

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

SEBASTIÃO MARCOS TAFURI

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADOR APLICÁVEL
EM PLATAFORMAS NANOTECNOLÓGICAS PARA O
MONITORAMENTO DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

**UBERLÂNDIA
2013**

SEBASTIÃO MARCOS TAFURI

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADOR APLICÁVEL
EM PLATAFORMAS NANOTECNOLÓGICAS PARA O
MONITORAMENTO DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

**Dissertação apresentada ao
programa de Pós Graduação em
Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Uberlândia, como
requisito parcial para obtenção
do título de mestre em Ciências
da Saúde.**

**Área de concentração: Ciências
da Saúde**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos
Ueira Vieira**

**Coorientadora: Dra. Fabiana de
Araujo Santos**

**UBERLÂNDIA
2013**

SEBASTIÃO MARCOS TAFURI

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADOR APLICÁVEL
EM PLATAFORMAS NANOTECNOLÓGICAS PARA O
MONITORAMENTO DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

**Dissertação apresentada ao
programa de Pós Graduação em
Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Uberlândia, como
requisito parcial para obtenção
do título de mestre em Ciências
da Saúde.**

**Área de concentração: Ciências
da Saúde**

Uberlândia, 26 de março de 2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. Guilherme Lino - UFG

Profa. Dra. Janaina Lobato - UFU

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira – Orientador – UFU

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Pedro Tafuri Neto e Balbina Amaral Tafuri pelo incentivo, o exemplo de honestidade e fé, para a realização deste estudo.

À minha querida esposa, Moema Barbosa Loureiro Tafuri que sempre esteve ao meu lado como uma grande guerreira durante todo este caminhar.

À toda minha família, por confiarem na minha dedicação.

Aos meus companheiros (as) do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, por terem me recebido com muito respeito e carinho, proporcionando um crescimento profissional e pessoal.

A todos os professores e técnicos administrativos da Escola Técnica de Saúde (ESTES) da Universidade Federal de Uberlândia, pelo incentivo e apoio incondicional para desenvolver este estudo.

Aos meus queridos amigos (in memorian), *Nilda Marques, Marlos Urquiza, Luiz Roberto Inocente*, que foram grandes incentivadores no convívio profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora Desatadora dos Nós pela luz que depositaram na realização deste estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Uiera Vieira, pela grande oportunidade de realizarmos este estudo.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart pelo grande incentivo, principalmente nos momentos mais delicados.

Aos professores do curso Técnico em Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde por terem permitido minha liberação total.

À Dra. Fabiana de Araujo Santos pela orientação e principalmente por sua dedicação e experiência.

À doutoranda Mayara Ingrid de Souza pela experiência, paciência e alegria em todos os dias que trabalhamos juntos na execução do *Biopanning*.

À doutoranda Patrícia Tieme, generosa, paciente, experiente, exigente, que em todo momento tinha uma palavra otimista, meu eterno agradecimento.

Aos amigos (as) do Laboratório de Nanobiotecnologia, pelo aprendizado e pela excelente convivência.

À professora Dra. Yara Cristina P. Maia, pelo incentivo.

Ao enfermeiro André Luís de Moraes pela execução e avaliação da Prova Tuberculínica dos indivíduos participantes do estudo.

Ao técnico administrativo Mauro Alexandre de Castro do Programa Nacional de Controle da Tuberculose em Uberlândia, pelas análises do SINAN.

A Profa. Rosária Maria Paixão coordenadora do Programa Nacional de Controle da Tuberculose em Uberlândia, pelo acesso aos dados do programa.

Aos Enfermeiros, Médicos e Residentes do Departamento de Moléstias Infecciosas do Hospital de Clínicas.

A todos os colaboradores do Laboratório CREDESH.

À Profa. Dra. Júlia Cruz do departamento de Imunologia pela gentileza no empréstimo de um reagente para realização de experimentos.

Aos professores Dra. Cynthia Barbosa Firmino e Dr. Mário Paulo Penatti, Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso do Curso Técnico em Análises Clínicas que sempre estimularam para cursar esta pós-graduação.

Ao Curso Técnico em Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde pela gentileza no empréstimo de reagentes para realização de experimentos.

Ao técnico Adriano Gonçalves Martins do Curso Técnico em Análises Clínicas pela colaboração fundamental na formatação deste estudo.

Aos meus filhos Pedro Henrique B. Tafuri e João Vitor B. Tafuri pela compreensão e auxílio na informática.

Aos pacientes e indivíduos saudáveis que aceitaram participarem deste estudo doando suas amostras biológicas.

Ao colega Farmacêutico Milton Pereira Gomes Junior pelas palavras otimistas.

“Talvez não tenha conseguido
fazer o melhor, mas lutei para que
o melhor fosse feito. Não sou o
que deveria ser, mas Graças a
Deus , não sou o que era antes.”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

Introdução: A Tuberculose é uma doença infectocontagiosa, que acomete mais de 9 milhões de indivíduos a cada ano em todo o mundo. Para o controle da tuberculose o estudo por métodos de diagnósticos mais acurados e o monitoramento ao tratamento, tornam se imprescindíveis. **Objetivos:** identificar biomarcadores pela técnica de *Phage display* e avaliar a imunorreatividade dos clones selecionados às IgG's de soros de pacientes com tuberculose para o monitoramento do tratamento. **Métodos:** foram coletadas amostras de sangue de 61 indivíduos maiores de 18 anos, ambos os sexos, e realizada a prova tuberculina (PPD) como controle. As amostras foram submetidas ao processo de seleção de clones, o *Biopanning*, utilizando uma biblioteca de 12 aminoácidos randômicos expressos na região da proteína pIII do bacteriófago. Após a seleção foi realizado o ensaio ELISA para analisar a imunorreatividade dos clones selecionados. **Resultados:** após as análises *in silico*, observou-se que a sequência do clone F10 (VYKTPNSTANRW), possui similaridade com a proteína MPT64 de membrana de baixo peso molecular, 28 a 32 KDa, imunogênica do complexo *M.tuberculosis*. No ensaio ELISA o clone F10 apresentou uma reatividade significativa ($p < 0,05$) e no monitoramento dos indivíduos em tratamento ($p < 0,005$). **Conclusão:** a reatividade do clone F10 demonstrou que pode ser utilizada para o monitoramento do tratamento da tuberculose, contribuindo para seu controle.

Palavras-chave: Biomarcador. ELISA. *Phage Display*. Tratamento. Tuberculose.

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis is an infectious disease that affects more than 9 million people each year worldwide. For tuberculosis control methods for the study of more accurate diagnostic and monitoring treatment, make it essential. **Objectives:** To identify biomarkers by Phage display technique and evaluate the immunoreactivity of the IgG's clones selected sera from patients with tuberculosis to monitor treatment. **Methods:** Blood samples were collected from 61 individuals over 18 years, both sexes, and performed the tuberculin test (PPD) as a control. The samples were subjected to the process of selection of clones, the biopanning using a library of random 12 amino acid region of the protein expressed on the phage pIII. After selecting the ELISA assay was performed to analyze the immunoreactivity of selected clones. **Results:** after *in silico* analysis, it was found that the sequence of clone F10 (VYKTPNSTANRW) has similarity to the membrane protein MPT64 low molecular weight, 28 to 32 kDa, immunogenicity of the *M.tuberculosis* complex. In ELISA clone F10 showed reactivity significant ($p < 0.05$) and monitoring of individuals in treatment ($p < 0.005$). **Conclusion:** the reactivity of clone F10 demonstrated that it can be used for monitoring the treatment of tuberculosis, contributing to its control.

Key words: Biomarker. ELISA. *Phage Display*. Tuberculosis. Treatment.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Pag.
Figura 1- Esquema da estratégia utilizada no primeiro ciclo do <i>Biopanning</i>	35
Figura 2- Ensaio de <i>Bead-ELISA</i> para verificação da eficiência do acoplamento de IgG's nas microesferas magnéticas	45
Figura 3- Gel de agarose contendo DNA dos clones selecionados.....	46
Figura 4- Alinhamento do clone F10 com a proteína MPT64 do <i>M.tuberculosis</i>	48
Figura 5- <i>Phage-Elisa</i> com os clones seleciona-dos na pré-validação.....	49
Figura 6- <i>Phage-Elisa</i> com os clones mais reativos.....	50
Figura 7- A razão do clone F10 com fago irrelevante utilizando soros individuais.....	51
Figura 8- A curva ROC demonstrando a sensibilidade e especificidade do clone F10 com indivíduos em tratamento com o PPD-, indivíduos saudáveis	52
Figura 9- Ensaio ELISA de soros individuais dos grupos (TB+,PPD+,PPD-), com extrato proteico.....	53
Figura 10- ELISA competitivo do clone F10 com extrato proteico em concentrações diferentes e soro de indivíduos em tratamento em dias.....	54
Tabela 1- Títulos (em <i>pfc</i> : unidades formadoras de colônias) obtidos nos três ciclos de seleção.....	46
Tabela 2- Sequências válidas dos aminoácidos dos peptídeos sequenciados, frequências absoluta e observada.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Aminoácidos
Abs	Absorbância
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
AM	Arabinomanana
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BSA	Soro albumina bovina
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
Célula NK	Célula Natural Killer
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFP	Proteína do Filtrado de Cultura
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CFP-10	Culture Filtrate Protein 10-KDa
CR	Receptor de Complemento
CTL	Linfócito T Citotóxico
Cut-off	Ponto de corte
DC	Célula Dendrítica
DDT	Dithiothreitol, β -mercaptanoethanol
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DO	Densidade Ótica
DOTs	Estratégia de Tratamento Diretamente Observado
DP	Desvio Padrão
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
ELISA	Teste imunoenzimático
ESAT-6	Early Secreted Antigenic Target 6-KDa
HC	Hospital de Clínicas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HR	Isoniazida e Rifampicina
HRZ	Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M

IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzível
IPTG	<i>Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside</i>
Irr	Fago irrelevante
kDa	Quilodalton
LAM	Lipoarabinomanana
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LM	Lipomanana
MDR	Multi droga resistente
MÊS	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado
MIP-1	Proteína 1 Inflamatória de Macrófagos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MPT 64	Proteína do <i>M.tuberculosis</i>
MS/SVS	Ministério da Saúde/Secretaria Vigilância em Saúde
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complexo
NO	Óxido Nítrico
NMT	Não <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Orto-fenilenodiamina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMPS	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	Fosfato de sódio com tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol
Pfu	Unidades formadoras de colônias
pH	Potencial Hidrogênico
Ph.D-12	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
pIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVII	Proteína VII capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVIII	Proteína VIII capsídica de bacteriófagos filamentosos
PIMs	Manosídeo de Fosfatidilinositol
PMSF	Fluoreto de alfa-fenilmetil sulfonila
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	Derivado de Proteína Purificada
RT-PCR	PCR em tempo real
RD-1	Regiões diferenciais
Sel	Fago selvagem

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
T.A	Temperatura ambiente
TB	Tuberculose
TBS	Tampão Tris-salino
TBS-T	Tampão Tris-salino com tween 20
T CD4+	Linfócitos T
T CD8+	Linfócitos T
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF	Fator de Crescimento Tumoral
Th	Linfócito T Auxiliar
TLR	Receptor do tipo Toll
TBM	Tetrametilbenzina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-alfa-D-galactosideo
°C	Grau Celsius
uG	Microgramas
uL	Microlitros
G	Grama
mG	Miligrama
L	Litro
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitro
N	Normalidade
Ng	Nanograma
Nm	Nanometro
RPM	Rotações por minuto
V	Volts

LISTA DE AMINOÁCIDOS

A	Alanina	Ala
C	Cisteína	Cis
D	Ácido aspártico	Asp
E	Ácido glutâmico	Glu
F	Fenilalanina	Fen
G	Glicina	Gly
H	Histidina	His
I	Isoleucina	Ile
K	Lisina	Lys
L	Leucina	Leu
M	Metionina	Met
N	Asparagina	Asn
P	Prolina	Pro
Q	Glutamina	Gln
R	Arginina	Arg
S	Serina	Ser
T	Treonina	Thr
V	Valina	Val
W	Triptofano	Trp
Y	Tirosina	Tyr

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A tuberculose	17
1.2 Patogenia da tuberculose	18
1.2.1 Transmissão	19
1.2.2 Aspectos imunológicos	20
1.2.3 Epidemiologia	22
1.2.4 O antígeno MPT 64	23
1.3 Diagnóstico para tuberculose	24
1.3.1 A técnica de <i>Phage display</i>	26
1.4 Tratamento para tuberculose	27
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Tipo de estudo	29
3.2 Casuística	29
3.2.1 Critérios de inclusão	30
3.2.2 Critérios de exclusão	30
3.3 Obtenção das amostras biológicas	31
3.4 Seleção das amostras biológicas	32
3.5 Acoplamento e purificação de IgG total em microesferas magnéticas de proteína G	32
3.6 Seleção de peptídeos recombinantes	33
3.6.1 <i>Biopanning</i>	33
3.6.2 Titulação	36
3.6.3 Amplificação dos Clones	36

3.6.4 Extração de DNA dos Clones.....	37
3.6.5 Sequenciamento	38
3.7 Análises <i>in silico</i>	39
3.8 <i>Screening</i> dos clones com <i>pool</i> de soros	39
3.9 ELISA dos clones D8, F10, G12 com pool de soros	40
3.10 ELISA do clone F10 com soros individuais: TB ativa (TB+), PPD positivo (PPD+), PPD negativo (PPD-)	41
3.11 ELISA do clone F10 com soros de indivíduos em tratamento	41
3.12 Extração da proteína do M. tuberculosis	42
3.13 ELISA com extrato proteico do M.tuberculosis, soros individuais TB+,PPD+,PPD-, e indivíduos em tratamento.....	42
3.14 ELISA competitivo do clone F10 com soros de indivíduos em tratamento e extrato proteico do M.tuberculosis.....	43
3.15 Análises estatísticas.....	44
4 RESULTADOS	44
4.1 Acoplamento das IgG's nas microesferas de proteína G	44
4.2 Seleção de peptídeos miméticos	45
4.2.1 <i>Biopanning</i> - Seleção de peptídeos	45
4.2.2 Extração do DNA dos clones selecionados.....	46
4.2.3. Sequenciamento do DNA e análise <i>in silico</i>	47
4.3 Validação por Phage-ELISA dos mimetopos selecionados no Biopanning.....	49
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	59

7. REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE- FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA	66
ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	67
ANEXO 2 - ANÁLISE FINAL N°. 660/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O ADENDO AO PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU 123/10.	68
ANEXO 3 - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN).....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 A tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecto contagiosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, que pertence ao *M. tuberculosis* complexo (MTBC), ao qual incluem mais seis outras espécies: *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.pnnipedii*, *M.caprae*, *M.caneti*, que acomete indivíduos em todos os continentes do mundo, principalmente aqueles menos desenvolvidos (MOUTINHO, 2011).

Os casos novos no mundo correspondem a 8,7 milhões (WHO, 2012). Destes, 13% são coinfectados com HIV e 1,4 milhão de indivíduos morreram. Dos quais 1,0 milhão, são HIV negativo e 430 mil de HIV positivo. As mulheres correspondem a 300 mil mortes entre o HIV negativo e 200 mil com HIV positivo. As crianças menores de 15 anos correspondem a 500 mil casos, sendo que 64 mil morreram (WHO, 2012). A tuberculose acomete mais homens, principalmente aqueles com idade economicamente ativa (WHO, 2012). Geograficamente a Ásia com 60% e África com 24% apresentam a maior carga da doença no mundo (WHO, 2012).

Apesar do aumento no número de casos novos, a taxa de incidência global vem diminuindo lentamente (menos de 1% ao ano), sendo estimada uma taxa de 139 casos por 100.000 hab. No mundo dos 3,7% dos casos novos, estima-se que 20% apresentam resistência aos medicamentos que tratam a tuberculose (TB-MDR) e 9% dos casos são indivíduos infectados com bacilos resistentes à maioria dos quimioterápicos antituberculose (TB-XDR). Com a estratégia do Tratamento Diretamente Observado (DOTs) o sucesso no tratamento tem mantido elevado, em torno de 85% a 87%, principalmente nos indivíduos com baciloscopia positiva para tuberculose pulmonar que representa a maior causa (WHO, 2012).

Os tratamentos de indivíduos que apresentam resistência a um ou mais fármacos antituberculose são mais de seis meses, com efeitos colaterais severos e de custos elevados (WHO, 2012).

Os investimentos para o controle da Tuberculose no mundo ainda são insuficientes, principalmente para o diagnóstico e tratamento dos casos MDR-TB (WHO, 2012).

Em 2011, o Brasil notificou 69.245 casos novos, correspondendo a um coeficiente de incidência de 36/100.000 habitantes. Destes, 41.117 casos novos foram bacilíferos no escarro. Estes indicadores colocam o Brasil na 19ª posição em relação ao número de casos e na 104ª posição em relação ao coeficiente de incidência (MS/SVS, 2011).

Entretanto há uma variação da incidência entre os estados, por exemplo, o Amazonas com 62,6/100mil habitantes e Distrito Federal com 11,1/100mil habitantes (MS/SVS, 2011).

É importante destacar que anualmente ainda morrem 4.500 pessoas por tuberculose no Brasil, mesmo sendo uma doença curável e evitável. Em sua maioria, os óbitos ocorrem nas regiões metropolitanas e em unidades hospitalares. A tuberculose é a terceira maior responsável pelos óbitos por doenças infecciosas e a primeira entre indivíduos com AIDS no Brasil (MS/SVS, 2011).

A proposta da Organização Mundial de Saúde (OMS) através do Plano Global para Combate à Tuberculose (2011 a 2015) tem por objetivo é diminuir a carga da doença até 2015 e uma das metas principais é reduzir pela metade, a incidência e a mortalidade por tuberculose, para que em 2050 a tuberculose seja eliminada como problema de saúde pública (MS/SVS, 2011).

1.2 Patogenia da tuberculose

O indivíduo pode ser infectado pelo *M.tuberculosis* e seu sistema imunológico manter seu organismo sem desenvolver a

doença, caracterizando a tuberculose infecção, podendo permanecer assim por muito tempo. Se o patógeno multiplicar-se o bastante para romper a barreira imunológica alcançando um ou mais órgãos caracteriza-se a tuberculose doença (WHO, 2010). A sobrevivência deste patógeno no pulmão infectado e o seu desenvolvimento, dependerá de sua virulência e da habilidade das células de defesa do hospedeiro (MELO et al., 2005).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010) estima que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo. A pandemia do HIV e o contraste entre o aumento da miséria das populações menos favorecidas e o aumento da sobrevida nas mais desenvolvidas favoreceram o aumento da tuberculose no mundo (MELO et al., 2005).

O indivíduo infectado pelo *M.tuberculosis* provavelmente ficará infectado por toda sua vida, porém apenas 10% destes indivíduos desenvolverão tuberculose (WHO, 2010). Aqueles portadores do HIV o risco para desenvolverem a doença sobe para 50% (MELO et al., 2005). O bacilo do *M.tuberculosis* também pode permanecer em uma fase latente (ULRICHS; KAUFMANN, 2006). Podendo resistir a um ambiente com baixa taxa de oxigênio (AKHTER et al., 2007).

1.2.1 Transmissão

A forma mais comum de transmissão do *M.tuberculosis* se dá por via aerógena, pela inalação de gotículas contendo bacilos quando o doente com tuberculose pulmonar espirra ou tosse, fazendo desta, uma via de transmissão, pela facilidade de propagação. O contágio depende das condições de aeração do ambiente, da proximidade e do tempo de exposição que um indivíduo está sujeito.

O aparelho respiratório retém muitos bacilos na porta de entrada através da depuração mucociliar, alguns bacilos que escapam desta barreira física, são fagocitados pelos macrófagos alveolares. Ao escapar dos mecanismos de defesa, os bacilos se multiplicam, constituindo o complexo de *Gohn*, pelo qual ocorre a disseminação linfática e a inflamação dos gânglios regionais, constituindo o complexo primário. A partir da via hematogênica, bacilos se instalam em outros órgãos, promovendo em algumas semanas a resposta imune adquirida ou adaptativa especificamente dirigida contra agentes agressores do bacilo (LAPA e SILVA, 2012).

1.2.2 Aspectos imunológicos

O mecanismo de defesa contra o *M.tuberculosis* é a interação entre os macrófagos e os linfócitos T (FLYNN, 2001).

As células dendríticas e macrófagos fagocitam o bacilo, destroem e processam os seus antígenos, que serão apresentados aos linfócitos através das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC I e MHC II). Para apresentação antigênica, estas células utilizam moléculas de superfície, denominadas de coestimuladoras, como CD80 e CD86 (FLORES-BATISTA et al., 2007). Esta apresentação antigênica desencadeia outros eventos biológicos nos linfócitos como ativação, expansão clonal e secreção de citocinas, principalmente o IFN- γ , que irá ativar outros macrófagos para serem mais eficazes contra o patógeno, eliminando-o (LAPA e SILVA, 2012).

Através de um mecanismo de escape, o *M.tuberculosis* consegue multiplicar-se e ficar protegido dentro do macrófago, evitando ação de mecanismos externos para sua eliminação, fazendo com que o indivíduo apresente o estado de tuberculose latente. Há vários mecanismos que são utilizados pelos

macrófagos para destruir o patógeno de seu interior dentre eles a apoptose (TEIXEIRA et al., 2007).

A apoptose tem sido descrita como um importante mecanismo da resposta imune do hospedeiro contra o patógeno. As células mortas liberam vesículas apoptóticas para o meio extracelular que são fagocitadas por outras células apresentadoras de antígenos, que participam ativando linfócitos T CD8+ por meio de um processo denominado "apresentação cruzada" destruindo o bacilo (WINAU et al., 2006).

Outro mecanismo é a ação de macrófagos mais ativados. Neste processo ocorre a expressão de várias enzimas, principalmente a *síntese de óxido nítrico sintetase* (iNOS) secretora de radical livre óxido nítrico, que são altamente tóxicos para o *M.tuberculosis* (NICHOLSON et al., 1996).

Para uma resposta protetora, os linfócitos T CD4+ expressam um grande número de citocinas fundamentais para eliminação do patógeno enquanto os linfócitos T CD8+ pela ação citotóxica tem efeito diretamente contra o bacilo, e através de seus grânulos citotóxicos contendo perforina e granzima que produzem poros na membrana celular, além produzirem citocinas (LAPA e SILVA, 2012). De acordo com perfil das células T CD4+, as células Th1 secretam IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α , TNF- β . As células Th2 que secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, tem uma função de induzir a diferenciação de células B, promovendo uma regulação negativa do perfil Th1. As células que produzem IL-17 e IL-23 teriam uma ação reguladora da resposta imune na tuberculose. A presença da IL-10 no sítio da infecção parece facilitar a ativação da tuberculose, por diminuir a ação bactericida dos macrófagos, desativando os mecanismos de proteção (LAPA e SILVA et al., 2009).

A citocina TNF- α secretada por macrófagos ativados e por outras células, apresenta uma função protetora e participa da patogenicidade da tuberculose, principalmente na formação do

granuloma onde ocorrem as ações biológicas da tuberculose. Sem a formação do granuloma os bacilos ficam dispersos numa necrose caseosa facilitando sua disseminação, o que ocorre em indivíduos infectados pelo HIV. O granuloma é a estrutura histopatológica característica da infecção do *M. tuberculosis*. Esta estrutura pode variar em composição celular, tamanho e distribuição, apresentando variações entre indivíduos diferentes e até mesmo no próprio indivíduo (KUNNATH-VELAYUDHAN, GENNARO, 2011).

Os antagonistas do TNF- α facilitam a reativação de tuberculose latente e a frequência aumentada de células T CD4+ secretoras de TNF- α é um preditor do desenvolvimento da tuberculose ativa (LAPA e SILVA, 2012).

Durante a fase ativa da tuberculose ocorre o aumento de mediadores intracelulares, como *suppressor of cytokine signaling* (SOCS1), *interleukin-1 receptor-associated kinase M* (IRAK-M) e extracelulares (IL-10, TGF- β RII, IL-1RN e *indoleamine 2,3-dioxygenase*) que podem resultar na menor atividade microbicida dos macrófagos que expressam a iNOS (HO et al., 2010).

1.2.3 Epidemiologia

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento da tuberculose, estão os contatos intradomiciliares com casos bacilíferos recém diagnosticados, crianças menores de 5 anos, infecção por HIV e desnutrição grave (SANT'ANNA;HIJJAR, 2007). Segundo MELO e colaboradores, 2005, a infecção e doença são mais frequentes entre os contatos de baixa idade, os idosos, os portadores de doenças em condições imunossupressoras, diabéticos e os de prova tuberculínica (PPD) não reativos.

A tuberculose é um problema social relacionado às condições econômicas, sendo que nos países desenvolvidos é mais comum em idosos, quando há a queda da imunidade, própria

da senescência, enquanto que em países em desenvolvimento é mais freqüente no grupo etário economicamente produtivo, entre os 15 e 44 anos (WHO, 2010). Os indivíduos moradores de rua, privados de liberdade e indígenas são mais suscetíveis à tuberculose (MS/SVS, 2011).

A tuberculose é uma doença milenar que acomete a humanidade, e o seu controle ainda representa um desafio para os governos, autoridades da saúde e comunidade que busquem novas formas de diagnóstico mais acurado e em tempo hábil, de maneira que torne mais abrangente e facilitada a busca de infectados e doentes, assim como do monitoramento do tratamento, de novos fármacos e vacinas mais preventivas que Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (WHO, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011) destaca a necessidade de mais estudos sobre a patogenia da tuberculose para permitir avanços no controle da doença, que permanece como uma doença negligenciada.

1.2.4 O antígeno MPT 64

O antígeno MPT 64 apresenta de 24 a 38-KDa, é secretado pela membrana plasmática das micobactérias. Na tuberculose extra pulmonar esta presente a de 24-KDa e na tuberculose pulmonar ativa é a de 38-KDa (Rv 0934), também conhecida como antígeno 5. Tem sido utilizada em diagnóstico para diferenciar em culturas positivas de escarro o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) das não micobactérias tuberculosis (NTB) que correspondem a 3% das culturas positivas (HASEGAWA et al. 2002). Vários casos de MTB com resultados negativos tem sido reportados. HIRANO e colaboradores, 2004, acreditam na possibilidade de uma mutação dentro do *gene mpt64* que possa produzir uma proteína incompleta que apresentaria resultados falsos negativos. Neste caso, técnicas convencionais

para o diagnóstico devem ser recomendadas quando a sintomatologia for sugestiva de tuberculose. Devido as suas características imunodominantes, estudos recentes revelam que a MPT 64 é considerada candidata a subunidade de vacina contra a tuberculose (SALI et al., 2010).

1.3 Diagnóstico para tuberculose

Desde o isolamento do bacilo por Robert Koch em 1882, muitas técnicas vem sendo desenvolvidas para o diagnóstico da tuberculose. O diagnóstico baseia-se nos achados clínicos, radiológicos, tomografia computadorizada de tórax, exames bacteriológicos e cultura do escarro. Atualmente os testes sorológicos, principalmente o ELISA e técnicas biomoleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e a PCR em tempo real (RT-PCR) estão sendo aplicadas (KUNNATH-VELAYUDHAN et al., 2010).

A baciloscopia é o método prioritário de diagnóstico e controle do tratamento da tuberculose (TEIXEIRA et.al., 2007). Apesar de sua facilidade de execução e baixo custo, tem como principal desvantagem o fato de ser negativa em 30 a 50% dos casos de indivíduos infectados com *M.tuberculosis*, em parte devido presença de no mínimo de 5000 bacilos/mL de escarro (TEIXEIRA et al., 2007).

A cultura microbiológica do escarro é empregada com a vantagem de permitir a detecção e o isolamento do bacilo, bem como sua identificação. Além da determinação da sensibilidade do bacilo aos quimioterápicos (TEIXEIRA et al., 2007).

Apesar de sua importância, a cultura do *M.tuberculosis* é um método demorado, pois o bacilo apresenta um crescimento lento em torno (15-20 h), e o teste nem sempre apresenta 100% de positividade (TEIXEIRA et al., 2007).

A prova de tuberculina, também conhecida como PPD, realizada a partir da aplicação intradérmica da proteína purificada derivada RT23, é útil para provar a infecção, mas não necessariamente a doença. A prova positiva para tuberculose sugere somente a exposição prévia ao antígeno, não infecção ativa, e, ainda, se o paciente estiver em estado de imunossupressão não podemos descartar a possibilidade de o paciente estar infectado com tuberculose (HORNUM et al., 2007).

Na identificação de novos antígenos que substituam o PPD, várias regiões do genoma do *M.tuberculosis* foram definidas como sendo expressas apenas em suas cepas, tornando se como potenciais para o diagnóstico. São conhecidas como regiões de diferença (RDs), tendo sido caracterizadas 16 RDs. Na RD1 (do inglês, region of difference 1), do *Mycobacterium tuberculosis*, ausente no *M.bovis* BCG, *M.avium*, e na maioria das micobactérias ambientais (ANDERSEN et al., 2000). São codificados pelo menos dois antígenos promissores para detecção da tuberculose, denominados do inglês como Early Secreted Antigenic Target 6-KDa (ESAT-6) e Culture Filtrate Protein 10-KDa (CFP-10), que são fortemente imunodominantes, assim sendo consideradas ideais para um método diagnóstico (TEIXEIRA et al., 2007). Os antígenos expressos no filtrado de cultura do *Mycobacterium tuberculosis* submetidos à condições de estresse, como antígeno 85 (Ag-85), a malato sintetase (Rv1837c), também conhecida por GLcB ou MTB81 (SMITH et al., 2003), a MPT51 (Rv3803c) (Wilson et al. 2004), e a Hspx (Proteínas de choque térmico) (Rv2031c) (O'TOOLE et al., 2003), formam um complexo aplicado em testes de diagnóstico da tuberculose.

O TLR-2 reconhece uma grande variedade de antígenos micobacterianos como as lipoproteínas de 19-KDa, a lipoarabinomanana (LAM) (BRIGHTBILL et al., 1999). São responsáveis pela indução da necrose caseosa e parece ter um

papel importante na virulência das diferentes espécies de micobactérias (BRIKEN et al., 2004).

Os testes sorológicos como ELISA tem sido aplicados pela facilidade de execução, baixo custo e rapidez, mas devido apresentar um alto índice de reações cruzadas não é recomendado pelo Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012).

As técnicas de biologia molecular, como a Reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, tem sido aplicadas para o diagnóstico rápido da tuberculose (ASSIS et al., 2007). A técnica de *Phage display*, permite identificar peptídeos que serão utilizados como biomarcadores para o diagnóstico, desenvolvimento de novas vacinas e novos medicamentos no estudo de doenças infecciosas (MULLEN, et al., 2006).

1.3.1 A técnica de *Phage display*

A metodologia do *Phage display*, exposição de biomoléculas em fagos, foi desenvolvida por Smith(1985), ao conseguir a expressão da enzima de restrição EcoR1 através da fusão com a proteína três (pIII) do capsídeo do fago.

Os bacteriófagos (fagos), são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram negativas usando o *pilus sexual* como receptor, principalmente a *E.coli*. Um fago viável expressa aproximadamente 2.700 cópias da proteína 8 ou pVIII, uma proteína de 50 resíduos de aminoácidos) e de 3 a 5 cópias da proteína 3 ou pIII com 406 aminoácidos. Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que fagos filamentosos não geram infecção lítica em *E.coli*, mas preferencialmente induzem a um estado no qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

A incorporação de proteínas exógenas na superfície dos fagos filamentosos faz-se fusionando às proteínas estruturais das partículas virais. As duas proteínas principais para esse fim são a

proteína pVIII e a pIII. A proteína 3, a maior das proteínas estruturais, com 42 Kda, também é responsável pela adesão da partícula viral ao *pillus sexual* (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

O peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago possibilita a sua seleção baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo por um processo de seleção *in vitro* denominado *Biopanning* (PARMELEY; SMITH, 1988).

A utilização de amostras de sangue periférico na seleção de peptídeos, através da técnica de *Phage display*, é uma estratégia que pode ser aplicada para o diagnóstico, monitoramento do tratamento ou no desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças, na tentativa de identificar sequências específicas que se ligam a anticorpos presentes nestas amostras. O *Phage display* pode permitir a geração de compostos mais simples e sensíveis, além do entendimento da participação de antígenos conhecidos, ou não, nos mecanismos da resposta imune (MANOUTCHARIAN et al., 1999).

A identificação de peptídeos miméticos aos antígenos da tuberculose, bem como sua caracterização como novos biomarcadores, poderá ser potencialmente aplicados no desenvolvimento do diagnóstico, monitoramento do tratamento e na produção de novas vacinas, mais aperfeiçoadas e protetoras do que a atual vacina do Bacilo de Calmette-Guérin (BCG).

1.4 Tratamento para tuberculose

A Organização Mundial de Saúde (OMS), considerando a situação da tuberculose um estado de emergência, criou estratégias de controle da tuberculose para reduzir a mortalidade, morbidade e transmissão da doença (WHO, 2010). Principalmente a estratégia STOP TUBERCULOSE (WHO, 2010). Para alcançar os objetivos é preciso assegurar o diagnóstico e garantir tratamento

e cura para os doentes. No Brasil existe um programa de controle da doença o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) que é um conjunto de 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).

Um grande problema da tuberculose 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 tuberculose multi droga resistente (MDR), (WHO, 2010). Entre as estratégias criadas pela OMS, 1993 estão o Tratamento Diretamente Observado (DOT), que consiste na monitoração pelo sistema de saúde ao paciente, durante o tratamento a fim de garantir o uso correto dos medicamentos e não abandono do tratamento (WHO, 2010). Estima-se que 500.000 indivíduos são infectados por bactérias multi droga resistente (MDR), (WHO, 2011).

A rifampicina, antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose, é a "chave" do esquema terapêutico, sendo que 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). Nas últimas décadas os principais desafios do controle da tuberculose são a pandemia de HIV/AIDS e a tuberculose multi drogas resistentes (MDR-TB) e a *extensively drug-resistant M.tuberculosis* (XDR-TB, tuberculose extrarresistente), revelando a necessidade de novos fármacos e novos protocolos de tratamento (MS/SVS, 2010).

A Tuberculose é curável em praticamente 100% dos casos novos desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e o acompanhamento operacional do

tratamento na observação da dose adequada, no tempo de uso correto e na associação dos fármacos preconizados para o tratamento (MS/SVS, 2010).

2 OBJETIVOS

- Caracterizar *in silico* peptídeos miméticos aos antígenos de soros de indivíduos com tuberculose.
- Aplicar a técnica de *Phage display* como ferramenta para identificar e caracterizar peptídeos miméticos aos antígenos de soros de indivíduos com tuberculose, para serem utilizados no monitoramento do tratamento da tuberculose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Estudo analítico observacional do tipo transversal.

3.2 Casuística

Foram convidados a participarem deste estudo, indivíduos com diagnóstico de tuberculose, maiores de 18 anos, com bacteriologia positiva ou não e em tratamento, atendidos no setor de Moléstias Infecciosas do Hospital de Clínicas da Universidade federal de Uberlândia e aqueles acompanhados pelo

Programa Nacional de Controle da Tuberculose na cidade de Uberlândia – MG, no período de maio de 2010 a fevereiro de 2012.

3.2.1 Critérios de inclusão

Pacientes com tuberculose confirmada segundo um dos critérios da WHO, 2010:

- Confirmado bacteriologicamente (casos definidos de tuberculose) indivíduos com duas amostras: positivas para bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) em exame direto ou cultura positiva para *M.tuberculosis* ou uma amostra positiva para BAAR e presença de alteração radiológica.
- Casos bacteriologicamente negativos - indivíduos com exame direto e cultura negativa, mas que apresentem à radiografia de tórax infiltrado em lobo superior com ou sem cavitação.
- Indivíduos com história de tratamento anterior para tuberculose que apresentarem alterações radiológicas quando comparadas com radiografias anteriores.
- Para o grupo de indivíduos saudáveis como aqueles contatos intradomiciliares e profissionais de saúde que apresentaram a Prova de Tuberculínica (PPD), negativa.

3.2.2 Critérios de exclusão

Foram adotados como critérios de exclusão indivíduos em tratamento com drogas imunodepressoras, uso de corticosteróides, diabetes, neoplasias, menores de 18 anos, gestantes e HIV/AIDS.

3.3 Obtenção das amostras biológicas

Durante a consulta regular no ambulatório de Moléstias Infecciosas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e acompanhado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose da Secretaria Municipal de Saúde de Uberlândia (Unidade Prisional, UAIs, UBSs, Casas de acolhimento e domicílios), o indivíduo foi convidado a participar do estudo. Aquele que concordou em participar foi ao mesmo tempo encaminhado para a coleta de material biológico: sangue periférico.

Foram coletados 8,0 ml de sangue periférico em tubos *vacutainer TM*, sem anticoagulante, para obtenção do soro. O material coletado foi conservado no gelo por 4 horas e encaminhado para o Laboratório de Nanobiotecnologia (INGEB/UFU). A separação da amostra foi realizada em centrifuga refrigerada à 4°C sob 4.500 rpm e armazenado em freezer à -20°C.

O número total de indivíduos foram de 61, maiores de 18 anos, no período de maio de 2010 a fevereiro de 2012, distribuídos da seguinte forma: indivíduos com tuberculose ativa com zero a 30 dias de tratamento =10, contatos intradomiciliares, profissionais de saúde (médicos e enfermeiros) com PPD, negativo=18 e PPD, positivo=15, e indivíduos com mais de 30 dias de tratamento=28.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o processo de nº123/10. Todas as técnicas de manipulação de amostras biológicas seguiram normas do Código de Ética em Pesquisa com Humanos (Resolução CNS N°196/96) e das normas de biossegurança aplicadas ao laboratório de risco nível 2.

Todos os indivíduos participantes após lido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o assinaram.

3.4 Seleção das amostras biológicas

Os soros foram descongelados em temperatura ambiente por 15 minutos, identificados e alicotados (300 uL) para formar *pools* de soros, distribuídos em: Grupo Tuberculose ativa (TB+); Grupo negativo(PPD-); Grupo Positivo(PPD+). Do total das amostras, 28 indivíduos permaneciam em tratamento com quimioterápicos preconizados pelo Ministério da Saúde (MS/SVS, 2011), com mais de 30 dias.

3.5 Acoplamento e purificação de IgG total em microesferas magnéticas de proteína G

Microesferas magnéticas ativadas com proteína G foram utilizadas para purificação de IgG's dos soros dos indivíduos.

A purificação de IgG a partir de pool de soros de indivíduos com tuberculose ativa(TB+), PPD positivo(PPD+), PPD negativo(PPD-), foi feita por meio de microesferas magnéticas (*beads* magnéticos) conjugadas a proteína G (*Dynabeads-Invitrogen*) como plataforma.

Para cada 2×10^9 partículas magnéticas (100 uL do estoque), lavadas anteriormente três vezes com tampão MES(0,1 M pH 5,0) para ativar as microesferas, adicionou-se 100 uL de *pool* de soro de tuberculose ativa (TB+), PPD+, PPD-, seguida da incubação por 1 hora sob agitação a T.A. As microesferas adsorvidas com anticorpos foram, então, lavadas novamente três vezes com tampão MES (0,1 M pH 5,0) com a finalidade de retirar os anticorpos não ligantes.

Para realizar a ligação covalente entre as microesferas e a IgG, o sistema *beads* foi lavado duas vezes com 1 mL de tampão trietanolamina (0,2 M pH 8,2) e, ressuspendido com 1 mL de tampão de ligação covalente (20 mM de dimetil pimelinidato X 2 HCl em tampão trietanolamina) por 30 minutos sob agitação a T.A.

A neutralização da reação da ligação covalente foi feita pela incubação do sistema *beads* com 1 mL de tampão Tris(50 mM pH 7,5) por 15 minutos a T.A. Em seguida, as microesferas foram lavadas com TBS-T 0,1% de Tween e bloqueadas por 1 hora à 37°C com solução de bloqueio(5% de BSA em TBS-T 0,05% de Tween) e ressuspendido em 200 uL de TBS.

Para certificar-se do acoplamento, 5 uL de *beads* contendo IgG dos pool de soros, foram incubadas por 1 hora a 37°C com anti-IgG (VH+VL da Sigma) humana diluído na proporção 1:5000 na solução de bloqueio e com IgY na proporção 1:5000 para controle da reação. Após a incubação, os *beads* foram lavados três vezes com TBS-Tween 0,1% e revelados com substrato de tetrametilbenzina (TBM), cor azul. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico 2N e efetuada a leitura a 450 nm em leitor de microplacas (*Titertek Multiskan Plus*, *Flow Laboratories, USA*).

3.6 Seleção de peptídeos recombinantes

3.6.1 Biopanning

Para a seleção de peptídeos miméticos às proteínas antigênicas de *M.tuberculosis* utilizou-se de biblioteca comercial de peptídeos apresentadas em bacteriófagos filamentosos M13: *Ph.D.-12* (complexidade: $2,7 \times 10^9$ transformantes), com peptídeos fusionados a proteína pIII (5 cópias por partícula de fago) da *New England BioLabs, Schwalbach, Alemanha*.

Para selecionar fagos ligantes às IgGs purificadas do soro de pacientes infectados com *M.tuberculosis*, foi realizado três ciclos de seleção, sendo que para cada ciclo foi feito uma incubação subtrativa com IgG de indivíduos controles PPD- e PPD+ acopladas no *bead* proteína G.

Para realizar a metodologia, pipetou-se 20ul de *beads* acopladas com IgG de indivíduos controles e incubou com 100µL da biblioteca comercial diluída em 10ul em 90µL de TBS-T. Agitou-se por 30 minutos a temperatura ambiente e os sobrenadante dos fagos não ligantes foram transferidos para os tubos contendo os 20uL *beads* acoplados com IgG de pacientes PPD+, os quais foram, também, submetidos a agitação por 30 minutos a temperatura ambiente (Figura 1).

Em seguida, o sobrenadante de fagos não ligantes foram transferidos para um novo tubo para serem incubados com 20uL de *beads* acoplados com IgG de pacientes com tuberculose por 30 minutos sob agitação. O sobrenadante foi removido, e os fagos inespecíficos foram lavados dez vezes com TBS-T (0,1% Tween-20) nos dois primeiros ciclos de seleção e no terceiro ciclo subsequente com TBS-T (0,5% Tween-20) para aumentar a estringência. Em todos os ciclos foram feitas eluições ácida com 500ul de Glicina 0,05M, pH=2,8 (Figura 1).

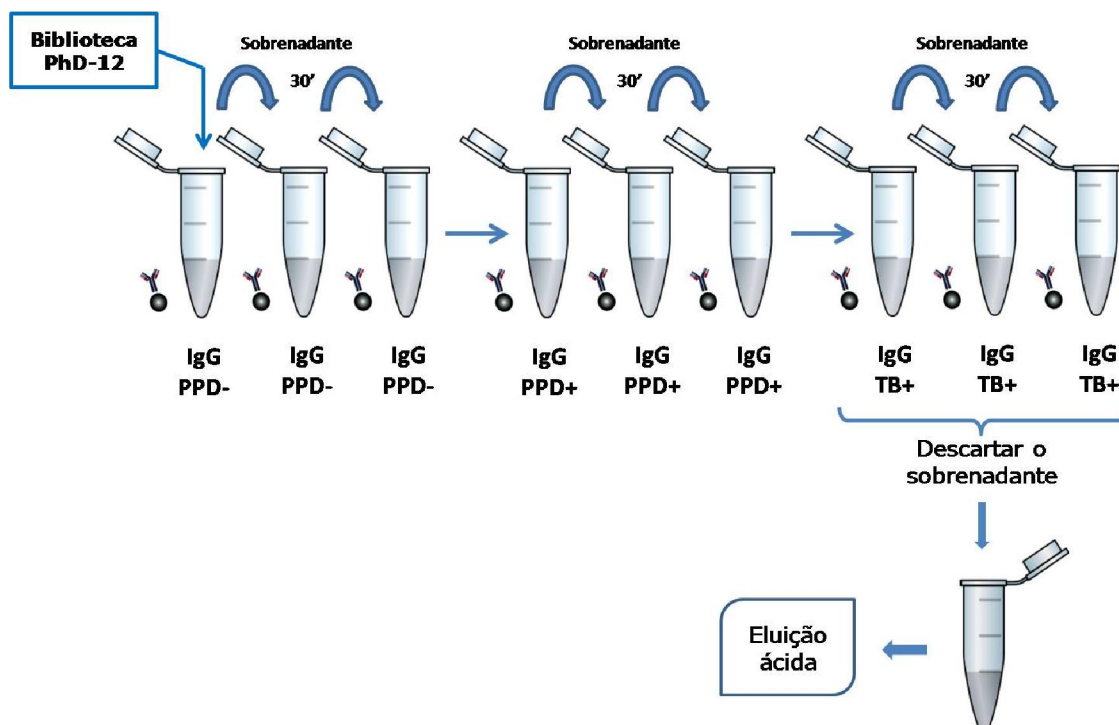


Figura 1. Estratégia do primeiro ciclo do *Biopanning* para seleção de mimetopos do *M. tuberculosis*.

Os fagos recuperados foram amplificados em *Escherichia coli* ER2738. A seleção foi repetida usando sempre o eluato anterior ao ciclo de seleção em questão como representantes da biblioteca comercial de fagos. Após o terceiro ciclo de seleção, os fagos foram escolhidos aleatoriamente e extraído o DNA e sequenciado no sequenciador Mega Bace™ 1000 (Molecular Dynamics/Amersham).

3.6.2 Titulação

Para realizar a titulação, em cada ciclo de seleção a solução de fagos foi submetida a diluições seriadas crescentes exponenciais sob log10 em meio LB.

Para os eluatos de fago de cada ciclo foram utilizadas diluições de 10^{-1} até 10^{-4} . Para os eluatos amplificados a faixa de diluição utilizada variou entre 10^{-8} a 10^{-11} . Em cada diluição acrescentou-se 200 uL da cultura de ER2738 na fase mid-log (densidade óptica 600 nm~0,5) e a solução foi agitada rapidamente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As células bacterianas, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3 mL de Ágar-Top a 45°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetraciclina.

As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas e após este período, foi feita a contagem das colônias azuis para obter o título dos fagos.

3.6.3 Amplificação dos Clones

Após a seleção, a amplificação dos fagos foi realizada pela inoculação de um meio *Luria-Bertani* (LB-Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), contendo tetraciclina, com uma colônia isolada de *Eschericia coli* da linhagem ER2738. O meio foi inoculado sob agitação a 37°C até a fase *early-log* (OD 600~ 0,3). Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 500 uL dos eluatos dos fagos e incubados a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação.

Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4°C a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril contendo uma solução de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M NaCl- solução estéril) na

quantidade 1/6 do volume do sobrenadante. A solução foi incubada por 12 a 16 hs a 4°C para precipitação do fago e posteriormente, centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos 4°C para descartar o sobrenadante. O precipitado foi, então, suspenso em 1 mL de TBS e precipitado com 1/6 do volume de PEG/NaCl, por 1 hora no gelo. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 200 uL de TBS a 0,02% , obtendo-se então o eluato amplificado.

3.6.4 Extração de DNA dos Clones

As colônias oriundas das placas do 3º ciclo do *biopanning*, foram isoladas e transferidas para poços de placas de cultura (tipo *deepwell*), contendo 1,2 ml de cultura de ER2738 em fase *early-log* (OD~0,3) para a extração do DNA dos fagos. Aos poços da placa foram adicionadas as 96 colônias dos fagos das 100 contadas na diluição de 10^{-2} . A placa foi então vedada com um adesivo e perfurada, incubada a 37°C, por 24 horas, sob vigorosa agitação 250 rpm. Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700 rpm, a 20°C, durante 40 minutos. 800 uL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e incubados, por 10 minutos, com 350 uL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20°C, durante 40 minutos para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100 uL de tampão iodeto (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA e 4 M de NaCl) foram adicionados aos fagos precipitados. As placas foram agitadas vigorosamente por 40 segundos e 250 uL de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas (3700 rpm, 20°C, por 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O DNA dos fagos foi lavado com 500 uL de etanol a 70% e centrifugado nas

mesmas condições. Finalmente, o DNA precipitado remanescente foi diluído em 20 uL de água Milli-Q. A quantidade do DNA de fita simples foi verificada pela resolução eletroforética em gel de agarose 0,8% e corado com solução de brometo de etídeo.

3.6.5 Sequenciamento

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5 pmol do *primer-96gIII*(5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'-Biolab) e Premix(*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amershan Biosciences*). A reação de 35 ciclos foi realizada em um Termociclador de Placas (*MasterCycler-Eppendorf*) nas seguintes condições: Desnaturação (a 95°C por 20 segundos); o anelamento do primer (a 50°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). A precipitação do DNA sequenciado foi feito com 1 uL de Acetato de Amônio e 27,5 uL de Etanol. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 3700 rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150 uL de Etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 minutos, a 3700 rpm. A solução de Etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800 rpm, durante um segundo. A placa foi coberta por papel alumínio e permaneceu em repouso durante 15 minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10 uL do tampão de diluição (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences*). A leitura do sequenciamento foi realizada no sequenciador automático MegaBase 1000 (*Amersham Biosciences*) no Laboratório de Nanobiotecnologia (INGEB/UFU).

3.7 Análises *in silico*

As sequências de DNA obtidas após o sequenciamento foram submetidas à análise *in silico* disponíveis *on-line*. As sequências dos peptídeos foram traduzidas utilizando o programa ExPASy (<http://web.expasy.org/translate>). O alinhamento dos peptídeos selecionados foi gerado utilizando o programa CLUSTAL W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html/>). Para caracterização dos peptídeos mais reativos no ELISA, suas sequências foram comparadas a sequências conhecidas do banco de dados SwissProt utilizando a ferramenta *on-line* de alinhamento BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), com o algoritmo *blastp*, limitando a procura a sequências do complexo *M.tuberculosis*. Para análises de similaridade e alinhamento tridimensional com proteínas do *M.tuberculosis* foi aplicado o programa *Pepitope Server* (<http://pepitope.tau.ac.il/>) (MAYROSE et al., 2007)

3.8 Screening dos clones com *pool* de soros

Para analisar a reatividade dos clones às IgGs dos indivíduos com TB+(ativa), PPD+, PPD-, foi realizado o ensaio ELISA em microplaca (NUNC MAXISORP) carregada, sensibilizada com 40 ug/poço de anticorpo monoclonal anti-M13(*GE Healthcare*) sem marcação, diluído em tampão carbonato 50 mM pH 9,6 por 16 horas a 4°C, bloqueada com tampão (PBS 1X + 5% de BSA) por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada três vezes com PBS-T a 0,05% e incubada com 100 uL/poço de cultura dos fagos selecionados e mais uma cultura de fago selvagem como controle, por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada com PBS-T 0,05% por cinco vezes e os clones miméticos as proteínas do *M.tuberculosis*, foi incubada por 1 hora a 37°C com o respectivo *pool* de soro na concentração de 1:500, diluídos em tampão de bloqueio. Lavada seis vezes e

incubada com anti-IgG humana conjugada com Peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T 0,05% + 5% de BSA durante 1 hora a 37°C. Lavada seis vezes com PBS-T 0,05%. A ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico 2N. A reatividade foi obtida em leitora de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) com absorvância de 492 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

3.9 ELISA dos clones D8, F10, G12 com pool de soros

Com os clones D8, F10, G12 e um clone irrelevante de câncer de próstata como controle (SPLFPWL), foi realizado um ELISA com 100 uL de *pool* de soros de indivíduos com tuberculose (TB+), indivíduos com prova tuberculínica positiva (PPD+) e prova tuberculínica negativa (PPD-).

Sensibilizou-se uma placa de microtitulação (NUNC MAXISORP) com 10^{1°}(Pfu) dos clones por poço. A sensibilização se deu com 50 uL de tampão carbonato 50 mM pH=9,6, por 16 horas a 4°C. No dia seguinte a placa foi bloqueada com 300 uL de tampão (PBS 1X + 5% de BSA) por 1 hora a 37°C. Em seguida, lavou-se três vezes a placa com PBS-T a 0,05% e incubada com 100 uL pool de soros por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada com PBS-T 0,05% por cinco vezes e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C com anti-IgG humana conjugada com Peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T 0,05% + 5% de BSA durante 1 hora a 37°C. Lavada a placa seis vezes com PBS-T 0,05%, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada. A reação foi interrompida pela solução de ácido sulfúrico 2N. A reatividade foi obtida em leitora de placas com

absorbância de 492 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

3.10 ELISA do clone F10 com soros individuais: TB ativa (TB+), PPD positivo (PPD+), PPD negativo (PPD-)

Uma placa carregada foi sensibilizada com fagos 10^{10} por poço com 50 uL de tampão carbonato 50 mM pH=9,6, por 16 horas a 4°C. Em seguida a placa foi bloqueada com 300 uL de tampão (PBS 1X + 5% de BSA) por 1 hora a 37°C. Lavou-se três vezes com PBS-T a 0,05% e incubada com 100 uL de soros individuais de TB+, PPD+, PPD-. A placa foi lavada com PBS-T 0,05% por cinco vezes e incubada por 1 hora a 37°C com anti-IgG humana conjugada com Peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T 0,05% + 5% de BSA durante 1 hora a 37°C. Após as seis lavagens com PBS-T 0,05%, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada. A reação foi interrompida pela solução de ácido sulfúrico 2N. A reatividade foi obtida em leitora de placas com absorbância de 492 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

3.11 ELISA do clone F10 com soros de indivíduos em tratamento

Uma placa carregada foi sensibilizada com fagos 10^{10} por poço com 50 uL de tampão carbonato 50 mM pH=9,6, por 16 horas a 4°C. Em seguida a placa foi bloqueada com 300 uL de tampão (PBS 1X + 5% de BSA) por 1 hora a 37°C. Lavou-se três vezes com PBS-T a 0,05% e incubada com 100 uL de soros dos indivíduos em tratamento. A placa foi lavada com PBS-T 0,05% por cinco vezes e incubada por 1 hora a 37°C com anti-IgG humana conjugada com Peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em

PBS-T 0,05% + 5% de BSA durante 1 hora a 37°C. Após as seis lavagens com PBS-T 0,05%, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada. A reação foi interrompida pela solução de ácido sulfúrico 2N. A reatividade foi obtida em leitora de placas com absorbância de 492 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

3.12 Extração da proteína do *Mycobacterium tuberculosis*

O extrato total proteico do patógeno foi obtido de colônia do *M. tuberculosis* em cultura de meio Löwenstein - Jensen e foram submetidas a uma centrifugação de 8.000 x g por 15 minutos a 4°C, após lavadas por 3 vezes com 1,0 ml de tampão contendo 10 mM Tris (pH 8.8); 3 mM NaCl; 5,0 mM EDTA mais 1 mM de fluoreto de alfa-fenilmetil sulfonila (PMSF) + Isopropanol e centrifugado por 2 min à 3.000 x g. O precipitado formado foi lisado com 200 uL da solução: 10 mM Tris (pH 8.8); 0,5 % p/v dodecil sulfato de sódio (SDS); 5,0 mM etileno diamino tetra acetato (EDTA); 1,0mM PMSF. Ao lisado foi acrescentado 100,0 mM *Dithiothreitol*, β -mercaptanoethanol (DTT). As amostras foram fervidas à 100 °C por 3 minutos e estocadas à – 80°C. A quantificação das proteínas foi realizada pelo manual do fabricante de BRADFORD. Todo o processo foi realizado seguindo as normas de biossegurança do laboratório de nível 2.

3.13 ELISA com extrato proteico do *M.tuberculosis*, soros individuais TB+,PPD+,PPD-, e indivíduos em tratamento

Uma placa carregada foi sensibilizada com 2.6 ug/ml de extrato proteico por do *M.tuberculosis* diluídos em tampão carbonato 50 mM pH=9,6, por 16 horas a 4°C. Em seguida a placa foi bloqueada com 300 uL de tampão (PBS 1X + 5% de BSA) por 1

hora a 37°C e, posteriormente, lavou-se três vezes com PBS-T a 0,05% e incubou-a com soros dos indivíduos TB+,PPD+,PPD- e em tratamento na proporção de 1:100. A placa foi, novamente, lavada com PBS-T 0,05% por cinco vezes e incubada por 1 hora a 37°C com anti-IgG humana conjugada com Peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T 0,05% + 5% de BSA durante 1 hora a 37°C. Após as seis lavagens com PBS-T 0,05%, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada. A reação foi interrompida pela solução de ácido sulfúrico 2N. A reatividade foi obtida em leitora de placas com absorvância de 492 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

3.14 ELISA competitivo do clone F10 com soros de indivíduos em tratamento e extrato proteico do *M.tuberculosis*

A placa (NUNC MAXISORP) foi sensibilizada com 50 uL de fago na diluição 10^{1°} com tampão carbonato 50 mM pH=9,6, por 16 horas *overnight* a 4°C. Bloqueada com 300 uL de tampão (PBS 1X + 5% de BSA) por 1 hora a 37°C. Os soros de pacientes em tratamento com quimioterápico (30, 60, 90, 120 e 180 dias) foram diluídos em 1:100 em PBS-T (0,005%) -BSA 5% e pré-incubados com 1,0 ug/mL, 7,5 ug/mL, 15,0 ug/mL de extrato proteico do *M.tuberculosis*. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T a 0,05% e incubada com a solução que continha os soros individuais mais o extrato proteico das diferentes concentrações por 1 hora a 37°C nas. A placa foi lavada com PBS-T 0,05% por cinco vezes, e incubadas com anti-IgG humana conjugada com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T 0,05% + 5% de BSA durante 1 hora a 37°C. Lavou-se novamente a placa e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de

água oxigenada. A reação foi interrompida pela solução de ácido sulfúrico 2N. A reatividade foi obtida em leitora de placas com absorvância de 492 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicatas.

3.15 Análises estatísticas

Os dados obtidos neste estudo foram analisados pelo aplicativo *GraphPadPrisma* versão 5.0. Para os dados que apresentaram dispersão Gaussiana foram utilizados testes e análise de variância (ANOVA) com repetição (amostra em duplicatas). Para os índices de significância foi considerado o valor de $p < 0,05$. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os diferentes grupos.

4 RESULTADOS

4.1 Acoplamento das IgG's nas microesferas de proteína G

A primeira etapa do estudo consistiu no acoplamento das IgG's por meio de microesferas magnéticas (*beads* magnéticos) de proteína G para quantificar e verificar a eficiência do isolamento dos anticorpos de pool de soros dos pacientes com tuberculose ativa (TB+), prova de tuberculínica positiva (PPD+), e negativa (PPD-). No ensaio *beads*-ELISA demonstrou um acoplamento significativo comparado ao controle (Figura 2).

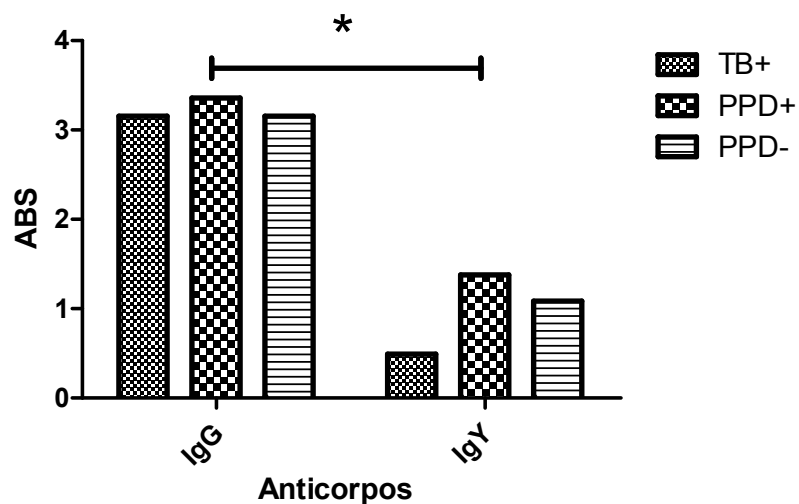


Figura 2. Ensaio de *beads*-ELISA para verificação da eficiência do acoplamento de IgG's nas microesferas magnéticas. O eixo Y representa a leitura média da absorvância a 492 nm, o eixo X representa os diferentes grupos mais o controle que foi incubado com um anticorpo IgY. A diferença entre os grupos e o controle foi evidenciada pelo teste estatístico ANOVA (* $p < 0,05$)

4.2 Seleção de peptídeos miméticos

4.2.1 *Biopanning* - Seleção de peptídeos

Para seleção dos peptídeos ligantes aos anticorpos policlonais de IgG's dos soros de indivíduos com tuberculose ativa (TB+), a especificidade dos peptídeos foi assegurada por dois processos de subtração negativa contra a IgG de indivíduos com prova tuberculínica positiva (PPD+), e negativa (PPD-). A eluição ácida através da glicina, possibilitou a seleção específica dos fagos ligantes a IgG's de indivíduos com tuberculose ativa. A quantidade de fagos selecionados pelos três ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificados e não amplificados do terceiro ciclo. Os títulos de entrada dos fagos no *Biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída (Tabela

1), pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos contra a tuberculose ativa permanecem ligados às IgG's por interação peptídeo/anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade foram removidos durante as lavagens.

Tabela 1: Títulos (em *pfc*: unidades formadoras de colônias) obtidos nos três ciclos de seleção.

Ciclos	Número de partículas de fagos	
		Entrada Saída
Primeiro	Biblioteca original	1×10^{11} $4,2 \times 10^7$
Segundo	Pool de fagos	1×10^{11} $1,5 \times 10^{10}$
Terceiro	Pool de fagos	1×10^{11} $1,0 \times 10^5$

4.2.2 Extração do DNA dos clones selecionados

Após o crescimento das colônias, foram escolhidas 96 para extração do DNA e posterior sequenciamento. Para análise da qualidade do DNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídeo (Figura 3). Este procedimento demonstrou que a extração do DNA foi eficiente, e com quantidade suficiente para realização da reação de sequenciamento. Segundo protocolo utilizado no laboratório de Nanobiotecnologia.

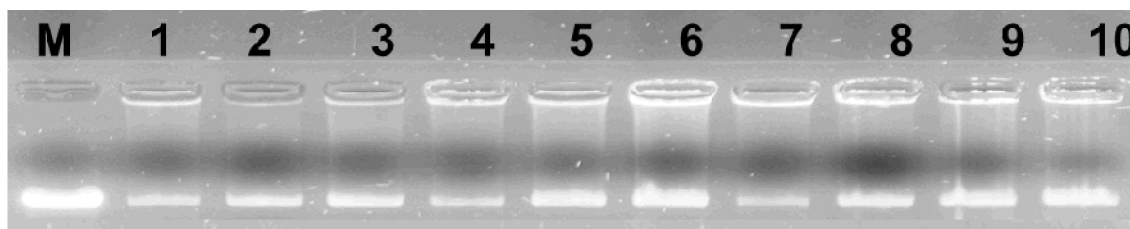


Figura 3. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo contendo: M; DNA do fago M13 padrão 400ng(GE) e (1-10) amostras do DNA dos clones selecionados no *Biopanning*.

4.2.3. Sequenciamento do DNA e análise *in silico*

Foram selecionados 96 clones e sequenciados. Por análise *in silico*, 45/96 (46,87%) dos clones apresentaram sequências de nucleotídeos válidas. Destas 17/45 (37,77%) são diferentes entre si e 28/45 (62,22%) são semelhantes. A Tabela 2 demonstra a sequência de aminoácidos e a frequência dos clones.

Tabela 2. Sequências válidas dos aminoácidos dos peptídeos sequenciados, frequências absoluta e observada.

Sequências Válidas	Frequência Absoluta	Frequência Observada
N V D A T N K P M L P S	1	1/45 (2,2%)
G I H V P W M P P V A F	1	1/45 (2,2%)
S P Q A I W K L P N K T	1	1/45 (2,2%)
N S N N A T L Y P V R P	6	6/45 (13,3%)
N V I S L R Q A V H H L	1	1/45 (2,2%)
N D D Q A K S D K M A L	1	1/45 (2,2%)
K A H T P V T F G L T H	2	2/45 (4,4%)
Y N Q E L H I P R T H K	3	3/45 (6,6%)
E H M A L T Y P F R P P	2	2/45 (4,4%)
H T L Q I P Q H A T S F	1	1/45 (2,2%)
V S S S A V V R F S L I	1	1/45 (2,2%)
E A H V M H K V A P R P	1	1/45 (2,2%)
Q P P A Q T T R Y P I D	3	3/45 (6,6%)
A I S S L S S Y N T S I	1	1/45 (2,2%)
Q S S H G L H V A G K S	1	1/45 (2,2%)
S V S V G M K P S P R P	4	4/45 (8,8%)
D D Y Y M D K P H R W P	1	1/45 (2,2%)
N P L E R L L D R P P F	2	2/45 (4,4%)
K H S Y Q T S W H L N N	1	1/45 (2,2%)
V Y K T P N S T A N R W	4	4/45 (8,8%)
L L A D T T H H R P W T	1	1/45 (2,2%)
G Q P L I A H S T K L L	2	2/45 (4,4%)
H N L V P S H Y T M V K	1	1/45 (2,2%)
S P P P Q S T I Q P H R	1	1/45 (2,2%)
T F R D D Y T M Q K P G	1	1/45 (2,2%)
N P L E R L L D R P P F	1	1/45 (2,2%)
Total	45	

Os peptídeos selecionados por *Phage display* foram submetidos à análises de similaridade com proteína MPT 64, importante constituinte de membrana do complexo *M.tuberculosis*. O programa *Pepitope Server* (<http://pepitope.tau.ac.il/qindex.html>) foi utilizado para o alinhamento em 3D dos peptídeos com as proteínas, evidenciando suas regiões de similaridades. Dentre as sequências válidas, a que representa o clone F10 (VYKTPNSTANRW) é similar à proteína de membrana a MPT 64 do *M.tuberculosis*. Como pode ser vista na (Figura 4a, 4b), as esferas vermelhas indicam a região de similaridade na proteína, mostrando um potencial alvo a ser estudado.

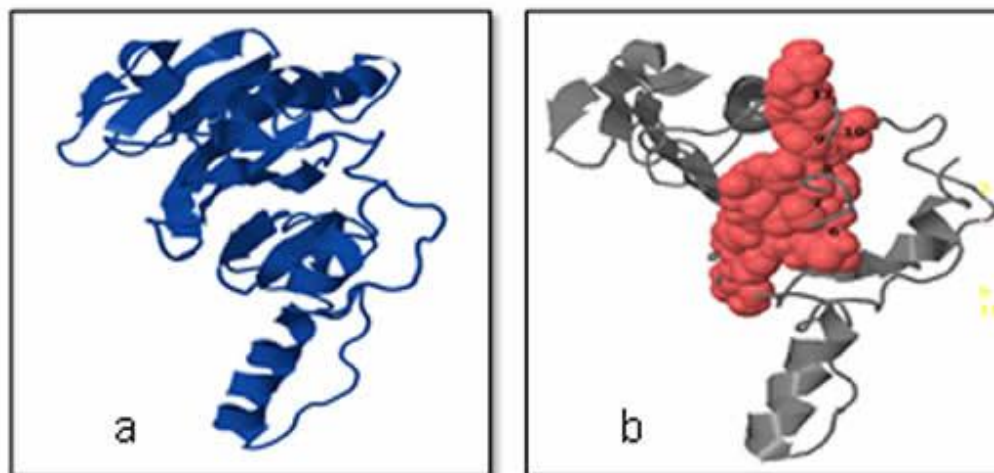


Figura 4 (a-b). Similaridade entre os peptídeos selecionados no *Biopanning* e a proteína MPT 64 do complexo *M.tuberculosis* utilizando o programa *Pepitope Server*. A Figura a demonstra a estrutura em 3D da MPT 64. A Figura b mostra em 3D a região da proteína que apresenta similaridade com os peptídeos selecionados (em vermelho) (MAYROSE et al.,2006).

4.3 Validação por Phage-ELISA dos mimetopos selecionados no Biopanning

Os clones eluidos do terceiro ciclo do *Biopanning* foram submetidos ao teste ELISA com pool de soro dos indivíduos com tuberculose (TB+), prova tuberculínica positiva (PPD+), e negativa (PPD-), com intuito de analisar a reatividade do alvo. O clone selvagem foi utilizado como controle negativo de reação.

A (Figura 5) apresenta um painel de pré-validação dos clones obtidos mostrando a reatividade dos anticorpos presentes nos soros dos indivíduos contra clones selecionados. Os clones que obtiveram uma absorbância média superior ao controle (clone selvagem) foram selecionados como prováveis mimetopos relacionados às proteínas expressas em indivíduos doentes.

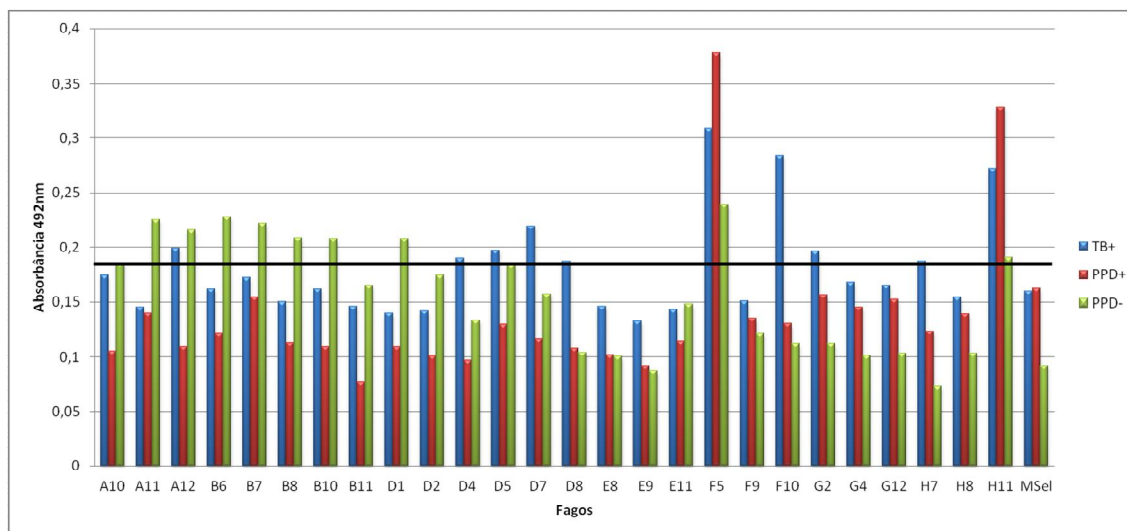


Figura 5: Gráfico representativo das leituras das absorbâncias a 492 nm do ELISA apresentando a reatividade dos 26 clones selecionados pelo *biopanning* reconhecidos por IgG's de pool de soros de indivíduos com tuberculose ativa (TB+), prova de tuberculínica positiva (PPD+) e prova tuberculínica (PPD-) considerados indivíduos saudáveis. Para comparação, o clone selvagem (Sel) foi submetido às mesmas condições. Os clones D8, E8, E9, F9, F10, G2, G4, G12, H7 e H8 apresentaram maior afinidade quando comparados ao selvagem. Foi escolhido um *cut-off* de 0,180 comparando as médias de TB+ e selvagem.

Para avaliar o comportamento dos clones mais reativos realizou-se o *Phage-ELISA*. Neste experimento testou os clones D8, F10, G12 e clone irrelevante com pool de soros dos indivíduos com tuberculose (TB+), indivíduos com prova tuberculínica positiva (PPD+) e indivíduos considerados saudáveis aqueles considerados prova tuberculínica negativa (PPD-) (Figura 6).

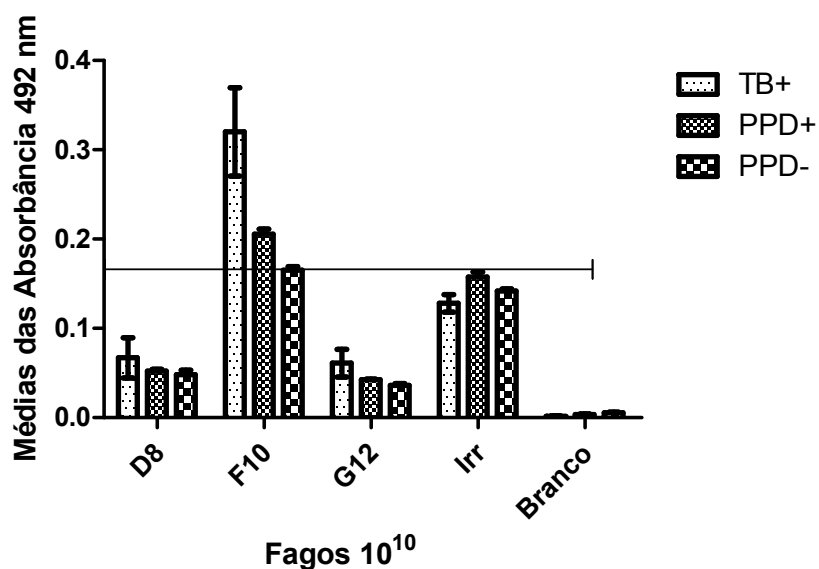


Figura 6. O gráfico de barras representa a média e o desvio padrão da reatividade dos clones D8, F10, G12, na concentração de 10^{10} com *pool* de soros em relação ao clone irrelevante (Irr) para o PPD+. O *cut-off* escolhido foi de 0,170 acima do clone irrelevante. O clone F10 apresentou uma reatividade significativa ($p < 0.05$) quando comparado com os outros clones.

Para avaliar a reatividade sorológica dos pacientes com tuberculose (TB+), prova tuberculínica positiva (PPD+), negativa (PPD-) e os indivíduos em tratamento (0 a 30, 31 a 60, 61 a 120, 121 a 183 dias) foi realizado um *Phage-ELISA* contra o clone F10 em soros individuais. O gráfico de razão (clone F10 / fago irrelevante) mostra que o clone F10 apresenta uma reatividade

significativa em pacientes com dias de tratamento quando comparados com pacientes com TB+, PPD+ e PPD- (Figura 7).

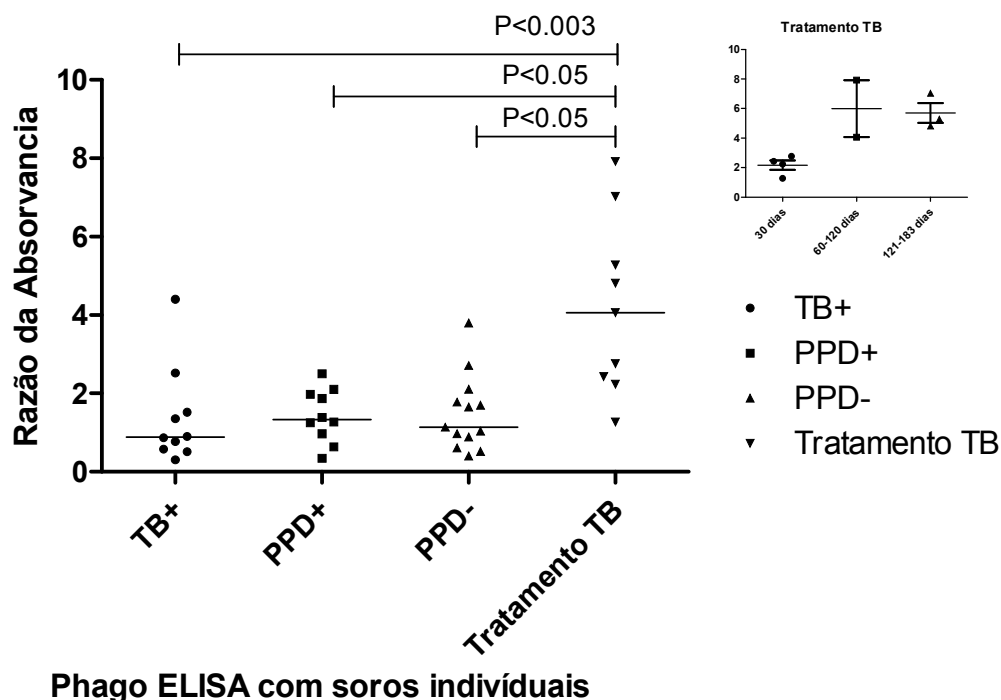


Figura 7. Razão das absorvâncias do clone F10 sob fago irrelevante: clone F10 apresenta diferenças significativas entre indivíduos com tuberculose (TB+) e os em tratamento $p < 0,003$ em relação aos demais grupos. Os indivíduos em tratamento foram assim distribuídos: de 0 a 30 dias (4/9), 61 a 120 dias (02/9), 121 a 183 (3/9). Em menor escala, encontram-se as razões das absorvâncias (492 nm) para o grupo Tratamento TB discriminadas por períodos de tratamento.

A curva ROC demonstrou a sensibilidade e a especificidade do clone F10 com relação aos pacientes em tratamento quando comparado com os pacientes PPD-. Aqueles pacientes em tratamento apresentaram uma diferença significativa ($p = 0,01119$ e área = 0,8248) quando comparados com PPD- (Figura 8) e sensibilidade de 77,78% e especificidade de 76,92%.

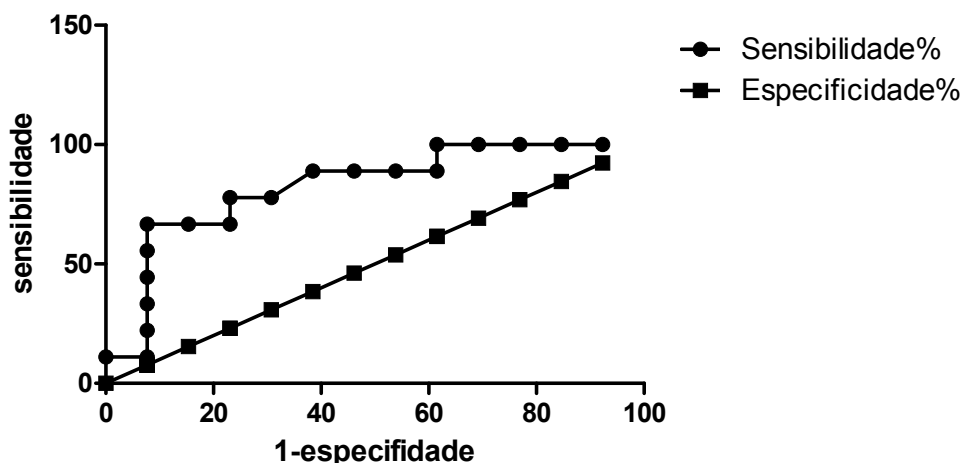


Figura 8. Representa a curva ROC do clone F10 com indivíduos prova tuberculínica (PPD-) considerados indivíduos saudáveis e em tratamento. Com uma área de 0,8248 (IC a 95% de 0,6435 a 1,006), erro padrão de 0,09246 e $p=0,01119$. A sensibilidade (77,78%) e especificidade (76,92%).

A (figura 9) mostra o gráfico de reatividade do teste ELISA de soros dos grupos de tuberculose (TB+), prova tuberculínica positiva (PPD+), negativa (PPD-) e pacientes em tratamento de 0-180 dias contra o extrato proteico do *M.tuberculosis* na concentração de 2,6 ug/ml. Os pacientes com tuberculose apresentaram uma reatividade significativa contra as proteínas bacterianas quando comparados aos pacientes em tratamento.

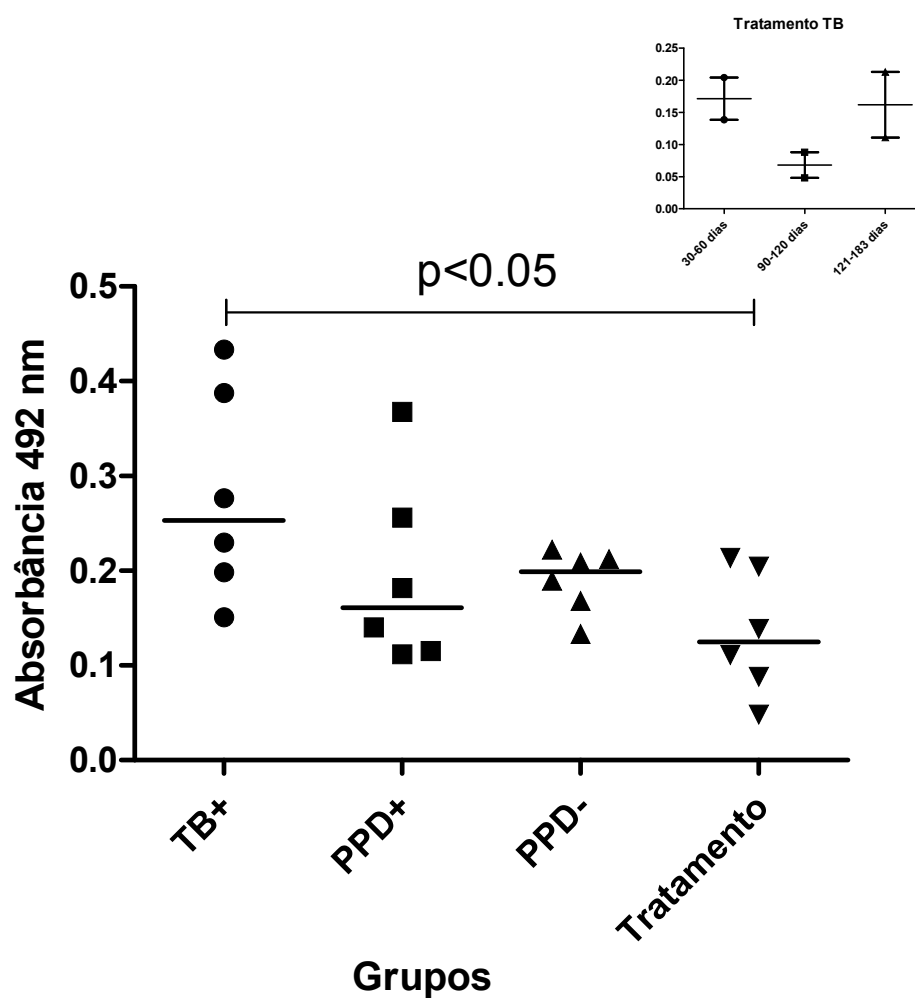


Figura 9. Reatividade do teste Elisa entre os grupos TB+, PPD+, PPD- e pacientes em tratamento contras as proteínas *M.tuberculosis*. O eixo x corresponde aos grupos e o eixo Y representa a absorbância em 492nm. A análise estatística foi feita pelo programa Graphpadprism, utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. Em menor escala, encontram-se as absorbâncias para o grupo Tratamento TB discriminadas por períodos de tratamento.

No ELISA competitivo do clone F10, verificou-se que quanto maior a concentração do extrato proteico, menor é a ligação do anticorpo de paciente em tratamento no período de 0 a 30 dias ao peptídeo apresentado pelo clone, uma vez que há uma diminuição do valor da absorbância. No entanto, essa diferença não é observada nos pacientes em tratamento superior a 60 dias.

A (figura 10) demonstra que os anticorpos dos indivíduos em tratamento no período de 0 a 30 dias reconhecem uma região antigênica do extrato proteico semelhante ao peptídeo expresso, uma vez que os anticorpos foram capazes de reconhecer o peptídeo apresentado pelo fago em menor concentração do extrato proteico, o mesmo perfil não é visto em outros indivíduos em tratamento.

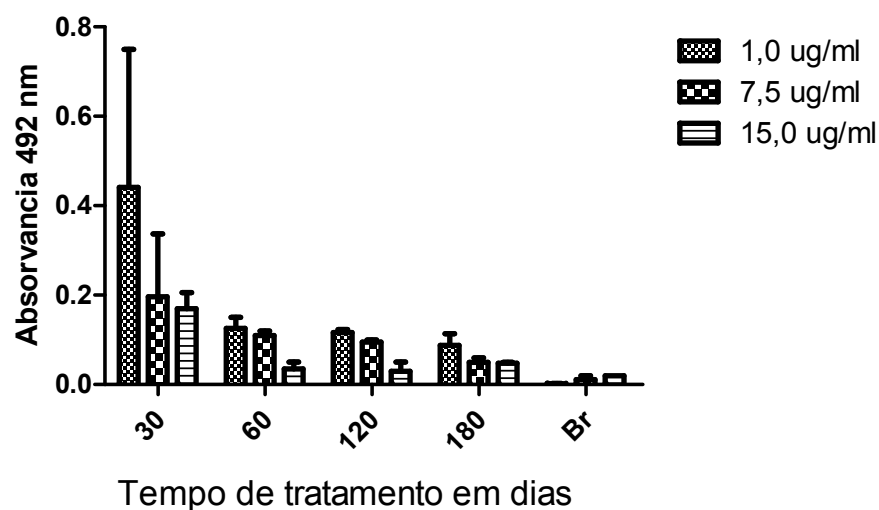


Figura 10. Demonstra o ELISA competitivo do clone F10 com soros de indivíduos em tratamento da tuberculose e com diferentes concentrações do extrato proteico do *M.tuberculosis* (1,0 ug/ml, 7,5 ug/ml, 15,0 ug/ml). O eixo Y representa a média das absorbâncias em 492 nm e no eixo X o tempo de tratamento em dias.

5. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com a perspectiva de verificar a imunoreatividade de biomarcadores obtidos dos clones selecionados pela técnica do *Phage display* para utilização em plataformas de diagnóstico da tuberculose. Entretanto verificou-se que o biomarcador representado pelo clone F10 foi melhor para o monitoramento do tempo de tratamento de indivíduos tuberculosos com quimioterápicos preconizados pelo Ministério de Saúde do Brasil (MS/SVS 2011). Vários estudos tem aplicado a técnica de *Phage display* como ferramenta na identificação de biomoléculas para o diagnóstico da tuberculose (LIU et al., 2011). Para o monitoramento do tratamento como há poucos estudos sobre biomarcadores (WALLIS et al., 2010), a técnica de *Phage display* apresenta-se como uma ferramenta importante.

A seleção de peptídeos obtidos neste estudo foi realizada contra IgG's purificadas através de *beads* magnéticos. Várias outras técnicas tem sido utilizadas para separação de proteínas, mas os *beads* magnéticos tem sido utilizados por ser uma metodologia rápida e eficaz na obtenção de IgG's de boa qualidade com pequenas amostras (SARAFIK; SAFARIKOVA, 2004).

A metodologia para captura de IgG's se mostrou eficiente uma vez que houve uma absorbância significativa no reconhecimento do anti-IgG aos anticorpos acoplados nos *beads*, quando comparados ao controle. As absorbâncias do controle demonstram a eficiência do bloqueio, garantindo a seleção de mimetótipos. A seleção de peptídeos foi realizada contra IgG's provenientes de soro de indivíduos com tuberculose (TB+), prova tuberculínica positiva (PPD+), e prova tuberculínica negativa (PPD-) considerados como saudáveis, a fim de reduzir a possibilidade de ligação inespecífica, foi realizado uma seleção subtrativa com IgG's de indivíduos saudáveis. Esta estratégia teve como propósito diminuir a ligação inespecífica e aumentar a

seleção de peptídeos ligantes de IgG's associadas a tuberculose ativa (TB+). Esta seleção foi utilizada com sucesso por LIU e colaboradores, 2010, para identificar proteína de membrana do *M.tuberculosis* em indivíduos com tuberculose.

O alinhamento entre os 45 peptídeos selecionados foi realizado utilizando o programa CLUSTAL W versão 2.1 e o clone F10 apresentou similaridade com a proteína MPT64, de baixo peso molecular (28 a 38-KDa), imunogênica do complexo *M.tuberculosis* e o seu alinhamento se deu com uma possível região antigênica (Figura 4b). A MPT64 que é um importante antígeno utilizado no diagnóstico da tuberculose, principalmente na extra pulmonar, entretanto uma larga variabilidade antigênica e da resposta imune gerada nos hospedeiros tem tornado sua aplicação limitada (YANG et al., 2011).

O clone F10 apresentou uma reatividade estatisticamente significativa com *pool* de soros entre os demais clones após o teste ELISA, quando comparado com fago irrelevante. Portanto o clone F10, selecionado através de IgG's purificadas de *pool* de soro de indivíduos com TB+, PPD+, e PPD-, a partir de uma biblioteca comercial de peptídeos randômicos, demonstra ser um candidato a biomarcador específico para o monitoramento do tratamento da tuberculose.

Neste estudo foi possível verificar que este clone apresentou resultados favoráveis como biomarcador para avaliar indivíduos em tratamento da tuberculose no ensaio ELISA, principalmente no tempo de tratamento de 0 a 30 dias. Segundo (WALLIS et al., 2010), há poucos estudos sobre biomarcadores para o monitoramento do tratamento da tuberculose. A identificação destes biomarcadores é fundamental para o controle da tuberculose no mundo (WALLIS et al., 2010). Com o abandono ao tratamento o indivíduo com tuberculose torna-se susceptível à cepas multirresistente do *M.tuberculosis* (WHO,2010).

Um estudo realizado por ARIAS-BOUDA e colaboradores,

2003, para avaliar a reatividade de anticorpos aos antígenos expressos pelo *M.tuberculosis* em indivíduos com tuberculose antes e durante o tratamento, em relação a outras doenças pulmonares, relata que os níveis de reatividade e de IgG's são maiores em pacientes sem tratamento em relação ao grupo de doenças pulmonares. A reatividade indicou também, que na presença de sintomas mais intensos em relação aos menos intensos, de que há uma maturação de afinidade de anticorpos específicos durante a tuberculose ativa, implicando na concentração menor de IgG's nesta fase considerada aguda pela sintomatologia da doença. Portanto a imunoreatividade do clone F10 aos pacientes com tuberculose ativa, apresentou uma diferença significativa em relação aos grupos controles e em tratamento (Figura 10).

A reatividade no teste ELISA dos grupos com o extrato proteico (Figura 10) foi maior para o grupo tuberculose ativa (TB+) demonstrando que na presença de uma proteína específica (antígeno) houve um aumento na concentração de anticorpos específicos quando comparado com o grupo dos indivíduos em tratamento. Alguns estudos demonstram que durante o período de tratamento ocorre a liberação de antígenos após a morte do patógeno porque os quimioterápicos antituberculosos agem contra bacilos extracelulares e os intracelulares que ficam latentes. Possivelmente estas células expressam estes antígenos e estimula a produção de anticorpos. Os medicamentos bactericidas *Isoniazida* (H), *Estreptomina* (S) e *Pirazinamida* (Z) são de primeira linha aplicados na fase inicial do tratamento eliminando os bacilos metabolicamente ativos e a *Pirazinamida* os de crescimento lento (SILVA; ANÍSIA, 2007). O *Etambutol* (E) é bacteriostático e utilizado em conjunto aos mais potentes para evitar os bacilos multidrogas resistentes (MDR-TB) (MS/SVS, 2011).

O clone F10 no ELISA competitivo com extrato proteico

do *M.tuberculosis* (Figura 10) demonstrou que sua especificidade com os indivíduos no início do tratamento na presença de concentração menor do antígeno é mais reativo. À medida que a concentração aumenta, esta reatividade diminui. Possivelmente isto se deve a uma intensa estimulação da resposta humoral por antígenos liberados a partir de patógenos mortos, refletindo a atividade bactericida dos quimioterápicos tuberculosos, levando à produção de anticorpos de baixa afinidade contra estes antígenos liberados (ARIAS-BOUDA et al., 2003). Justifica-se a melhor reatividade do clone F10 em relação ao extrato proteico, devido a uma abundância de antígenos que comprometem a ligação antígeno-anticorpo, podendo resultar em sua menor reatividade.

6. CONCLUSÕES

-Por meio da tecnologia de *Phage Display* foi possível selecionar peptídeos imunorreativos contra anticorpos circulantes em indivíduos com tuberculose.

-Análises de bioinformática mostraram similaridade entre a proteína MPT 64 expressa na membrana do *M.tuberculosis* com o peptídeo obtido no *Biopanning*.

-A partir do ensaio ELISA foi detectada imunorreatividade entre o clone F10 selecionado e amostras de soro de indivíduos com tuberculose, pré-validando um provável biomarcador com potencial para o monitoramento do tratamento da tuberculose, embora ainda sejam necessários estudos nesse sentido.

-Os resultados deste estudo indicam que os mimetopos selecionados são promissores no que se refere ao uso para o monitoramento ao tratamento da tuberculose.

-A tecnologia de biblioteca de peptídeos esta sendo aplicada para estudos que visam a caracterização molecular.

7. REFERÊNCIAS

ABEBE F.; BJUNE G. The prospective role of antibody response during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Clinical experiment immunology**, v.157, n.2, p. 235-243, aug. 2009.

AKHTER Y.; TUNDUP, S.; HASNAIN, S.E. Novel biochemical properties of a CRP/FNR family transcription factor from *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Medical Microbiology**, 297, n. 6, p. 451-457, oct. 2007.

ANDERSEN P.; MUNK M.E.; POLLOCK J.M.; DOHERTY T.M. Specific immune-based diagnostic of tuberculosis. **The Lancet**, 23, 356((9235), p.1099-1104, 2000.

ANDERSEN P. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. **Trends in Microbiology**, v. 15, n.1, p.7-13, jan. 2007.

ARIAS-BOUDA L.M.; KUIJPER S.; VAN der WERF A.; NGUYEN L.N.; JANSEN H.M.; KOLK A.H. Changes in avidity and level of immunoglobulin G antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in sera of patients undergoing treatment for pulmonary tuberculosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.4, p. 702-709, jul. 2003.

ASSIS N.C.S. Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n.1, p. 1-7, fev. 2007.

AZZAZY H.M.E & HIGHSMITH, W.E. Phage display Technology Clinical Applications and Recent Innovations. **Clinical Biochemistry**, v.35. p. 425-445, 2002.

BARBAS C.F. III; BURTON D.R.; SCOTT J.K.; SILVERMAN G.J. **Phage display: A Laboratory Manual**. Plain View, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

BRIGHTBILL H.D.; LIBRATY D.H.; KRUTZIK S.R.; YANG R.B.; BELISE J.T.; BLEHARSKI J.R.; MAITLAND M.; NORGARD M.V.; PLEVY S.E.; SMALE S.T.; BRENNAN P.J.; BLOOM B.R.; GODOWSKI P.J.; MODLIN R.L. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, 30, 285 (5428), p. 732-736, 1999.

BRIGIDO M.D.M. & MARANHÃO A.Q. Bibliotecas apresentadas em Fagos. **Biociência e Desenvolvimento**, v.26, p.44-51, 2002

BUA A.; ROSU V.; MOLICOTTI P.; DAS GUPTA S.K.; AHMED N.; ZANETTI S.; SECHI L.A. Phages specific for mycobacterial lipoarabinomannan help serodiagnosis of tuberculosis. **New Microbiologica**, v. 32 n.3 p. 293-296, fev. 2009.

CARVALHO W.S.; MIRANDA S.S.; PESQUERO J.L.; GOMES M.A. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.43, n.1, p. 31-38, mar. 2007.

COLLINS H.L.; KAUFMANN, S.H.E. The many faces of host responses to tuberculosis. **British Society for Immunology**, v.103, n.1, p. 1-9, mai. 2001.

COSTA A.C. et al. Resposta imune humoral ao antígeno rGroES do *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com tuberculose e seus contatos domiciliares. **Revista de Patologia Tropical**, v.40, n.1, p. 23-24, jan – mar. 2011.

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

FLORES-BATISTA V.C. Low expression of antigen presenting and costimulatory molecules by lung cells from tuberculosis patients. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v.40, n. 1 p. 21671-1679, dec. 2007.

FLYNN J.L.; CHAN J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review Immunology**, v.19, p.93-129, apr. 2001.

GOLDSTEIN W.; MAIMON N.; AVENDAÑO M. Central nervous system tuberculous abscess. **European Journal of Internal Medicine**, v.18, n.6, p. 504–506, oct. 2007.

HASEGAWA N.; MIURA T.; ISHII K.; YAMAGUCHI K.; LINDENER L.H.; MERRITT S.; MATTHEWS J.D.; SIDDIQI S.H. New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.908-912, 2002.

HIRANO K.; AONO A.; TAKAHASHI M.; ABE C. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPT 64 protein of Capilia TB- negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 390-392, 2004.

HÄRMÄ H.; TARKKINEN P.; SOUKKA T.; LÖVGREN T. Miniature Single-Particle immunoassay for Prostate-specific Antigen in Serum Using Recombinant Fab Fragments. **Clinical Chemistry**, v.46, n.1, p.1755-1761, nov. 2000.

HO J.L.; LAPA & SILVA JR. Promotion of a down-modulated lung immune state may be a strategy by *M. tuberculosis* to foster active disease and persistence. **Discov Med**, v.9, p. 34-41, 2010.

HORNUM M.; MORTENSEN K.L.; KAMPER A.L.; ANDERSEN A.B. Limitations of the QuantiFERON®-TB Gold test in detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection in immunocompromised patients. **European Journal of Internal Medicine**, v.19, n.2, p.137-139, set. 2007.

HUEBNER R.E.; SCHEIN M.F.; BASS J.B. JR. The tuberculin skin test. **Clinical Infectious Diseases**, v.17, n.6, p. 968-975, dec. 1993.

JADALI Z.; SANATI M.H. The autoimmune diseases manifested by production of autoantibodies: The autoantigens identified by random peptide library. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, v.7,n.3, p.115-131, set.2008.

KAUFMANN S.H.E.; HUSSEY G.; LAMBERT P.H. New vaccines for tuberculosis. **The Lancet**, v.375, n.9731, p.2110-2119, jun. 2010.

KUMAR V.G.S.; URS T.A.; RANGANATH R. MPT 64 antigen detection for rapid confirmation of *M.tuberculosis* isolates. **BMC Research Notes**, v.4, n.79, p.1-4, mar. 2011.

KUNNATH-VELAYUDHAN S.; GENNARO M.L. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.4, p.792-805, oct. 2011.

LAPA & SILVA JR.; ALMEIDA M.G.; BOECHAT N.; FLORES-BATISTA V.L.;LAGO P.M.; LAZARRINI L.C. Immunosuppressive state in the lung response to *Mycobacterium tuberculosis* .In: Tomioka H, ed. Current Topics on the Profiles of Host Immunological Response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Research Signpost**, Kerala, India, p.167-182, 2009.

LAPA & SILVA JR. Novos Aspectos da Patogenia da Tuberculose. **Pulmão RJ**, v.21, n.1, p 10-14, 2012.

LOPES A. C. **Tratado de clínica médica**. 2. ed. São Paulo,Editora Roca, 2009. p.5504.

LOSET G.A.; BOGEN B.; SANDLIE I. Expanding the versatility of phage Display I: Efficient display of peptide- tags on protein VII the filamentous phage. **PLoS One**, v.6, n.2, e 1470, feb. 2011.

LIU S.; HAN W.; SUN C.; LEI L.; FENG X.; YAN S.; DIAO Y.; GAO Y.; ZHAO H.; LIU Q.; YAO C.; LI M. Subtractive screening with the *Mycobacterium tuberculosis* surface protein phage display library. **Science Direct Tuberculosis**,p.1-8, jul.2011.

MANOUTCHARIAN, K. Recombinant Bacteriophage – based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.99, p.125-131, 2007.

MAGLIONE P.J.; CHAN J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Immunology**, v.39, n.2, p. 676-686, mar. 2009

MAYROSE I. Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides. **Bioinformatics**, v.23, n.8, p.3244-3246. mai. 2007

MELO F.A.F., AFIUNE, J.B.,HIJJAR, M.A., GOMES, M., RODRIGUES, D.S.S., KLAUTAU, G.B. Tuberculose. In: VERONESI, R. *Tratado de I editor científico* FOCACCIA, R.3ª ed. São Paulo. Atheneu. 2005. Cap.70, p.1141-1208.

MOUTINHO I.L.D. Tuberculosis: immunological aspects in the infection and in the disease. **Revista Medicina Minas Gerais**, v.21, n.1 p.42-48. 2011.

MS/SVS-Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica: protocolo de enfermagem**, MS, Brasília, 168 pp. 2011.

MULLEN L.M.; NAIR S.P.; WARD J.M.; RYCROFT A.N.; HENDERSON B. Phage display in the study of infections diseases. **Trends in Microbiology**, v.14, n.4 p.141-147. may. 2006.

NICHOLSON S. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **Journal Experiments Medical**, v.183, p.293-2302 . 1996.

PAI M.; RILEY L.W.; COLFORD J.M.JR. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis a systematic review. **Lancet Infection Diseases**, v.4, n.12, p.761-776, dec. 2004.

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

RAJAVELU P.J.; MADHUMATHI, D.D.; SULOCHANA, D.D. Humoral immuneresponses of normals and tuberculosis patients to multiple sonicate antigens prepared from the most prevalent strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Science**, v.91, n. 7, p. 918-922, oct. 2006.

SALI M.; SANTE D.G.; CASCIO FERRO A.; ZUMBO A.; NICOLOC.; DONÀ V.; ROCCA S.; PROCOLI A.; MORANDI M.; RIA F.; PALÙ G.; FADDA G.; MANGANELLI R.; DELOGU G. Surface expression. of MPT 64 as a fusion with the PE domain of PE-PGRS33 enhances *Mycobacterium bovis* BCG proctetive activity against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Infec Immun**, v.78, n.12, p.5202-5213, dec.2010.

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

SAFARIK L.; SAFARIKOVA M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. **BioMagnetic Research and Technology**, v.2, p.7, nov.2004.

SELIG L.; BELO, M.; CUNHA, A.J.L.A. Óbitos atribuídos à tuberculose no Estado do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n.4, p.417-424. 2004

SILVA J.R.L.; BOÉCHAT N. The resurgence of the study and impact of lung immunopathology. **Journal Brazilian Pneumology**, v. 30, n.4 p.478-484. 2004.

SILVA P.A., AÍNSA J.A. Drugs and Drug Interactions. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. Disponível em: www.tuberculosisTextbook.com; p. 593-633. 2007.

SMITH C.V.; HUANG C.C.; MICZAK A.; RUSSEL D.G.; SACCHETTINI J.C.; HONER zu B.K. Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis* . **J Biol Chem**, 278 (3) p.1735-1743, 2003.

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

SINGH M.; ESPITIA C. Immunologica Diagnosis. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis from basic to patient care. Disponível em: [HTTP:www.tuberculoistextbook.com/tuberculosis2007.pdf](http://www.tuberculoistextbook.com/tuberculosis2007.pdf). Acesso em 20/01/2013.

STEPHEN C.W., HELMINEN, P., LANE, D.P., 1995. Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. **Journal Molecular Biology**, v.248, n.1, p.58-78. 2001

TEIXEIRA H.C.; ABRAMO, C.; MUNK, M.E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Ribeirão Preto - SP, v.33, n.3, p.323-334, 2007.

ULRICH S.T.; KAUFMANN, S.H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. **Journal of Pathology**, v.208, n.2 p. 261–269. jan. 2006

VAN-LUME D.S.M. Diagnóstico imunológico da tuberculose infantil utilizando os antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10. Dissertação (Tese de mestrado), Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

WALLIS R.S.; PAI M.; MENZIES D.; DOHERTY T.M.; WALZL G.; PERKINS M.D.; ZUMLAT A.. Biomarkers and diagnostic for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. **The Lancet**, v.376, n.9752, p.1920-37. nov. 2010.

WILSON R.J.; MAUGHAN W.N.; KREMER L.; BESTRA G.S.; FUTTER K. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. **J Mol Biol**, v.2, p. 519-530, 2004.

WHITEAKER J.R. et al. Antibody-based enrichment of peptides on magnetic *beads* for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers. **Analytical Biochemistry**, v.362, n.1, p.44-54, mar. 2007.

WHO - World Health Organization 2006. The global Plan to stop TB 2006-2015. Genève

WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Control. 2009.

WHO - World Health Organization 2010a. Global tuberculosis control: WHO report 2010. Available from who.int/tb/publications/globalreport/archive/index.html.

WHO - World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2010. World Health Organization, Geneva. 2010

WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Control. 2011.

WINAU F.; WEBER S.; SAD S.; DE DIEGO J.; HOOPS S.L.; BREIDEN B. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, v.24, n.1, p.105-117, 2006.

YAN H.; LIU Z.H.; ZHANG L.T.; WANG J.; YANG H.S.; OIN L.H.; JIN R.L.; FENG Y.H.; CUI Z.L.; ZHENG R.J.; HU Z.Y. Selection and application of peptide mimotopes of MPT64 protein in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal Medical Microbiology**, v.60, n.1, p.69-74. jan. 2011.

ZHANG S.; ZHAO J.W.; SUN Z.Q.; YAN J.H.; ZHAO Q. Development and evaluation of a novel multiple-antigen ELISA for serodiagnosis of tuberculosis. **Elsevier**, v.89, n.1, p.278-284, mar. 2009.

APÊNDICE- FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

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

Nº: _____ **Data da coleta:** _____

Pront.: _____ **Nome do paciente:** _____

Forma TB: () Pulmonar () Extrapulmonar
() Primária () Recidiva

Forma de diagnóstico: Pesquisa de BAAR ()

Radiografia ()

Cultura ()

PPD ()

Outros: _____

Outros diagnósticos: _____

Tratamento: Sim () Não ()

Tempo : _____

CD4: _____ **CD8:** _____

Observações: _____

ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



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



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

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

ANEXO 3 - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN)

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO		Nº
FICHA DE NOTIFICAÇÃO / INVESTIGAÇÃO TUBERCULOSE				
Dados Gerais	1 Tipo de Notificação	2- Individual		2 Data da Notificação
	3 Município de Notificação	Código (IBGE)		
	4 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)	Código		
Dados do Caso	5 Agravado	TUBERCULOSE		6 Data do Diagnóstico
	7 Nome do Paciente	8 Código (CID10)	A 16 9	
	9 (ou) Idade	10 Sexo	11 Raça/Cor	12 Escolaridade (em anos de estudo concluídos)
	13 Número do Cartão SUS	14 Nome da mãe		
Dados de Residência	15 Logradouro (rua, avenida, ...)	Código		16 Número
	17 Complemento (apto., casa, ...)	18 Ponto de Referência	19 UF	
	20 Município de Residência	Código (IBGE)	Distrito	
	21 Bairro	Código (IBGE)	22 CEP	
	23 (DDD) Telefone	24 Zona	25 País (se residente fora do Brasil)	
Dados Complementares do Caso				
Antecedentes Epidemiológicos	26 Nº do Prontuário	27 Ocupação / Ramo de Atividade Econômica		
	28 Tipo de Entrada	29 Caso Novo 2 - Recidiva 3 - Reingresso Após Abandono 4 - Não Sabe 5 - Transferência		
Dados Clínicos	29 Raxo X do Tórax	30 Teste Tuberculínico		
	31 Forma	32 Se Extrapulmonar		
	33 Agravos Associados			
Dados do Laboratório	34 Baciloscopia de Escarro	35 Baciloscopia de Outro Material		
	36 Cultura de Escarro	37 Cultura de Outro Material		
	38 HIV	39 Histopatologia		
	40 Data de Início do Tratamento Atual	41 Drogas		
Tratamento	42 Tratamento Supervisionado	43 Doença Relacionada ao Trabalho		
	44 Município/Unidade de Saúde	45		
Investigador	46 Nome	47 Função		48 Assinatura

Tuberculose

CENEPI 03.4 27/12/01