAVENPORT, D. & NICOL, J.A.C. (1955). Luminescence in Hydromedusae. *Proceedings of the Royal Society*. 144(B). p. 399–411.
- DENNEHY, M. & WILLIAMSON, A.-L. (2005). Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG vaccines. *Vaccine*. 23(10). p. 1209–24.
- DESEL, C., DORHOI, A., BANDERMANN, S., GRODE, L., EISELE, B. & KAUFMANN, S.H.E. (2011). Recombinant BCG Δ ureC hly+ induces superior protection over parental BCG by stimulating a balanced combination of type 1 and type 17 cytokine responses. *The Journal of infectious diseases*. 204(10). p. 1573–84.
- DHANDAYUTHAPANI, S., VIA, L.E., THOMAS, C.A., HOROWITZ, P.M., DERETIC, D. & DERETIC, V. (1995). Green fluorescent protein as a marker for gene expression and cell biology of mycobacterial interactions with macrophages. *Molecular Microbiology*. 17. p. 901–912.
- DIETRICH, G., VIRET, J.F. & HESS, J. (2003). Novel Vaccination Strategies Based On Recombinant *Mycobacterium Bovis* BCG. *Int. J. Med. Microbiol.* 292(7–8). p. 441–451.
- EHRMANN, M. A., SCHEYHING, C.H. & VOGEL, R.F. (2001). *In vitro* stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions. *Letters in Applied Microbiology*. 32(4). p. 230–234.
- FARINACCI, M., WEBER, S. & KAUFMANN, S.H.E. (2012). The recombinant tuberculosis vaccine rBCG Δ ureC::hly(+) induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Vaccine*. 30(52). p. 7608–7614.

- FENNELLY, G.J., FLYNN, J.L., TER MEULEN, V., LIEBERT, U.G. & BLOOM, B.R. (1995). Recombinant bacille Calmette-Guerin priming against measles. *Journal of Infectious Diseases*. 172. p. 698–705.
- FORRELLAD, M. A, KLEPP, L.I., GIOFFRE, A, GARCIA, J.S., MORBIDONI, H.R., DE LA PAZ SANTANGELO, M., CATALDI, A A & BIGI, F. (2013). Virulence factors of the mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*. 4(1). p. 3–66.
- GALEN, J.E. & LEVINE, M.M. (2001). Can a “flawless” live vector vaccine strain be engineered? *Trends Microbiol.* 9. p. 372–376.
- GARNIER, T., EIGLMEIER, K., CAMUS, J.C., MEDINA, N., MANSOOR, H., PRYOR, M., DUTHOY, S., GRONDIN, S., LACROIX, C., MONSEMPE, C., SIMON, S., HARRIS, B., ATKIN, R., DOGGETT, J., MAYES, R., KEATING, L., WHEELER, P.R., PARKHILL, J., BARRELL, B.G., ET AL. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100(13). p. 7877–7882.
- GOVAN, V.A., CHRISTENSEN, N.D., BERKOWER, C., JACOBS, W.. J. & WILLIAMSON, A.L. (2006). Immunisation with recombinant BCG expressing the cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) L1 gene provides protection from CRPV challenge. *Vaccine*. 24. p. 2087–2093.
- GRODE, L., GANOZA, C. A, BROHM, C., WEINER, J., EISELE, B. & KAUFMANN, S.H.E. (2013). Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial. *Vaccine*. 31(9). p. 1340–8.
- GRODE, L., SEILER, P., BAUMANN, S., HESS, J., BRINKMANN, V., EDDINE, A.N., MANN, P., GOOSMANN, C., BANDERMANN, S., SMITH, D., BANCROFT, G.J., REYRAT, J., SOOLINGEN, D. VAN, RAUPACH, B. & KAUFMANN, S.H.E. (2005). Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *The Journal of clinical investigation*. 115(9). p. 2472–2479.
- GURUNATHAN, S., WOONG HAN, J., KIM, E., KWON, D.-N., PARK, J.-K. & KIM, J.-H. (2014). Enhanced green fluorescent protein-mediated synthesis of biocompatible graphene. *Journal of nanobiotechnology*. 12(41).
- HAGGLE, P.M. & VERKMAN, A.S. (2005). Gfp sensors. In *Advanced Concepts in Fluorescence Sensing*. p. 21–41.
- HIMMELRICH, H., LO-MAN, R., WINTER, N., GUERMONPREZ, P., SEDLIK, C., ROJAS, M. & AL., E. (2000). Immune responses induced by recombinant BCG strains according to level of production of a foreign antigen: Male. *Vaccine*. 18(24). p. 2636–2647.
- HOFT, D.F., BLAZEVIC, A., ABATE, G., HANEKOM, W.A., KAPLAN, G., SOLER, J.H., WEICHHOLD, F., GEITER, L., SADOFF, J.C. & HORWITZ, M.A. (2008). A New

Recombinant Bacille Calmette-Guerin Vaccine Safely Induces Significantly Enhanced Tuberculosis-Specific Immunity In Human Volunteers. *Journal of Infectious Diseases*. 198. p. 1491–1501.

KAUFMANN, S.H.E., LANGE, C., RAO, M., BALAJI, K.N., LOTZE, M., SCHITO, M., ZUMLA, A.I., MAEURER, M. & FOUNDATION-DIVISION, J. (2014). Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies — a state of the art review. *The Lancet Respiratory*. 2(4). p. 301–320.

KIMATA, Y., IWAKI, M., LIM, C.R. & KOHNO, K. (1997). A Novel Mutation Which Enhances The Fluorescence Of Green Fluorescent Protein At High Temperatures. *Biochem Biophys Res Commun*. 232. p. 69–73.

KREMER, L., BAULARD, A., ESTAQUIER, J. & AL., E. (1995). Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Molecular Microbiology*. 17(5). p. 913–922.

LANGERMANN, S., PALASZYNSKI, S.R., BURLEIN, J.E., KOENIG, S., HANSON, M.S. & AL., E. (1994). Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein. *A. J Exp Med*. 180. p. 2277–2286.

LORANG, J.M., TUORI, R.P., MARTINEZ, J.P., SAWYER, T.L., REDMAN, R.S., ROLLINS, J.A., WOLPERT, T.J., JOHNSON, K.B., RODRIGUEZ, R.J., DICKMAN, M.B. & CIUFFETTI, L.M. (2001). Green Fluorescent Protein Is Lighting Up Fungal Biology. *Applied And Environmental Microbiology*. 67(5). p. 1987–1994.

LUO, Y., SZILVASI, A, CHEN, X., DEWOLF, W.C. & O'DONNELL, M. A (1996). A novel method for monitoring *Mycobacterium bovis* BCG trafficking with recombinant BCG expressing green fluorescent protein. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 3(6). p. 761–768.

MACHOWSKI, E.E., DAWES, S. & MIZRAHI, V. (2005). TB tools to tell the tale—molecular genetic methods for mycobacterial research. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 37(1). p. 54–68.

MAGALHAES, I., SIZEMORE, D.R., AHMED, R.K., MUELLER, S., WEHLIN, L., WEICHOLD, F., SCHIRRU, G., PAU, M.G., GOUDSMIT, J., KU, S., ANDERSSON, J., GAINES, H., THORSTENSSON, R. & SKEIKY, Y.A.W. (2008). rBCG Induces Strong Antigen-Specific T Cell Responses in Rhesus Macaques in a Prime-Boost Setting with an Adenovirus 35 Tuberculosis Vaccine Vector. *PLoS ONE*. 3(11).

MANK, M. & GRIESBECK, O. (2008). Genetically Encoded Calcium Indicators. *Chemical Reviews*. 108(5). p. 1550–1564.

MATSUMOTO, S., YUKITAKE, H., KANBARA, H. & YAMADA, T. (1998). Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin secreting merozoite surface protein 1 (MSP1) induces protection against rodent malaria parasite infection

depending on MSP1-stimulated interferon gamma and parasite-specific antibodies. *J Exp Med.* 188. p. 845–854.

MATSUO, K. & YASUTOMI, Y. (2011). *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin as a Vaccine Vector for Global Infectious Disease Control. *Tuberculosis Research and Treatment.* 2011. p. 1–9.

MEDEIROS, M. A., DELLAGOSTIN, O. A., ARMÔA, G.R.G., DEGRAVE, W.M., DE MENDONÇA-LIMA, L., LOPES, M.Q., COSTA, J.F., MCFADDEN, J. & MCINTOSH, D. (2002). Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. *Microbiology.* 148(7). p. 1999–2009.

MEDERLE, I., BOURGUIN, I., ENSERGUEIX, D., BADELL, E., MONIZ-PEIREIRA, J. & AL., E. (2002). Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: impact on *in vivo* antigen persistence and immune responses. *Infection and Immunity.* 70: p. 303–314.

MIYAWAKI, A (2003). Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering. *Current Opinion in Chemical Biology.* 7(5). p. 557–562.

MORIN, J.G. & HASTINGS, J. (1971). Energy transfer in a bioluminescent system. *Journal of Cellular Physiology.* 77. p. 313–318.

MORISE, H., SHIMOMURA, O., JOHNSON, F.H. & WINANT, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry.* 13(12). p. 2656–2662.

MURRAY, A., WINTER, N., LAGRANDERIE, M., HILL, D.F., RAUZIER, J., TIMM, J., LECLERC, C., MORIARTY, K.M., GHEORGHIU, M. & GICQUEL, B. (1992). Expression of 41 *Escherichia-Coli* Beta-Galactosidase in *Mycobacterium-Bovis* BCG Using An Expression System Isolated from *Mycobacterium-Paratuberculosis* Which Induced Humoral and Cellular Immune-Responses. *Molecular Microbiology.* 6. p. 3331–3342.

NASCIMENTO, I.P., DIAS, W.O., QUINTILIO, W., CHRIST, A.P., MORAES, J. & AL., E. (2008). Neonatal immunization with a single dose of recombinant BCG expressing subunit S1 from pertussis toxin induces complete protection against *Bordetella pertussis* intracerebral challenge. *Microbes Infe.* 10. p. 198–202.

OHARA, N. & YAMADA, T. (2001). Recombinant BCG Vaccines. *Vaccine.* 19. p. 4089–4098.

PALMER, A.E., QIN, Y., PARK, J.G. & MCCOMBS, J.E. (2011). Design and application of genetically encoded biosensors. *Trends in Biotechnology.* 29(3). p. 144–152.

- PARISH, T. & STOKER, N.G. (1998). Electroporation Of Mycobacteria. *Methods Mol Biol.* 101. p. 129–144.
- PARKER, A.E. & BERMUDEZ, L.E. (1997). Expression of the green fluorescent protein (GFP) in *Mycobacterium avium* as a tool to study the interaction between Mycobacteria and host cells. *Microb Pathog.* 22(4). p. 193–198.
- PARKS, D., HERZENBERG, L. & LA, H. (1989). Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting. In *Fundamental Immunology*. Edited by Paul WE. New York: Raven Press Ltd. p. 781–802.
- PECORA, N.D., FULTON, S.A., REBA, S.M., DRAGE, M.G., DAIMON, P., URANKARNAGY, N.J., BOOM, W.H. & HARDING, C. V (2009). *Mycobacterium bovis* BCG decreases MHC-II expression *in vivo* on murine lung macrophages and dendritic cells during aerosol infection. *Cell Immunology.* 254(2). p. 94–104.
- PRASHER, D.C., ECKENRODE, V.K., WARD, W.W., PRENDERGAST, F.G. & CORMIER, M.J. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene.* 111. p. 229–233.
- RAFAT, M., CLEROUX, C.A., FONG, W.G., BAKER, A.N., LEONARD, B.C., O'CONNOR, M.D. & TSILFIDIS, C. (2010). PEG-PLA Microparticles For Encapsulation And Delivery Of Tat-Egfp To Retinal Cells. *Biomaterials.* 31. p. 3414–3421.
- REZENDE, C.A.F., DE MORAES, M.T.B., MATOS, D.C.D.S., MCINTOCH, D. & ARMOA, G.R.G. (2005). Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens. *Journal of Virological Methods.* 125(1). p. 1–9.
- ROWLAND, R. & MCSHANE, H. (2011). Tuberculosis Vaccines In Clinical Trials. *Expert Rev Vaccines.* 10(5). p. 645–658.
- SATCHIDANANDAM, V., KUMAR, N., JUMANI, R.S., CHALLU, V. & ELANGOVA, S. (2014). The Glycosylated Rv1860 Protein of *Mycobacterium tuberculosis* Inhibits Dendritic Cell Mediated TH1 and TH17 Polarization of T Cells and Abrogates Protective Immunity Conferred by BCG. . 10(6).
- SEIXAS, F.K., DA SILVA, É.F., HARTWIG, D.D., CERQUEIRA, G.M., AMARAL, M., FAGUNDES, M.Q., DOSSA, R.G. & DELLAGOSTIN, O.A. (2007). Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine.* 26(1). p. 88–95.
- SENDIDE, K., DEGHMANE, A., REYRAT, J., TALAL, A. & HMAMA, Z. (2004). *Mycobacterium bovis* BCG Urease Attenuates Major Histocompatibility Complex Class II Trafficking to the Macrophage Cell Surface. *Infection and Immunity.* 72(7). p. 4200–4209.

- SHIMOMURA, O., JOHNSON, F.H. & SAIGA, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*. 59.
- SILVA, J.R.S.N. E (2010). *Construção de vetores para superexpressão da proteína L1 do HPV16 em Pichia pastoris*.
- SINGH, V., BISWAS, R.K. & SINGH, B.N. (2014). A double recombinant *Mycobacterium bovis* BCG strain for screening of primary and rationale-based antimycobacterial compounds. (3). p. 1389–1396.
- STEARNS, T. (1995). Green Fluorescent Protein. The Green Revolution. *Curr Biol*. 5. p. 262–264.
- STOLTZFUS, J.R., JANSSON, J.K., BRUIJN, F.J. DE & GFP, P.W. (2000). Using Green Fluorescent Protein (GFP) as a Biomarker or Bioreporter for Bacteria. In *Tracking Genetically-Engineered Microorganisms*. p. 101–116.
- STOVER, C.K., BANSAL, G.P., HANSON, M.S., BURLEIN, J.E., PALASZYNSKI, S.R., YOUNG, J.F., KOENIG, S., YOUNG, D.B., SADZIENE, A. & BARBOUR, A.G. (1993). Protective Immunity Elicited By Recombinant Bacille Calmette-Guerin (BCG) Expressing Outer Surface Protein A (Ospa) Lipoprotein: A Candidate Lyme Disease Vaccine. *Expmed*. 178(1). p. 197–209.
- STOVER, C.K., DE LA CRUZ, V.F., FUERST, T.R., BURLEIN, J.E., BENSON, L.A. & BENNETT, L.T.E.A. (1991). New Use Of Bcg For Recombinant Vaccines. *Nature*. 351(6326). p. 456–60.
- STREIT, J.A., RECKER, T.J., DONELSON, J.E. & WILSON, M.E. (2000). BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. *Exp Parasitol*. 94. p. 33–41.
- SUN, R., SKEIKY, Y. A W., IZZO, A., DHEENADHAYALAN, V., IMAM, Z., PENN, E., STAGLIANO, K., HADDOCK, S., MUELLER, S., FULKERSON, J., SCANGA, C., GROVER, A., DERRICK, S.C., MORRIS, S., HONE, D.M., HORWITZ, M. A, KAUFMANN, S.H.E. & SADOFF, J.C. (2009). Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*. 27(33). p. 4412–23.
- TRICCAS, J. A., PINTO, R. & BRITTON, W.J. (2002). Destabilized green fluorescent protein for monitoring transient changes in mycobacterial gene expression. *Research in Microbiology*. 153(6). p. 379–383.
- TSIEN, R.Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem*. 67. p. 509–544.

- TYAGI, A.K., DAS GUPTA, S.K.D. & JAIN, S. (2000). Gene expression: Reporter technologies. In *Molecular Genetics of Mycobacteria*. p. 131–147.
- VALDIVIA, R.H. & FALKOW, S. (1998). Flow cytometry and bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 1. p. 359–363.
- VIVIANI, V.R. & BECHARA, E.J.. (2008). Um Prêmio Nobel Por Uma Proteína Brilhante. *Qnesc*. 30. p. 24–25.
- WANG, L.-M., SHI, C.-H., FAN, X.-L., XUE, Y., BAI, Y.-L. & XU, Z.-K. (2007). Expression and immunogenicity of recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin strains secreting the antigen ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Chinese Medical Journal*. 120. p. 1220–1225.
- WIEDENMANN, J., OSWALD, F. & NIENHAUS, G.U. (2009). Fluorescent Proteins for Live Cell Imaging: Opportunities, Limitations, and Challenges. *IUBMB Life*. 61(11). p. 1029–1042.
- WINTER, N., LAGRANDERIE, M., GANGLOFF, S., LECLERC, C., GHEORGHIU, M. & GICQUEL, B. (1995). Recombinant BCG Strains Expressing the SIV (Mac251)Nef Gene Induce Proliferative and CTL Responses Against Nef Synthetic Peptides in Mice. *Vaccine*. 13. p. 471–478.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014). *Global Tuberculosis Report*,
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013). *Global Tuberculosis Report*,
- YANG, Z., WANG, Y., LI, Y., LIU, Q., ZENG, Q. & XU, X. (2014). Options For Tracking Gfp-Labeled Transplanted Myoblasts Using *In Vivo* Fluorescence Imaging: Implications For Tracking Stem Cell Fate. *Bmc Biotechnology*. 14(55).
- ZHANG, G., GURTU, V. & KAIN, R.S. (1996). An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection Of Gene Transfer In Mammalian Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 227. p. 707–711.
- ZHU, T.C., GU, M.J., SUN, C. & AL., E. (2009). A systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains. *Biotechnology Letters*. 31. p. 679–684.
- ZIMMER, M. (2002). Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chemical Reviews*. 102. p. 759–781.