

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

***SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES
APLICÁVEIS EM PLATAFORMAS NANOTECNOLÓGICAS PARA
O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE***

Léa Duarte da Silva Morais

Uberlândia – MG

2012

Léa Duarte da Silva Morais

***SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES
APLICÁVEIS EM PLATAFORMAS NANOTECNOLÓGICAS PARA
O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE***

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde

Área de Concentração: Genética Molecular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia – MG

2012

LÉA DUARTE DA SILVA MORAIS

***SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES
APLICÁVEIS EM PLATAFORMAS NANOTECNOLÓGICAS PARA
O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE***

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde

Área de Concentração: Genética Molecular

Uberlândia, 13 de abril de 2012

Comissão Examinadora:

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Examinadores titulares: Dr. Milton Ozório Moraes – FIOCRUZ

Dr. Jair Pereira Cunha Junior – UFU

Dedico este trabalho:

aos amores de minha vida,
Ezequiel e Daniel,

ao meu esposo, Márcio,
que sempre esteve ao meu lado,
me incentivando e renunciando-se,

aos meus pais, Francisco e Lucila,
que se doaram pra que eu
chegasse até aqui.

“A alegria do SENHOR é a nossa força”

Ne 8.10

AGRADECIMENTOS

Sou grata ao meu Deus, que tem dirigido meus passos e me feito vencedora em todos os aspectos da minha vida, "que darei ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?"

Aos meus pais, Francisco e Lucila, pelo exemplo singular de uma vida honrada, pelos conselhos, dedicação e auxílio. Serei uma eterna aprendiz de vocês.

Ao meu esposo, Márcio, presente de Deus para minha vida; minha gratidão pelo seu afeto, carinho, apoio e companheirismo. Amo você.

Aos meus filhos, Ezequiel e Daniel, pelo prazer de viver, pela alegria e força que me dão todos os dias.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, exímio pesquisador, pela oportunidade e confiança, otimismo e exemplo de dedicação e apreço na produção do conhecimento;

Ao Prof. Dr. Carlos Ueira, pela acessibilidade, apoio e amizade durante a execução deste trabalho;

À Dra. Fabiana Almeida, por tamanha dedicação e amizade, pela paciência e empenho na realização deste trabalho, que Deus lhe abençoe!

Às minhas amáveis irmãs e cunhados, aos meus sobrinhos, ao Ernesto e Ayla, e à querida Vey, pelo apoio e orações em meu favor.

Às amigas: Luciana, Emília, Patrícia Thieme, Carolina Reis, Angela, Thamires, Vanessa, Cláudia, Mayara, e ao Sebastião pelo auxílio nas técnicas e coletas.

Aos demais amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia pela receptividade e amizade, e pelas horas descontraídas e encorajadoras.

Aos colegas do CREDESH e do Laboratório de Genética da UFU, pelo apoio.

Aos amigos e companheiros do setor de Bacteriologia do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU, Vivieni, Fernanda, Luci, Graça, Ricardo, Rosilene, Simone e Vандir, a compreensão e apoio de vocês foram essenciais nesta conquista, que Deus vos recompense com grandes bênçãos.

As amigas Angelita, Camila e Tamyres do setor de Coleta do Laboratório de Análise Clínicas pelo auxílio nas coletas e rastreamento dos pacientes.

Ao setor de Micologia do LABOR- HC/UFU, em especial à Lucivânia, pela cooperação tanto com o espaço físico como na obtenção de amostras bacterianas.

À Dra. Paula A.D. Fogaça de Aguiar, pelo auxílio na obtenção de dados.

À equipe médica do Ambulatório de Moléstia Infecciosa, pela simpatia e cooperação no recrutamento dos voluntários.

Aos pacientes e voluntários que se dispuseram a participar, pela doação das amostras clínicas e cooperação para o avanço da ciência.

À Gisele, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela atenção e dedicação.

As agências de fomento que financiaram esta pesquisa: FAPEMIG e CNPQ

A UFU e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por oferecer um ensino e pesquisa de qualidade

A Deus seja a honra, a glória e o louvor!

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana de alta mortalidade, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, transmitida pelo doente através das vias respiratórias. A TB é um grave problema de saúde pública. Estima-se que um terço da população mundial seja infectada com *M. tuberculosis*, na forma de infecção latente, que pode assim permanecer por toda a vida, até que por queda da imunidade venha se desenvolver caracterizando a infecção ativa. O Brasil, apesar da imunização em massa de recém-nascidos, está entre os 22 países que representam 80% dos infectados. Para controlar a disseminação e o avanço da doença é necessário, além de monitorar os pacientes garantindo o tratamento e cura, rapidez no diagnóstico. Os métodos diagnósticos atualmente utilizados não correspondem à necessidade quanto à agilidade e sensibilidade, e não são capazes de diferenciar infecção de doença ativa. Alguns estudos vem demonstrando a importância de proteínas secretadas por cepas virulentas para o uso em plataformas diagnósticas. Nas últimas décadas, muitos autores tem chamado a atenção para as características promissoras da saliva como amostra biológica ideal para ensaios de diversos tipos de doenças. O objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar ligantes de alta afinidade a Imunoglobulinas A presentes em saliva de indivíduos com tuberculose. Nós utilizamos a tecnologia de bibliotecas apresentadas em fagos, *phage display*, para identificar peptídeos miméticos a proteínas de *M. tuberculosis*, a partir de IgA de saliva de pacientes com tuberculose. Vinte clones foram selecionados e analisados quanto à similaridade e alinhamento com proteínas depositadas em banco de dados. Cinco apresentaram similaridade e alinharam com proteínas antigênicas relacionadas à virulência de *M. tuberculosis*, CFP-10/ESAT-6, rpf e família PE de proteínas, codificadas na Região de Diferenciação (RD1). Os clones foram submetidos a testes ELISA, para avaliar a imunorreatividade frente a IgA presente em saliva de indivíduos saudáveis, reativos ou não ao teste tuberculínico e de pacientes com tuberculose com tempo de tratamento variando de 0 a 6 meses. As análises estatísticas mostraram que os clones diferenciaram significativamente as salivas positivas das negativas ($p < 0,05$), com sensibilidade de 100% e especificidade média de 73%. A análise da curva de regressão dos valores das absorbâncias em função do tempo de tratamento

mostrou uma tendência a declínio. Nossos clones são potenciais marcadores para diagnóstico e possivelmente para controle de tratamento, sendo capazes de diferenciar infecção latente e doença ativa.

Palavras chave: *Mycobacterium tuberculosis*, CFP10-ESAT6, *phage display*, saliva e peptídeos.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a bacterial disease of high mortality, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, transmitted by the patient through the respiratory tract. TB is a serious public health problem. It is estimated that one third of the world population is infected with *M. tuberculosis* in the form of latent infection, which may as well stay for the entire life, until a drop of immunity will develop characterizing the active infection. Brazil, despite the mass immunization of newborns, is among the 22 countries that represent 80% of those infected. To control the spread and disease progression is necessary, and monitor patients to ensuring the treatment and cure, rapid diagnosis. The diagnostic methods currently used do not meet the need and the speed and sensitivity, and are not able to differentiate infection from active disease. Some studies have demonstrated the importance of proteins secreted by virulent strains for use in diagnostic platforms. In recent decades, many authors have called attention to the promising features of saliva as a biological sample ideal for testing various types of diseases. The objective of this work was to select and characterize high-affinity ligands to immunoglobulins A present in the saliva of individuals with tuberculosis. We used the technology libraries displayed on phage, phage display to identify mimetic peptides to proteins of *M. tuberculosis*, IgA saliva from patients with tuberculosis. Twenty clones were selected and analyzed for similarity and alignment with proteins deposited in the database. Five showed similarity and aligned with antigenic proteins related to virulence of *M. tuberculosis*, CFP-10/ESAT-6, rpf and PE-family of proteins encoded in the Region of Differentiation (RD1). The clones were subjected to ELISA tests to evaluate the immunoreactivity against IgA in saliva from healthy individuals, or non-reactive with PPD and tuberculosis patients with treatment time range 0-6 months. Statistical analyzes showed that the clones differed significantly from negative to positive salivas ($p < 0.05$), with 100% sensitivity and specificity averaged 73%. The analysis of the regression curve of absorbance values versus time of treatment tended to decline. Our clones are potential markers for diagnosis and possibly treatment control, being able to differentiate between latent infection and active disease.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, CFP10-ESAT6, phage display, saliva and peptides.

LISTA DE ABREVIações

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BLASTp	(<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>), programa de busca por alinhamento.
BSA	(<i>Bovine Serum Albumin</i>), Soro Albumina Bovina
CEP/UFU	Cômite de Ética e Pesquisa da UFU
CFP-10	10 kDa <i>Culture Filtrate Protein</i>
DNA	Ácido desoribonucléico
DOT	(<i>Directly Observed Treatment</i>) Tratamento Diretamente Observado
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	(<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>), Imunoensaio enzimático
ESAT-6	6 kDa <i>Early Secretory Antigen Target</i>
ETBP	Tuberculose Extra-pulmonar
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgA	Imunoglobulina A
IPTG	(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)
Kda	Quilodalton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MS	Ministério da Saude
NEG	Negativo
NP+	Negativo reator ao PPD

NP-	Negativo não reator ao PPD
OD	Densidade ótica
OMS	Organização Mundial de Saude
OPD	Orto-fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino com <i>Tween 20</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D.- 12	Biblioteca comercial de <i>Phage Display</i> de 12 aminoácidos
pIII	Proteína três do capsídeo do fago
pIX	Proteína nove do capsídeo do fago
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PNT	Positivo não tratado
PPD	Proteína P Derivada
pVI	Proteína seis do capsídeo do fago
pVII	Proteína sete do capsídeo do fago
pVIII	Proteína oito do capsídeo do fago
PT	Positivo em tratamento
RD1	Região de Diferenciação 1
Rpf	Fator promotor de ressuscitação
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TA	Temperatura ambiente
TB	Tuberculose

TBP	Tuberculose Pulmonar
TBS	Tampão Tris-NaCl
TBST	Tampão Trifosfato de Sódio com <i>Tween 20</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
WHO	<i>World Health Organization</i>
XGal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α -D-galactosídeo

LISTA DE NOTAÇÕES

°C Graus Celsius

dL decilitro

g gramas

M Molar

µg micrograma

mg miligrama

min minuto

mL mililitro

mM milimolar

N normal

ng nanogramas

pmol picomol

g gravitacional

µL microlitro

µm micrometro

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01:** Esquema representativo de um bacteriófago filamentosso ilustrando as proteínas do capsídeo viral: pIX, pVII, pVIII, pVI e pIII. 27
- FIGURA 02:** *Biopanning* (três ciclos A, B e C): biblioteca sendo submetida a três subtrações negativas (1, 2 e 3) com IgA (-) pra tuberculose. O remanescente em dupla triagem com IgA (+) para tuberculose (4 e 7) por eluição negativa com proteína de *Mycobacterium sp* (5 e 8) e eluição positiva com *M. tuberculosis* (6 e 9). Amplificação (11) e titulação (12) do eluato final (10). 34
- FIGURA 03:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% de 12 amostras de DNA extraído de fagos (1-12) aleatoriamente escolhidos e de 200ng de DNA controle (C) com 7249pb. 42
- FIGURA 04:** Alinhamento tridimensional; a) estrutura molecular do complexo Cfp-10/Esat-6 com destaque para a região de similaridade com o clone G01; b) estrutura molecular do complexo Cfp-10/Esat-6 com destaque para a região de similaridade com o clone C10; c) estrutura molecular do *Resuscitation-promoting factor* com destaque para a região de similaridade com o clone E11. 43
- FIGURA 05:** Avaliação em *phage-ELISA* da reatividade dos clones selecionados frente a saliva de pacientes doentes não tratados (PNT), doentes em tratamento (PT), indivíduos sadios PPD+ (NP+) e indivíduos sadios PPD- (NP-). 44
- FIGURA 06:** Representação das curvas ROC geradas a partir do *phage-ELISA*, com o valor da área obtida por cada clone e seus respectivos valores de *p*. .. 45
- FIGURA 07:** Análise da regressão linear e do coeficiente de determinação da reatividade dos clones em função do tempo de tratamento. 46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sensibilidade e especificidade de métodos diagnósticos <i>versus</i> limitações.	25
TABELA 2: Distribuição das amostras segundo critério de diagnóstico tempo de tratamento	40
TABELA 3: Dados epidemiológicos das amostras	40
TABELA 4: Títulos de fagos de entrada e saída do <i>Biopanning</i>	41
TABELA 5: Frequencia das sequencias peptídicas e alinhamento com proteínas antigênicas de <i>M. tuberculosis</i>	43
TABELA 6: Valores de sensibilidade e especificidade obtidos nos testes ELISA na detecção de anticorpos IgA anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em amostras de saliva.	45

Sumário:

Resumo.....	VIII
Abstract.....	X
Lista de Abreviações.....	XII
Lista de Anotações.....	XV
Lista de Figuras.....	XVI
Lista de tabelas.....	XVII
1- Introdução.....	20
1.1 - Epidemiologia e Etiologia da Tuberculose.....	20
1.2 - Resposta Imunológica.....	21
1.3 - Tratamento.....	22
1.4 - Diagnóstico.....	23
1.5 - Proteínas antigênicas e virulência.....	25
1.6 - Saliva e biomarcadores.....	25
1.7- <i>Phage Display</i>	26
2. – Objetivos.....	29
2.1 - Objetivos específicos.....	29
3 - Material e Métodos.....	30
3.1 - Obtenção das amostras biológicas.....	30
3.2 - Purificação de IgA com microesferas magnéticas.....	30
3.3 - Acoplamento de microesferas magnéticas à Anti-IgA.....	31
3.4 - Obtenção de Extrato Protéico de <i>Mycobacterium</i> spp.....	32
3.5 - Eletroforese em SDS-PAGE.....	32
3.6 - Coloração de gel com <i>Coomassie-blue</i>	33
3.7 - Seleção de peptídeos recombinantes.....	33
3.7.1 - <i>Biopanning</i> (seleção de fagos).....	33
3.7.2 – Titulações.....	35
3.8 - Extração de DNA de fagos.....	36

3.9 - <i>Phage</i> -ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) contra proteínas de <i>Mycobacterium sp</i>	37
3.10 – Seqüenciamento	37
3.11 - Análise <i>in silico</i>	38
3.12 - <i>Phage</i> -ELISA contra IgA de saliva	38
3.13 - Análise Estatística	39
4 – Resultados	40
4.1- Caracterização da amostra	40
4.2 - Purificação de IgA	40
4.3 - <i>Biopanning</i> e Titulações	41
4.4 - Extração de DNA de fagos.....	42
4.5 – Sequenciamento	42
4.6 – Imunorreatividade.....	44
5 – Discussão.....	47
6 - Conclusões e Perspectivas	51
7 – Referências Bibliográficas	52
Anexos	58
Anexo A.....	58
Anexo B1.....	60
Anexo B2.....	61
Anexo B3.....	62
Anexo B4.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e etiologia da tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana, infecto-contagiosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. O bacilo foi descoberto em 1882 por Robert Koch, que o isolou ao conseguir o seu cultivo e reproduzir a doença em animais de laboratório (COLLINS et al., 1997). O *M. tuberculosis* é um bacilo delgado, ligeiramente encurvado de 1,0 a 4,0 µm de comprimento e 0,3 a 0,6 µm de diâmetro, capaz de sobreviver no interior de células fagocitárias, é considerado um parasito intracelular facultativo, de crescimento lento, o qual se divide a cada 16 ou 20 horas, (FLYNN & CHAN, 2001).

A tuberculose é responsável por 2 milhões de mortes anualmente (WHO, 2006). Ainda, segundo a OMS, a TB também é responsável por 25% das mortes evitáveis em adultos nos países em desenvolvimento. O Brasil é um país com alta incidência e prevalência de TB, ocupando a 19ª posição entre 22 países com 80% dos casos de TB no mundo (MS, 2010).

Estima-se que um terço da população mundial seja infectada pelo *M. tuberculosis*. Na maioria dos indivíduos infectados, este patógeno persiste em latência, podendo resistir em um ambiente muito hostil, por longos períodos com baixa nutrição (AKHTER et al., 2007), caracterizando a doença assintomática ou infecção latente, onde as manifestações clínicas não são evidentes e pode permanecer assim por muito tempo (WAYNE 1994). Pelo menos 10% dos indivíduos com TB latente desenvolverão a doença ativa, este risco em indivíduos coinfectados pelo HIV sobe para 50%. (WHO, 2004; MELO et al., 2005).

A forma mais comum de transmissão do *M. tuberculosis* se dá por via aerógena, pela inalação de gotículas contendo a bactéria, quando o doente com TB de pulmão (em fase bacilífera) espirra ou tosse. Esta via de transmissão é de grande preocupação, pela facilidade de propagação. O contágio depende diretamente das condições de aeração do ambiente, assim como da proximidade e do tempo de exposição, (MELO et al., 2005).

Os fatores de risco são o contato intradomiciliar com caso bacilífero recém diagnosticado, crianças menores de 05 anos, infecção por HIV e desnutrição grave. Contudo, os dados epidemiológicos da TB infantil são

bastante limitados, uma vez que estes são feitos sobre as informações de baciloscopia positiva e 80% dos casos de TB infantil são negativos ao exame de escarro (SANT'ANNA & HIJJAR, 2007).

A tuberculose é problema social relacionado às condições econômicas, sendo nos países desenvolvidos, mais comum em idosos, quando há a queda da imunidade, própria da senescência, enquanto em países em desenvolvimento é mais frequente no grupo etário economicamente produtivo, entre os 15 e 59 anos (MELO *et al.*, 2005). A pandemia do HIV e o contraste entre o aumento da miséria das populações menos favorecidas e o aumento da sobrevivência nas mais desenvolvidas favoreceram o aumento da tuberculose no mundo (MELO *et al.*, 2005).

Os índices de mortalidade chamam a atenção e apontam para a necessidade de maiores cuidados e investimentos no sentido de controlar a doença. Muitos esforços vem sendo empregados para conhecer melhor esta patologia e encontrar alternativas que possibilitem este controle.

A OMS criou estratégias de controle da TB para reduzir a mortalidade, morbidade e transmissão da doença (WHO, 2004). Em todo o mundo foi implantado um programa de monitoramento ao doente. No Brasil existe um programa de controle da doença PNCT (Programa Nacional de Controle da Tuberculose) que é um conjunto ações integradas com participação do governo e comunidade visando reduzir a morbidade, a mortalidade e atenuar o sofrimento humano causado pela doença. A principal ação de controle constitui-se da procura de casos novos e da quimioterapia efetiva, de modo a reduzir os focos de infecção (MELO *et al.*, 2005).

1.2 Resposta Imunológica

O sucesso da infecção depende da eficiência do sistema imunológico do indivíduo que inala os aerossóis contendo bacilos. A sobrevivência deste microorganismo no pulmão e o seu desenvolvimento dependerá de sua virulência e da habilidade das células de defesa do hospedeiro (MELO *et al.*, 2005).

Após a inalação, a micobactéria é fagocitada por macrófagos alveolares e combatida pela resposta imune inata. Macrófagos, células dendríticas e

outras células apresentadoras de antígenos (APCs) internalizam a bactéria dando início ao processamento do patógeno e apresentação de antígeno. No interior dos macrófagos, os fagossomos, onde a bactéria permanece aprisionada, fundem-se aos lisossomos, dando origem ao fagolisossomo onde há a lise bacteriana para eliminação e apresentação de antígenos às células T CD4⁺ a fim de estimular outros componentes da resposta imune. (AHMAD, 2011; TEIXEIRA, 2007).

O *M. tuberculosis* desenvolve mecanismos que o permitem evadir da resposta imune, pelos quais são capazes de impedir a fusão do fago-lisossomo e ali permanecer latente, assim como lisar os macrófagos liberando bactérias viáveis para infectar outras células (AHMAD, 2011).

Os macrófagos ao falharem em sua função, trabalham a favor do patógeno, e carregados de micobactérias em seu interior acabam por desempenhar o papel de transportador do germe para outros órgãos, onde poderão futuramente desenvolver a TB extrapulmonar (MELO *et al.*, 2005). TB extrapulmonar (ETBP) são classificadas de acordo com a localização: óssea, renal, ocular, pleural, meningoencefália, miliar (disseminada) entre outras (MS, 2002).

Os mecanismos de escape utilizados pelo *M. tuberculosis* são mediados por proteínas e compostos antigênicos que desempenham importante papel na virulência bacteriana, alguns deles codificados geneticamente na Região de Diferenciação 1 (RD1). Esta região genômica está ausente no Bacilo Calmette-Guérin (BCG) utilizado na imunização contra tuberculose. No Brasil todos os indivíduos são imunizados ao nascer com a BCG, porém esta imunização somente protege das formas mais graves da doença no período da infância. (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

1.3 Tratamento

A tuberculose é uma das doenças mais antigas e comuns da humanidade, e o seu controle ainda representa um desafio para os governos, autoridades da saúde e comunidade. Um grande problema da TB é a duração do tratamento, que por ser prolongado, faz com que muitos pacientes desistam do tratamento logo ao desaparecerem os sintomas, o que leva ao surgimento

de cepas multirresistentes. Entre as estratégias criadas pela OMS está o DOT (*Directly Observed Treatment*), que consiste no monitoramento pelo sistema de saúde ao paciente, durante o tratamento a fim de garantir o uso correto dos medicamentos e não abandono do tratamento (WHO, 2004).

A resistência aos fármacos é um agravante no controle da TB (DUTTA *et al.*, 2007). A rifampicina, antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose, é a "chave" do esquema terapêutico, mas alguns autores chamam a atenção para o fato de que pacientes portadores de cepas de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina têm grande chance de serem resistentes a outros tuberculostáticos (CARVALHO *et al.*, 2007).

Alguns estudos mostram a existência de infecção por cepas diferentes quanto ao perfil de resistência a fármacos, tanto em indivíduos com infecção ativa quanto com infecção latente (SIQUEIRA, 2009; CABRAL, 2010).

O tratamento deve ser eficaz e eficiente, e iniciado o mais rápido possível, visando minimizar a propagação do bacilo e seleção de cepas multirresistentes. No contexto geral, há uma real necessidade de maior viabilidade técnica que permita em tempo hábil avaliar a resposta ao tratamento de maneira que permita melhor direcionamento e eficácia do mesmo.

1.4 Diagnóstico

A tuberculose é um problema de saúde pública que requer atenção especial das autoridades da saúde a fim de controlar a disseminação e o avanço desta patologia (MELO, 2005). Para alcançar este objetivo, além de monitorar os pacientes durante o tratamento, é necessário uma abrangência maior e mais facilidade na busca de casos novos, assegurando rapidez e acurácia no diagnóstico (WHO, 2006)

Desde a descoberta do organismo por microscópico em 1882, muitas técnicas vem sendo testadas, objetivando o aprimoramento das ferramentas diagnósticas. Existem limitações diagnósticas quanto à sensibilidade e agilidade, uma vez que a definição de um caso de TB é feita a partir da baciloscopia positiva, o exame direto do escarro, que só é aplicável ao doente que estiver com sintomas respiratórios.

Os métodos atuais de diagnóstico se baseiam em métodos radiográficos, cultura, microscopia, amplificação de ácidos nucleicos e sorologia (TABELA 01). O isolamento do *M. tuberculosis* por cultura é um teste de diagnóstico definitivo, mas demanda tempo. A radiografia por raios-X requer equipamento especializado, além de possuírem baixa especificidade principalmente quando correlacionado com outras infecções, como em indivíduos co-infectados com HIV. A microscopia é o método mais barato, tem ótima especificidade, mas é pouco sensível. A cultura, considerada padrão-ouro, é altamente específica, permite determinar suscetibilidade à drogas, mas é demorada, semi-quantitativa, e também requer equipamentos e infraestrutura adequada e especializada (WHO, 2006; MS, 2010).

A detecção de ácidos nucleicos é altamente específica e sensível, mas requer condições laboratoriais adequadas e possui maior custo, além do que dificilmente pode ser usada em condições de campo, onde apresenta grande proporção de falso-positivos. Quanto à sorologia, é o método mais prático, mas os antígenos atuais não permitem distinguir a tuberculose ativa da infecção latente. Os testes diagnósticos atualmente utilizados deixam a desejar o que dificulta o rastreamento do doente e o monitoramento da evolução clínica (WHO, 2006; MS, 2010).

A carência de um diagnóstico preciso e rápido é agravada pela grande amplitude de manifestações clínicas da doença, influenciadas pela idade, comorbidades, órgãos afetados (como linfonodos, sistema nervoso central, pulmões, ossos e sistema urinário), além da severidade da doença. Diante deste contexto, a grande preocupação em nível mundial continua a ser a falta de um diagnóstico que atenda estas necessidades e de fácil utilização em campo (“*point-of-care*”) para a tuberculose ativa (WHO, 2006; MS, 2010).

O teste da tuberculina, também conhecido como PPD, feito a partir da aplicação intradérmica de proteína purificada derivada Rt23, é útil para provar a infecção, mas não necessariamente a doença. O teste positivo para TB indica somente a exposição prévia ao antígeno, mas não implica em infecção ativa, e, ainda, se o paciente estiver em estado de imunossupressão e o teste para TB der negativo, não podemos descartar a possibilidade do paciente estar infectado com tuberculose (WHO, 2004).

TABELA 01: Sensibilidade e especificidade de métodos diagnósticos versus limitações.

Método	Sensibilidade	Especificidade	Limitações
Radiografia	Satisfatória	Baixa	Equipamento especializado
Microscopia	Baixa	Alta	Representatividade amostral
Cultura	Alta	Alta	Serviço especializado e tempo
PCR	Alta	Alta	Custo Elevado e Infra-estrutura
Sorologia	Baixa	Variável	Disponibilidade de antígenos
PPD	Baixa	Baixa	Detecta apenas a infecção.

1.5 Proteínas antigênicas e virulência

O sucesso do processo infeccioso, e da reativação da doença também se deve à ação de proteínas secretadas pelo *M. tuberculosis* que interferem na regulação da resposta imune do hospedeiro, algumas destas proteínas são codificadas na região genômica de *Mycobacterium sp*, considerada a responsável por parte da virulência bacteriana - RD1. Grandes esforços vem sendo empregados em estudos que busquem compreender melhor o papel destas proteínas com o interesse em desenvolver testes eficazes para o diagnóstico e dentre estas os alvos têm sido: *ESAT-6 (6 kDa Early Secretory Antigen Target)* and *CFP-10 (10 kDa Culture Filtrate Protein)*, *Ag85 A, B e C*, *Rv3872, Rv3878, Rpf* (PYDI *et al.*, 2011; BELAY *et al.*, 2011; MUKHERJEE *et al.*, 2007; HETT *et al.*, 2007; ZHANG, 2007).

1.6 Saliva e biomarcadores

Os espécimes clínicos usados em testes diagnósticos já padronizados são limitados e não oferecem aos testes sensibilidade satisfatória (POTTUMARTHY *et al*, 2000). Alguns pesquisadores chamam a atenção para o fato do fluido salivar, apresentar excelente potencial diagnóstico por conter

numerosas proteínas, fragmentos protéicos e anticorpos, que conferem a este fluido importante valor analítico (LAWRENCE, 2002; TABAK, 2001; STRECKFUS & BIGLER, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2010; LARREA *et al.*, 2006)

A saliva pode ser considerada a amostra ideal tanto para o diagnóstico de doenças infecciosas quanto para o monitoramento da evolução do tratamento por não ser invasiva e por sua produção contínua, evidenciando mais precisamente o estado atual do organismo (LAWRENCE, 2002). Portanto, identificar biomarcadores presentes na saliva pode contribuir para o monitoramento de tuberculose.

Optar pela utilização dessa amostra biológica como ferramenta diagnóstica possui diversas vantagens, por ser um fluido continuamente produzido, excretado e renovado, reflete o estado atual do organismo, além disso, deve-se considerar a coleta, que é um procedimento simples, não invasivo, e que não requer habilidades e nem equipamentos especiais e pode ser conduzida em qualquer ambiente (WONG, 2011). Porém a busca por marcadores reativos neste fluido biológico ainda é restrita, mas com perspectivas extremamente interessantes.

A obtenção de biomarcadores que sirvam tanto como alvo diagnóstico como alvo terapêutico para a tuberculose pode melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes portadores dessa patologia.

1.7 Phage Display

Phage display é uma técnica eficiente para identificar peptídeos ou proteínas que se ligam a outras moléculas com diversas finalidades, como mapeamento de epítomos reconhecidos por anticorpos. A tecnologia é baseada no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de bacteriófagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressado fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína viral naturalmente expressa no bacteriófago.

A possibilidade de expressão de uma proteína de fusão no capsídeo de bacteriófagos, de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante, demonstrada em 1985 por Smith, abriu caminho para a construção de

bibliotecas conformacionais apresentadas na superfície destas partículas virais (SMITH, 1985), um bacteriófago que infecta uma variedade de bactérias gram-negativas, frequentemente a *Escherichia coli* do gênero masculino (BENHAR, 2001).

Os bacteriófagos M13 são formados por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (FIGURA 1). Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2.800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago (PHIZICKY & FIELDS, 1995; BARBAS, 2001; BRIGIDO & MARANHÃO, 2002).

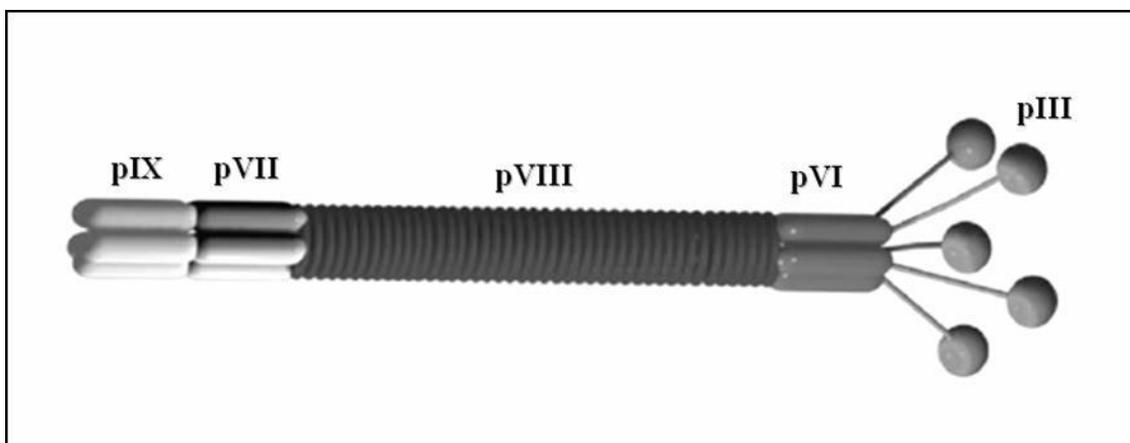


FIGURA 1 - Esquema representativo de um bacteriófago filamentosso ilustrando as proteínas do capsídeo viral: pIX, pVII, pVIII, pVI e pIII (ARAP, 2005).

Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que eles não geram uma infecção lítica em *Escherichia coli*, mas preferencialmente induzem um estado no qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise.

Bibliotecas de peptídeos geradas por *phage display* são extensivamente aplicadas na descoberta de uma grande variedade de polipeptídeos incluindo anticorpos, receptores e enzimas (HAARD *et al*, 1998). Epítomos ou determinantes antigênicos, regiões de reconhecimento do antígeno pelos anticorpos, podem também ser identificados através desta metodologia de apresentação de peptídeos em fagos (STEPHEN *et al*, 1995), a qual tem sido extremamente importante para a identificação e caracterização de novos ligantes de alta afinidade e seus receptores de uma infinidade de doenças, incluindo câncer, doenças infecciosas, cardiovasculares e autoimunes.

A seleção de seqüências baseada na afinidade de ligação do fago a uma molécula alvo é feita por um processo de seleção “*in vitro*” denominado *biopanning* (PARMLEY & SMITH, 1988). O *biopanning* consiste na incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. Os fagos não ligantes ou menos específicos são eliminados por lavagens sucessivas e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O *pool* de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção. Após três ou quatro ciclos de seleção os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA, *Western Blotting* ou ELISA (SMITH, 1985).

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi selecionar e caracterizar peptídeos miméticos de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* por *phage display*; e avaliar sua aplicação em processos nanobiotecnológicos para detecção de anticorpos associados à tuberculose.

2.1 Objetivos específicos

1- Selecionar e identificar peptídeos miméticos aos antígenos reconhecidos por IgA de indivíduos com tuberculose utilizando a tecnologia de *phage display*.

2- Fazer a caracterização molecular de mimetopos selecionados por ferramentas de bioinformática.

3- Avaliar a possibilidade de utilização de peptídeos miméticos em ensaios imunoenzimáticos com fins diagnósticos.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção das amostras biológicas

As amostras de saliva foram obtidas de indivíduos, maiores de 18 anos, mediante autorização dos mesmos e assinatura do TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A). A seleção dos indivíduos com diagnóstico de tuberculose foi realizada pela equipe médica do departamento de Moléstias Infecciosas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU), e junto à Secretaria Municipal de Controle da Tuberculose em Uberlândia mediante a notificação de casos atendidos na rede municipal de saúde. Os indivíduos controles saudáveis foram selecionados de acordo com resultado do teste tuberculínico (PPD), realizados pelo PNCT.

Este trabalho foi aprovado pelo setor interno de avaliação de projetos Secretaria Municipal de Controle da Tuberculose em Uberlândia (Anexo B1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU (CEP/UFU) sob o processo nº123/2010 (Anexos B2, B3 e B4) e todas as técnicas de manipulação dos materiais biológicos seguiram normas do Código de Ética em Pesquisa com Humanos (Resolução CNS N° 196/96).

Para a coleta da saliva, os pacientes foram orientados a enxaguar a boca repetidamente com água potável. Posteriormente, o fluxo salivar foi coletado sem estimulação prévia utilizando-se tubos *Salivettes*. Durante a coleta, os pacientes permaneceram com um *swab* de algodão (1 cm de diâmetro, 2,5cm de comprimento) dentro da cavidade bucal por 3 minutos, ou até encharcar o *swab*, alternando-o cuidadosamente de um lado para o outro da bochecha evitando morder o mesmo. Posteriormente, o *swab* de algodão foi acondicionado dentro tubo *Salivette* mantido em gelo por tempo mínimo, até a centrifugação para a obtenção da amostra em si, que foi armazenada imediatamente a -20°C.

3.2 Purificação de IgA com microesferas magnéticas

A purificação de IgA das amostras salivares foi obtida utilizando-se microesferas magnéticas (beads magnéticos) conjugadas a proteína G

(Dynabeads- Invitrogen) acopladas a um anticorpo IgG, específico a IgA humana produzida em cabra (KPL).

3.3 Acoplamento de microesferas magnéticas à Anti-IgA

Para cada 2×10^9 partículas (100 μ l do estoque), lavadas anteriormente três vezes com tampão citrato-phosphato (pH=5,0) para ativar as microesferas, adicionou-se 100 μ L anti-IgA, correspondente a 100 μ g de Anti-IgA, agitando gentilmente por 40 minutos a temperatura ambiente (T.A). As microesferas adsorvidas com anticorpos foram, então, lavadas novamente três vezes com tampão citrato-phosphato (pH=5,0) com a finalidade de retirar os anticorpos não ligantes.

Para realizar a ligação covalente entre a microesfera e os anticorpos, o sistema *beads*-anticorpo foi lavado duas vezes com 1ml de tampão trietanolamina (0,2M pH 8,2) e, ressuspendido e 1mL de tampão de ligação covalente (20mM de dimetil pimelinidato x 2HCl em tampão trietanolamina – 0,2 M, pH 8,2) por 30 minutos sob agitação leve a T.A. A neutralização da reação da ligação covalente foi feita pela incubação do sistema *beads*-anticorpos com 1mL de tampão Tris (50mM pH=7,5) por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as microesferas foram lavadas com TBS-T 0,1% de tween e incubadas com a solução de bloqueio (5% de BSA em TBS-T 0,05% de tween) *overnight* a 4°C, e ressuspendidas em 200ul de TBS.

Para purificação e IgA, 100 μ L de *pools* de salivas do grupo PNTe grupo NP-, foram separadamente adicionados a 100 μ L do complexo *bead*-anti-IgA, e incubadas 1 hora a 37°C, sob agitação leve. Observou-se aglutinação da suspensão, sugerindo a formação de uma cadeia em função do reconhecimento de várias partes da IgA pela anti-IgA, não sendo esta última específica da cadeia alfa. Esta observação possibilitou certificar o funcionamento do acoplamento dos *beads* e conseqüente purificação de IgA. Foram realizadas 5 lavagens sucessivas, e em seguida, eluição ácida com Glicina (0,2M) pH 2,2 para liberação das IgAs e o pH neutralizado com Tris HCl pH 9,1.

3.4 Obtenção de Extrato Protéico de *Mycobacterium* spp

O extrato protéico de micobactérias foi obtido a partir de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium sp* (não tuberculosis), cultivadas em meio MB BacT® (BioMerieux), no setor de micologia do Laboratório de Análises Clínicas. As cepas foram mortas por choque térmico com 3 ciclos de fervura por 15 min e banho em gelo por 5 min. Foi realizado um controle para testar a eficiência deste procedimento antes da abertura do frasco, inoculando novamente em outro frasco estéril e incubando por 60 dias a 37°C sob agitação, nestas condições não foi detectado crescimento bacteriano.

Os frascos contendo as células inativadas foram armazenados a -20°C, até a liberação do controle negativo. O conteúdo deste frasco foi transferido para tubo Falcon para sedimentação das células por centrifugação, as quais foram ressuspensas em 1,5 mL de Tampão Salino Fosfato (PBS), e submetidas a sonicação (20 ciclos de 5 min) com resfriamento em gelo. Esta suspensão foi centrifugada a 10.000 g por 17 min a 4°C, o sobrenadante contendo proteínas solúveis foi transferido para outro tubo e armazenado a -80°C e o sedimento foi novamente ressuspenso em 1,0 mL de PBS, e centrifugado a 1.000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o sedimento ressuspenso em 500µL de PBS, ambos armazenados a -80°C.

A quantificação das proteínas de *M. tuberculosis* e Imunoglobulinas A foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (Spectrophotometer ND 1000).

3.5 Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada segundo Barbas et al. (2001), a concentração do gel foi de 16% (p/v). As amostras foram diluídas em 10µL de tampão de amostra (12mL de SDS a 10%, 6mL de Glicerol, 1mL de Tris-HCl 1M pH 6,8) e aplicadas em cada poço do gel. Foi utilizado um marcador de peso molecular (SIGMAMARKER™, Wide Molecular Weight Range) para determinar o tamanho das proteínas no gel. Foram utilizados dois tampões de corrida: ânodo (Tris-HCl 0,2M pH 8,9) e cátodo (Glicina 0,1M; Tris 0,1M; 0,1% de SDS). A corrente foi fixada em 120V e a corrida foi realizada por 2 horas.

Para a visualização das proteínas resolvidas no gel utilizou-se o procedimento de coloração *coomassie-blue*.

3.6 Coloração de gel com *Coomassie-blue*

Após a eletroforese o gel foi retirado do aparato e imerso em solução corante (0,2% de *coomassie-blue* R-250, 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de H₂O) por aproximadamente 10 minutos e lavado uma vez. Em seguida, para visualização das proteínas, adicionou-se solução descorante de gel (30% de etanol, 10% de ácido acético e 60% de H₂O), que foi trocada diversas vezes até que o gel adquirisse contraste suficiente para visualização das bandas equivalentes as proteínas resolvidas.

3.7 Seleção de peptídeos recombinantes

3.7.1 *Biopanning* (seleção de fagos)

Para seleção de fagos ligantes às IgAs de saliva de indivíduos com tuberculose foram utilizadas 10 μ L (2×10^{11} partículas virais) de uma biblioteca comercial de peptídeos randômicos fusionados no capsídeo de fagos (Ph.D.-12 da NEW ENGLAND BioLabs®Inc.). A biblioteca consistia de 12 aminoácidos randômicos entre duas seqüências espaçadoras curtas fusionados a região N-terminal da Proteína III (pIII) de bacteriófagos filamentosos M13. Todas as cinco cópias da pIII dos fagos continham peptídeos recombinantes. Foi utilizado para eluição dos fagos a solução de proteínas solúveis descritas no item 3.4.

Foram realizados três ciclos de seleção. Cada ciclo de seleção foi realizado utilizando uma placa de microtitulação (Nunc Immuno MaxiSorp, Roche Diagnostics), em que sensibilizou-se 5 poços com 150 μ L/poço (1 μ g/poço) das IgA purificadas, 3 com IgA de indivíduos negativos (IgA-), e 2 com IgA de indivíduos positivos para TB (IgA+), a 70 μ g/mL em tampão bicarbonato 0,1 M (pH 8,6) e incubada *overnight* a 4°C, sob agitação leve, bloqueada com 250 μ L de tampão de bloqueio (5% de Soro Albumina Bovina, BSA, em PBS) por uma hora a 37°C; e lavada seis vezes com PBST (PBS contendo 0,1%

Tween-20). Acrescentou-se no primeiro poço da placa, contendo IgA-, 10µL da biblioteca diluídos em 100µL de PBST (passo 01A) agitando-se por 40 min a temperatura ambiente (TA). Fagos não ligantes foram transferidos para outro poço contendo IgA- (passo 02), repetindo-se este procedimento por mais uma vez (passo 03), fagos não ligantes do 3º poço foram transferidos para o 4º poço contendo IgA+ (passo 04), para a seleção positiva, prosseguindo com incubação por 40 min a TA sob agitação, em seguida acrescentou-se 15,0µg extrato protéico de *Mycobacterium sp* (não tuberculosis) agitando por 40 min a TA, o que ficou em suspensão foi descartado (passo 05), fez-se 10 lavagens com PBST para eliminar os ligantes inespecíficos, e acrescentado 15,0µg extrato protéico de *Mycobacterium tuberculosis* (passo 06), incubando-se a TA, por 40 min sob agitação, o eluato foi transferido para outro poço contendo IgA+ (passo 07) repetindo-se o procedimento para seleção positiva (passos 08 e 09) (FIGURA 02).

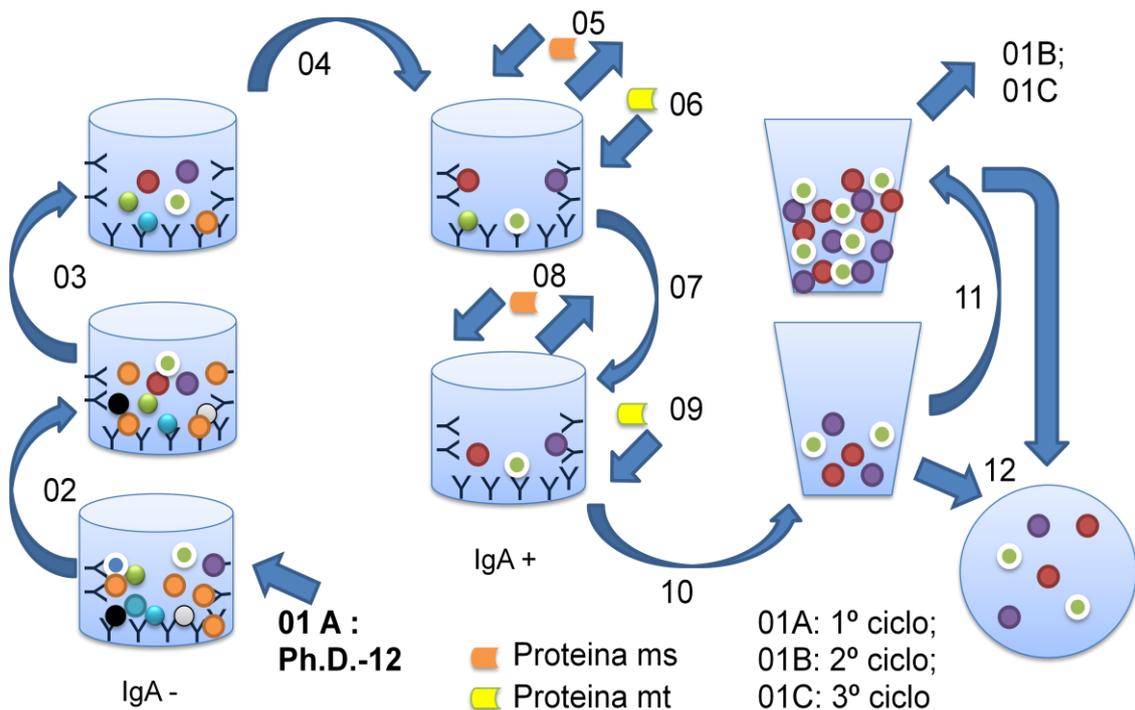


FIGURA 2: *Biopanning* (três ciclos A, B e C): biblioteca sendo submetida a três subtrações negativas (1, 2 e 3) com IgA (-) pra tuberculose. O remanescente em dupla triagem com IgA (+) para tuberculose (4 e 7) por eluição negativa com proteína de *Mycobacterium sp* (5 e 8) e eluição positiva com *M. tuberculosis* (6 e 9). Amplificação (11) e titulação (12) do eluato final (10).

Pequenas alíquotas do eluato final (passo 10) de cada ciclo foram utilizadas para a titulação (passo 12). O eluato remanescente foi amplificado (passo 11) da seguinte maneira: inicialmente retirou-se uma colônia (isolada) de *Escherichia coli* linhagem ER2738 previamente crescida em meio LB (0,2g LB + 20mL de água destilada e posterior esterilização) com tetraciclina, sob agitação a 37°C até a fase *early-log* ($OD_{600} \sim 0,3$) e acrescentando o eluato incubou-se a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação. A cultura foi submetida à centrifugação a 12300g por 10 min a 4°C e novamente centrifugada para total separação das bactérias. Logo após, o sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado e adicionou-se 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de polietilenoglicol 8000 e 2,5M de NaCl – solução estéril) incubando-se por 12-16 horas a 4°C.

Para a sedimentação dos fagos, centrifugou-se a solução a 12300g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e centrifugou-se, brevemente uma outra vez para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi suspenso em 1mL de PBS e precipitou-se novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl incubando em gelo por 1 hora. Centrifugou-se a 14000g por 10 minutos a 4°C descartando o sobrenadante e repetiu-se a centrifugação brevemente para remoção de sobrenadante residual com a pipeta. O precipitado foi ressuspenso em 200µL PBS, obtendo-se então o eluato amplificado, que foi posteriormente titulado (passo 12) e armazenado a 4°C, sendo parte deste utilizado no ciclo seguinte.

3.7.2 Titulações

A titulação foi realizada para determinar o número de entrada e saída das partículas virais durante os ciclos do *biopanning*.

A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriadas de 10 vezes em meio LB. Para eluatos não amplificados foram utilizadas as diluições de 10^{-1} até 10^{-4} ; e as soluções com fagos amplificados a faixa de diluição utilizada foi de 10^{-8} a 10^{-11} . Cada diluição foi acrescida de 200µL da cultura de ER2738 na fase *mid-log* ($OD_{600} \sim 0,5$). Esta mistura foi agitada brevemente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As células, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de agarose top a 45°C

e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido com IPTG/Xgal e tetraciclina. Para cada diluição foi confeccionada uma placa.

As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas. Após este período, contou-se as Unidades Formadoras de Placas (colônias azuis) multiplicando o número pelo fator de diluição de cada placa para obter o título dos fagos.

3.8 Extração de DNA de fagos

Para a extração do DNA dos fagos, 96 clones de fagos foram coletados aleatoriamente e transferidos individualmente para poços de 2mL de placas de cultura tipo *deepwell*, contendo 1,2mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* ($OD_{600} \sim 0,3$). A placa foi vedada com um adesivo próprio e incubada a 37°C, por 24 horas, sob vigorosa agitação (250 rpm).

Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 2127g, a 20°C, durante 10 minutos. Apenas 800µL do sobrenadante da centrifugação foram transferidos para novas placas e incubados por 10 minutos com 350µL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 2127g, a 20°C durante 40 minutos para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente e deu-se um pulso na placa invertida (a 99g) para eliminar o excesso de líquido, logo após adicionou-se 100µL de Tampão Iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0; 1mM de EDTA e 4M de NaI) ao precipitado de fagos.

As placas foram agitadas vigorosamente e, em seguida, acrescentou-se 250µL de etanol absoluto. Após uma incubação de 10 minutos, a TA, as placas foram centrifugadas a 2127g, 20°C, 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado de fagos foi lavado com 500µL de etanol 70% e novamente centrifugado a 2127g por 10min, a 20°C. O precipitado remanescente foi diluído em 30µl de água Milli-Q. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo.

3.9 Phage-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) contra proteínas de *Mycobacterium* sp

Um *screening* foi realizado para avaliar a reatividade dos clones selecionados frente ao alvo. Poços de uma Microplaca (Nunc Immuno Maxisorp) foram sensibilizados com 50µL de tampão Carbonato-Bicarbonato (50mM pH 9,6) contendo 1,0µg de extrato protéico de *M. tuberculosis* por poço, mantidos em repouso a 4°C, *overnight*, bloqueados com PBS acrescido de 5% de Soro Albumina Bovina, BSA, (PBS-BSA 5%) a 37°C por duas horas, lavados em seguida com PBST 0,1% (PBS acrescido de 0,1% de *Tween* 20). Acrescentou-se 100µL de sobrenadante da cultura de fagos, incubou-se a 37°C por 01 hora, em seguida lavou-se 6X com PBST 0,1%. Acrescentou-se 50µL de anticorpo monoclonal anti-M13 conjugado com peroxidase (GE Healthcare) na diluição de 1:5000 em PBS-BSA 5% e incubou-se por 01 hora a 37°C, em seguida lavou-se por 6X com PBST 0,1%. A reatividade foi obtida pela adição de 50 µL do substrato composto por tampão citrato-fosfato 0,5 M, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,03%, e orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL. A reação foi interrompida pela adição de 25µL ácido sulfúrico 2N. A leitura da absorbância foi realizada a 492nm em leitora de microplacas (*Thermoplate*).

3.10 Seqüenciamento

Na reação de seqüenciamento foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do *primer* -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3' - *Biolabs*) e *Premix* (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences*).

A reação de 35 ciclos foi realizada em um termociclador de placas (*MasterCycler - Eppendorf*) nas seguintes condições: desnaturaçãõ (a 95°C por 20 segundos), anelamento do *primer* (a 58°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). O DNA a ser seqüenciado foi precipitado com 1µL de acetato de amônio e etanol, homogeneizando a placa com leves batimentos. Então, foram acrescentados 27,5µL de etanol absoluto, em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 2127g. O sobrenadante foi descartado.

Adicionou-se 150µL de etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 10 minutos, a 2127g. A solução de etanol foi descartada, a placa

permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 99g, durante um segundo. A placa foi coberta por um papel alumínio durante cinco minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos no tampão de diluição (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences*).

A leitura do sequenciamento foi realizada em um seqüenciador automático *MegaBace 1000* (*Amersham Biosciences*) no laboratório de Genética Molecular (UFU).

3.11 Análise *in silico*

Após o sequenciamento, as sequencias dos insertos foram obtidas por busca simples e manual das sequencias inicial e final do vetor, no caso o bacteriófago M13. A predição das sequencias de aminoácidos foi realizada utilizando o programa de bioinformática Expasy disponível em (<http://web.expasy.org/translate/>). A similaridade entre os peptídeos selecionados e as proteínas depositadas foi realizada utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível em (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). BLAST é um conjunto de programas que comparam (alinham) as seqüências a serem investigadas com todas as depositadas nos bancos de dados de ácidos nucléicos e proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Dentro do *Blast* a busca foi realizada no “*Protein blast*” utilizando como database o “*Protein Data Bank proteins (pdb)*”, algoritmo - *blastp* (*protein-protein BLAST*) e restrita a *Mycobacterium tuberculosis* (taxid: 1773). Para o alinhamento tridimensional utilizou-se a ferramenta PEPITOPE SERVER em (<http://pepitope.tau.ac.il/>).

3.12 Phage-ELISA contra IgA de saliva

Após o sequenciamento e a caracterização molecular dos clones, cinco (G01, C10, E07, E11 e H11) considerados relevantes devido à similaridade a proteínas antigênicas de *M. tuberculosis*, foram selecionados para a avaliação quanto à imunorreatividade de cada um contra IgA presente na saliva, por meio de testes ELISA.

Para controle negativo, utilizou-se um clone irrelevante, selecionado para outros fins, totalizando seis clones foram re-amplificados, e precipitados com PEG/NaCl. Poços de microplacas (Nunc Immuno Maxisorp) foram sensibilizados com 50 µL de tampão Carbonato-Bicarbonato contendo 10^{10} ufp de clones dos fagos purificados por poço. As microplacas foram mantidas em repouso *overnight* a 4°C, decorrido este período, os poços foram lavados com PBST 0,1% e bloqueados com PBS-BSA 5% por 02 horas a 37°C. Em seguida foram novamente lavados por 6X com PBST 0,1% e acrescentou-se 50 µL de saliva diluída 1:10 em PBS-BSA 5%, incubou-se a 37°C por 01 hora, lavou-se por 6X com PBST 0,1% acrescentando, em seguida, 50 µL de anti-IgA humana conjugada com peroxidase, específica de cadeia alfa, diluídas a 1:1000 em PBS-BSA 5%, incubou-se por 01 hora a 37°C, e depois lavadas 6 X com PBST 0,1%. A reatividade foi obtida pela adição de 50 µL do substrato composto por tampão Citrato-Fosfato, Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) e orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL. A reação foi interrompida pela adição de 25 µL ácido sulfúrico 2 N. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas (*Thermoplate*).

3.13 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism para Windows, versão 5.0 (GraphPad Software Inc.). Foram realizados os testes Kruskal-wallis (One-way ANOVA), Kolmogorov-Sminov with Dallal-Wikinson-Lilliefor P value (Column statistics) para verificar a normalidade dos dados.

4. Resultados

4.1 Caracterização das amostras

As amostras foram coletadas em um período de 15 meses e totalizaram 55 amostras, que foram agrupadas de acordo com o diagnóstico para TB, tempo de tratamento e reatividade ao teste tuberculínico, conforme a TABELA 02.

TABELA 02: Distribuição das amostras segundo critério de diagnóstico tempo de tratamento

PNT	Diagnóstico positivo para tuberculose primária ou recidiva, virgem de tratamento (de 0 a 30 dias de tratamento).
PT	Diagnóstico positivo para tuberculose, em percurso de tratamento (01 a 06 meses de tratamento)
NP+	Indivíduos aparentemente saudáveis, reativos ao PPD
NP-	Indivíduos aparentemente saudáveis, não reativos ao PPD.

Na TABELA 03 está representada a caracterização das amostras quanto aos dados epidemiológicos e forma da doença

TABELA 03: Dados epidemiológicos das amostras

	n	Idade Média	Sexo (%)		Forma da Doença	
			F	M	TBP*	ETBP*
PNT	14	48	50	50	9	5
PT	17	54	35	65	12	5
NP+	11	45	18	82	-	-
NP-	13	43	23	77	-	-
Total	55	49	33	67	21	10

* TBP: Tuberculose Pulmonar; ETBP: Tuberculose Extrapulmonar.

4.2 Purificação de IgA

Saliva de 07 indivíduos do grupo PNT e de 07 do grupo NP- foram utilizadas para a purificação de IgA, por imunoprecipitação com microesferas magnéticas ativadas com proteína G, acopladas a um anti-IgA humana.

A utilização de microesferas magnéticas foi importante, pois trata-se de uma metodologia rápida e eficaz na obtenção de imunoglobulinas de boa qualidade e excelente grau de pureza utilizando-se pequeno volume da amostra biológica.

4.3 Biopanning e Titulações

A seleção dos peptídeos ligantes aos anticorpos anti-proteínas de *M. tuberculosis* foi realizada utilizando uma biblioteca de 12 peptídeos expressos na superfície de fagos filamentosos M13. A especificidade dos peptídeos foi assegurada pelas três subtrações negativas utilizando IgA de indivíduos saudáveis, e também pelas duas eluições negativas utilizando extrato protéico de *Mycobacterium sp (não tuberculosis)* descartando possíveis ligantes não relacionados à tuberculose, finalizando o processo com a eluição positiva com extrato protéico de *Mycobacterium tuberculosis*

A quantidade de fagos selecionados durante os três ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificado e não amplificado de cada ciclo (TABELA 04). Os títulos de entrada dos fagos no “*biopanning*” foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade ao alvo permaneceram ligados por interação peptídeo/anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade foram removidos durante as lavagens. Os títulos de entrada e saída indicam a eficiência do processo de amplificação e seleção.

TABELA 04: Títulos de fagos de entrada e saída do Biopanning

Ciclo/Estrigência	Seleção para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
	Número de partículas	
	Entrada	Saída
1º Ciclo/ 0,1% tween	$2,0 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^1$
2º Ciclo/ 0,1% tween	$2,0 \times 10^{13}$	$2,0 \times 10^3$
3º Ciclo/ 0,1% tween	$1,2 \times 10^{12}$	$8,0 \times 10^1$

4.4 Extração de DNA de fagos

Uma amostra de DNA extraído dos fagos foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, para verificar sua qualidade e estimar sua quantidade, comparando a intensidade das bandas das amostras com a intensidade da banda do DNA padrão, o qual continha uma massa de 200ng (FIGURA 03). Em seguida o DNA foi seqüenciado e analisado.

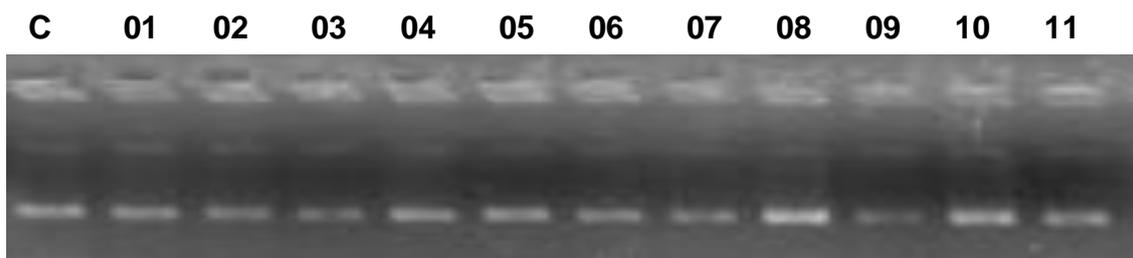


FIGURA 03: Eletroforese em gel de agarose 0,8% de 12 amostras de DNA extraído de fagos (1-12) aleatoriamente escolhidos e de 200ng de DNA controle (C) com 7249pb.

4.5 Sequenciamento

Quarenta e oito clones mais reativos no *phage*-ELISA foram escolhidos para o sequenciamento, obtendo-se 20 sequencias válidas, isto é, sem erro de sequenciamento, sendo 16 distintas entre si. Após a tradução e análise de similaridade linear e alinhamento tridimensional dos peptídeos pelos programas Expasy, Blast e Pepitope Server, 09 peptídeos apresentaram similaridade e alinhamento com proteínas de importante valor analítico. Sobretudo, cinco sequencias alinharam com proteínas conhecidas por seu papel na virulência e patogenia do *M. tuberculosis*, codificadas na Região de Diferenciação (RD1) de *Mycobacterium sp*. (TABELA 05). O alinhamento tridimensional para três clones está representado em vermelho nas estruturas proteicas 3D; clone G01 (Fig. 4A), C10 (Fig. 4B) e E11 (Fig. 4C). Para os clones E07 e H11 não foi possível a visualização do alinhamento 3D, em virtude de não haver estruturas tridimensionais resolvidas em bancos de dados.

TABELA 05: Frequencia das sequencias peptídicas e alinhamento com proteínas antigênicas de *M. tuberculosis*.

Peptídeo	Frequência	Provável proteína	Identidade	Score
G01	5/20	Solution Structure Of The Cfp-10. Esat-6 Complex. Major Virulence Determinants Of Pathogenic Mycobacteria	4/7 (57%)	18
C10	1/20	Structure Of The Cfp10-Esat6 Complex From <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5/7 (71%)	33
E07	1/20	PE PGRS family protein [Mycobacterium tuberculosis CDC1551]	7/10 (70%)	45
E11	1/20	Resuscitation-promoting factor rpfE [Mycobacterium tuberculosis SUMu001]	4/4 (100%)	35
H11	1/20	PE-PGRS family protein [Mycobacterium tuberculosis T92]	6/8 (75%)	45

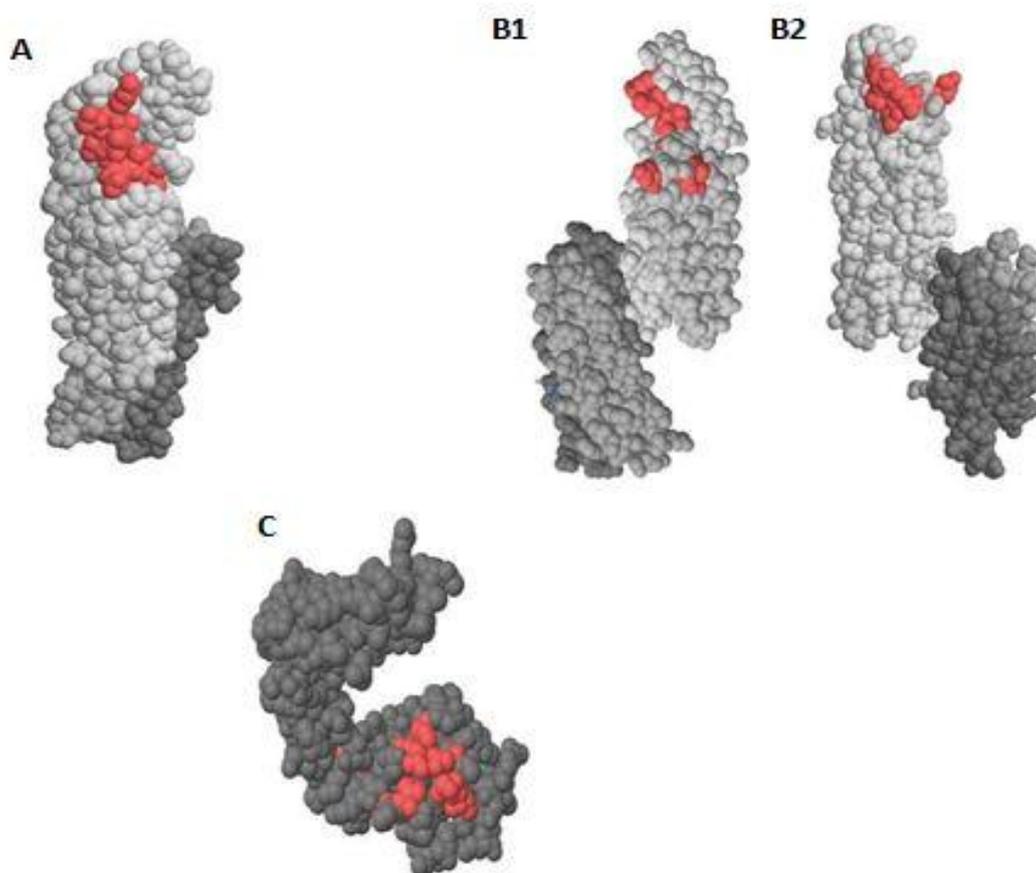


FIGURA 04: Alinhamento tridimensional; A) estrutura molecular do complexo Cfp-10/Esat-6 com destaque para a região de similaridade com o clone G01; B1) estrutura molecular do complexo Cfp-10/Esat-6 com destaque para a região de similaridade com o clone C10; B2) visão em ângulo de 180° da estrutura demonstrada em B1; C) estrutura molecular do *Resuscitation-promoting factor* com destaque para a região de similaridade com o clone E11.

4.6 Imunorreatividade

Os cinco clones de maior interesse, devido às características de similaridade das moléculas, descritos na TABELA 05, e um clone irrelevante foram avaliados quanto à reatividade em testes ELISA frente a IgA de saliva. Os níveis de IgA presente nas salivas foram mensuradas pela absorbância (OD_{492}) e estão demonstrados na FIGURA 05, foram consideradas amostras individuais dos quatro grupos de indivíduos: PNT, PT, NP+ e NP-.

Todos os peptídeos selecionados foram capazes de discriminar significativamente as salivas positivas de negativas para tuberculose ($P < 0,05$), com maior ênfase para o clone C10 que apresentou melhor reatividade. Os valores obtidos no cálculo da área das curvas ROC, representada nos gráficos da FIGURA 06, foram maiores que 0,9, sugerindo que os peptídeos discriminam satisfatoriamente os indivíduos positivos dos negativos para a TB.

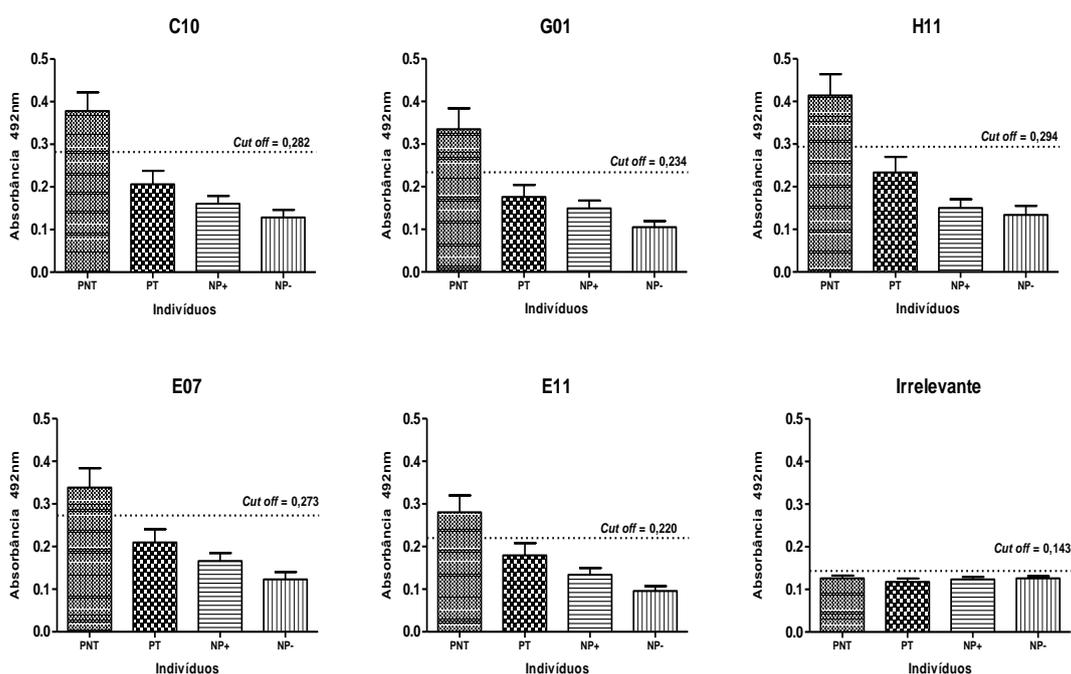


FIGURA 05: Avaliação em phage-ELISA da reatividade dos clones selecionados frente a saliva de pacientes doentes não tratados (PNT), doentes em tratamento (PT), indivíduos sadios PPD+ (NP+) e indivíduos sadios PPD- (NP-).

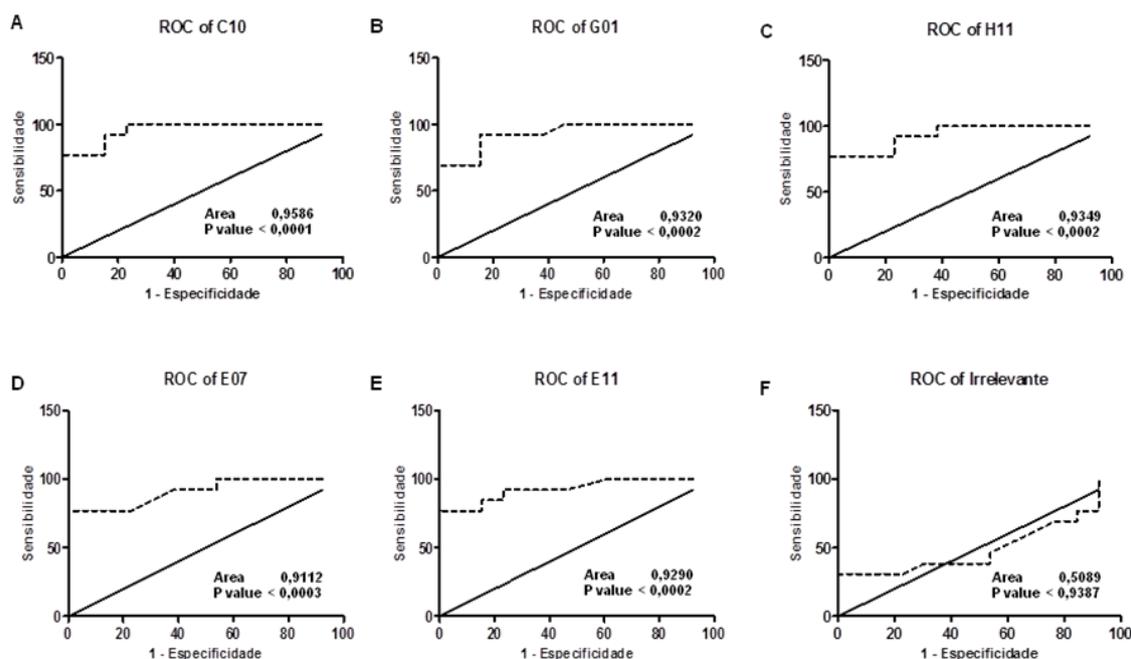


FIGURA 06: Representação das curvas ROC geradas a partir do *phage*-ELISA, com o valor da área obtida por cada clone e seus respectivos valor de P.

Os testes apresentaram sensibilidade de 100% para os cinco clones e especificidade de 77% para os peptídeos C10, E07 e H11 e de 69% para os clones G01 e E11, como mostra a TABELA 06

TABELA 06 : Valores de sensibilidade e especificidade obtidos nos testes ELISA na detecção de anticorpos IgA anti-*Mycobacterium tuberculosis* em amostras de saliva.

Clones	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
C10	100	76,9
G01	100	69,2
H11	100	76,9
E07	100	76,9
E11	100	69,2

A análise de regressão linear que avaliou o perfil de respostas dos indivíduos positivos tratados e não tratados, grupos PT e PNT, em função do tempo de tratamento, mostrou uma tendência a declínio nos valores da absorbância (FIGURA 07). O maior declínio foi observado no clone C10.

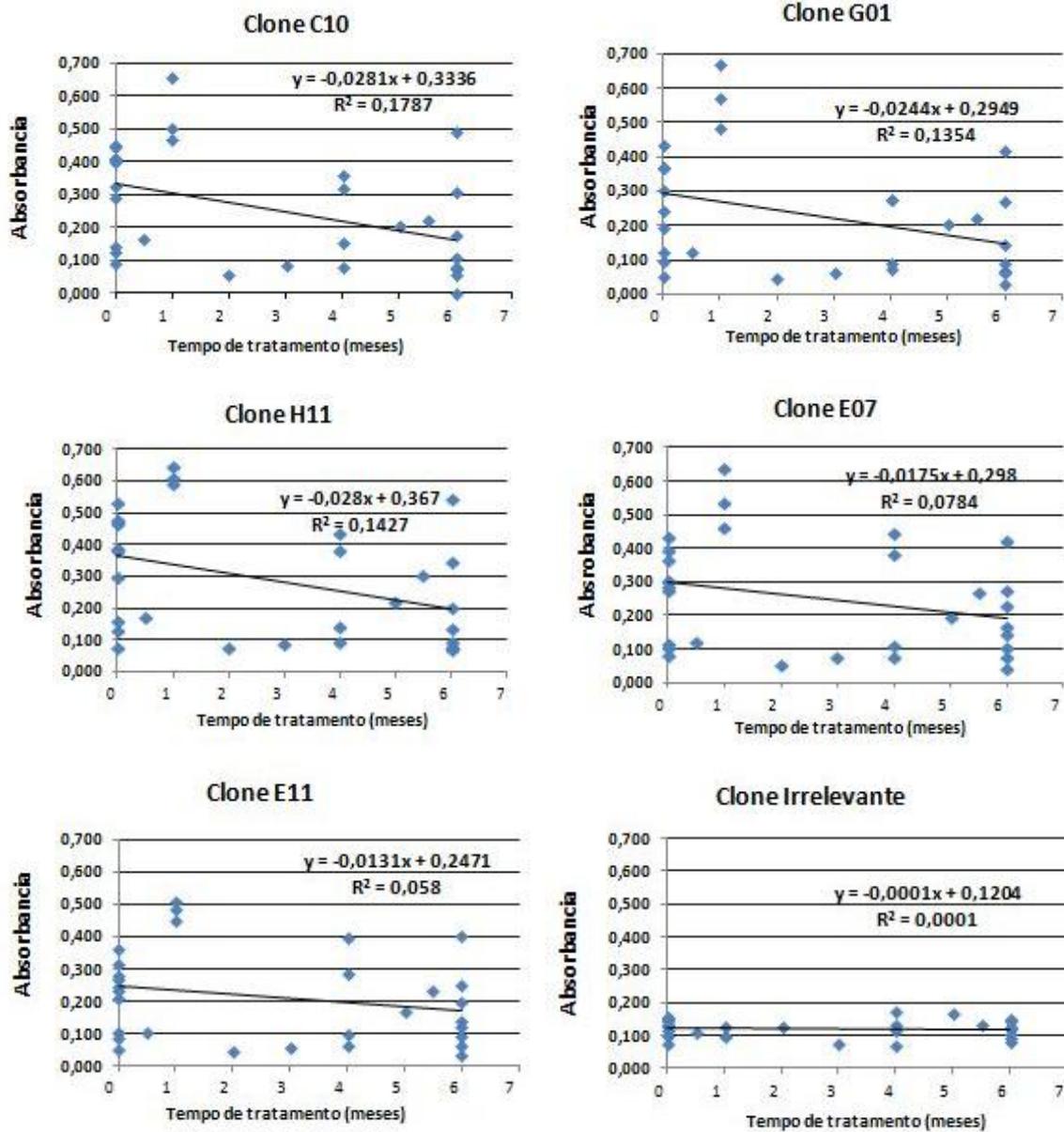


FIGURA 07: Análise da regressão linear e do coeficiente de determinação da reatividade dos clones em função do tempo de tratamento.

5. Discussão

A tecnologia de *phage display* é uma importante ferramenta, que tem sido amplamente usada para seleção de diversificados ligantes para diferentes finalidades (BRATKOVIČ, 2009; KALANTRI, 2005). Os resultados obtidos por esta tecnologia, demonstrados em pesquisas realizadas por outros pesquisadores e também neste trabalho evidenciam a eficiência metodológica (BARENHOLZ *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2006; GEVORKIAN *et al.*, 2005). A tecnologia de *phage display* representa, sem dúvida, um grande avanço para a comunidade científica (BRATKOVIČ, 2009)

A estratégia utilizada no *biopanning* se mostrou eficiente para seleção de clones de alta afinidade. As possibilidades de seleção de peptídeos inespecíficos, característicos de outras patologias e micobacterioses atípicas foram minimizadas pelo acirramento do processo de seleção em cada etapa dos ciclos. Esta realizada a partir de IgA de saliva de indivíduos com tuberculose, com sucessivas subtrações negativas utilizando amostras negativas para tuberculose, e ainda dupla eluição negativa com extrato protéico de *Mycobacterium* sp (não tuberculosis) e dupla eluição positiva com extrato protéico de *M. tuberculosis* o que permitiu garantir de especificidade de maneira eficaz.

Deve-se considerar também a importância dos critérios de triagem de amostras para a realização do *biopanning*, as quais foram caracterizadas a partir de um diagnóstico bem definido e agrupadas com a finalidade de obtenção de um padrão homogêneo quanto a forma da doença e ausência de tratamento para as amostras positivas e ausência de qualquer sintoma clínico e não reatividade ao teste tuberculínico (PPD) para as amostras negativas.

A saliva foi escolhida, neste ensaio, por suas características físico-químicas favoráveis, das quais podemos enumerar a representatividade peculiar da saliva do real estado do organismo, conferido pela atividade constante das glândulas salivares; a disponibilidade de Imunoglobulinas A em níveis satisfatórios para a realização dos testes propostos; a viabilidade de coleta não invasiva; o risco biológico menor quando comparado a outros espécimes clínicos (LAWRENCE, 2002; TABAK, 2001). Até o momento não há descrição de outro trabalho similar utilizando IgA de saliva contra miméticos de *M. tuberculosis* por *phage display*.

Foram obtidos 20 clones com sequências válidas e similares a proteínas de *M. tuberculosis* de interesse diagnóstico, 16 distintas entre si. Dentre as sequências válidas nove se alinharam com componentes da célula micobacteriana, que os caracterizam como peptídeos com potencial valor diagnóstico, entretanto, apenas cinco sequências se alinharam com proteínas já conhecidas por sua antigenicidade e por conferirem maior virulência bacteriana.

A escolha destes clones se baseou no fato de serem similares a proteínas codificadas na Região de Diferenciação RD1, ausente no Bacilo de Calmette Guérin (BCG), Cfp-10/Esat-6 e *PE-family protein*, e ao *resuscitation-promoting factor*, de forma a garantir a busca mais utilitária de dados que melhor caracterizassem a TB ativa, afastando a possibilidade de infecção latente e a não infecção.

Os testes ELISA, que avaliaram a reatividade destes clones contra IgA em saliva de cada indivíduo, apresentaram diferenças significativas comparando-se amostras positivas e negativas, além de apresentarem diferença gradativa entre os pacientes com tuberculose relacionando-os entre si em função do tempo de tratamento, sugerindo que estes clones são potenciais marcadores de tratamento, como se pode observar nas linhas de tendência na FIGURA 07.

Embora os clones G01 e C10 sejam similares a regiões distintas do mesmo complexo antigênico, Cfp-10/Esat-6, C10 apresentou melhores resultados em relação a G01, ambos com excelente desempenho medido pelo valor da área da curva ROC, maior que 0,9 (FIGURA 06), discriminando satisfatoriamente indivíduos positivos de negativos, valor de $p < 0,05$. Comparando os dois clones, verifica-se que a diferença na reatividade pode estar diretamente relacionada ao percentual de identidade, C10 71% e G01 57% (TABELA 05), e também à superfície de ligação, em que o mimetopo C10, conforme demonstrado nas FIGURAS 4A, 4B1 e 4B2 apresenta maior exposição ao anticorpo, tanto pela região de localização no complexo proteico, quanto pela disposição da superfície.

Cfp-10/Esat-6 são proteínas altamente antigênicas secretadas pelo *M. tuberculosis* que com a alteração de pH se dissociam e atuam nos mecanismos de escape da resposta imune. Dissociada a molécula Esat-6 é capaz de

romper a membrana citolítica, desestabilizar e lisar os lipossomos através de associação com colesterol e desta forma impedir a maturação do fagossomo, lisar a membrana de macrófagos pela formação de poros ou pela sua inserção na bicamada lipídica (BEHAR, 2008; TAN, *et al.*, 2006; DE JONGE, *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos com os cinco clones sugerem a importância da aplicação destes mimetopos em plataformas diagnósticas, capazes de distinguir indivíduos vacinados não infectados, indivíduos infectados e indivíduos com TB ativa.

O clone E11 apesar de apresentar 100% de identidade quanto à similaridade essa identidade corresponde a apenas 4 aminoácidos (TABELA 5), diminuindo a superfície de interação com o anticorpo e como pode se observar na FIGURA 4C a região mimética exposta é restrita. Os clones H11 e E07 apresentaram maior intervalo de aminoácidos similares e maior percentual de identidade. Os três clones apresentaram ótimo desempenho quanto imunorreatividade e podem discriminar com precisão indivíduos positivos de negativos, apresentando uma área sob a curva ROC com valores maiores que 0,9 e $P < 0,05$ (FIGURA 06).

Os testes atualmente utilizados, embora tenham boa especificidade, não atendem satisfatoriamente quanto à sensibilidade, e dependendo da qualidade da amostra biológica a sensibilidade pode ser ainda menor (JULIA *et al.*, 2004; GOLETTI *et al.*, 2006). Embora cresça o interesse em buscar testes sorológicos, utilizando diversos tipos de antígenos de *M. tuberculosis*, em especial aqueles capazes de diferenciar as cepas virulentas, os resultados indicam baixa sensibilidade e especificidade relativa (SENOL *et al.*, 2007; SHARMA, *et al.*, 2006; TAVARES *et al.*, 2006; HOUGARDY *et al.*, 2007; JULIAN *et al.*, 2002). Os clones selecionados apresentaram sensibilidade de 100% com uma especificidade de 77% para os clones C10, E07 e H11 e 69% para os clones G01 e E11, atendendo a recomendação (acima de 60%) da Organização Mundial de Saúde para testes de *screening* inicial (WHO, 2006), reforçando que nossos clones são potenciais marcadores de diagnóstico rápido, viável economicamente, sensíveis e específicos, e também poderão ser utilizados como marcadores de resposta ao tratamento.

Os valores do coeficiente de determinação e a tendência ao declínio nos valores da reta sugerem que os clones, especialmente os C10, G01 e H11, merecem maior atenção e avaliação minuciosa com um número maior de amostras de forma a testar sua aplicação como marcadores de resposta ao tratamento. Ao analisar os valores de r^2 é importante considerar que existem diferentes formas da doença, aliada a divergência da resposta ao tratamento inerente a cada indivíduo, além da alta probabilidade da ocorrência de cepas resistentes aos fármacos que não foram devidamente avaliadas laboratorialmente, sugerindo um acompanhamento mais detalhado da resposta frente ao tratamento e identificação das cepas, num estudo de “*coorte*”.

6. Conclusões e Perspectivas

Cinco mimetopos foram selecionados por *phage display* com alta reatividade à IgA da saliva de pacientes com TB, mimetizado provavelmente o complexo CFP10-ESAT6 da região de virulência RD1 da bactéria *M. tuberculosis*.

Estes clones foram utilizados diretamente como reagentes em ensaios ELISA com sensibilidade de 100% e especificidades acima de 69%, indicando sua utilização potencial como biomarcadores de TB ativa.

Este é o primeiro trabalho que identifica potenciais biomarcadores para o diagnóstico na saliva de pacientes com TB, e conseguem distinguir com sucesso a TB ativa da infecção latente, além da possibilidade de seu uso no monitoramento do tratamento. Estes biomarcadores poderão ser otimizados em diferentes plataformas diagnósticas para testes rápidos no *screening* de pacientes com tuberculose.

7. Referencias bibliográficas

_____. MS 2010 Vigilância, S. D., Nacional, P., & Controle, D. Brasília-DF.

_____. MS,2002. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília-DF

AHMAD, S. (2011). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical & developmental immunology*, 2011, ID 814943.

AKHTER, Y., TUNDUP, S., HASNAIN, S.E, (2007). Novel biochemical properties of a CRP/FNR family transcription factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Medical Microbiology* 297, 451-457.

ARAP, M.A. (2005) Phage display technology - Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 1, p. 1-9,

BARBAS, C.F.III, *et al.*, Phage Display: A Laboratory Manual. Plain View, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

BARENHOLZ, A., *et al.*, (2007). A peptide mimetic of the mycobacterial mannosylated lipoarabinomannan: characterization and potential applications. *Journal of medical microbiology*, 56(Pt 5), 579-86.

BELAY, M., BJUNE, G., & AMEN, G. (2011). Serodiagnostic Performance of Resat-6-CFP-10 in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Ethiopia. *Mycobacterial Diseases*, 01(02), 1-7.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 19, p. 1-33, 2001.

BRATKOVIČ, T. (2009). Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 3, 749-767.

BRIGIDO, M.M., MARANHAO, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 26, 2002.

CABRAL, V. R., *et al.* (2010). Heterogeneity in human IFN- γ responses to clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains, *J Bras Pneumol*. 36(4), 494-497.

CARVALHO, W.S. *et al.*, 2007. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 43, São Paulo.

COLLINS, K. R. *et al.*, (2002). Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Quasispecies at the Sites of *Mycobacterium tuberculosis* Infection Contribute to Systemic HIV-1 Heterogeneity. *Society*, 76(4), 1697-1706.

DE JONGE, M. I., *et al.* (2007). ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of bacteriology*, 189(16), 6028-34.

DUTTA, N.K., MAZUMDAR, K., DASTIDAR, S.G., 2007. Activity of diclofenac used alone and in combination with streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30, 336–340.

GEVORKIAN, G., *et al.*, (2005). Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. *The Biochemical journal*, 387(Pt 2), 411-7.

GOLETTI, D. *et al.*, (2006). Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(6), 544-50.

HAARD, H., HENDERIKX, P., HOOGENBOOM, H.R. Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 31, p. 5-31, 1998.

HETT, E. C., *et al.*, (2007). A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 66(October), 658-668

HORNUM M, *et al.* (2008) Limitations of the QuantiFERON-TB Gold test in detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection in immunocompromised patients. *Eur J Intern Med* 2008;19:137–9

HOUGARDY, J.M., *et al.*, 2007. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 176 (4), 409-16.

JULIA, E., *et al.*, 2002. Serodiagnosis of Tuberculosis: Comparison of Immunoglobulin A (IgA) Response to Sulfolipid I with IgG and IgM Responses to 2,3-Diacyltrehalose, 2,3,6-Triacyltrehalose, and Cord Factor Antigens. *Journal of clinical microbiology*. 40(10,) 3782–8

JULIA, E., MATAS, L., & LUQUIN, M. (2004). Comparison of Antibody Responses to a Potential Combination of Specific Glycolipids and Proteins for Test Sensitivity Improvement in Tuberculosis Serodiagnosis. *Society*, 11(1), 70-76.

KALANTRI, S., *et al.*, (2005). Bacteriophage- based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and meta- analysis. *BMC infectious diseases*, 5, 59.

LARREA, C. F. D, *et al.*, (2006). The secretory immunoglobulin A response to *Mycobacterium tuberculosis* in a childhood population - Resposta da imunoglobulina A secretória ao *Mycobacterium tuberculosis* em população infantil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(5), 456-461.

LAWRENCE, H. P. (2002.). Salivary Markers of Systemic Disease : Noninvasive Diagnosis of Disease and (Marqueurs salivaires des maladies systémiques : méthode non *invasive de*). *J Can Dent Assoc* 68(3):170-4

MELO, F.A.F., *et al.*, Tuberculose. In: VERONESI, R. *Tratado de Infectologia* editor científico FOCACCIA, R. 3^a ed. São Paulo. Atheneu. 2005. Cap.70, p.1141-1208.

MUKHERJEE, P. *et al.*, (2007). The RD1-encoded antigen Rv3872 of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential candidate for serodiagnosis of tuberculosis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(2), 146-52.

PARMLEY, S., SMITH, G. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, v. 73, p. 305–318, 1988.

PHIZICKY, E.M., FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol*, v. 59, p. 94-123, 1995.

POTTUMARTHY, S., WELLS, V. C., & MORRIS, A J. (2000). A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 38(6), 2227-31.

PYDI, S. S., *et al.*, (2011). Vaccine for tuberculosis: up-regulation of IL-15 by Ag85A and not by ESAT-6. *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland), 91(2), 136-9. Elsevier Ltd.

RIBEIRO, V. S. *et al.*, (2010). Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. *Immunology letters*, 134(1), 69-74.

SANT'ANNA, C.C. & HIJJAR, M.A., 2007. Recente contribuição da Organização Mundial de Saúde para o controle da tuberculose na infância. *Rev Saúde Pública* 41(Supl. 1),117-120

SENOL, G., *et al.*, 2007. Humoral immune response against 38-kDa and 16-kDa mycobacterial antigens in tuberculosis. *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 29 (1), 143-8.

SHARMA, A. *et al.*, (2006). Specific and randomly derived immunoactive peptide mimotopes of mycobacterial antigens. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 13(10), 1143-54.

SIQUEIRA, H. R. D. *et al.*, 2009. Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of the katG gene, *J Bras Pneumol*. 35(8), 773-779.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

STEPHEN, C.W., HELMINEN, P., LANE, D.P. Characterization of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol*, v. 248, n. 1, p. 58-78, 1995.

STRECKFUS, C. F., & BIGLER, L. R. (2002). Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Diseases*, (September 2001), 69-76.

TABAK, L. A., & Ph, D. (2001). A Revolution in Biomedical Assessment : The Development of Salivary Diagnostics. *Journal of Dental Education*, (December), 1335-1339.

TAN, T., *et al.*, (2006). The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cellular Microbiology*, 8(9), 1417-29.

TAVARES, R. C. O., *et al.*, 2006. Cell proliferation and interferon-gamma response to recombinant MBP-3, NarL, MT-10.3, and 16 kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Brazilian tuberculosis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 101(8), 857-861

TEIXEIRA, H. C., ABRAMO, C., & MUNK, M. E. (2007.). Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso* .Artigo de Revisão. *J Bras Pneumol*. 2007;33(3):323-334

WAYNE L G 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and Latency of disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 3, 908-914.

WONG, D. T. 2006. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics *J Am Dent Assoc*. 137;313-321

WOODWORTH , J.S., FORTUNE, S. M., BEHAR, S. M. 2008.Bacterial Protein Secretion Is Required for Priming of CD8+ T Cells Specific for the *Mycobacterium tuberculosis* Antigen CFP10. *Infection and Immunity*. 76(9) 4199–4205

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Tropical Diseases Research Global agenda for TB control. In: *Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential*. ed. FIND SA. *Geneva,Switzerland*. 2006: 20-30

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Tropical Diseases Research Improving the technology. In: *Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential*. ed. FIND SA. *Geneva,Switzerland*. 2006: 73-89

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Tropical Diseases Research Overview of current TB diagnostics. In: *Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential*. ed. FIND SA. *Geneva,Switzerland*. 2006: 32-47

ZHANG, H., et al. (2006). PPE protein (Rv3425) from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis*: a potential B-cell antigen used for serological diagnosis to distinguish vaccinated controls from tuberculosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 139–145.



ANEXO A

**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Laboratório de Nanobiotecnologia**

Campus Umuarama – Bloco 2E, Sala 24
38400-902 - Uberlândia-MG - FONES: (034) 3218-2478 – ueira@ingeb.ufu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “**Seleção e Caracterização Molecular e Imunológica de Biomarcadores Aplicados em Processos Nanotecnológicos no Diagnóstico da Tuberculose**”, sob a responsabilidade dos seguintes pesquisadores: Dr. Marcelo Simão Ferreira, Dr. Aécio Sebastião Borges, Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira.

O projeto refere-se ao estudo de peptídeos ligantes e na possível obtenção de biomarcadores que possam identificar anticorpos envolvidos na resposta imune contra tuberculose (TB). A obtenção de biomarcadores que sirvam tanto como alvos diagnósticos quanto alvos terapêuticos para tuberculose podem melhorar significativamente a qualidade de vida dos indivíduos portadores dessa patologia.

O paciente poderá encaixar-se em um dos dois grupos seguintes: casos (diagnóstico confirmado para TB) e controles (ausência da infecção e doença). Para realização dos exames laboratoriais, será necessária a coleta de uma amostra de sangue (8 mL), uma amostra de saliva (2 mL). Esse procedimento será realizado conforme recomendação clínica e não será de forma alguma alterado para a realização desta pesquisa. As amostras de sangue e saliva serão utilizadas somente para a pesquisa, e trata-se de um procedimento de coleta seguro que será realizado por um profissional experiente da equipe de pesquisadores.

Não haverá, portanto, risco ao paciente. O material coletado será enviado ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizadas extrações de DNA e proteínas.

As responsáveis pela coleta do material serão: a aluna de doutorado Fabiana de Almeida Araújo Santos e os alunos de mestrado Léa Duarte da Silva Moraes, Sebastião Marcos Tafuri. Estes também ficarão responsáveis pela aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os resultados da pesquisa serão publicados, mas em nenhum momento as pessoas que participarem da pesquisa serão identificadas. Não haverá gasto financeiro para quem aceitar participar, nem direito a pagamento pela sua participação.

É direito do paciente pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultado dos exames realizados. Informações adicionais poderão ser obtidas no seguinte endereço: Av. Amazonas, s/n, Bloco 2E, Sala 24, Campus Umuarama – Telefone: 3218-2478 (falar com Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira).

Os pacientes que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio e com a garantia de que seu material biológico será descartado.

Pelos presentes termos apresentados por este documento, concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Uberlândia, de de 20.....

Pesquisador responsável pela coleta do Termo de Consentimento

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa ou representante legal

ANEXO B1

DIRETORIA DE
GESTÃO DE PESSOAS
E EDUCAÇÃO EM SAÚDE

SECRETARIA MUNICIPAL DE
SAÚDE

PREFEITURA DE
UBERLÂNDIA
NOSSA CIDADE CADA VEZ MELHOR

PROJETO DE PESQUISA NA REDE DA SMS

Formulário de Solicitação

Nome do Projeto: *Seleção e Caracterização Molecular e Imunológica de Biomarcadores Aplicados em Processos Nanotecnológicos no Diagnóstico da Tuberculose.*

Área da Pesquisa: Ciências da Saúde

Instituição Responsável: Universidade Federal de Uberlândia

Orientador (a): Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Pesquisadores: Léa Duarte da Silva Morais
Sebastião Marcos Tafuri

Órgão (s) da Secretaria Municipal de Saúde onde será realizada a Pesquisa: Programa de Tuberculose

Aprovação pelo Setor no qual será realizada a pesquisa.	Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Data: 29/08/11	Assinatura:  André Vitorino Vieira GERÊNCIA DE ESTÁGIOS Diretoria de Gestão de Pessoas, do Trabalho e Educação em Saúde / SMS - Uberlândia - MG.
Aprovação pelo Setor de Estágios e Pesquisas.	Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Data: 29/08/11	Assinatura:  André Vitorino Vieira GERÊNCIA DE ESTÁGIOS Diretoria de Gestão de Pessoas, do Trabalho e Educação em Saúde / SMS - Uberlândia - MG.

A liberação da realização do projeto nas Unidades do Serviço Municipal de Saúde está condicionada:

- Doação de um exemplar do trabalho finalizado para o Centro de Documentação – SMS;
- Participação no Forum de Projetos e Pesquisas realizado na rede SUS Municipal;
- Ao término do projeto, informar à Diretoria de Gestão de Pessoas a conclusão do mesmo.

A Pesquisa só poderá ser iniciada após aprovação na Comissão de Ética em Pesquisa – CEP.

Assinatura do pesquisador: 

Data: ____/____/____

ANEXO B2



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Avila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 457/10 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
123/10

Projeto Pesquisa: Seleção e caracterização molecular e imunológica de biomarcadores aplicados em processo nanotecnológicos da Tuberculose.

Pesquisador Responsável: Carlos Ueira Vieira

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito da pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de entrega do relatório parcial: Agosto de 2011.

Data de entrega do relatório final: Dezembro de 2012.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 23 de julho de 2010

Prof. Dra. Sandra Terozinha de Farias Furtado
Coordenadora CEP/UFU

ANEXO B3

Uberlândia, 21 de setembro de 2011.

Ilma. Coordenadora do CEP/UFU

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado

Prezada Professora:

Vimos pela presente solicitá-la um adendo ao projeto de pesquisa de n.º 123/10 aprovado em 23/07/2010, relativo ao Item 2.2, que trata dos locais de coleta de amostras biológicas (Sangue e Saliva) inclusos na casuística do projeto. Pretende-se estender a coleta de amostras às Unidades do Serviço Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Uberlândia que atende aos pacientes inclusos no Programa Nacional de Controle à Tuberculose (PNCT) tais como: UBS, UAI, PSF, Penitenciárias e Residências acompanhados dos executores do programa (Médicos, Enfermeiros, Serviço Social).

Justificamos tal adendo pelo número insuficiente de pacientes com tuberculose ativa atendidos no departamento de Moléstias Infecciosas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC).

Na certeza de sermos compreendidos e atendidos, aguardamos vosso manifesto.

Pesquisadores responsáveis pela coleta: Léa Duarte da Silva Morais e Sebastião Marcos Tafuri.

Desde já agradecemos.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

ANEXO B4



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Neves de Ávila, nº 2121 - Bloco A - sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3239-4131

ANÁLISE FINAL Nº. 660/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O ADENDO AO PROTOCOLO REGISTRO
CEP/UFU 123/10

Projeto Pesquisa: "Seleção e caracterização molecular e imunológica de biomarcadores aplicados em processo manotecnológicos no diagnóstico da Tuberculose".

Pesquisador Responsável: Carlos Ueira Vieira

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do adendo ao protocolo de pesquisa proposto.
O adendo ao protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

SITUAÇÃO: ADENDO AO PROTOCOLO APROVADO

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 21 de outubro de 2011.

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU