



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MAURO DANIEL PEREIRA SILVA

OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES MIMÉTICAS A ANTÍGENOS DE *Mycobacterium tuberculosis*

Uberlândia

2025

MAURO DANIEL PEREIRA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES MIMÉTICAS A ANTÍGENOS DE *Mycobacterium tuberculosis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Almeida
Araújo Santos

Coorientadora: Dra. Teresiama Velikkakam

Uberlândia

2025

MAURO DANIEL PEREIRA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES MIMÉTICAS A ANTÍGENOS DE *Mycobacterium tuberculosis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Biotecnologia

Uberlândia, abril de 2025.

Banca examinadora:

Dra. Teresiana Velikkakam (UFU)

Profa. Dra. Bianca Uliana Picolo (UFU)

Me. Lucas Ian Veloso Correia (UFU)

“Nunca desista dos seus sonhos, vá à luta mesmo tendo obstáculos. Lute e vença, você é capaz.” São palavras que minha mãe escreveu em meu caderno alguns anos atrás. Dedico este trabalho a ela, por ser a maior heroína da minha vida e sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos de que de forma direta ou indireta contribuíram, me apoiaram e foram fundamentais para que eu chegasse até onde estou hoje e pudesse realizar este Trabalho de Conclusão de Curso.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela força concedida durante esta jornada, pela orientação e por nunca me desamparar.

A minha mãe, Cleusangela, que sempre me apoiou, me deu suporte, acreditou em mim e não me deixou faltar amor. Sem o seu apoio incondicional não poderia ser quem sou hoje. Agradeço aos meus irmãos, Rafaela, Junio e Fellipe, a minha avó Cleusa e ao restante da minha família, que também sempre me deram suporte e por diversos meios contribuíram para que eu chegasse até aqui.

A minha orientadora Profa. Dra. Fabiana de Almeida Araújo Santos e a minha coorientadora Dra. Teresiana Velikkakam pela amizade e pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho e em todos os momentos de orientação.

A minha companheira de laboratório e amiga de longa data Maraisa, pela amizade e companheirismo durante essa pesquisa e ao longo dos anos.

Aos demais pesquisadores do Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho pelo suporte, amizade e pela disposição em contribuir para essa pesquisa.

Aos meus amigos de curso que espero levar para a vida, pela amizade e por serem um suporte durante toda minha graduação e por nunca deixarem que eu me sentisse sozinho.

Aos meus professores, da graduação, ensino fundamental e médio, pelo ensino e por contribuírem para a minha formação e por moldar quem sou hoje.

A UFU e aos demais órgãos institucionais que me proporcionaram estrutura para realização dessa graduação e deste trabalho.

E ao CNPq, pelo financiamento da pesquisa que possibilitou a realização deste TCC.

RESUMO

Mycobacterium tuberculosis (MTB) é o agente causador da tuberculose (TB), que representa um grave problema de saúde pública global. A TB é transmitida majoritariamente por via respiratória, e o estabelecimento da doença envolve a formação de um granuloma de células imunes. Sua progressão pode levar a sintomas como tosse persistente, febre, perda de peso, mal-estar geral e, em casos mais grave até a morte. Apesar da existência de tratamento, os métodos de diagnóstico ainda apresentam limitações, tornando-se necessário o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas otimizadas. Sob essa perspectiva, a pesquisa envolvendo proteínas recombinantes miméticas a antígenos do MTB tem se mostrado promissora, uma vez que esses biomarcadores podem tornar os meios diagnósticos mais rápidos e acessíveis. Neste estudo, buscou-se otimizar a produção de duas proteínas recombinantes, MTG3F3 e PMT64, miméticas ao antígeno MPT64 do *M. tuberculosis*, com potencial aplicação em testes diagnósticos sorológicos. A clonagem dos genes de interesse, referentes as proteínas, foi realizada em plasmídeos pET32a de expressão em *E. coli* BL21(DE3). Foram avaliadas diferentes condições para maximizar a expressão proteica, incluindo variações de temperatura (30°C e 37°C), tempo de indução (1h a *overnight*) e presença ou ausência de IPTG. A condição mais favorável foi a incubação a 30°C, *overnight*, com indução por IPTG. Após a expressão, as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade e avaliadas por SDS-PAGE, sendo identificadas bandas compatíveis com os pesos moleculares esperados: 31,7 kDa para MTG3F3 e 29,9 kDa para PMT64. As amostras purificadas foram testadas em ensaio *Dot blot* com soros de indivíduos com e sem tuberculose, indicando reatividade de soros com TB frente às proteínas. Os resultados demonstraram a viabilidade de obtenção de proteínas recombinantes imunorreativas a partir de *E. coli*, reforçando o potencial dessas biomoléculas como candidatas para uso em testes imunodiagnósticos rápidos. Apesar dos resultados positivos, pesquisa futuras que visem aprimorar a padronização da produção dessas proteínas em maior escala são indispensáveis. Além de estudos adicionais necessários, como a padronização do teste ELISA.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, proteínas recombinantes, expressão, purificação, diagnóstico.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (MTB) is the causative agent of tuberculosis (TB), a serious global public health problem. TB is primarily transmitted via the respiratory route, and disease establishment involves the formation of an immune cell granuloma. Its progression can lead to symptoms such as persistent cough, fever, weight loss, general malaise, and in severe cases, even death. Despite the availability of treatment, diagnostic methods still present limitations, highlighting the need for the development of optimized diagnostic tools. In this context, research involving recombinant proteins that mimic MTB antigens has shown promise, as these biomarkers can make diagnostic methods faster and more accessible. This study aimed to optimize the production of two recombinant proteins, MTG3F3 and PMT64, mimetic to the MPT64 antigen of *M. tuberculosis*, with potential application in serological diagnostic tests. The genes of interest were cloned into pET32a expression plasmids and expressed in *E. coli* BL21(DE3). Different conditions were evaluated to maximize protein expression, including variations in temperature (30°C and 37°C), induction time (from 1 hour to overnight), and presence or absence of IPTG. The most favorable condition was incubation at 30°C overnight with IPTG induction. After expression, the recombinant proteins were purified by affinity chromatography and evaluated by SDS-PAGE, with bands consistent with the expected molecular weights: 31.7 kDa for MTG3F3 and 29.9 kDa for PMT64. The purified samples were tested in *Dot blot* assays with sera from individuals with and without tuberculosis, showing reactivity of TB-positive sera against the proteins. The results demonstrated the feasibility of obtaining immunoreactive recombinant proteins from *E. coli*, reinforcing the potential of these biomolecules as candidates for use in rapid immunodiagnostic tests. Despite the positive results, future research aiming to improve the standardization of large-scale protein production is essential, along with additional studies such as ELISA assay standardization.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, recombinant proteins, expression, purification, diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da fisiopatologia da tuberculose.	10
Tabela 1: Condições de incubação para a expressão teste.	20
Figura 2: SDS-PAGE do teste de condições de expressão (temperatura, tempo de incubação e indução por IPTG) para a proteína recombinante MTG3F3.	25
Figura 3: SDS-PAGE do teste de condições de expressão (temperatura, tempo de incubação e indução por IPTG) para a proteína recombinante PMT64.	26
Figura 4: Gráficos da cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose da eluição de duas amostras.	27
Figura 5: SDS-PAGE da proteína MTG3F3 após purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose.	28
Figura 6: SDS-PAGE da proteína PMT64 após purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose.	28
Figura 7: Ensaio <i>Dot Blot</i> para detecção de reatividade sorológica frente às proteínas recombinantes MTG3F3 e PMT64.	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 O bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
1.2 Transmissão e fisiopatologia	9
1.3 Epidemiologia.....	11
1.4 Tratamento e imunização.....	12
1.5 Diagnóstico.....	13
1.6 Produção de proteínas recombinantes para diagnóstico	15
1.7 Proteínas MTG3F3 e PMT64	16
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. METODOLOGIA	18
4.1 Desenho dos genes artificiais e análise de bioinformática	18
4.2 Cultura das bactérias transformadas e preparação de <i>backups</i>	19
4.3 Expressão teste para otimização da produção das proteínas recombinantes	19
4.4 SDS-PAGE dos <i>pellets</i> referentes a expressão teste	20
4.5 Expressão principal, otimizada na melhor condição avaliada.....	21
4.6 Processamento do produto da expressão	21
4.7 Purificação das proteínas em cromatografia de afinidade	22
4.8 SDS-PAGE das proteínas purificadas	23
4.9 Validação das proteínas por reconhecimento de anticorpos específicos	23
4.9.1 Amostras.....	23
4.9.2 Ensaio <i>Dot Blot</i>	24
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Melhores condições para expressão das proteínas recombinantes	24
5.2 Purificação da expressão bacteriana	26
5.3 Validação do êxito da purificação	27
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	32
8. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 O bacilo *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (MTB) faz parte de um complexo de bactérias patogênicas causadoras da tuberculose (TB) em animais e humanos (Kanabalan *et al.*, 2021). Em 1882, MTB foi definido pela primeira vez como o principal agente etiológico da TB humana, quando foi isolado e descrito por Robert Koch, passando a ser nomeado também como Bacilo de Koch (BK) (Koch, 1882). O MTB pertence à família Mycobacteriaceae e ao gênero *Mycobacterium*, que compreende cerca de 190 espécies (Leão, 2023). MTB é um patógeno intracelular facultativo, de crescimento lento, aeróbio obrigatório, e, assim como as demais bactérias do gênero, é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (Koch; Mizrahi, 2018). As micobactérias, incluindo o MTB, apresentam uma parede celular rica em lipídios, principalmente ácidos micólicos, que confere certas características específicas a esses bacilos. Pode-se citar como característica a álcool-ácido resistência, o crescimento lento, a resistência a detergentes, e a capacidade de induzir uma resposta imune intensa do hospedeiro em função da sua antigenicidade (Murray *et al.*, 2022).

1.2 Transmissão e fisiopatologia

A transmissão do bacilo causador da TB ocorre, na maioria dos casos, pela propagação de aerossóis de uma pessoa com TB ativa, que expela a bactéria por meio da fala, espirros e tosse, para o ambiente. A partir do momento que o bacilo se encontra livre e suspenso no ar, ele pode ser inalado pelo próximo hospedeiro através de suas vias aéreas (Coleman *et al.*, 2022). Para a infecção ser instaurada, o *M. tuberculosis* precisa percorrer o aparelho respiratório e chegar aos pulmões em uma região que é favorável à infecção por este patógeno (Figura 1) (Fennelly, 2020). Em indivíduos saudáveis, o microrganismo pode ser destruído em algum momento pelo seu sistema imune inato, ou pode ser eliminado até mesmo antes de chegar aos pulmões, quando param nas vias aéreas superiores (Tobin; Tristram, 2024).

Após a micobactéria chegar aos alvéolos pulmonares (Figura 1), o indivíduo pode progredir para diferentes situações, a depender da virulência da bactéria e do sistema imune desse novo hospedeiro (Tobin; Tristram, 2024). O bacilo pode ser neutralizado e eliminado do organismo do indivíduo, pode entrar em um estado latente, ou evoluir para a forma ativa da doença, a TB pulmonar (Drain *et al.*, 2018). Os macrófagos alveolares são as primeiras células a agirem, fagocitando o MTB, após a infecção (Figura 1). Em seguida, entram mais células imunológicas em ação, como linfócitos T e B, que participarão da formação de um granuloma,

uma das marcas registradas da TB pulmonar (Figura 1) (Alsayed; Gunosewoyo, 2023). O granuloma da TB é descrito como uma massa amorfa de células imunológicas que tem como objeto conter o avanço da disseminação bacteriana (Luies; du Preez, 2020; Maison, 2022).

Em pessoas imunocompetentes, os bacilos tendem a permanecer no interior do granuloma, não evoluindo para a TB ativa e passando para uma fase de latência, com risco de reativação ao longo da vida (Gopalaswamy *et al.*, 2020; Maison, 2022). Aqueles que possuem a TB na sua forma inativa ou latente não são capazes de transmitir a bactéria (Teo *et al.*, 2024). Em indivíduos imunocomprometidos, os granulomas podem sofrer necrose caseosa e se romperem formando cavitações ao longo dos pulmões, favorecendo a proliferação das bactérias. A partir do momento em que se estabelece a TB pulmonar ativa, o indivíduo entra em um período de alta transmissibilidade e, na maioria dos casos, entra também na fase sintomática da doença (Urbanowski *et al.*, 2020; Alsayed; Gunosewoyo, 2023). Nesse momento, os bacilos são capazes de proliferar dentro dos pulmões, ou até mesmo atingir outras regiões do organismo, estabelecendo a TB extrapulmonar (Baykan *et al.*, 2022).

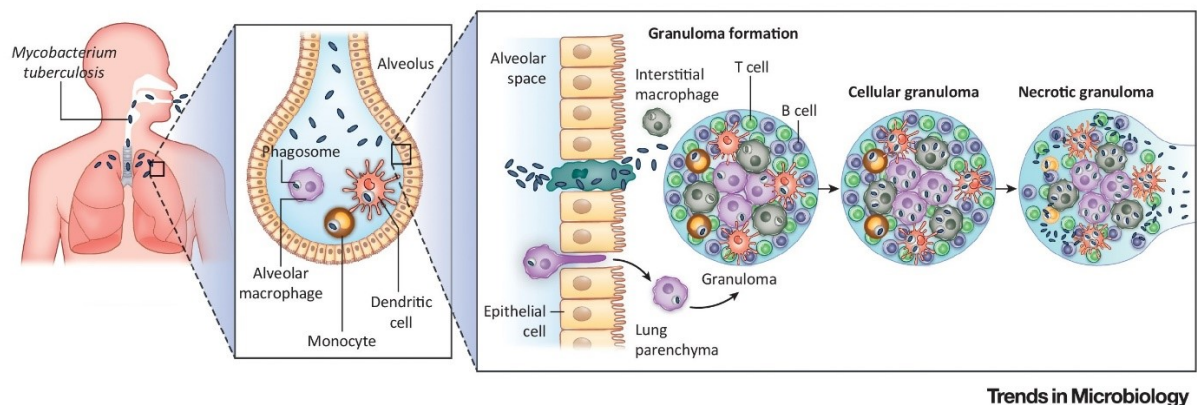


Figura 1: Representação esquemática da fisiopatologia da tuberculose. A infecção inicia-se com a inalação do *Mycobacterium tuberculosis*, que percorre o sistema respiratório até alcançar os alvéolos pulmonares, onde é fagocitado por macrófagos alveolares. A ativação do sistema imune leva ao recrutamento de mais células, como os linfócitos T e B, que juntos auxiliam na formação do granuloma. Esses granulomas visam conter a infecção e podem evoluir para necrose, com possível disseminação do bacilo e progressão da doença. Adaptado de Koch e Mizrahi (2018).

Os sintomas clínicos da TB pulmonar ativa são inespecíficos, aparecem de modo lento e podem variar de casos assintomáticos a graves (Tobin; Tristram, 2024). A literatura descreve sintomas como tosse prolongada e com muco, falta de ar, dispneia, pleurisia e hemoptise. Esses sintomas são ocasionados pela resposta imune inflamatória que compreende desde a formação do granuloma, seu rompimento e necrose, até um possível derrame pleural (Luies; du Preez,

2020). Em casos de danos pulmonares mais significativos, a doença pode evoluir para bronquite crônica, e os granulomas podem progredir para pneumonia. Febre, perda de peso, suores noturnos e mal-estar são sintomas sistêmicos, mas também associados à TB (Luies; du Preez, 2020; Teo *et al.*, 2024). Após os diversos danos ao tecido pulmonar, ocorre a sua cicatrização, que consiste na fibrose do tecido, o que contribui para a perda de função do órgão (Ravimohan *et al.*, 2018).

Como já mencionado anteriormente, a disseminação do MTB para fora do pulmão caracteriza a TB extrapulmonar (Tobin; Tristram, 2024). Essa disseminação pode atingir regiões do organismo como pleura, sistema linfático, geniturinário, gastrointestinal, ossos, articulações e sistema nervoso central. Entre as regiões mais afetadas na disseminação da TB está o sistema linfático (Brehm; Terhalle, 2023). Essa variação da doença corresponde a um número baixo de todas as infecções por TB, mas pode ocorrer independentemente do estado imunológico do indivíduo (Rodriguez-Takeuchi *et al.*, 2019). No entanto, vale destacar que pacientes que vivem com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) possuem uma maior chance de desenvolver a TB disseminada. Isso acontece em razão da imunossupressão causada pelo vírus, no organismo, ao infectar linfócitos TCD4⁺ e macrófagos, células fundamentais na formação do granuloma e na contenção do MTB dentro do pulmão. (Bell; Noursadeghi, 2018). Nesses casos, a TB extrapulmonar constitui mais de 50% dos casos totais de TB em pacientes com o HIV (Natarajan *et al.*, 2020).

1.3 Epidemiologia

Desde a sua descoberta a TB se tornou um problema de saúde pública global pela sua alta incidência, elevado contágio, e devido a questões socioeconômicas, coinfeção com HIV, resistência a medicamentos e a sua alta taxa de mortalidade (Koegelenberg *et al.*, 2021; Natarajan *et al.*, 2020). Segundo o Relatório Global sobre Tuberculose de 2023 feito pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de adoecimentos por TB é de mais de 10 milhões todos os anos, totalizando 10,6 milhões em 2022, 300 mil a mais que 2021. No cenário atual, ainda segundo a OMS, cerca de um quarto da população mundial está infectada pelo *M. tuberculosis* com risco do desenvolvimento da doença (OMS, 2023). Semelhantemente à situação global, no Brasil, os números também são altos. Segundo o Boletim Epidemiológico da Tuberculose no Brasil de 2024, mais de 80 mil pessoas desenvolvem TB todos os anos no país (Ministério da Saúde, 2024). Além disso, o Brasil se encontra entre os 30 países com maiores índices de TB no mundo. Em relação à mortalidade, no Brasil e no restante do mundo,

a TB foi a segunda principal causa de morte por um único agente infeccioso no ano de 2022 (OMS, 2023; Ministério da Saúde, 2024). Em relação a coinfeção do *M. tuberculosis* e o HIV, antes era uma preocupação alarmante pela sua elevada letalidade, principalmente na década de 80, na grande epidemia de HIV/AIDS. Entretanto, o número de mortes por TB, entre pessoas com o vírus, vem caindo a cada ano. Todavia, ainda deve ser uma preocupação a ser considerada, visto que é uma população que está mais suscetível a desenvolver a TB ativa e extrapulmonar (Bell; Noursadeghi, 2018; Natarajan *et al.*, 2020; OMS, 2023).

1.4 Tratamento e imunização

Quando não tratada, a TB ativa leva a óbito 50% dos indivíduos com a infecção. Com tratamento adequando e recomendando pela OMS, cerca de 85% das pessoas podem superar a doença (OMS, 2023). Por isso, o acesso imediato ao diagnóstico e ao tratamento é de suma necessidade para reduzir os danos e a mortalidade causados pela TB. O tratamento padrão para a TB pulmonar na sua forma ativa dura seis meses e utiliza quatro antibióticos, rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (OMS, 2022). Em nova recomendação, a OMS indica também regimes de tratamento de 4 meses com isoniazida, rifapentina, moxifloxacino ou pirazinamida (CDC, 2023; OMS, 2022). Quando o paciente não responde ao tratamento usual para TB suscetível aos medicamentos, o tratamento para TB resistente entra em ação, frequentemente, como a última opção terapêutica, uma vez que os custos para a saúde pública são altos caso o tratamento falhe. Custos que podem incluir a disseminação de uma forma de TB mais resistente e difícil de tratar (OMS, 2022). A transição para o tratamento da TB resistente considera a evolução clínica e laboratorial do paciente, especialmente a persistência da positividade na baciloscopia e cultura, além da identificação de resistências em testes de sensibilidade, durante o tratamento com o esquema básico. A definição do momento de início e da duração do tratamento para TB resistente depende do tipo de resistência identificada, já que para cada fármaco um esquema terapêutico diferente é utilizado (Ministério da Saúde, 2019).

No que se refere à imunização, a vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) é a única licenciada para uso. Ela utiliza uma cepa viva e atenuada de *M. bovis*, que faz parte do complexo *M. tuberculosis* e é responsável pela TB bovina (Bouzeyen; Javid, 2022). Apesar dos efeitos benéficos, a vacina BCG apresenta uma variação de 0 a 80% na eficácia como vacina preventiva para a TB pulmonar, forma mais prevalente da doença. Ainda assim, é a vacina mais

abrangeiramente usada no mundo, sendo extremamente recomendada por prevenir as formas mais graves da doença (Batista *et al.*, 2022; Bouzeyen; Javid, 2022; Ministério da Saúde, 2024).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da TB, de modo rápido e eficaz agiliza o controle da doença, otimizando o tratamento e proporcionando cada vez mais o sucesso do mesmo (Martínez-Campreciós *et al.*, 2024). Para isso, a identificação da presença do *M. tuberculosis* no organismo pode ser feita de algumas formas que são recomendadas pela OMS, globalmente e pelo Ministério da Saúde, no Brasil (OMS, 2023; Ministério da Saúde, 2022). Atualmente, se utilizam métodos diagnósticos baseados em diversos princípios, entre eles estão, a baciloscopia, cultura, testes imunológicos e o teste rápido molecular (TRM – TB). Existem outros testes mais específicos para casos especiais como o Fluxo lateral LAM, para pacientes que vivem com o HIV e outros que visam identificar resistências medicamentosas (Acharya *et al.*, 2020).

A baciloscopia é um exame microscópico barato e de baixa complexidade que pode ser empregado nos mais diversos laboratórios (Ministério da Saúde, 2022). Seu princípio consiste na pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), em amostras biológicas como o escarro, por técnicas de coloração específicas como a de Ziehl-Neelsen e a de Auramina O (Zaporojan *et al.*, 2024). Na técnica de Ziehl-Neelsen, que é a mais empregada, os bacilos retêm a fucsina fenicada de Ziehl e resistem a descoloração pela solução de álcool-ácido, em função da presença de ácidos micólicos em sua parede celular. As micobactérias coram em um vermelho róseo, enquanto o fundo cora em azul pelo corante azul de metileno (Arteta *et al.*, 2022; Ministério da Saúde, 2022). Apesar de muito usual, esse método diagnóstico possui muitas limitações, como uma baixa sensibilidade e especificidade, já que ele não consegue diferenciar o *M. tuberculosis* de outras micobactérias não tuberculosas (Suárez *et al.*, 2019). Portanto, este é um teste de rastreio para a TB sendo necessário outros testes confirmatórios e específicos para fechar o diagnóstico de TB ao paciente (Acharya *et al.*, 2020; Ministério da Saúde, 2022; OMS, 2024).

O teste rápido molecular para TB (TRM-TB) foi a alternativa que chegou para revolucionar o diagnóstico dessa doença, pois se mostra uma opção mais eficaz, sensível e rápida, com execução em cerca de 90 minutos (Acharya *et al.*, 2020; Izudi *et al.*, 2020). O procedimento consiste em uma PCR (reação em cadeia da polimerase) e tem como objetivo a amplificação e detecção do DNA das bactérias do complexo *M. tuberculosis*, não detectando bactérias não tuberculosas (Cepheid, 2017; Ministério da Saúde, 2022). Segundo

recomendações da OMS, o referido teste deve ser utilizado como primeiro teste para diagnóstico em crianças e adultos com suspeita de TB (OMS, 2024). O teste utiliza a plataforma GeneXpert e seus cartuchos minimizam as etapas de uma PCR em tempo real convencional (preparação da amostra, amplificação e detecção) (Cepheid, 2017; Ministério da Saúde, 2022). Apesar de ser um teste altamente recomendado, sua execução é limitada dependendo da infraestrutura do laboratório. Ele possui algumas exigências, como refrigeração, energia elétrica contínua, treinamento adequado para profissionais e suprimento contínuo de cartuchos, além de ser um teste caro se comparado a baciloscopia (Ministério da Saúde, 2022; OMS, 2024).

Quanto ao diagnóstico padrão ouro, destaca-se a cultura bacteriana, que continua sendo utilizado e obtendo ótimos resultados (CDC, 2024; Zaporojan *et al.*, 2024). A cultura é um método diagnóstico com uma alta especificidade e sensibilidade, sendo capaz de isolar e identificar micobactérias causadoras da TB pulmonar e extrapulmonar e micobactérias não tuberculosas (Ministério da Saúde, 2022). O processo consiste na semeadura de uma amostra clínica em meios específicos para essas bactérias, permitindo a multiplicação e isolamento. cultura deve ser feita em qualquer caso que haja suspeita de TB, independentemente do resultado da baciloscopia. Se positivada a cultura, deve ser feitos testes específicos para identificação do espécime, como testes fenotípicos, imunocromatográficos e moleculares (Ministério da Saúde, 2022; Zaporojan *et al.*, 2024). A cultura é um procedimento que também necessita de uma infraestrutura laboratorial mais robusta. Além de ser um teste com um tempo de execução extremamente elevado, já que o tempo de crescimento das micobactérias é bem lento se comparados a outras bactérias, levando de 14 dias até 8 semanas para que o resultado possa ser liberado (Afsar *et al.*, 2018; Ministério da Saúde, 2022; Nadeem *et al.*, 2022). É o método padrão ouro, mas deve ser utilizado juntamente a teste mais rápidos, como a baciloscopia e o TRM, para antecipar o início do tratamento em casos suspeitos ou positivos, garantindo uma maior chance de cura (CDC, 2024; Lewinsohn *et al.*, 2017).

Ademais, outra opção de teste diagnóstico, seria o sorológico baseado em antígenos, que possui como princípio a identificação de antígenos do *M. tuberculosis* a partir de alguma amostra biológica do paciente (Zhu *et al.*, 2014). Apesar de ser uma opção, atualmente, os ensaios sorológicos comerciais não têm tido um bom desempenho, devido à baixa sensibilidade e especificidade, à possibilidade de reatividade cruzada, e à variabilidade entre kits. Em uma declaração publicada em 2011, mas ainda válida, a OMS desaconselha o uso de testes como esses, devido a esses problemas de desempenho (OMS, 2011; Walzl *et al.*, 2018). Nesse sentido, estudos nessa linha de testes diagnóstico continuam sendo realizados, uma vez que o desenvolvimento de novas metodologias para testes é de suma necessidade para superar as

desvantagens dos testes padrões que estão disponíveis atualmente (Araújo *et al.*, 2021). Esses estudos concentram-se na identificação de antígenos específicos do *M. tuberculosis* em amostras acessíveis, como o soro, que possam atuar como biomarcadores no paciente infectado. Os biomarcadores escolhidos são avaliados quanto a sua aplicabilidade diagnóstica e facilidade de serem produzidos em laboratório como peptídeos recombinantes. (Khurshid, *et al.*, 2017; Walzl *et al.*, 2018).

1.6 Produção de proteínas recombinantes para diagnóstico

A produção de proteínas recombinantes é um dos principais marcos da biotecnologia dos últimos tempos e possuem importância significativa em indústrias químicas, médicas, alimentícias e outras. Elas são produzidas em organismos hospedeiros heterólogos, podendo ser eucariotos ou procariotos (Pouresmaeil M; Azizi-Dargahlou, 2023; Zhang *et al.*, 2022). Na década de 1970, Herbert Boyer e Stanley Cohen utilizaram pela primeira vez essa engenharia genética e a partir disso, processos de clonagem e expressão gênica aumentaram até chegar nos dias de hoje, em que a produção de proteínas recombinantes está difundida mundialmente (Kaur *et al.*, 2018; Pouresmaeil M; Azizi-Dargahlou, 2023).

Células de *Escherichia coli* são um dos organismos hospedeiros mais utilizados para produção de proteínas recombinantes principalmente pela facilidade e eficiência de uso e custo, proliferação rápida e expressão estável (Schütz *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2022). Por isso, no laboratório de pesquisa, a produção recombinante de proteínas em *E. coli* é o método de escolha ideal, sendo a cepa BL21(DE3) o hospedeiro preferido. Essa cepa se destaca pela sua maior velocidade de multiplicação, capacidade superior de secreção, menor produção de acetato e escassez de proteases (Rosano *et al.*, 2019). O vetor de expressão pET é a escolha mais indicada para transformação na cepa BL21(DE3). Isso, porque a RNA polimerase T7 (RNAP) do profago λ presente no genoma dessa cepa pode reconhecer o promotor T7 no plasmídeo e transcrever 8 vezes mais rápido que a RNAP própria da *E. coli* (Zhang *et al.*, 2022).

Uma vez expressas, as proteínas recombinantes devem ser purificadas para obtenção de moléculas biologicamente ativas e com um elevado grau de pureza. Para isso, o conteúdo da expressão é submetido a um processamento que no fim resulta em um extrato proteico que é separado entre proteínas solúveis e aquelas insolúveis que ficaram contidas em corpos de inclusão e necessitam de mais etapas para sua solubilização (Gomes, 2023; Wingfield, 2015). A obtenção da proteína de interesse isolada ocorre por técnicas específicas de separação e purificação de moléculas como é o caso da cromatografia de afinidade. O processo pode ser

otimizado pelo uso de etiquetas de fusão, que facilitam a purificação permitindo a ligação seletiva da proteína a resinas imobilizadas na coluna de cromatografia (Pouresmaeil M; Azizi-Dargahlou, 2023; Saraswat *et al.*, 2013). A etiqueta de histidina (His-tag) que consiste na fusão de uma sequência de 6 a 10 resíduos desse aminoácido à extremidade N-terminal ou C-terminal da proteína a ser purificada, no momento da expressão, tem sido frequentemente utilizada com esse objetivo. Essa etiqueta é incluída durante a construção do vetor de expressão. A His-tag possui uma alta afinidade para íons metálicos como o níquel e o zinco, que são utilizados em colunas de cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC) (Loughran *et al.*, 2017; Saraswat *et al.*, 2013).

Na literatura pode-se encontrar trabalhos que buscam produzir proteínas recombinantes miméticas a antígenos do *M. tuberculosis*, para possíveis aplicações em métodos diagnósticos. Vale citar o trabalho de Ramalingam *et al.*, 2023, que tiveram como objetivo clonar, expressar e purificar as proteínas secretadas pelo MTB (PPE41, MPT53, LPQH, CFP10, ESAT6 e TB18.5) e analisar seu uso como marcadores de diagnóstico precoce, produzindo assim, uma nova tecnologia para diagnosticar TB. Hwang *et al.*, 2014, teve como objetivo expressar e avaliar dois tipos diferentes de antígenos PstS1 (PstS1-TF e PstS1-GST), que já são conhecidos e com potencial para o diagnóstico sorológico da TB, no qual constataram que um antígeno possui capacidade sorodiagnóstica mais precisa que o outro. Já Heidari *et al.*, 2015, também obtiveram sucesso ao expressar e purificar a proteína recombinante do citocromo P450 CYP141 de *M. tuberculosis* para ser usada como candidata a vacina e para fins diagnósticos. Algo em comum a esses estudos é o esforço em padronizar e otimizar a produção de proteínas recombinantes antigênicas que sejam eficazes, visando a inclusão em futuros testes de diagnóstico para identificação da infecção pelo bacilo *M. tuberculosis* (Heidari *et al.*, 2015; Khurshid, *et al.*, 2017; Ramalingam *et al.*, 2023).

1.7 Proteínas MTG3F3 e PMT64

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu os peptídeos PMT64 e MTG3F3, que demonstraram em testes de *Biopanning* serem ligantes às IgGs purificadas a partir de soros de pacientes com TB. As duas proteínas recombinantes foram construídas em cima de regiões antigênicas da proteína MPT64, um antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*. Essas regiões foram identificadas em trabalho prévio pela tecnologia de *Phage Display* (Tafari, 2013).

MPT64 é uma proteína secretada pela membrana plasmática do *M. tuberculosis*, em divisão ativa e tem sido frequentemente usada como uma proteína candidata para diagnóstico e

vacinas (Cao *et al.*, 2021; Isaei *et al.*, 2024). Além disso, esse antígeno é expresso no MTB isolado, mas não na cepa de vacina de *M. bovis* (BCG), o que o torna uma evidência direta de infecção por MTB em amostras clínicas (Pan *et al.*, 2025).

A identificação de novos peptídeos reativos a anticorpos de pacientes portadores do MTB poderá configurar-se como uma alternativa para a elaboração de novos biomarcadores, podendo ser potencialmente aplicados em testes rápidos para diagnóstico da doença. Por modelagem de bioinformática, teve-se que as proteínas PMT64 e MT3F3 exibiram similaridade com o importante antígeno MPT64 do MTB, e, portanto, podem configurar alvos promissores para discriminação de pacientes portadores do bacilo, de indivíduos saudáveis.

2. JUSTIFICATIVA

O *M. tuberculosis* é um patógeno histórico que assola a humanidade há milênios, é o principal agente etiológico da TB humana e continua sendo um problema de saúde pública global. Nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta nos dias de hoje a urgência em investimentos para combate à doença. Ainda, segundo a organização, esses investimentos são necessários para se atingir uma das metas de saúde dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas que tem como objetivo acabar com a epidemia de TB até 2030.

Para isso, um passo importante para combater essa importante doença, é o desenvolvimento de novas plataformas de diagnóstico acessíveis, rápidas e precisas, e que possam, em tempo hábil, facilitar a detecção do *M. tuberculosis*, antecipando o início do tratamento e contribuindo no monitoramento de pessoas com TB. Métodos de diagnóstico baseados na interação antígeno-anticorpo, por meio da utilização de antígenos bacterianos como biomarcadores, é um campo que se destaca e se mostra promissor. Sob esse ponto de vista, estudos de antígenos da TB estabelecem uma base forte para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico ou melhoria dos métodos imunológicos já existentes. Nesse viés, considerando a limitação dos métodos diagnósticos atuais e a carência de formas otimizadas de detecção da doença é de suma importância estudos que deem ênfase nas etapas iniciais do desenvolvimento de um novo teste.

Diante disso, os peptídeos miméticos, selecionados pelo nosso grupo de pesquisa, correspondentes, apresentaram alto potencial para uso em plataformas diagnósticas. Com isso, o intuito desse projeto é trabalhar no princípio de um novo teste, focando na formulação e na produção de duas proteínas recombinantes MTG3F3 e PMT64, que mimetizam regiões

antigênicas de uma proteína secretada pelo MTB. Proteínas recombinantes, que uma vez consideradas satisfatórias, levando em consideração as melhores condições de produção (expressão e purificação), possam ser utilizadas em futuros testes de triagem para infecções por *M. tuberculosis*.

Em síntese, testes baseados em antígenos podem ser uma alternativa rápida e barata para diagnóstico *endpoint* (testes rápidos) que não necessitem de muitos reagentes, equipamentos e mão de obra especializada. Portanto, a realização do estudo representa os degraus iniciais do desenvolvimento de um novo teste de diagnóstico rápido para identificação de anticorpos IgG específicos em pacientes com TB, por meio do reconhecimento das proteínas recombinantes miméticas ao *M. tuberculosis* produzidas neste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Otimizar a produção das proteínas recombinantes, MTG3F3 e PMT64, miméticas a antígenos do *M. tuberculosis*, para futuras aplicações em testes diagnósticos de TB.

3.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a expressão de proteínas recombinantes inseridas em células bacterianas *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas com plasmídeos pET32a, por meio de testes em diferentes condições;
- Padronizar a purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade;
- Verificar e validar o êxito da purificação, das proteínas expressas, por eletroforese;
- Validar o reconhecimento de cada proteína por anticorpos específicos encontrados em soro de indivíduos infectados;
- Validar, *in vitro*, as proteínas miméticas a antígenos do *M. tuberculosis*, desenhadas por bioinformática.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho dos genes artificiais e análise de bioinformática

De acordo com os resultados, anteriormente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, dos peptídeos selecionados por *Phage display*, foram feitas construções em vetor de expressão pET32a para produção das proteínas recombinantes nomeadas de MTG3F3 e PMT64. Para

escolher os melhores desenhos dos genes artificiais das proteínas recombinantes, foram analisadas as predições de estrutura proteica, em programas de bioinformática pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos prévios.

4.2 Cultura das bactérias transformadas e preparação de *backups*

As células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os plasmídeos pET32a contendo os genes sintéticos correspondentes às proteínas recombinantes MTG3F3 e PMT64 foram produzidas pela empresa GenScript.

Os clones transformados foram inicialmente cultivados em placa de ágar Luria Bertani (LB) contendo ampicilina, IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo). As culturas foram incubadas a 37°C, *overnight* para multiplicação bacteriana.

O estoque bacteriano foi preparado com 1 colônia das bactérias transferida a um inóculo contendo 10 mL de ágar LB líquido com ampicilina (0,1 mg/mL) em um frasco Erlenmeyer de 125 mL. Foi incubado à 37°C sob agitação (220 rpm) até atingir a OD₆₀₀ ideal (entre 0,6 e 0,8). Após esse período, os *backups* foram separados em alíquotas de 300 uL por microtubo (150 uL de inóculo e 150 uL de glicerol 50%). Os *backups* foram armazenados a -20°C para as futuras expressões.

4.3 Expressão teste para otimização da produção das proteínas recombinantes

A expressão teste, em que foram testadas condições variáveis durante o processo de fermentação, foi iniciada a partir da preparação do pré-inóculo. O pré-inóculo, de cada clone, foi preparado inoculando em 10 mL de ágar LB líquido com ampicilina (0,1 mg/mL), 10 uL do backup bacteriano descongelado, em um frasco Erlenmeyer de 125 mL. Foi incubado à 37°C sob agitação (220 rpm) *overnight*.

O inóculo dos clones foi preparado, para cada um, com 50 mL de meio LB líquido, ampicilina (0,1 mg/mL) e 500 uL de pré-inóculo (1:100, em relação ao volume do caldo LB) em um Erlenmeyer de 250 mL. Foram incubados a 37°C, sob agitação de 220 rpm, até atingir a OD₆₀₀ ideal. Uma vez atingida a OD₆₀₀: foi aliqotado 1 mL, de cada inoculo, em um microtubo, (referente ao tempo zero da expressão); em seguida as alíquotas foram centrifugadas (10.000 rpm, 5 minutos, 4°C); o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* seco mantido a -20°C. Em seguida, o volume de cada inóculo (MTG3F3 e PMT64) foi fracionado em 4 Falcons, sendo 10 mL em cada.

Das 4 frações de cada inóculo, duas receberam indução por IPTG. Para isso, foi adicionado 1mM do indutor. Os novos inóculos (8 Falcons = F1-F8) foram incubados conforme as condições descritas na Tabela 1. Foram testadas a temperatura ideal de expressão (30°C e 37°C) e o melhor tempo de incubação para indução (1h, 2h, 3h, 4h e *overnight*). A ausência e presença de indução da expressão gênica pelo uso de IPTG foi testada para quesito de comparação. Para avaliação do teste de condições, foi aliquoteado, a cada hora, em um período de 4 horas, 1 mL de cada inóculo (8 microtubos a cada hora). Após 4 horas, os inóculos continuaram na incubação *overnight*. No dia seguinte, foram coletadas as últimas alíquotas correspondentes a incubação *overnight*. Todas as alíquotas, assim que coletadas, foram imediatamente centrifugadas (10.000 rpm, 5 minutos, 4°C); o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* seco mantido a -20°C.

Tabela 1: Condições de incubação para a expressão teste

MTG3F3				PMT64			
30°C		37°C		30°C		37°C	
F1 (10 mL)	F2 (10 mL)	F3 (10 mL)	F4 (10 mL)	F5 (10 mL)	F6 (10 mL)	F7 (10 mL)	F8 (10 mL)
Com IPTG	Sem IPTG	Com IPTG	Sem IPTG	Com IPTG	Sem IPTG	Com IPTG	Sem IPTG
Agitação a 220 rpm							

4.4 SDS-PAGE dos *pellets* referentes a expressão teste

Para identificar a melhor condição de expressão, o perfil proteico dos produtos da fermentação bacteriana foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os *pellets* das alíquotas coletadas durante a expressão teste (tempo zero, 1h, 2h, 3h, 4h e *overnight*) foram descongelados e ressuspensos em 250 uL de tampão de amostra cada. O tampão de amostra foi preparado com água destilada 47,5% v/v, SDS 2% p/v (a partir de solução a 10%), Tris-HCl 6,25 mM (pH 6,8), glicerol 10% v/v, β-mercaptoetanol 5% v/v e azul de bromofenol 0,05% p/v.

O gel de separação foi preparado na concentração de 12,5% de acrilamida (4,17 mL de acrilamida/bis-acrilamida (30%; 0,8%); 3,18 mL de água destilada; 2,5 mL de Tris-HCl 1,5M (pH 8,8); 100 uL de SDS 10%; 75 uL persulfato de amônio (PSA) 10%; e 30 uL de Tetrametiletilenodiamina (TEMED)). O gel de empilhamento foi preparado na concentração de

4% de acrilamida (2,96 mL de água destilada; 650 uL de acrilamida/bis-acrilamida (30%; 0,8%); 250 uL de Tris-HCl 0,5M (pH 6,8); 40 uL de SDS 10%; 25 uL PSA 10%; e 10 uL de TEMED).

Foi aplicado 10 uL de cada amostra nos poços dos géis. O marcador de peso molecular (10 – 250 kDa) e 2 ug de albumina sérica bovina (BSA) também foram aplicados em cada gel. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram aquecidas em termobloco por 10 minutos (100°C) e centrifugadas (6.000 rpm, 3 minutos). A corrida eletroforética foi realizada a 80V até o empilhamento das proteínas, e a 100V no restante da corrida, em uma corrente de aproximadamente 25 mA, por cerca de 3 horas, em 1 L de tampão de corrida (Tris Base 3% p/v; glicina 14,4% p/v; SDS: 1% p/v; pH 8,3).

Após o fim da corrida, os géis foram fixados em solução fixadora (metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v e água destilada 40% v/v) por 15 minutos, sob agitação (80 rpm). Em seguida, foram corados com solução de Coomassie Blue (metanol 50% v/v; água destilada 40% v/v; ácido acético 10% v/v; Coomassie brilhante R-250 0,05% p/v) por 10 minutos, sob agitação (80 rpm). Por fim, foram descoloridos em solução descolorante (etanol 40% v/v, ácido acético 10% v/v e água destilada 50% v/v), também sob agitação (80 rpm), até que as bandas fossem distinguidas.

Após a descoloração dos géis, foi avaliado as bandas proteicas a fim de identificar a melhor condição de expressão para as duas proteínas, na qual houve um maior rendimento.

4.5 Expressão principal, otimizada na melhor condição avaliada

O pré-inóculo dos clones foi preparado conforme descrito na expressão teste, a partir do *backup* das células bacterianas. Em um Erlenmeyer foi inoculado o pré-inóculo ao meio LB líquido na proporção 1:100 (8 mL de pré-inóculo para 800 mL de meio). A ampicilina foi acrescentada a uma concentração de 0,1 mg/mL. Os inóculos foram incubados a 37°C sob agitação (220 rpm) até atingir a OD₆₀₀ ideal. A partir disso, foi adicionado 1mM do indutor de expressão (IPTG) aos inóculos e estes foram incubados a uma rotação de 220 rpm. A melhor condição de expressão (30°C, *overnight*, com indução por IPTG), foi definida após análise dos géis da expressão teste.

4.6 Processamento do produto da expressão

Após o fim do período de incubação da expressão, o caldo, contendo o conteúdo bacteriano e o produto da fermentação, foi processado em algumas etapas. Primeiramente, foi

fracionado em Falcons (50 mL) e levados para centrifugar (10.000 rpm, a 4°C, 5 minutos). O sobrenadante foi desprezado após a centrifugação mantendo apenas o *pellet*. Na segunda etapa, o *pellet* foi submetido a três processos de lise como descrito a seguir.

- Lise química: os *pellets* de cada bactéria foram ressuspensos em solução de lisozima a 0,25% diluída em PBS 1x. Foram 3 mL de lisozima para cada 100 mL de meio centrifugado.

- Lise térmica: os Falcons com a suspensão de bactérias foram submersos em nitrogênio líquido (-195,8°C) alternando a submersões em banho-maria a 60°C. O choque térmico foi repetido por aproximadamente três vezes.

- Lise mecânica: mantidas no gelo, as suspensões sofreram sonicação em uma amplitude de 55%, com ciclos de 0,55. Alternado entre 30 segundos de sonicação e 30 segundos de repouso. O processo foi repetido, por aproximadamente, três vezes, dependendo da viscosidade da amostra.

Após esses processos, as amostras lisadas foram centrifugados (10.000 rpm, 4°C, 30 minutos). O produto da expressão foi separado em frações. Os sobrenadantes, correspondentes as frações solúveis da expressão das proteínas, foram recuperados e armazenados a -20°C. Os *pellets*, que correspondem a fração insolúvel, seguiram com seu processamento. Eles foram ressuspensos em solução de ureia a 8M diluída em Tris-HCl 25mM, pH 8 (5 mL de ureia para cada 100 mL de meio centrifugado) e centrifugados (10.000 rpm, 4°C, 30 minutos). Foi adicionado mais ureia em algumas amostras que ainda se mostraram viscosas após a centrifugação (a centrifugação também foi repetida, nesse caso). Por fim, os sobrenadantes, fração insolúvel da expressão, foram recuperados e armazenados a -20°C.

4.7 Purificação das proteínas em cromatografia de afinidade

Com o objetivo de obter as proteínas de interesse purificadas, as frações solúvel e insolúvel, foram submetidas a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e sepharose (HisTrap HP, 5 mL - Cytiva).

Foram utilizados os seguintes tampões no processo de purificação: tampão de ligação = Binding, tampão de eluição = Elution, além de solução de Sulfato de níquel 0,1M e água ultrapura. O tampão de ligação foi preparado com 20mM de Fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), 20mM de Imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$) e 500mM de Cloreto de sódio (NaCl). O tampão de eluição foi preparado com 20mM de Fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), 500mM de Imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$) e 500mM de Cloreto de sódio (NaCl). Todos os tampões foram ressuspensos em água ultrapura, filtrados em membrana poro 0,22 μm , tiveram o pH ajustados a 7,4 e foram

armazenados a 4°C. O Sulfato de níquel (NiSO₄) foi preparado a 100mM e ressuspendido em água ultrapura.

A coluna foi inicialmente lavada com 5 volumes de água ultrapura em um fluxo de 2,5 mL/min; seguido de 5 volumes de tampão de ligação; e novamente 5 volumes de água ultrapura. Após as lavagens, a coluna foi carregada com 1,5 volume de Sulfato de níquel; seguida por lavagens com 5 volumes de água ultrapura; e 5 volumes de tampão de ligação. Após isso, a amostra (fração solúvel ou insolúvel) já descongelada, mantida no gelo e previamente filtrada (com membranas de poro 0,22 µm), foi diluída em tampão de ligação (50% de amostra, 50% de tampão de ligação). Foi passado, a cada purificação, cerca de 10 volumes de amostra pela coluna. Em seguida, 5 volumes de tampão de ligação e por último, aproximadamente, 1 volume de tampão de eluição para que a proteína fosse eluída da coluna. Todos os tampões, foram mantidos no gelo durante todo processo de purificação. As proteínas recombinantes eluídas foram coletadas em tubos Falcon (15 mL), separadas por concentração e mantidas a -20°C. A etapa de purificação ocorreu em vários dias, até que todas as frações fossem purificadas.

4.8 SDS-PAGE das proteínas purificadas

Para verificar a composição das frações solúveis e insolúveis e o êxito das purificações, foram realizadas eletroforeses (SDS-PAGE) seguidas às purificações. Identificando, assim, em qual dessas frações esteve presente, em maior quantidade, as proteínas recombinantes expressas e purificadas.

Para aplicação no gel, as amostras, foram preparadas com 21 µL de proteínas eluídas e 7 µL de tampão de amostra. Os géis foram preparados conforme descrito anteriormente. Foi aplicado nos poços do gel, 28 µL de cada amostra contendo as proteínas purificadas. Foi aplicado, também, marcador de peso molecular (10 – 250 kDa) e 2 µg de BSA diluída em tampão de amostra em cada gel para quantificação das massas aproximadas por comparação.

4.9 Validação das proteínas por reconhecimento de anticorpos específicos

4.9.1 Amostras

As amostras que foram necessárias para validar as proteínas purificadas foram obtidas de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG) e voluntários saudáveis. Indivíduos saudáveis (Grupo controle) e com TB (Grupo TB), com idade acima de 18 anos, que aceitaram participar da pesquisa mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), tiveram suas amostras coletadas. O grupo controle

foi selecionado incluindo indivíduos saudáveis e assintomáticos, sem alterações de radiografia, e/ou tomografia de tórax, sem vínculo epidemiológico com paciente tuberculoso, que apresente teste PPD, ou Interferon Gama Release Assay (IGRA), negativo. Já as amostras TB+ são de pacientes doentes, sendo aqueles que demonstraram, em qualquer amostra biológica, prova direta da bactéria positiva. Foram obtidas 65 amostras de soro no total, 44 de pacientes com TB pulmonar ativa, e 21 amostras de indivíduos sadios. Os soros se encontram armazenadas a -80°C no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, UFU. Essa pesquisa conta com a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa sob o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 38450020.9.0000.5152.

4.9.2 Ensaio *Dot Blot*

Para testar a reatividade das proteínas recombinantes com os anticorpos produzidos por pacientes com TB, proteínas purificadas por cromatografia de afinidade foram validadas por ensaio *Dot Blot*. Para tanto, 10 uL de cada proteína recuperada foi aplicada em membrana de nitrocelulose (etapa de sensibilização). Posteriormente, foi adicionado solução de bloqueio (solução com Molico 5%) e incubado a temperatura ambiente (T.A), por 1h. Após lavagem com solução de PBS Tween 0,05%, as membranas foram incubadas com o *pool* de soros dos grupos controle (indivíduos saudáveis) e grupo TB+ (indivíduos com TB ativa), a T.A, por 1h. O *pool* foi preparado utilizando as amostras diluídas em PBS 1x (1:100). Após as lavagens, as membranas foram novamente incubadas com anticorpo anti-IgG humana conjugada com HRP diluído em PBS 1x (1:5000), a T.A., por mais 1h. Finalmente, após as últimas lavagens, a reação de conjugação antígeno-anticorpo foi revelada usando solução DAB a 0,6% diluída em PBS 1x, por pelo menos 15 minutos.

5. RESULTADOS

5.1 Melhores condições para expressão das proteínas recombinantes

Entre as condições testadas estavam a temperatura, o tempo de incubação para indução e a indução por IPTG. Houve expressão de proteínas nas duas temperaturas, 30°C e 37°C. Na expressão a 37°C houve um maior rendimento das proteínas de interesse, mas também de outras proteínas no total (Figuras 2 e 3). Em relação ao tempo de incubação, os resultados obtidos mostraram um crescente aumento das bandas proteicas entre o tempo zero e 4h. As amostras da incubação *overnight* se mostraram um pouco menos concentradas em proteínas totais em relação à incubação de 4h, embora as bandas de interesse não apresentem diferenças

significativas nesses períodos. Sobre a indução de expressão, não houve uma diferença significativa entre as bandas das amostras das expressões induzidas por IPTG e as não induzidas (Figuras 2 e 3).

As condições que se mostraram mais favoráveis para a expressão avaliada se deu na incubação à 30°C, *overnight* e com indução por IPTG. A condição foi definida para a; expressão das duas proteínas recombinantes, MTG3F3 e PMT64 (Figuras 2B e 3B).

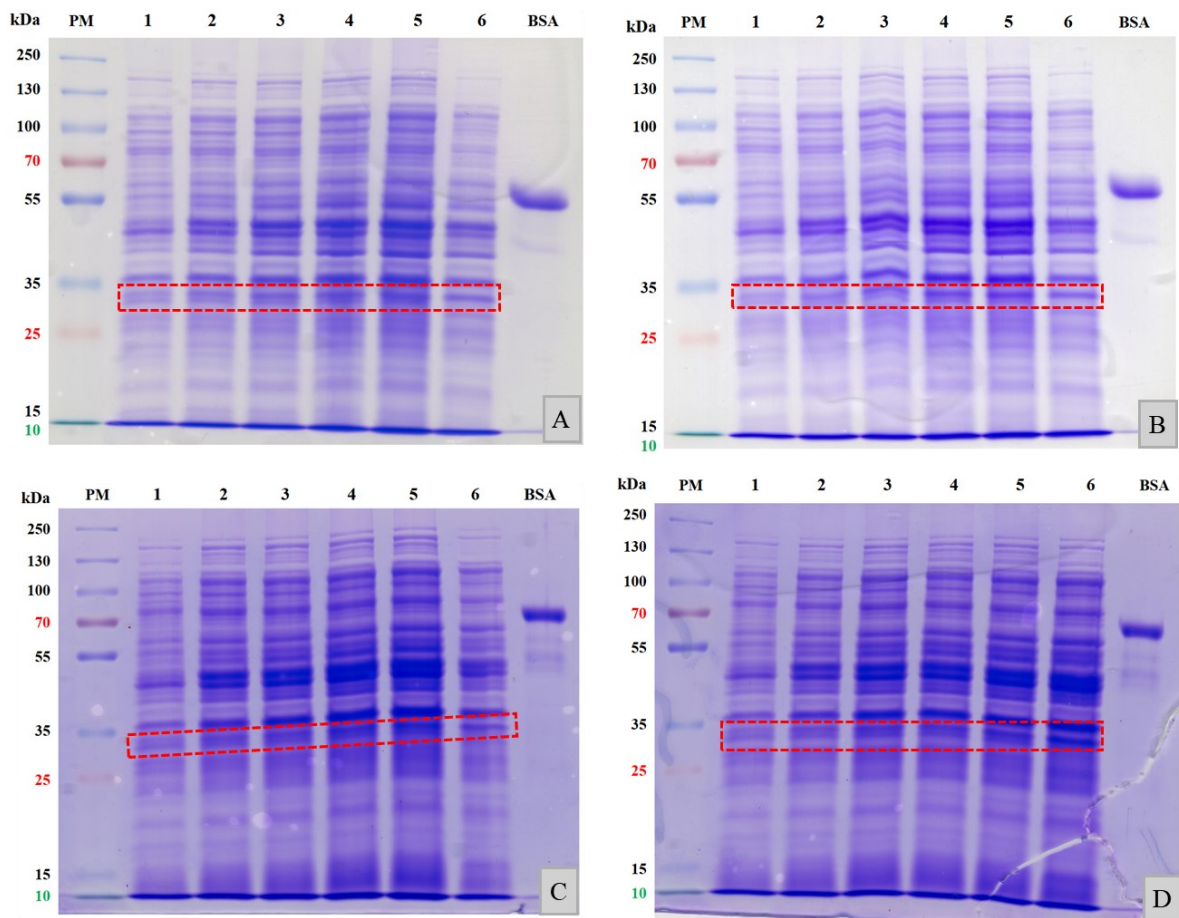


Figura 2: SDS-PAGE do teste de condições de expressão (temperatura, tempo de incubação e indução por IPTG) para a proteína recombinante MTG3F3. (A) Incubação a 30°C sem indução por IPTG. (B) Incubação a 30°C com indução por IPTG. (C) Incubação a 37°C sem indução por IPTG. (D) Incubação a 37°C com indução por IPTG. (A, B, C e D) PM: padrão de peso molecular (10 – 250 kDa); 1: tempo zero (pré-inóculo); 2: 1h; 3: 2h; 4: 3h; 5: 4h; 6: *overnight*; BSA: albumina sérica bovina (2µg – 66kDa). O retângulo pontilhado indica a linha em que as bandas da proteína MTG3F3, de peso estimado de 31,7kDa, estão presentes.

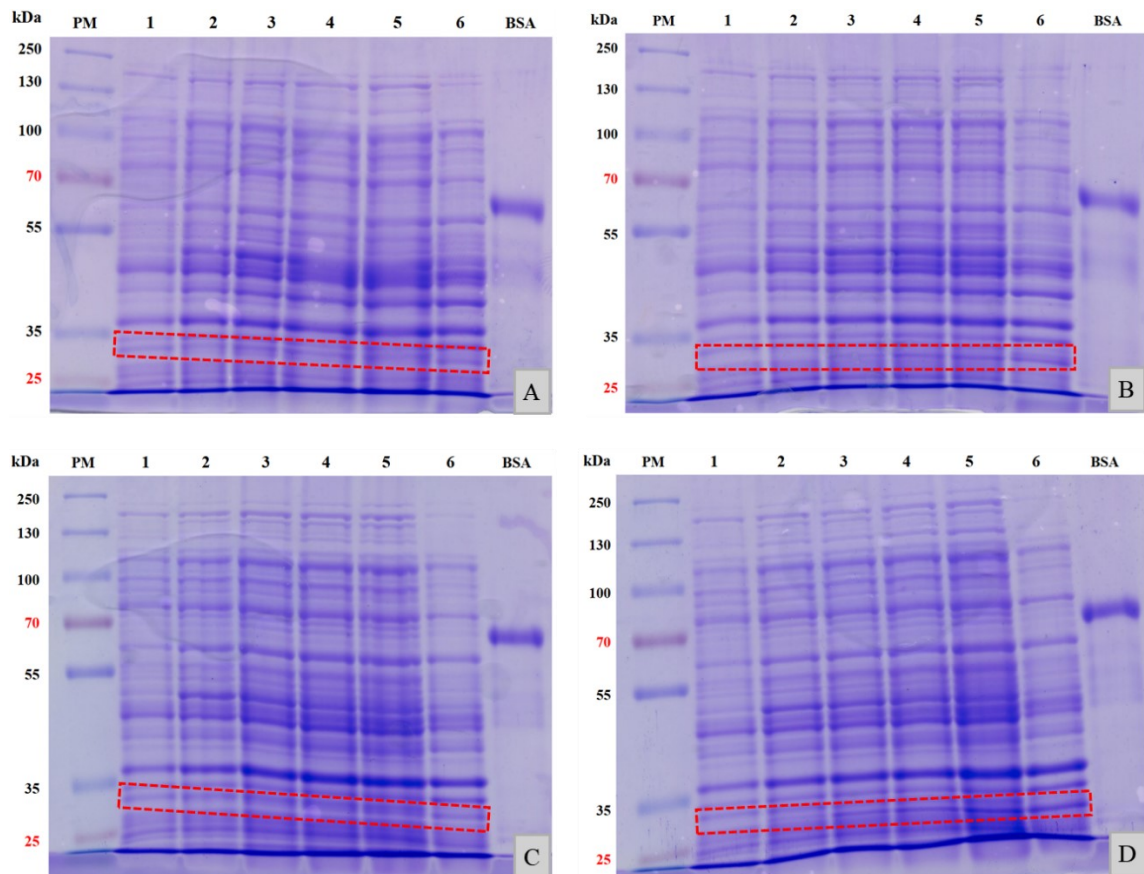


Figura 3: SDS-PAGE do teste de condições de expressão (temperatura, tempo de incubação e indução por IPTG) para a proteína recombinante PMT64. (A) Incubação a 30°C sem indução por IPTG. (B) Incubação a 30°C com indução por IPTG. (C) Incubação a 37°C sem indução por IPTG. (D) Incubação a 37°C com indução por IPTG. (A, B, C e D) PM: padrão de peso molecular (10 – 250 kDa); 1: tempo zero (pré-inóculo); 2: 1h; 3: 2h; 4: 3h; 5: 4h; 6: *overnight*; BSA: albumina sérica bovina (2 μ g – 66kDa). O retângulo pontilhado indica a linha em que as bandas da proteína PMT64, de peso estimado de 29,9kDa, estão presentes.

5.2 Purificação da expressão bacteriana

O processo de purificação das frações (solúveis e insolúveis) obtidas na expressão principal e submetidas a cromatografia de afinidade gerou 23 amostras da proteína MTG3F3 e 15 amostras da proteína PMT64. As amostras foram coletadas durante momentos de pico (alta concentração proteica) e na descida do pico (baixa concentração proteica) conforme o gráfico do programa de cromatografia indicado pela Figura 4. O volume de cada amostra sofreu variação em função da amplitude e comprimento do seu pico quando coletada.

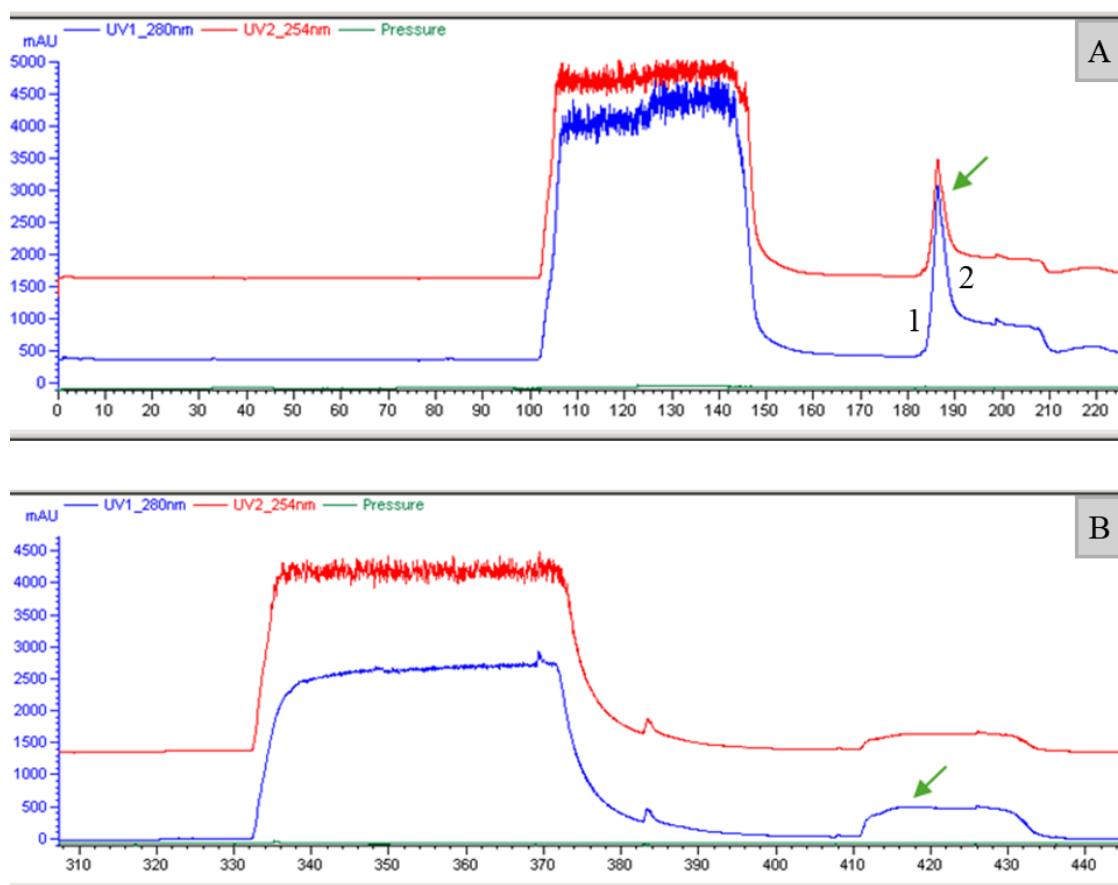


Figura 4: Gráficos da cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose da eluição de duas amostras. (A) Eluição com pico de 3071,12 mAU no comprimento de onda UV 280nm, sugerindo alta concentração proteica; 1: subida do pico; 2: descida do pico; correspondente às amostras 3 e 4 da proteína PMT64. (B) Eluição com pico de 467,10 mAU no comprimento de onda UV 280nm, sugerindo uma menor concentração proteica que o gráfico A; correspondente à amostra 9 da proteína PMT64. As setas verdes indicam o pico do momento de eluição das proteínas.

5.3 Validação do êxito da purificação

Entre as amostras purificadas, frações solúveis e insolúveis, testadas no SDS-PAGE foram avaliadas aquelas que apresentaram as bandas das proteínas de interesse de forma mais pura e concentrada (Figuras 5 e 6). A proteína MTG3F3, com o peso molecular de aproximadamente 31,7kDa, apresentou melhores bandas nas amostras 2 e 4, todas correspondentes a fração solúvel (Figura 5A). Já a proteína PMT64, com o peso de aproximadamente 29,9kDa, apresentou melhores bandas nas amostras 9,10 e 11, todas correspondentes a fração insolúvel (Figura 6B).

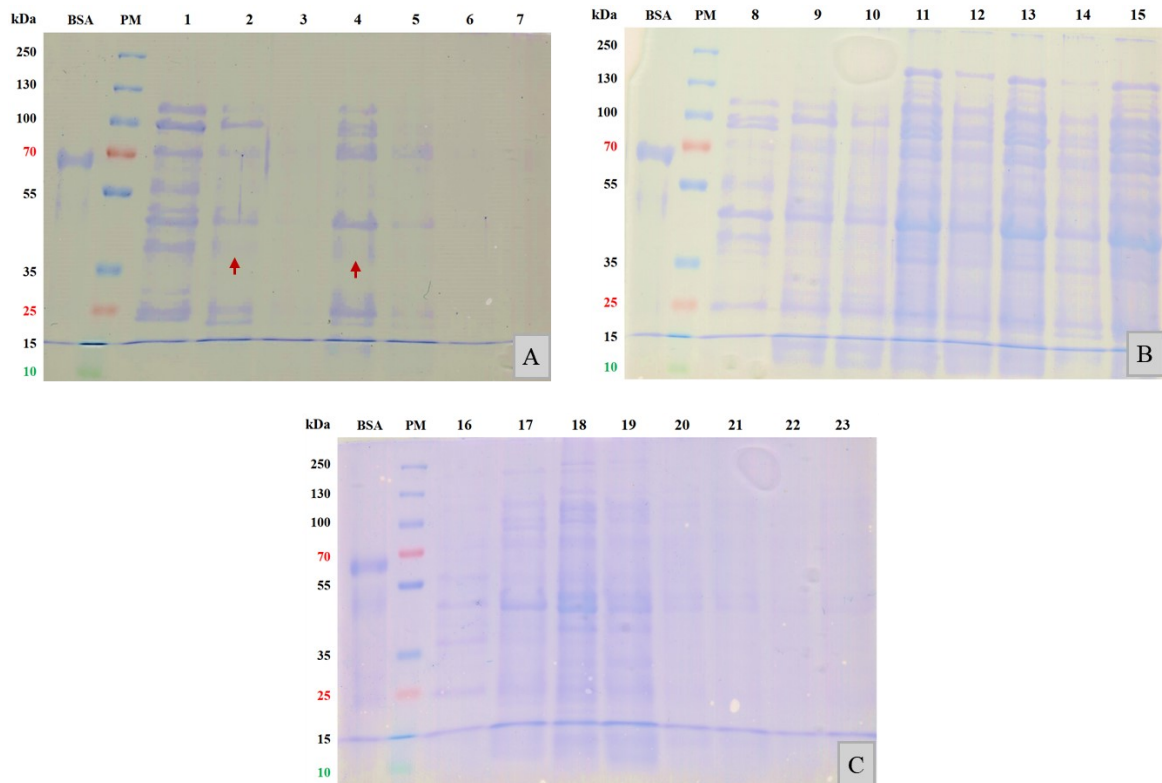


Figura 5: SDS-PAGE da proteína MTG3F3 após purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose. (A) 1 e 4: frações solúveis com alta concentração proteica (↑); 2, 3, 5, 6 e 7: frações solúveis com baixa concentração proteica (↓). As setas indicam as bandas correspondentes à proteína MTG3F3, com peso molecular estimado de ~31,7 kDa. (B) 8, 11, 13 e 15: frações solúveis (↑); 12 e 14: frações solúveis (↓); 9: fração insolúvel (↑); 10: fração insolúvel (↓). (C) 16: fração solúvel (↑); 17: fração solúvel (↓); 18, 20 e 22: frações insolúveis (↑); 19, 21 e 23: frações insolúveis (↓). (A, B e C) BSA: albumina sérica bovina (2 µg, 66 kDa); PM: padrão de peso molecular (10–250 kDa).

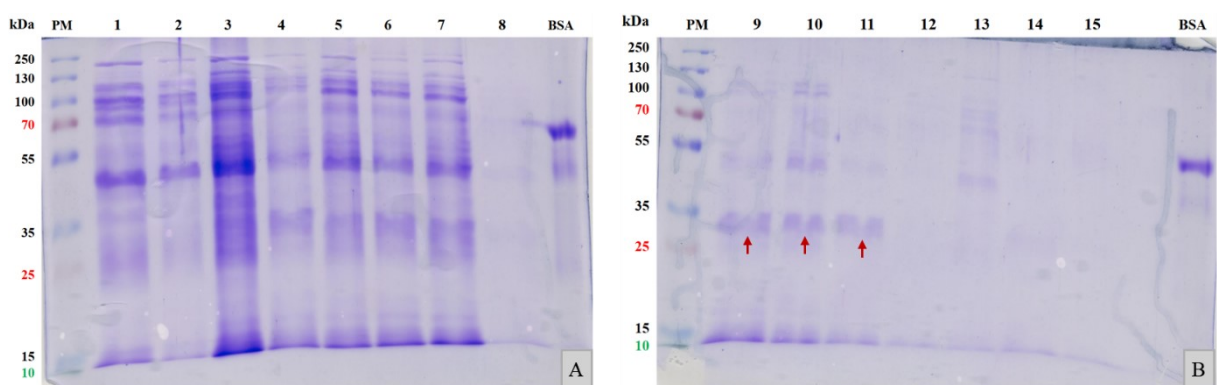


Figura 6: SDS-PAGE da proteína PMT64 após purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose. (A) 1 e 7: frações solúveis com alta concentração proteica (↑); 2 e 8: frações solúveis com baixa concentração proteica (↓); 3 e 5: frações insolúveis (↑); 4 e 6: frações insolúveis (↓). (B) 13: fração solúvel (↓); 10, 12 e 14: frações insolúveis (↑); 9, 11 e 15: frações insolúveis (↓). As setas indicam as bandas correspondentes à proteína PMT64, com peso molecular estimado de ~29,9 kDa. (A e B) PM: padrão de peso molecular (10–250 kDa); BSA: albumina sérica bovina (2 µg, 66 kDa).

O ensaio *Dot*, também feito com objetivo de validar as proteínas purificadas, foi um ensaio qualitativo para verificar a reatividades de anticorpos presentes nos soros de indivíduos com TB e de pessoas saudáveis frente a essas proteínas. Nossos testes iniciais, demonstraram que havia reatividade principalmente do grupo TB, frente a ambas as proteínas (Figura 7), ou seja, a imunoglobulina IgG presente no soro de pessoas com a doença foram capazes de se ligar às proteínas purificadas. Com isso, os ensaios foram direcionados para a fase de otimização da discriminação entre os grupos controle e TB, que seria o teste de ELISA.

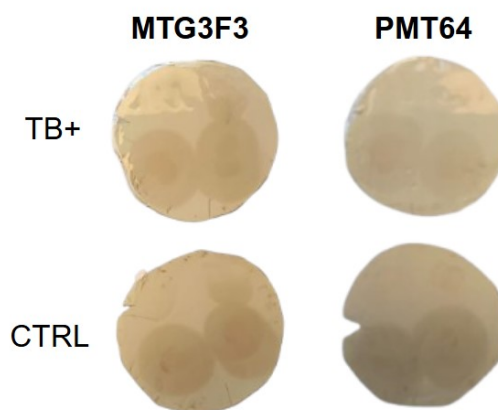


Figura 7: Ensaio *Dot Blot* para detecção de reatividade sorológica frente às proteínas recombinantes MTG3F3 e PMT64. Membranas de nitrocelulose sensibilizadas com as proteínas MTG3F3 (esquerda) e PMT64 (direita), incubadas com soro de indivíduos com tuberculose ativa (TB+) e indivíduos controle não infectados (CTRL). Observa-se a presença de sinal nas amostras TB+, indicando reconhecimento das proteínas pelos anticorpos presentes no soro de pacientes infectados.

6. DISCUSSÃO

A tuberculose permanece como uma das doenças infecciosas mais impactantes em nível global, com desafios persistentes no diagnóstico rápido e eficiente. Em termos de diagnóstico sorológico, que poderia simplificar e otimizar a abordagem da doença, até os dias atuais ainda não se pode encontrar nenhum teste que atendesse aos critérios da OMS. Por isso, o desenvolvimento de novos biomarcadores baseados em antígenos miméticos representa uma abordagem promissora para suprir essas limitações (Bartolomeu-Gonçalves *et al.*, 2024). Seguindo nessa linha, muitos estudos possuem o objetivo de desenvolver ferramentas sensíveis para diagnóstico de TB utilizando proteínas secretadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* que poderão ser produzidas de forma recombinante em organismos heterólogos (Ramalingam *et al.*, 2023). Portanto, o desenvolvimento desse trabalho, partiu desse ponto inicial, a otimização da produção desses antígenos em ambiente laboratorial.

Para esse trabalho, a escolha da *E. coli*, como hospedeiro heterólogo para produção das proteínas recombinantes apresentou vantagens principalmente econômicas e de acessibilidade. A escolha foi justificada principalmente pela facilidade de seu manuseio em laboratórios de pesquisa, como o que foi realizado este trabalho, em comparação com a escolha de sistemas eucariotos de expressão (Ahmad *et al.*, 2018; Kaur *et al.*, 2018).

A preferência pela cepa *E. coli* BL21(DE3) como sistema de expressão foi estratégica, uma vez que é um dos sistemas heterólogos mais amplamente utilizados devido à sua rapidez de crescimento, facilidade de manipulação genética e baixo custo operacional (Rosano *et al.*, 2019). O vetor pET32a, utilizado neste trabalho, oferece vantagens adicionais por conter etiquetas de fusão como a Trx-tag, que favorece a solubilidade da proteína, e a His-tag, que facilita a purificação por cromatografia de afinidade (Pouresmaeil M; Azizi-Dargahlou, 2023). Com suas poucas exigências quanto ao cultivo, a cepa de *E. coli* foi ideal para manipulação em ambiente laboratorial. Exigiu poucas vidrarias, meio de cultivo (LB) de fácil produção e tempo de expressão relativamente curto.

Neste trabalho, foram expressas e purificadas duas proteínas recombinantes, MTG3F3 e PMT64, correspondentes a regiões antigênicas de uma mesma proteína, a MPT64 do *M. tuberculosis*, isolada do soro de indivíduos com tuberculose. Foram selecionadas previamente por *Phage Display* pelo nosso grupo de pesquisa, apresentando potencial aplicação diagnóstica, por demonstrarem reatividade contra anticorpos IgG circulantes em pessoas com TB ativa (Tafari, 2013).

O resultado do teste de condições, para tempo e temperatura de indução, na expressão das proteínas MTG3F3 e PMT64 mostrou que quanto maior o tempo e a temperatura maior a expressão de proteínas no geral. Porém, com o aumento da proteína de interesse também houve aumento de outras proteínas contaminantes, o mesmo problema encontrado por Vaz (2024). Já Araújo *et al.* (2019) e Ashayeri-Panah *et al.* (2017) abordam em seus trabalhos que temperaturas altas de indução favorecem a agregação proteica e a formação de corpos de inclusão. Com a intenção de reduzir a contaminação com proteínas que não eram aquelas de interesse e evitar a formação desnecessária de corpos de inclusão a temperatura de indução foi fixada a 30°C.

Sobre o tempo de indução, apesar do crescente aumento do conteúdo proteico geral (proteínas totais) entre o tempo zero e 4h, o tempo de escolha foi a incubação *overnight*, já que as bandas de interesse não apresentaram concentrações muito díspares com as apresentadas no período de 4h. Na literatura, não se encontra um tempo consensual de expressão, variando em média de 4h até 24 horas, mas sempre em função da temperatura (Fernandez-Soto *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2014). Por exemplo, Zhu *et al.* (2014) testaram a expressão de TB16.3, uma proteína

antigênica recombinante para diagnóstico de tuberculose e concluíram que a sua expressão máxima ocorreu com 5h de incubação a 37°C. Já Fernandez-Soto *et al.* (2020) mostraram que a expressão do antígeno recombinante SapM, proteína secretada pelo *M. tuberculosis*, ocorreu melhor a 20°C, durante 24h por autoindução. Com o objetivo de se ter uma condição máxima de produção proteica a escolha pelo período *overnight* veio com intenção da recuperação das proteínas em suas formas solúveis e insolúveis.

A concentração de IPTG foi definida em 1mM conforme utilizado com sucesso por Fihiruddin *et al.* (2022). O indutor foi uma importante escolha para induzir a transcrição dos genes clonados, permitindo definir quando iniciar a expressão, resultando em quantidades maiores de proteínas expressas. Analisando os resultados do teste de condição não se nota grande diferença entre as bandas induzidas e aquelas não induzidas. Isso pode sugerir uma capacidade de autoindução da cepa BL21(DE3) com o vetor utilizado, nessas condições, sem a presença do IPTG. Outra hipótese seria uma concentração ineficaz do indutor para as condições de expressão definidas (Pouresmaeil M; Azizi-Dargahlou, 2023; Zhang *et al.*, 2015).

A cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel e tampões com imidazol permitiu a purificação das proteínas, expressas em maior quantidade após a definição das condições adequadas. Posteriormente validadas por SDS-PAGE, as bandas demonstraram que as bactérias foram capazes de expressar proteínas recombinantes miméticas ao MPT64. A proteína MTG3F3 apresentou melhores bandas em frações solúveis, enquanto a PMT64 mostrou maior rendimento nas frações insolúveis, indicando uma tendência de formação de corpos de inclusão. Ambos os perfis foram compatíveis com os pesos moleculares esperados (31,7 kDa para MTG3F3 e 29,9 kDa para PMT64), o que reforça o sucesso da expressão e purificação.

Além disso, a validação *in vitro* das proteínas expressas, por ensaio *Dot Blot* indicaram reatividade com soros de pacientes com TB ativa, reforçando o potencial dessas proteínas como ferramentas diagnósticas. Embora também tenha sido observado sinal no grupo controle, o ensaio demonstrou bom desempenho inicial, já que confirmou o reconhecimento das proteínas por anticorpos específicos. Nossos resultados assim como no estudo de 2022 de Fihiruddin *et al.*, indicam que biomoléculas recombinantes de MPT64 podem fornecer estratégias para o desenvolvimento de candidatos a testes de triagem e sorodiagnostics contra o *M. tuberculosis*.

Para um melhor rendimento as condições de expressão e purificação ainda podem ser mais bem trabalhadas, já que de 23 amostras para MTG3F3 e 15 para PMT64, apenas 5 delas apresentaram bandas correspondentes visíveis no SDS-PAGE do material purificado. Na expressão, a melhor padronização das variáveis dependentes tempo e temperatura, poderia

melhorar o rendimento e evitar o excesso de produção de proteínas contaminantes e formação de corpos de inclusão (Araújo *et al.*, 2019; Upadhyay *et al.* 2012). Para a purificação, a metodologia de recuperação das proteínas purificadas (feita em momentos de alta e baixa concentração proteica) feita nesse trabalho se mostrou adequada, no entanto, ainda se faz necessário ajustes no protocolo, mais precisamente na eluição, com a intenção de aumentar a probabilidade de recuperação das proteínas em mais amostras.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a viabilidade da expressão e purificação das proteínas recombinantes MTG3F3 e PMT64, miméticas ao antígeno MPT64 de *Mycobacterium tuberculosis*. A otimização das condições experimentais permitiu a obtenção de proteínas com rendimento e pureza satisfatórios, especialmente por meio da expressão em *E. coli* BL21(DE3) e uso do vetor pET32a. A identificação de proteínas recombinantes com reatividade frente a anticorpos específicos de pacientes com tuberculose reforça o potencial dessas biomoléculas como candidatas para uso em testes imunodiagnósticos rápidos.

Apesar dos resultados positivos, pesquisa futuras que visem aprimorar a padronização da produção dessas proteínas em maior escala são indispensáveis. Além de estudos adicionais necessários, como a padronização do teste ELISA, os dados aqui obtidos representam os primeiros passos rumo ao desenvolvimento de plataformas diagnósticas acessíveis, rápidas e eficientes para o controle da TB.

8. REFERÊNCIAS

- ACHARYA, B. *et al.* Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Biol Rep**, v. 47, p. 4065–4075, mai. 2020. DOI: 10.1007/s11033-020-05413-7.
- AFSAR, I. *et al.* Comparison of culture, microscopic smear and molecular methods in diagnosis of tuberculosis. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 31, n. 5, p. 435–438, out. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30229645/>
- AHMAD, I. *et al.* Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif**, v. 144, p. 12–18, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.pep.2017.11.005.
- ALSAYED, S. S. R.; GUNOSEWOYO, H. Tuberculosis: Pathogenesis, Current Treatment Regimens and New Drug Targets. **Int J Mol Sci**, v. 24, n. 6, p. 5202, 8 mar. 2023. DOI: 10.3390/ijms24065202.
- ARAUJO, L. D. C. T. *et al.* Formulation and Validation of Recombinant Antigens CFP10 and ESAT6 for Tuberculosis Diagnosis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, e21210127, 2021. DOI: 10.1590/1678-4324-75years-2021210127.
- ARAUJO, L. D. C. T. *et al.* Process parameters optimization to produce the recombinant protein CFP10 for the diagnosis of tuberculosis. **Protein Expr Purif**, v. 154, p. 118–125, fev. 2019. DOI: 10.1016/j.pep.2018.09.016.
- ARTETA, A. A. *et al.* Ziehl-Neelsen stain in the pathology laboratory: Performance and diagnostic aid for mycobacteria in bronchoalveolar lavage. **Biomedica**, v. 42, n. 3, p. 460–469, 2 set. 2022. DOI: 10.7705/biomedica.6347.
- ASHAYERI-PANAH, M. *et al.* Cloning, optimization of induction conditions and purification of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1733c protein expressed in *Escherichia coli*. **Iran J Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 64–73, abr. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29213997/>
- BARTOLOMEU-GONÇALVES, G. *et al.* Tuberculosis diagnosis: current, ongoing, and future approaches. **Diseases**, v. 12, n. 9, p. 202, 3 set. 2024. DOI: 10.3390/diseases12090202.
- BATISTA G. K. *et al.* A variação da eficácia da vacina BCG justifica uma segunda dose? uma revisão integrativa. **Com. Ciênc. Saúde**. v. 33, n. 01, fev. 2022. DOI: [10.51723/ccs.v33i01.942](https://doi.org/10.51723/ccs.v33i01.942).
- BAYKAN, A. H. *et al.* Extrapulmonary tuberculosis: an old but resurgent problem. **Insights Imaging**, v. 13, n. 1, p. 39, 7 mar. 2022. DOI: 10.1186/s13244-022-01172-0.
- BELL, L. C. K.; NOURSADEGHI, M. Pathogenesis of HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* co-infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80–90, 7 nov. 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.128.

BOUZEYEN, R.; JAVID, B. Therapeutic vaccines for tuberculosis: An overview. **Front Immunol**, v. 13, p. 878471, jun. 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.878471.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico - Tuberculose 2024**. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. 72 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 364 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para o diagnóstico laboratorial de tuberculose e micobactérias não tuberculosas de interesse em Saúde Pública no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 494 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vacina BCG**, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/b/bcg>.

BREHM, T. T.; TERHALLE, E. Extrapulmonale Tuberkulose [Extrapulmonary tuberculosis]. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 148, n. 19, p. 1242–1249, set. 2023. DOI: 10.1055/a-1937-8186.

CAO, X. J. *et al.* MPT64 assays for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 336, 10 abr. 2021. DOI: 10.1186/s12879-021-06022-w.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Clinical and Laboratory Diagnosis for Tuberculosis**. 2024. Disponível em: <https://www.cdc.gov/tb/hcp/testing-diagnosis/clinical-and-laboratory-diagnosis.html>.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Treatment for TB Disease**. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/tb/topic/treatment/tbdisease.htm#Drug-Susceptible>.

CEPHEID. **Xpert MTB/RIF Ultra assay**: Product Insert. Sunnyvale, USA: Cepheid Inc., 2017.

COLEMAN, M. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Transmission in High-Incidence Settings- New Paradigms and Insights. **Pathogens**, v. 11, n.1, p. 1228, 25 out. 2022, DOI:10.3390/pathogens1111228.

DRAIN, P. K. *et al.* Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 31, n. 4, e00021-18, 18 jul. 2018. DOI: 10.1128/CMR.00021-18.

FENNELLY, K. P. Particle sizes of infectious aerosols: implications for infection control. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 9, p. 914-924, set. 2020. DOI:10.1016/S2213-2600(20)30323-4.

FERNANDEZ-SOTO, P.; CAVET, J. S.; TABERNERO, L. Expression and purification of soluble recombinant SapM from *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Expr Purif**, v. 174, p. 105663, out. 2020. DOI: 10.1016/j.pep.2020.105663.

FIHIRUDDIN, F. *et al.* Expression and epitope prediction of MPT64 recombinant proteins from clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* as immunoserodiagnostic candidates. **Vet World**, v. 15, n. 10, p. 2376–2383, out. 2022. DOI: 10.14202/vetworld.2022.2376-2383.

GOMES, M. M. C. Proteínas recombinantes de interesse na área da saúde. 56 f. 2023. Monografia (Especialização em Biotecnologia para Saúde – Vacinas e Biofármacos) – **Escola Superior do Instituto Butantan**, São Paulo, 2023. Disponível em: <https://repositorio.butantan.gov.br/handle/butantan/5058>.

GOPALASWAMY, R. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections - a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. **J Biomed Sci**, v. 27, n. 1, p. 74, 17 jun. 2020. DOI: 10.1186/s12929-020-00667-6.

HEIDARI, R. *et al.* Expression and Purification of the Recombinant Cytochrome P450 CYP141 Protein of *Mycobacterium Tuberculosis* as a Diagnostic Tool and Vaccine Production. **Iran Red Crescent Med J**, v. 17, n. 6, e23191, 23 jun. 2015. DOI: 10.5812/ircmj.23191v2.

HWANG, W. H. *et al.* Expression, purification and improved antigenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* PstS1 antigen for serodiagnosis. **Protein Expr Purif**, v. 95, p. 77–83, mar. 2014. DOI: 10.1016/j.pep.2013.11.011.

ISAEI, E. *et al.* The application of aptamer in tuberculosis diagnosis: a systematic review. **Trop Dis Travel Med Vaccines**, v. 10, n. 1, p. 25, 15 dez. 2024. DOI: 10.1186/s40794-024-00235-y.

IZUDI, J. *et al.* Association between GeneXpert Diagnosis and Same-Day Initiation of Tuberculosis Treatment in Rural Eastern Uganda. **Am J Trop Med Hyg**, v. 103, n. 4, p. 1447-1454, out. 2020. DOI: 10.4269/ajtmh.19-0900.

KANABALAN, R. D. *et al.* Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. **Microbiol Res**, v. 246, p. 126674, mai.2021. DOI:10.1016/j.micres.2020.126674.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **Int J Biol Macromol**, v. 106, p. 803–822, jan. 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080.

KHURSHID, S. *et al.* Potential of multi-component antigens for tuberculosis diagnosis. **Biologicals**, v. 48, p. 109–113, jul. 2017. DOI: 10.1016/j.biologicals.2017.04.004.

KOCH, A.; MIZRAHI, V. *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol**, v. 26, n. 6, p. 555–556, jun. 2018. DOI: 10.1016/j.tim.2018.02.012.

KOCH, R. Die Ätiologie der Tuberkulose. **Berliner Klinische Wochenschrift**, 1882.

KOEGELENBERG, C. F. N. *et al.* Tuberculosis: The Past, the Present and the Future. **Respiration**, v. 100, n. 7, p. 553–556, 25 mai. 2021. DOI: 10.1159/000516509.

LEÃO, S. C. Micobactérias. In: SALOMÃO, R. **Infectologia - Bases Clínicas e Tratamento**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. cap. 12, p.81-83.

- LEWINSOHN, D. M. *et al.* Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. e1–e33, 15 jan. 2017. DOI: 10.1093/cid/ciw694.
- LOUGHRAN, S. T.; BREE, R. T.; WALLS, D. Purification of polyhistidine-tagged proteins. **Methods Mol Biol**, v. 1485, p. 275–303, 2017. DOI: 10.1007/978-1-4939-6412-3_14.
- LUIES, L.; DU PREEZ, I. The Echo of Pulmonary Tuberculosis: Mechanisms of Clinical Symptoms and Other Disease-Induced Systemic Complications. **Clin Microbiol Rev**, v. 33, n. 4, e00036-20, 1 jul. 2020. DOI: 10.1128/CMR.00036-20.
- MAISON, D. P. Tuberculosis pathophysiology and anti-VEGF intervention. **J Clin Tuberc Other Mycobact Dis**, v. 27, p. 100300, 19 jan. 2022. DOI: 10.1016/j.jctube.2022.100300.
- MARTÍNEZ-CAMPRECIÓ, J. *et al.* Update on the treatment of tuberculosis. **Med Clin (Barc)**, v. 163, n. 5, p. 245–252, 13 set. 2024. DOI: 10.1016/j.medcli.2024.02.030.
- MURRAY, P. R. *et al.* *Mycobacterium* e Bactérias Álcool-Ácido Resistentes Relacionadas. In: MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. Tradução: Angela Nishikaku. 9. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2022. cap. 22 p.231-246.
- NADEEM, Z. *et al.* Comparative Analysis of the Efficacies of the GeneXpert and Solid Culture Media Techniques in the Diagnosis of *Mycobacterium Tuberculosis*. **Arch Razi Inst**, v. 77, n. 6, p. 2065-2072, 31 dez. 2022. DOI: 10.22092/ARI.2022.359856.2486.
- NATARAJAN, A. *et al.* A systemic review on tuberculosis. **Indian J Tuberc**, v. 67, n. 3, p. 295–311, jul. 2020. DOI: 10.1016/j.ijtb.2020.02.005.
- PAN, X. *et al.* MPT64 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* with negative MPT64 antigen assay results from a tertiary hospital in Southeastern China. **Front Med (Lausanne)**, v. 12, 2025. DOI: 10.3389/fmed.2025.1531853.
- POURESMAEIL, M.; AZIZI-DARGAHLU, S. Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. **Arch Microbiol**, v. 205, n. 5, p. 212, 29 abr. 2023. DOI: 10.1007/s00203-023-03541-9.
- RAMALINGAM, G. *et al.* Exploring recombinant secretory proteins from *Mycobacterium tuberculosis* to develop a serological platform for tuberculosis diagnosis. **Int J Biol Macromol**, v. 249, p. 126769, 30 set. 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126769.
- RAVIMOHAN, S. *et al.* Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. **Eur Respir Rev**, v. 27, n. 147, 28 fev. 2018. DOI: 10.1183/16000617.0077-2017.
- RODRIGUEZ-TAKEUCHI, S. Y. *et al.* Extrapulmonary Tuberculosis: Pathophysiology and Imaging Findings. **Radiographics**, v. 39, n. 7, p. 2023–2037, 2019. DOI: 10.1148/rg.2019190109.

ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Sci**, v. 28, n. 8, p. 1412–1422, ago. 2019. DOI: 10.1002/pro.3668.

SAFFARI, B. *et al.* An efficient method for recombinant production of human alpha synuclein in *Escherichia coli* using thioredoxin as a fusion partner. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 50, n. 7, p. 723–734, 2020. DOI: 10.1080/10826068.2020.1734938.

SARASWAT, M. *et al.* Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 312709, 17 dez. 2013. DOI: 10.1155/2013/312709.

SCHÜTZ, A. *et al.* A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. **STAR Protoc**, v. 4, n. 4, p. 102572, 15 dez. 2023. DOI: 10.1016/j.xpro.2023.102572.

SUÁREZ, I. *et al.* The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. **Dtsch Arztebl Int**, v. 116, n. 43, p. 729–735, 25 out. 2019. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0729.

TAFURI, S. M. Seleção e caracterização de biomarcador aplicável em plataformas nanotecnológicas para o monitoramento do tratamento da tuberculose. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – **Faculdade de Medicina**, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

TEO, A. K. J. *et al.* Subclinical tuberculosis: a meta-analysis of prevalence and scoping review of definitions, prevalence and clinical characteristics. **Eur Respir Rev**, v. 33, n. 172, 8 mai. 2024. DOI: 10.1183/16000617.0208-2023.

TOBIN, E. H.; TRISTRAM, D. Tuberculosis. **StatPearls [Internet]**, jan. 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441916/>.

UPADHYAY, A. K. *et al.* Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33951, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0033951.

URBANOWSKI M.E. *et al.* Cavitory tuberculosis: the gateway of disease transmission. **Lancet Infect Dis**. v. 20, n. 6, p. e117-e128, jun. 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30148-1.

VAZ, F. A. B. Expressão e purificação do domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína Spike do vírus *SARS-Cov-2* da cepa de Wuhan. 2024. 69 f. Dissertação (Biologia Molecular) – **Escola Paulista de Medicina**, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, 2024.

WALZL, G. *et al.* Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers. **Lancet Infect Dis**, v. 18, n. 7, p. e199–e210, jul. 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30111-7.

WHO - World Health Organization. **Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis: policy statement**. Geneva: WHO; 2011. 26 p.

WHO - World Health Organization. **Global tuberculosis report 2023**. Geneva: WHO, 2023. 75 p.

WHO - World Health Organization. **WHO consolidated guidelines on tuberculosis**. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection, 3. ed. Geneva: WHO; 2024. 184 p.

WHO - World Health Organization. **WHO consolidated guidelines on tuberculosis**. Module 4: treatment - drug-susceptible tuberculosis treatment. Geneva: WHO, 2022. 72 p.

WHO - World Health Organization. **WHO operational handbook on tuberculosis**. Module 4: treatment - tuberculosis care and support. Geneva: WHO, 2022. 110 p.

WINGFIELD, P. T. Overview of the purification of recombinant proteins. **Curr Protoc Protein Sci**, v. 80, p. 6.1.1–6.1.35, 1 abr. 2015. DOI: 10.1002/0471140864.ps0601s80.

ZAPOROJAN, N. *et al.* Evolution of laboratory diagnosis of tuberculosis. **Clin Pract**, v. 14, n. 2, p. 388–416, 23 fev. 2024. DOI: 10.3390/clinpract14020030.

ZHANG, Z. X. *et al.* Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. **Microb Cell Fact**, v. 21, n. 1, p. 191, 15 set. 2022. DOI: 10.1186/s12934-022-01917-y.

ZHANG, Z. *et al.* High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. **Microb Cell Fact**, v. 14, p. 142, 16 set. 2015. DOI: 10.1186/s12934-015-0328-z.

ZHU, Z. Y. *et al.* Expression and diagnostic value of proteins in *Mycobacterium tuberculosis*. **Genet Mol Res**, v. 13, n. 3, p. 7780–7790, 26 set. 2014. DOI: 10.4238/2014.September.26.16.