

NICOLAS TOMAZETTO MARCHON

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS
RECOMBINANTES PARA O IMUNODIAGNÓSTICO
DA TUBERCULOSE HUMANA**



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Walter M.R. Oelemann



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
SETEMBRO DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

MARCHON, Nicolas Tomazetto

Caracterização de antígenos recombinantes para o imunodiagnóstico da tuberculose humana. Rio de Janeiro, 2009
xii, 67

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/ UFRJ, 2009.

Orientador: Walter M.R. Oelemann

Referências bibliográficas: f 59

1. Mycobacterium tuberculosis
2. Tuberculose
3. Imunodiagnóstico
4. Antígenos Recombinantes

I.Oelemann, W.M.R.

II.Universidade Federal do Rio de Janeiro – Mestrado em Ciências Biológicas

III. Obtenção e caracterização de antígenos recombinantes para o imunodiagnóstico da tuberculose humana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nicolas Tomazetto Marchon

CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE HUMANA

Rio de Janeiro, 30 de setembro de 2009

(Walter Martin Roland Oelemann, Professor Doutor, UFRJ)

(Leila de Souza Fonseca, Professora Doutora, UFRJ)

(Marinella Silva Laport, Professora Doutora, UFRJ)

(Maria Helena Feres Saad, Professora Doutora, UFRJ)

(Rafael Silva Duarte, Professor Doutor, UFRJ)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Abordagens Diagnósticas de Doenças Infecciosas, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Prof. Walter M.R. Oelemann.

Trabalho dedicado a minha família

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço principalmente a Deus, como não poderia deixar de ser.

A minha família, responsável por colaborações diretas e indiretas, fornecendo sempre conforto e apoio: Carla Mônica; Eurico Marchon; Matheus Santos; Theo Marchon; Edith Emmerich; Livia, Mateus e Ana Rita Carvalho e Claudio Borges.

Aos amigos adquiridos durante a faculdade que propiciaram intercâmbio de conhecimentos, idéias e momentos de descontração em meio ao desenvolvimento desta dissertação: Rafael Peixoto, Anderson e Henrique Fragoso, Barbara Fonseca, Nelson Júnior, Mauro Jorge.

A todos os outros amigos, tão presentes quanto importantes, mesmo com a distância física, durante toda minha vida: Rodrigo e Fabio Pinha, Enrique Solla, Hermann Fecher, Vinicius Esteves, Thiago Pinho e Jorge Ones.

A todos os professores com quem tive contato, que tiveram participação direta em minha formação, a quem devo tudo que aprendi.

Aos sempre prestativos colaboradores: Eliane de Oliveira, Maria Helena Saad, Márcia Giambiagi, Rafael Duarte, Leila Fonseca, Marinella Laporte e Marlei Gomes, que contribuíram para inúmeros experimentos e esclareceram dúvidas relacionadas.

Aos integrantes do LADDI, pela convivência e ajudas diárias.

Ao grande amigo e contribuinte de todo o trabalho desenvolvido: Rafael Maciel, cujas ajudas e parcerias foram imprescindíveis para realização desta dissertação.

Ao orientador Walter Oelemann, pela oportunidade, confiança e apoio incondicional.

RESUMO

Nicolas Tomazetto Marchon

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE HUMANA

Walter M.R. Oelemann

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

A tuberculose (TB) pulmonar é a doença infecciosa mais prevalente em todo o mundo, gerando 8,8 milhões de novos casos e 2,7 milhões de mortes anualmente, números incrementados com o advento da AIDS. O diagnóstico da doença é dificultado pelos diferentes aspectos da baciloscopia, cultura, e a influência da vacinação com BCG e sensibilização do imunodiagnóstico com outras micobactérias. Somado a isso, o caráter endêmico no Brasil e em outros países subdesenvolvidos e os diferentes estágios da doença remetem a necessidade de novos métodos diagnósticos rápidos, sensíveis, específicos e economicamente viáveis. Neste sentido, os testes sorológicos emergem como uma importante alternativa. Diversos antígenos secretados pelo agente etiológico da doença – *Mycobacterium tuberculosis* - vêm sendo estudados e testados sorologicamente, dentre os quais ESAT-6, CFP-10, Tb 9.7, Tb 16.3 e ICD-2. Entretanto a obtenção e posterior estudo com soros de pacientes do Brasil não têm sido relatados para todos os antígenos. Assim, o objetivo do presente trabalho foram a obtenção e avaliação sorológica dos antígenos supracitados frente a soros de pacientes sadios e com tuberculose, para estabelecer uma alternativa diagnóstica viável e confiável para a tuberculose. Os genes que codificam os antígenos em questão foram amplificados por PCR e clonados em vetor de expressão heterólogo. Posteriormente bactérias *Escherichia coli* foram transformadas com as proteínas, tiveram sua expressão induzida e posterior purificação. Todos os antígenos testados separadamente ou formando "pools" em ELISA, foram capazes de reconhecer e diferenciar soros tuberculose positivos e negativos de maneira significativa. A aplicação dos antígenos estudados em testes sorológicos futuros, com painéis de soros de pacientes do Brasil, poderão integrar um coquetel antigênico que auxilie no diagnóstico da tuberculose e representar um estudo pioneiro no âmbito nacional.

Palavras-chave: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, sorologia, ELISA, antígenos recombinantes.

Rio de Janeiro
Setembro de 2009

ABSTRACT

Nicolas Tomazetto Marchon

CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ANTIGENS FOR
IMUNODIAGNOSIS OF HUMAN TUBERCULOSIS

Walter M.R. Oelemann

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Pulmonary Tuberculosis is the most prevalent infectious illness in the world, contributing for 8,8 million of new cases and 2,7 million of deaths per year, enhanced numbers with the AIDS advent. The disease diagnosis is difficult by different aspects of bacilloscopy, culture and the influence of BCG vaccination and the imunodiagnosis sensibilization with micobacteria. Additionally to this, the endemic character in Brazil and other non developed countries and the different stages of the illness refers to the necessity of new fast, sensitive, specific and economically feasible diagnosis methods. Serological tests has emerged as in important alternative. Several secreted antigens of the etiologic agent of the disease – *Mycobacterium tuberculosis* – has been studied and tested serologically, such as ESAT-6, CFP-10, Tb 9.7, Tb 16.3 and ICD-2. Meanwhile, Brazilian patients sera studies by using these antigens have not been reported yet. This project aimed to obtain and characterize the mentioned antigens by immunological diagnosis assays (ELISA). The codifying genes of reported antigens were amplified by PCR and cloned in heterologous expression vector. Lately *Escherichia Coli* cells were transformed and the expression induced. All antigens were purified and tested both alone or in pools in ELISA been significantly recognized and differentiated sera from tuberculosis positive and negative individuals. Future serological studies with sera panels from Brazilian patients may indicate an antigenic cocktail helpful for tuberculosis diagnosis and also represent a pioneer study in this country.

Key-words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosis, serology, ELISA, recombinant antigens

Rio de Janeiro
Setembro de 2009

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	2
FICHA DE APROVAÇÃO	3
DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1-INTRODUÇÃO	13
1.1-O agente etiológico: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
1.2-A Tuberculose	18
1.2.1-Histórico	18
1.2.2-Epidemiologia	18
1.2.3-Contágio	19
1.2.4-Tuberculose e o sistema imunológico	19
1.2.4.1-Resposta Imunológica Inata	19
1.2.4.2-Resposta Imunológica Adquirida	21
1.2.7-Manifestações Clínicas	23
1.2.8-Prevenção	24
1.2.9-Tratamento	25
1.2.10-Formas resistentes de tuberculose	26
1.2.11-Diagnóstico	27
1.2.11.1-Antígenos utilizados em sorodiagnóstico	31
2-OBJETIVOS	35
2.1-Geral	35
2.2-Específicos	35
3-MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1-Análises de Bioinformática	36
3.2-Fluxograma do delineamento experimental	36
3.3-DNA	37
3.4-Eletroforese	37
3.5-Células	38
3.6-Amplificação por PCR	39
3.7-Clonagem	40
3.8-Obtenção de células eletrocompetentes	42
3.9-Transformação de células competentes	42
3.10-Seleção dos clones positivos	43
3.11-Extração de DNA plasmidial	43
3.12-Confirmação da clonagem por digestão enzimática	44
3.13-Indução da expressão das proteínas de fusão	44
3.14-SDS-Page	45
3.15-Lise mecânica desnaturante	45
3.16-Purificação das proteínas fusionadas	46
3.17-Lavagem com gradiente de uréia	47

3.18-Precipitação de proteínas	48
3.19-Dosagem das proteínas de fusão	48
3.20-Testes Sorológicos	48
3.20.1-Soros utilizados	48
3.20.2-Western Blotting	49
3.20.3-ELISA in-house com as proteínas de fusão	50
4-RESULTADOS	51
4.1-PPE-55 (Rv3347c): Escolha de subfragmento gênico para expressão de peptídeo recombinante	51
4.2-Obtenção e clonagem dos genes codificadores de ESAT-6, CFP-10, Tb 9.7, Tb 16.3 e ICD-2	53
4.2.1-Amplificação	53
4.2.2-Confirmação da clonagem por análise de restrição	54
4.3-Indução da expressão das proteínas de fusão	57
4.4-Solubilização por lise mecânica desnaturante	57
4.5-Purificação das proteínas de fusão	58
4.6-Concentração dos antígenos recombinantes com acetona	59
4.7-Avaliação da reatividade dos antígenos recombinantes obtidos frente a soros tuberculose positivos	60
4.7.1-Western-blotting	61
4.7.2-Avaliação sorológica dos antígenos recombinantes com pools de soros por ELISA	61
5-DISCUSSÃO	68
6-BIBLIOGRAFIA	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA-adenosina deaminase
AIDS-Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Amp-ampicilina
APCs-células apresentadoras de antígenos profissionais
BCG- Bacilo de Calmette-Guérin
CFP-10-proteína de filtrado de cultura de 10 kDa
D.O.-densidade óptica
DAT-antígeno diaciltrealose
DNA-ácido desoxirribonucléico
DOTS-Estratégia do Tratamento Supervisionado da Tuberculose
EDTA-ácido etileno diamino tetraacético
ELISA-*enzyme-linked immunosorbent assay*
ESAT-6-*6kDa early secreted antigen*
GTE-glicose + Tris + EDTA
HCl-ácido clorídrico
HIV-vírus da imunodeficiência humana
HPLC-cromatografia líquida de alto desempenho
HSP-proteína de choque térmico
HUCFF-Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
ICD-2-enzima isocitrato desidrogenase 2
IFN-interferon
IL- interleucina
IS-Insertion Sequence (Elemento de inserção)
kb-kilobases
LAM-lipoarabinomanana
LB-meio Luria-Bertani
LTBI-*Latent Tuberculosis Infection*
M.-gênero *Mycobacterium*
mA-mili Ampere
MDR-TB-Tuberculose multi-resistente
MeOH-metanol
MgSO₄-Sulfato de Magnésio
MHC-complexo principal de histocompatibilidade
mL-mililitro
mM-milimolar
MTB-complexo *Mycobacterium tuberculosis*
Mtb-espécie *Mycobacterium tuberculosis*
NaCl-cloreto de sódio
NaOH-hidróxido de sódio
NaPO₄-fosfato de sódio
OMS-Organização Mundial da Saúde

ORF-*Open Reading Frame*
pb-pares de bases
PBS-tampão fosfato salino
PCR-reação em cadeia da Polimerase
PCTH-Programa de Controle da Tuberculose Hospitalar
PDIMs-*phthiocerol dmycoserosates*
PGLs-glicolipídeos fenólicos
PPD-derivado protéico purificado
PPE55-proteína da família PPE de 55 kDa
PT-prova tuberculínica
RD-regiões de diferença
RHZ-rifampicina, isoniazida, pirazinamida
RNA-ácido ribonucléico
RPM-rotações por minuto
SDS-dodecilsulfato de sódio
SFB-soro fetal bovino
SL-antígeno sulfolipídico
TAT-antígeno triaciltrealose
TB-tuberculose
Tb 16.3-antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* de 16,3k Da
Tb 9.7-antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* de 9,7 kDa
TBE-tampão Tris-borato-EDTA
TBS-tampão Tris-borato salina
TE-tampão Tris-EDTA
TGF β -fator de crescimento tumoral beta
Th-linfócitos T CD4+ *helper*
Tm-temperatura de anelamento
TMB-tetrametilbenzidina
TNF-fator de necrose tumoral
UPT-Unidade de Pesquisa em Tuberculose
V-volts
W-watts
XDR-TB-Tuberculose extensivamente resistente
ZrO₂ – óxido de Zircônio

1-INTRODUÇÃO

1.1-O agente etiológico: *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) é um micro-organismo pertencente à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*, o qual existe possivelmente há cerca de 150 milhões de anos. Este gênero apresenta atualmente, acima de 130 espécies descritas (Daniel 2006; Haas *et al.*, 2000; Primm, Lucero & Falkinham 2004). *Mtb* foi descrito pela primeira vez pelo pesquisador alemão Robert Koch em 1882, sendo por isso também conhecido, até os dias atuais, como bacilo de Koch, agente etiológico da Tuberculose (TB).

O bacilo da TB pertence ao complexo *Mtb*, cujos membros possuem ampla identidade genética, sendo indistinguíveis por estudos de hibridização DNA-DNA (Brosh *et al.*, 2001). O complexo *Mtb*, além de *Mtb* abriga várias espécies tais como a espécie *Mycobacterium bovis*, capaz de infectar humanos, causando tuberculose em alguns casos, e outros mamíferos, sendo o agente etiológico da tuberculose bovina. As espécies *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium canetti* já foram isolados em alguns casos de tuberculose em humanos no continente africano; *Mycobacterium microti*, embora seja um patógeno de roedores, tem sido isolado em alguns casos de tuberculose em humanos, também na África (Raviglione & Obrien, 2004); *Mycobacterium pinipedii* é comumente encontrado em hospedeiros mamíferos marinhos, como a foca, mas também já foi isolado de mamíferos terrestres, inclusive o homem, e *Mycobacterium caprae* que usualmente infecta cabras (Smith, 2006).

O complexo *Mtb* abrange micobactérias de crescimento lento, levando mais de sete dias para que seja possível visualização de colônias em meio sólido, o que retarda seu isolamento e identificação. Geralmente são patogênicas ao homem e animais (Shinnick & Good, 1994). Uma possível explicação para o lento crescimento do complexo seria a distância da origem de replicação (*ORC*) até o operon de RNA ribossômico (*rrn*) (Brosh *et al.*, 2001).

Mtb é um bacilo aeróbio desprovido de flagelo e não-formador de esporos, medindo cerca de 0,2 a 0,6 µm de diâmetro e 1 a 10 µm de comprimento. A bactéria possui uma parede celular bastante peculiar (Figura 1) caracterizada pelo alto teor de lipídios, geralmente ligados a diversos polissacarídeos (principalmente a arabinogalactana de

elevado peso molecular e alto grau de ramificação) e peptídeos diversos (Murray *et al.*, 1994).

Outra importante peculiaridade da parede celular de *Mtb* é a composição diferenciada da peptideoglicana, caracterizada por ligações β -1,4 entre o ácido N-glicosilmurâmico e N-acetilglicosamina, diferentemente das demais bactérias, em que o N-glicosil é substituído pelo ácido N-acetilmurâmico. *Mtb* apresenta um elevado grau de ligações cruzadas na sua peptideoglicana, o que representa outro fator que contribui para a impermeabilidade celular (Boshoff & Barry, 2006).

O elevado conteúdo de lipídios da parede celular de *Mtb* é responsável por importantes propriedades desse bacilo, como resistência a antibióticos e antissépticos, capacidade de evasão da resposta imunológica do hospedeiro, hidrofobicidade e impermeabilidade (Van Soolingen, Van der Zanden & Haas, 1998).

Dentre esses lipídios merecem destaque os ácidos micólicos, que são ácidos graxos insaturados com cadeias de 70 a 90 átomos de carbono de comprimento, presentes em abundância na parede celular (representam aproximadamente 50% do peso seco do bacilo). Estas moléculas são responsáveis pela impermeabilidade do envelope celular e foram recentemente associadas ao desenvolvimento da resistência de *Mtb* a antimicrobianos (Campos, 1999).

Outro componente lipídico importante da parede celular de micobactérias é a lipoarabinomanana (LAM), um fator de virulência que parece inibir a atividade dos monócitos. Outras moléculas lipídicas incluindo tiocerol dimicoserosato (PDIMs, do inglês *phthiocerol dimycoserates*), glicolipídicos fenólicos (PGLs, do inglês *phenolic glycolipids*) glicolipídeos ricos em trealose, sulfolipídeos e outros têm sido descritas na literatura internacional (Knutson *et al.*, 1998).

A alta hidrofobicidade da parede celular de *Mtb* lhe confere a característica de álcool-ácido resistente, segundo a coloração de Ziehl-Neelsen. Isto é, são mais dificilmente corados, mas uma vez corados por técnicas mais drásticas (empregando aquecimento), resistem fortemente à descoloração, mesmo por ácidos fortes diluídos e álcool absoluto. *Mtb* é resistente ainda a agentes químicos, capaz de formar grumos em meio líquido, uma vez corado, resistente à descoloração por ácidos fortes e apresenta, como já citado, crescimento bastante lento (Eisentadt & Haal, 1995; Spitznagel, 1999).

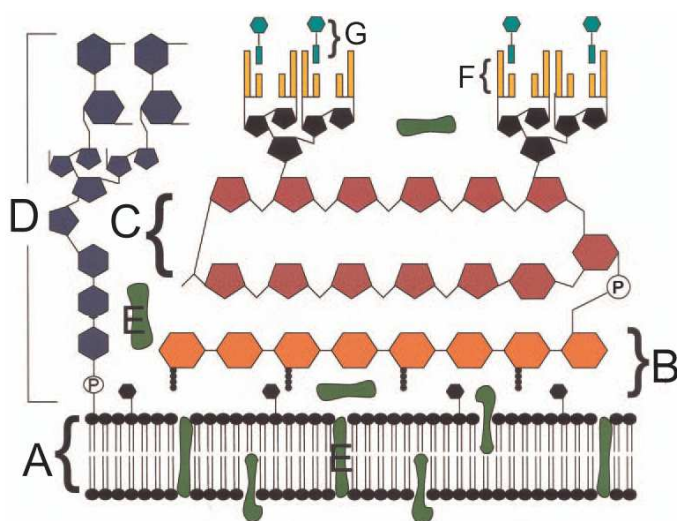


Figura 1: Parede celular de micobactérias (adaptado de Karakousis, Bishai & Dorman (2004)

(A) Membrana plasmática; (B) Peptidoglicanos; (C) Arabinogalactanas; (D) Lipoarabinomanana com envoltório de manose; (E) Proteínas associadas à membrana e ao envelope celular; (F) Ácidos micólicos; (G) Moléculas glicolípídicas de superfície associadas aos ácidos micólicos

O sequenciamento da cepa patogênica H37Rv de *Mtb* foi um marco que possibilitou melhor estudo e compreensão do metabolismo desta micobactéria (Cole *et al.*, 1998). A genômica comparativa e suas ferramentas têm sido importantes para identificação de componentes envolvidos na patogenicidade, como fatores de virulência e mecanismos de sobrevivência na célula hospedeira. Aliadas a estas ferramentas, estudos proteômicos como técnicas bioquímicas e de espectrometria de massa permitiram predição da função para 84% do genoma de *Mtb* (Mawuenyega *et al.*, 2005).

O genoma de *Mtb* possui um elevado índice das bases nitrogenadas guanidina e citosina (C+G), chegando a 65,5%. Um dos principais motivos para este índice é a ocorrência do códon de iniciação alternativo GTG em 35% das fases de leitura aberta (ORFs, do Inglês para *open reading frame*). Comparativamente, este códon alternativo ocorre em aproximadamente 9% das ORFs de *Escherichia coli* (Palomino *et al.*, 2007). Este elevado conteúdo G+C se mantém de maneira relativamente uniforme em todo o genoma de *Mtb*, podendo, entretanto, variar em determinados genes, como nos membros da família gênica PPE onde o índice é ainda superior, ou nos genes que codificam proteínas transmembranas onde é inferior (Sreevatsan *et al.*, 2007).

Uma importante característica do material genético de *Mtb* é a presença de elementos de inserção (IS, do Inglês para *insertion sequence*), especialmente *IS6110*, amplamente utilizada para tipagem e epidemiologia devido à existência de variações no seu tamanho e número de cópias (Van Embden, Cave & Crawford 1993).

Análises genômicas de *Mtb* indicam o potencial de alteração de rotas metabólicas, o que é de fundamental importância para a sobrevivência do patógeno em diferentes condições ambientais, como as encontradas dentro de células hospedeiras e em granulomas (Cole *et al.*, 1998).

No aspecto molecular, evidências sugerem que a virulência das micobactérias esteja ligada à presença e variabilidade das seqüências gênicas nas regiões de diferença (RD). Tais regiões parecem ter sido perdidas evolutivamente entre as diferentes espécies do gênero. Por codificarem antígenos específicos, com conseqüente potencial para o desenvolvimento de uma resposta imunológica específica, as seqüências dessas regiões são importantes instrumentos para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas. Até os dias atuais já foram caracterizadas 16 regiões de diferença, RD 1 a 16 (Teixeira, Clarice & Munk, 2007). A região de diferença RD1 é uma das principais e consiste em um segmento de DNA genômico de 9,5 kb. Esta seqüência está presente em todas as cepas virulentas, mas deletada em todas as cepas BCG utilizadas na vacinação e na maioria das micobactérias não tuberculosas (NTM, *non tuberculous mycobacteria*). Ela é responsável, entre outros, pela codificação dos dois antígenos mais bem caracterizados: CFP-10 e ESAT-6 (Okkels *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2006).

A importância clínica de *Mtb* está relacionada à relevância da doença por ele causada: a tuberculose. A partir do século XX, o desenvolvimento da vacinação com o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), a melhoria em estratégias de saúde pública e a descoberta de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento do micro-organismo, como a estreptomicina, isoniazida, rifampicina e outros sugeriam que a doença poderia ser erradicada, no final da década de 70. Entretanto, a partir da década de 1980, a prevalência da doença aumentou, devido ao advento da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*), à negligência dos órgãos públicos de controle da TB, ao aumento das desigualdades sociais e do fluxo migratório e à resistência adquirida por *Mtb* contra as drogas usadas, basicamente devido a não aderência completa ao tratamento adequado. Atualmente, estima-se que quase um terço da população mundial

(aproximadamente 1,6 bilhões de pessoas) esteja infectada com *Mtb*, mantendo a TB pulmonar como a doença infecciosa mais prevalente no mundo (OMS, 2009; Drobniewski *et al.*, 2003).

1.2-A Tuberculose

1.2.1-Histórico

A tuberculose recebeu este nome de J. L. Schoenlein, em 1839, o primeiro a constatar e notificar os múltiplos sintomas da doença. No entanto, relatos históricos sugerem que seu surgimento ocorreu há milhares de anos atrás, tendo sido amplamente disseminada no Egito, Roma, e inclusive na América muito antes dos primeiros contatos com os europeus (Konomi, *et al.*, 2002; Zink *et al.*, 2003).

A principal epidemia de tuberculose ocorreu na Europa a partir do século XVII e a doença ficou mundialmente conhecida como Peste Branca, devido à extrema palidez dos doentes. Fruto das altas densidades populacionais e de condições sanitárias precárias, a doença se alastrou pelo continente, perdurando aproximadamente 200 anos e dizimando cerca de um terço da população europeia (Daniel, 2006).

1.2.2-Epidemiologia

Anualmente, cerca de 9 milhões de pessoas em todo o mundo são infectadas por *Mtb*, e a doença causa a morte de mais de 2 milhões, o que representa mais de 5 mil pessoas por dia (OMS, 2009). Aproximadamente 80% dos casos estão ligados a países em desenvolvimento, o que permite concluir que a TB é uma doença socialmente determinada, ou seja, predominante em países com condições precárias de saneamento. O advento da AIDS favoreceu a globalização da transmissão da doença e desde 1993, e a OMS decretou a TB uma doença de emergência global.

No Brasil há aproximadamente 82 mil novos casos por ano, o que corresponde a 35% dos relatos das Américas (OMS, 2009). Estes números podem ser ainda maiores considerando a existência de subnotificações. O Brasil ocupa a 18ª posição no grupo dos 22 países que concentram a maioria dos casos de TB registrados no mundo, e cerca de 6 mil pessoas morrem todos os anos no país em decorrência da tuberculose. O estado do Rio de Janeiro figura como um dos maiores detentores dos casos de tuberculose no país: são

aproximadamente 15 mil casos novos todo ano, o que corresponde a 87 tuberculosos a cada 100 mil habitantes (SVS, 2007; OMS 2009).

1.2.3-Contágio

A infecção por *Mtb* geralmente ocorre de uma pessoa bacilífera para outra, por gotículas aéreas capazes de transportar o micro-organismo. Após o contágio estabelecido, *Mtb* alcança os alvéolos pulmonares pelas vias aéreas. Em seguida é direcionado aos linfonodos, de onde pode ganhar as correntes linfática ou sanguínea atingindo outros sítios do corpo. Apesar de 75% dos casos de TB serem restritos aos pulmões, não são raros casos de TB extrapulmonar. Dentre os quais, TB intestinal, óssea, meníngea, laríngea, gastrointestinal, cutânea, ou a miliar, que também acomete os pulmões, mas de maneira disseminada (Zelina, 2004).

A potencialização do contágio em países em desenvolvimento culmina com a determinação social da tuberculose e pode ser explicada por diversos fatores: elevada densidade populacional, ausência de serviços de saúde básicos, que deveriam garantir acesso abrangente ao diagnóstico e tratamento, além de condições de vida insalubres, desnutrição, habitações e locais de trabalho sem ventilação (OMS, 2009).

1.2.4-Tuberculose e o Sistema Imunológico

Apesar de não conseguir a destruição completa do bacilo, o sistema imunológico de 90% das pessoas infectadas é capaz de conter a infecção por meio de formação de granuloma. Nestes casos o patógeno permanece vivo, mas em estado latente, com níveis basais de proliferação (Schluger & Rom, 1998). Esses frequentes casos são conhecidos por tuberculose infecção latente (LTBI, do inglês *latent tuberculosis infection*) e constituem um grupo de difícil diagnóstico. Anos depois, em eventuais situações de debilidade do sistema imunológico (como nos casos de AIDS, em pacientes imunossuprimidos e em usuários de corticóides), pode haver a reativação da tuberculose, com posterior caracterização da doença ativa. A LTBI é, portanto, uma fase onde o hospedeiro mantém a infecção por *Mtb*, porém não possui sinais e sintomas da doença (Karakousis *et al.*, 2004).

1.2.4.1-Resposta Imunológica Inata

O sistema imunológico inato constitui a primeira barreira de proteção do hospedeiro à infecção por *Mtb*. Diversas células deste sistema desempenham importantes papéis no combate ao agente infeccioso.

Os macrófagos alveolares são fundamentais para a eliminação de partículas que entram no organismo por via aérea, sendo considerados a primeira população de células a interagir com o bacilo de Koch. Entretanto, os macrófagos são, também, os responsáveis pela manutenção da infecção por *Mtb*, devido à capacidade de sobrevivência dos bacilos nos fagossomos (Dannenberg, 1991). As micobactérias são resistentes aos mecanismos microbicidas dos macrófagos, os quais são capazes de eliminar a grande maioria de outras bactérias fagocitadas. Isto se deve pela capacidade do *Mtb* de inibir tanto a acidificação e a maturação do fagossomo, escapando das enzimas lisossomais, como dos mecanismos apoptóticos dos macrófagos que fagocitam as micobactérias (Alcais *et al.*, 2005; Yoshikai, 2006). As micobactérias possuem ainda a capacidade de bloquear etapas da fusão do fagolisossomo. Tais processos podem, eventualmente, ser revertidos por citocinas como IFN- γ e TNF- α (Pieters, 2001).

Apesar dos macrófagos serem considerados os alvos principais para infecção por *Mtb*, recentemente tem-se proposto que outras populações de células, a exemplo dos neutrófilos, também podem ser infectadas e desempenhar um papel importante no desenvolvimento da doença. Neutrófilos estão entre as células inicialmente recrutadas em sítios onde ocorre invasão por agentes patogênicos ou aonde sinais de inflamação são disparados. Além de possuírem mecanismos microbicidas, acredita-se que tenham importante papel no controle do crescimento micobacteriano (Appelberg *et al.*, 1995). Sugere-se que essas células contribuam para o controle da infecção através da produção de quimiocinas e indução da formação do granuloma (Tan *et al.*, 2006). Por outro lado, tem se atribuído também aos neutrófilos um papel no desenvolvimento da doença, permitindo a replicação do bacilo (Eruslanov *et al.*, 2005).

Neste contexto, recentes relatos vêm sugerindo que a possibilidade de estabelecimento da doença ativa esteja ligada ao tipo celular que confere resposta inicial ao *Mtb*. Quando esta resposta ocorre via macrófagos, geralmente a infecção tende a ser

contida, mas quando é realizada por neutrófilos, normalmente ocorre manifestação da doença ativa (Cruz, Barbosa & Oliveira, 2005).

Por outro lado, os mastócitos são células estrategicamente distribuídas no pulmão, apresentando importante função na defesa às micobactérias. Quando ativadas, essas células liberam diversos mediadores imunológicos, como histamina, heparina, prostaglandinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-8, entre outros. (Williams & Galli, 2000). A IL-6 está envolvida na ativação de neutrófilos, enquanto o mediador TNF- α , na manutenção do granuloma (Munoz *et al.*, 2003). Acentuado aumento nas populações de mastócitos é observado nos pulmões após a infecção por *Mtb*. Consequentemente ocorre degranulação e liberação de diversos mediadores, principalmente pró-inflamatórios (Adams *et al.*, 1995).

Lesões causadas por *Mtb* apresentam elevados números de células dendríticas. Essas células, assim como outras APCs possuem a capacidade de reconhecer antígenos, endocitá-los, e realizar o processamento e apresentação via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II, do inglês *major histopatibility complex*) para células efetoras da resposta imune (linfócitos CD4+). O componente LAM ligado a resíduos de manose (LAM-cap de manose) está presente na parede celular das micobacterias e é apontado como um dos fatores capazes de interagir com receptores dessas células (Geijtenbeek *et al.*, 2003). Estudos recentes relataram que a subpopulação de linfócitos T CD4+ *helper* 1 (T_H1) expandem em resposta a antígenos de BCG, apresentados por células dendríticas nos linfonodos, e migram para os sítios de infecção, tais como o tecido pulmonar. Nesses sítios são capazes de liberar IFN- γ ativando macrófagos locais que controlam a replicação do bacilo (Humphreys *et al.*, 2006).

Embora a depleção de células NK (*natural killer*) não tenha influência na carga bacteriana nos pulmões, essas células vêm sendo apontadas como importantes coadjuvantes nas respostas imunológicas inata e adaptativa às micobactérias (Junqueira-Kipnis *et al.*, 2003). Células NK humanas têm mostrado um aumento da citotoxicidade por macrófagos infectados com *Mtb*. Além disso, são capazes também de potencializar a habilidade dos linfócitos T CD8+ de produzir IFN- γ e lisar células infectadas por *Mtb* (Vankayalapati *et al.*, 2002).

Provavelmente por se encontrar em concentrações 30 vezes maiores que os macrófagos alveolares, as células pulmonares epiteliais são as primeiras células a

interagirem com *Mtb*. Apesar de manter e permitir a replicação de *Mtb* em seu interior, tais células podem gerar importantes respostas pró-inflamatórias pela secreção de IL-8, induzindo a produção de agentes microbicidas como o óxido nítrico (Pethe, Alonso & Bier, 2001).

1.2.4.2-Resposta Imunológica Adquirida

O sistema imunológico inato muitas vezes é capaz de conter infecções por *Mtb*, no entanto, isto nem sempre acontece. Neste contexto, o sistema imunológico adquirido também inicia seus mecanismos para eliminar o agente infeccioso. Vale lembrar que, *in vivo*, as respostas aos invasores ocorrem de maneira dinâmica, com atuação concomitante dos sistemas imunológicos inato e adaptativo em prol da proteção do hospedeiro. A imunidade adaptativa é mediada por linfócitos antígeno-específicos, que utilizam receptores também específicos gerados por rearranjo genético e precisam de alguns dias para completar os processos de diferenciação e expansão clonal. Durante esse intervalo de tempo para a formação da resposta imunológica adaptativa, a memória imunológica específica pode se estabelecer, promovendo proteção duradoura contra reinfecções. De maneira geral, a resposta imunológica adquirida é dividida em resposta celular, através de mecanismos de citotoxicidade, e a resposta humoral, mediada por anticorpos (Yoshikai, 2006).

Estudos mostram que a resposta imunológica celular é essencial para o controle da infecção causada por *Mtb*, principalmente via linfócitos T CD4+, mais especificamente sua subpopulação T_H1. Linfócitos T_H1 são capazes de reconhecer antígenos do micro-organismo apresentados pelo MHC II e ativar os macrófagos através da secreção de citocinas, como TNF- α , IL-4 e, principalmente, IFN- γ (Murray, 1999). Esta citocina está em níveis elevados em indivíduos com doença limitada, que, em contrapartida, apresentam baixa presença de anticorpos específicos contra *Mtb* (Wilsher *et al.*, 1999). Essas células também ajudam a desenvolver a resposta mediada por T CD8+ e participam da indução da apoptose de células infectadas (Scanga, Mohan & Yu, 2000).

De forma semelhante, as células T CD8+ também auxiliam no controle da infecção, principalmente através de secreção de citocinas e lise bacteriana. A liberação de IFN- γ promove a ativação dos macrófagos. Linfócitos T CD8+ são eficientes na lise de células infectadas e na eliminação de bactérias intracelulares. Os linfócitos T também

apresentam a capacidade de processar e apresentar antígenos de forma eficiente, estabelecendo-se como uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa (Serbina, Lazarevic & Flynn, 2001).

Baseando-se em estudos como os supracitados, e devido ao fato da infecção por *Mtb* possuir caráter intracelular, durante as últimas décadas considerava-se que a resposta imune humoral não possuía participação efetiva na proteção contra TB. Porém, apesar do papel dos anticorpos em infecções bacterianas intracelulares ainda não estar completamente elucidado, a resposta humoral contra *Mtb* tem sido foco de diversos estudos (Williams *et al.*, 2004, Reljic *et al.*, 2006).

Sabe-se que os anticorpos exercem diversas funções no sistema imunológico, tais como neutralizar toxinas, intermediar ligações de patógenos a receptores, opsonizar invasores, ativar o sistema complemento, induzir e direcionar a secreção de citocinas e mediar mecanismos de citotoxicidade dependente de anticorpo. Além disso, devido a sua especificidade, os anticorpos possuem função preponderante em estudos relacionados a testes diagnósticos baseados na sorologia. Alguns achados importantes no contexto de imunidade humoral mostram que BCG quando revestido por anticorpos, é mais eficientemente processado e apresentado por células dendríticas para estimular respostas de linfócitos T. Os anticorpos parecem também aumentar a internalização e destruição desses bacilos mediada por neutrófilos e macrófagos, fato extremamente importante no contexto da imunidade de mucosa (Vallière *et al.*, 2005).

Um estudo importante estabeleceu um marco na elucidação da interação entre *Mtb* e resposta humoral, mostrando que anticorpos monoclonais podem alterar o curso da infecção. Foi constatado que a resposta humoral, mesmo não sendo capaz de reduzir a carga de bacilos em uma infecção, atua eficientemente em prol da formação do granuloma, minimizando a disseminação do patógeno e favorecendo a sobrevivência do paciente (Glatman-Freedman, 2003).

Vale salientar que a variabilidade no MHC de indivíduo para indivíduo e de população para população é determinante na instalação da doença, seu curso e diagnóstico, o que permite inferir que a susceptibilidade à doença e a resposta imunológica ao *Mtb* estejam intimamente ligadas a um caráter populacional local.

1.2.7-Manifestações Clínicas

As infecções por *Mtb* são em sua maioria assintomáticas e permanecem latentes por um grande período de tempo. Entretanto, em alguns casos, a doença pode se desenvolver no primeiro contato com o bacilo. A TB primária, como é classificada nesses casos, acomete com frequência crianças de até 4 anos de idade e geralmente representa uma forma grave, disseminada e não transmissível da doença. Dentre as pessoas que apresentam LTBI aproximadamente 10% desenvolvem posteriormente a doença ativa. Entretanto, esse risco é muito elevado em casos de debilidade do sistema imunológico, como em casos de co-infecção por HIV, podendo chegar a 60%. A TB ativa, em 80% dos casos, se apresenta na forma pulmonar (Raviglione & O'Brien, 2004).

Os sintomas da TB ativa incluem, de maneira geral, tosse crônica por mais de 15 dias (principal marcador da doença), com eventuais casos de hemoptise (expectoração de sangue através da tosse), anorexia, fadiga sem causa aparente, perda ponderal lenta e progressiva, dor tóraxica, febre geralmente ao entardecer e sudorese noturna intenso. Nos casos de TB extrapulmonar, os sintomas irão depender da localização da doença. Em alguns casos, a evolução pode originar conseqüências graves, ocorrendo o que se chama de TB crônica. Neste caso, há reativação dos focos primários, caseificação progressiva (que corresponde à necrose do tecido) e cavernização (OMS, 2009).

Nos dias atuais, um grupo especial de pacientes infectados por *Mtb* merece destaque: os co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A AIDS é uma pandemia que afeta mais de 40 milhões de pessoas (OMS, 2009). Indivíduos com AIDS são debilitados imunologicamente por sofrerem uma forte diminuição no repertório de células T CD4+ e por este motivo são mais facilmente infectados por *Mtb* e passíveis de reativação da TB. Nesses casos ocorre agravamento das manifestações da TB. Anualmente, cerca de 700 mil casos de tuberculose ativa ocorrem em pacientes HIV-positivos, causando cerca de 200 mil mortes. Este grupo ainda se caracteriza por maior dificuldade de diagnóstico para a tuberculose, devido a características atípicas no quadro de TB que desenvolvem (Cherian & Verghese, 2000).

1.2.8-Prevenção

A prevenção da TB é feita através da imunização vacinal com Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), em alusão aos pesquisadores que a desenvolveram. Esta vacina consiste em bacilos vivos de *M. bovis* atenuados por mais de 230 passagens em meio de cultura e

liofilizados. Este processo de atenuação levou à perda de regiões genômicas como a RD 1. BCG é capaz de estimular a resposta imunológica contra *Mtb*, possibilitando que em um eventual contato com o micro-organismo, a doença não se estabeleça. No Brasil a cepa vacinal utilizada é a cepa Moreau, mas existem diversas cepas e sub-cepas de *M. bovis*, com diferentes níveis de atenuação, também utilizadas na vacinação em outras regiões do mundo (Chen *et al.*, 2007).

A vacina BCG começou a ser utilizada em 1921 por via oral, mas posteriormente passou a ser administrada por via cutânea, devido à melhor indução da resposta de hipersensibilidade tardia a tuberculina e a oferecer menores custos. Por não ser eficaz no impedimento e desenvolvimento da tuberculose pulmonar, conferindo proteção satisfatória apenas para a meningite tuberculosa e para as formas disseminadas infantis da doença, a utilização da BCG é bastante controversa (Bricks, 2004).

Apesar de conferir resistência bastante variável (pode oscilar de 0 a 80%, dependendo da população estudada), devido a fatores ambientais e fatores genéticos da população, a vacinação com BCG é indicada apenas em alguns países. Comprovadamente, a vacinação com BCG garante até 100% de eficiência na prevenção de meningite tuberculosa em neonatos. No Brasil, a BCG está no Calendário Básico de Vacinação, programada para o primeiro mês de vida. A indicação de doses subsequentes de BCG na profilaxia da tuberculose ainda é ainda desprovida de comprovação científica quanto à eficácia (CVA, 2004).

1.2.9-Tratamento

Estima-se que aproximadamente 50% dos infectados por *Mtb*, que não recebem tratamento, estão propensos ao óbito. Entretanto, o tratamento para TB, apesar de sua longa duração (em média seis meses a um ano), é bastante eficaz e leva a cura em 95% dos casos, quando realizado regularmente. Geralmente utiliza-se o RHZ, um coquetel que inclui três medicações: rifampicina (R), isoniazida (H) e pirazinamida (Z), que agem sobre *Mtb* de maneira sinérgica em vias metabólicas e localizações celulares diferentes, além do etambutol (OMS, 2009). Esses medicamentos atuam inibindo a RNA polimerase, enzima essencial ao metabolismo celular e a síntese de ácidos micólicos, componentes essenciais à parede celular de *Mtb*.

Outros fármacos também podem ser indicadas no combate ao bacilo nos casos de resistência, como amicacina, capreomicina, estreptomicina, etambutol e outras (Portal da Saúde, 2008). Casos de LTBI são analisados particularmente e pacientes adultos propensos à ativação da doença são tratados com baixas doses de isoniazida (Hopewell, Migliori & Raviglione, 2006).

No entanto, a existência de fármacos efetivos por si só, não parece ser capaz de eliminar a tuberculose, uma vez que os pacientes geralmente não realizam o tratamento até o final. Neste sentido, a DOTS (Estratégia do Tratamento Supervisionado da Tuberculose, do inglês para *directly observed treatment strategy*) é uma proposta de intervenção com o objetivo de se favorecer o tratamento completo assistido aos pacientes com tuberculose. Esta estratégia pode levar ao aumento na probabilidade de cura e o não desenvolvimento de resistências, contribuindo para a melhoria no controle da TB (OMS, 2009). Atualmente, novas abordagens, adicionais à estratégia DOTS, vêm sendo propostas. Neste sentido, o desenvolvimento da DOTS diretamente nas comunidades, com participação de agentes comunitários de saúde, e com avaliação intensiva dos contatos intradomiciliares seguida de tratamento ou quimioprofilaxia tem levado a maiores índices de cura (Cavalcante, 2007).

Atualmente, o número de cepas de *Mtb* com resistência múltipla a drogas é cada vez maior, o que estimula as pesquisas na busca de novas moléculas eficientes no tratamento, e melhor compreensão dos mecanismos de sobrevivência e resistência desse micro-organismo. Estudos diversos vêm mostrando que tais resistências são principalmente fruto de mutações espontâneas no DNA de *Mtb* e da interrupção no tratamento à TB (Quirós-Roldán, Airolti & Moretti, 2001).

1.2.10-Formas resistentes de tuberculose

A gravidade de um caso de TB está intimamente ligada à resistência da cepa infectante e às possibilidades de tratamento disponíveis. Desta maneira, a OMS realiza uma classificação dos casos de resistência:

Mtb mono-resistente: quando apresenta resistência a uma única droga, sendo esta comumente a isoniazida;

Mtb poli-resistente: quando ocorre resistência a pelo menos duas drogas, mas não envolvendo rifampicina e isoniazida simultaneamente;

Mtb multi-resistente (MDR-TB): quando há resistência a pelo menos duas drogas, sempre envolvendo rifampicina e isoniazida. Estima-se em 450 mil casos anualmente;

Mtb extensivamente resistente (XDR-TB): que se caracteriza por cepas MDR com resistências adicionais a drogas de segunda linha e à pelo menos uma droga injetável, utilizadas nos casos de resistência às drogas de primeira escolha. É considerada uma potente ameaça e vêm preocupando a comunidade científica e autoridades de saúde, por ter sido diagnosticada em aproximadamente 30 mil pessoas em todas as regiões do mundo e ser considerada incurável (TB Alliance, 2008).

Ainda de acordo com a TB Alliance (2008), outra classificação de resistência pode ser empregada no estudo da tuberculose:

- Resistência primária: presença de resistência a uma ou mais drogas em pacientes que não haviam recebido medicamentos antituberculose anteriormente;
- Resistência secundária: presença de resistência a uma ou mais drogas em pacientes previamente tratados com drogas antituberculose, por um período mínimo de um mês;
- Resistência indeterminada: presença de resistência a uma ou mais drogas em pacientes sem informação em prontuário sobre tratamento anterior com drogas antituberculose.

1.2.11-Diagnóstico

Atualmente, a cultura e o isolamento de *Mtb* em meios adequados, principalmente de Löwenstein-Jensen, constituem o método confirmatório de diagnóstico para TB. Outros meios de cultura também podem ser utilizados, como Middlebrook 7H10 e 7H11, e os meios líquidos Middlebrook 7H9 e 7H12 (Drobniewski *et al.*, 2003). Entretanto, o patógeno apresenta crescimento lento, o que demanda semanas para obtenção de colônias visíveis, retardando os resultados. A cultura bacteriológica apresenta, ainda, sensibilidade zero no diagnóstico de LTBI e a obtenção do espécime clínico para a cultura pode ser de difícil acesso, exigindo muitas vezes procedimentos invasivos (Almeida *et al.*, 2005).

Nos casos de TB pulmonar, geralmente o espécime clínico utilizado é o escarro. No entanto, alguns pacientes (principalmente crianças) são incapazes de produzi-lo e a cultura bacteriológica nestes casos pode ser feita a partir de lavados brônquio-alveolares ou lavagens gástricas. A especificidade nesses casos varia de 80% a 93%. A cultura bacteriológica é amplamente utilizada nos casos de TB extrapulmonar. Na linfadenite tuberculosa, por exemplo, as amostras podem ser obtidas por biópsia cirúrgica, e a cultura

apresenta sensibilidade de 70 a 80%. Nos casos de acometimento do trato geniturinário, culturas a partir da urina matinal média apresentam sensibilidade de 90%. Culturas do líquido cefalorraquidiano podem apresentar sensibilidade de 80% ou mais no diagnóstico de meningite tuberculosa (Raviglione & Obrien, 2004).

Paralelamente a cultura bacteriológica, é realizada a microscopia direta por coloração de Ziehl-Neelsen, que consiste, resumidamente, na submersão do esfregaço em fucsina fenicada, seguida de aquecimento, adição de álcool-ácido à 3% e por fim azul de metileno, sempre intercaladas de lavagens com água. A observação microscópica revela os bacilos álcool-ácido resistentes. Apesar de constituir uma metodologia diagnóstica rápida, barata e de fácil execução, a baciloscopia possui importantes limitações. Dependendo do estágio da doença, pode ser realizada a partir de escarros de pacientes com TB pulmonar, apresentando elevada especificidade, mas sensibilidade variável (de 34% a 80%). Em outros casos de TB, como linfadenite e meningite tuberculosas, a sensibilidade da baciloscopia é ainda menor. Limitações desta técnica ocorrem principalmente relacionadas a sensibilidade, uma vez que resultados positivos só ocorrem quando há entre 5000 a 10000 bacilos por mL de amostra, sendo ineficiente para casos de TB paucibacilar (Raviglione & Obrien, 2004).

Desde 1958, a prova tuberculínica (PT), também chamada de intradermorreação de Mantoux, é utilizada como método auxiliar para diagnóstico da TB. Esta abordagem diagnóstica possui grande importância no diagnóstico de crianças e outros grupos de pacientes incapazes de expectorar. A suspeita clínica que indica a realização da prova tuberculínica se dá por radiografia do tórax, além de informações sobre contato com doentes. A PT utiliza o derivado protéico purificado (PPD RT 23, inglês: *purified protein derivative*, preparada de cultura de cepas de *Mtb*) que é aplicado intradermicamente (0,1 mL) no antebraço do paciente (Raviglione *et al.*, 2004).

Nos indivíduos infectados (ou previamente vacinados) se desenvolve uma reação inflamatória local, mediada por células T_H1 . Esta reação inflamatória leva à liberação de citocinas, que estimulam a expressão de moléculas de adesão no endotélio e aumentam a permeabilidade dos vasos sanguíneos locais, permitindo a chegada de plasma e células acessórias, gerando um endurecimento tecidual visível. Assim, é possível avaliar, de 48 a 72 horas após a aplicação, um endurecimento palpável na área da aplicação. De acordo com o diâmetro da área do endurecimento, sugere-se o diagnóstico: se for de 5 mm, o resultado

será positivo em pacientes HIV+ ou que estão em contato com pacientes com TB ativa; maior ou igual a 10 mm, será positivo em diabéticos e pacientes com problemas hepáticos, além de profissionais da área da saúde; já para pacientes sem fatores de risco, é necessário endurecimento de 15 mm para diagnóstico positivo (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2004).

Entre as deficiências desta técnica amplamente utilizada estão: a diferença na resposta imunológica de cada indivíduo que pode alterar os resultados de hipersensibilidade; o contato prévio de um indivíduo com micobactérias ambientais; o aspecto particular de cada avaliação por profissionais da saúde; e a ineficácia deste teste para indivíduos HIV positivos, os quais não possuem um sistema imunológico capaz de montar uma resposta imunológica via T_H1 eficiente.

Considerando as dificuldades e limitações das técnicas atualmente utilizadas para auxiliar no diagnóstico da TB, aliadas ao caráter altamente contagioso da TB, a busca por métodos mais simples, acurados, definitivos e rápidos, se faz necessária para evitar a disseminação da doença, além de possibilitar o início do tratamento o mais cedo possível (Saegerman *et al.*, 1995). Por outro lado, tendo a doença um forte componente social, isto é, encontra-se concentrada em países com carências sócio-econômico-sanitárias, é importante que as técnicas de diagnóstico propostas apresentem viabilidade econômica para que possam ser implementadas principalmente nas regiões endêmicas.

Dentre as técnicas mais recentemente empregadas, encontram-se os ensaios baseados em Biologia Molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), geralmente utilizando como seqüências-alvo de DNA os genes que codificam o rRNA 16S e os elementos de inserção. Esta técnica, apesar de ser altamente específica e permitir rápida obtenção de resultados, não vem sendo amplamente utilizada na rotina de diagnóstico de TB por diferentes razões: Por ser uma técnica capaz de detectar patógenos vivos ou mortos, é impossível inferir se a doença está ou não ativa no paciente. Além disso, possui um custo relativamente alto e necessita de adequada estrutura física e pessoal especializado para sua realização, fatores estes limitantes para ser utilizada na rede pública, em locais com alta demanda diagnóstica (Rossetti *et al.*, 2002).

Além de análises baseadas em biologia molecular, métodos não convencionais de baciloscopia surgem como alternativa à coloração de Ziehl-Neelsen, embora a maioria desses testes alternativos não tenha ainda importância clínica relevante comprovada. Dentre

os quais, o uso da combinação dos fluoróforos auramina e rodamina, que permitem detectar micobactérias presentes no escarro por meio de fluorescência (BA & Rieder, 1999). Há também métodos não convencionais de cultura, como o teste comercial MGIT (*Mycobacteria growth indicator tube*), em tentativa de substituir o cultivo tradicional em meio Löwenstein-Jensen, visando maior eficiência e rapidez de crescimento micobacteriano (Palomino, 2005). Estes métodos, entretanto, ainda são caros e necessitam de adequada estrutura física para serem realizados.

Há também estudos no diagnóstico da TB pulmonar com base em técnicas chamadas de não microbiológicas, como é o caso da detecção da ADA (adenosina deaminase), uma enzima envolvida no metabolismo das purinas que funciona como marcador, estando aumentada em efusões pleurais de tuberculosos; constituindo-se uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da doença. Entretanto, os estudos têm apresentado sensibilidade variável (Lima, Colares & Fonseca, 2003; Trajman *et al.*, 2007).

Outros métodos tais como a HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho, do inglês *high pressure liquid chromatography*) baseada na detecção de ácido micólicos, têm sido utilizados para diferenciação entre micobactérias, mas com sensibilidade variável visto que duas ou mais espécies podem conter o mesmo ácido micólico (Palomino, 2005).

Por possibilitar um diagnóstico mais rápido e simples, os métodos de diagnóstico da TB baseados em testes sorológicos ganharam destaque em meio a comunidade científica. Estes testes têm como fundamento o reconhecimento específico de antígenos de *Mtb* pelos anticorpos dos soros de indivíduos infectados (Lyashchenko *et al.*, 1998). Os testes sorológicos são economicamente viáveis e de fácil execução, com potencial para um diagnóstico eficiente da TB. Tais virtudes se estendem às formas extrapulmonares da TB, uma vez que a detecção de anticorpos contra antígenos de *Mtb* ocorre de maneira independente ao sítio acometido pelo patógeno (Harboe, *et al.* 1990; Ghoshal *et al.*, 2003; Lodha & Kabra, 2004; Imaz *et al.*, 2008). Entretanto, os testes sorológicos possuem limitações, referentes à especificidade e sensibilidade, de maneira que elevados níveis de anticorpos estão, geralmente, relacionados ao surgimento de sinais clínicos, quando se faz presente uma forte carga antigênica. Outro fator limitante é a ocorrência de reações cruzadas devido à vacinação por BCG ou por compartilhamento dos antígenos de *Mtb* com micobactérias ambientais (Collins, 1996). Mas com o sequenciamento completo do DNA

de *Mtb*, tornou-se viável a busca de antígenos com potencial imunodiagnóstico e adequada sensibilidade e especificidade.

Atualmente, diversas abordagens são propostas para o diagnóstico da TB. Entre elas destacam-se métodos sorológicos como o *Western Blotting* e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), que verificam a presença de anticorpos específicos nos pacientes com tuberculose, e ensaios de tipo IGRA (do Inglês *interferon gama release assay*) como o Quantiferon-TB, que analisa os níveis de IFN- γ , citocina chave na resposta ao *Mtb*, produzida por linfócitos T presentes no sangue periférico após estímulo *in vitro* com antígenos micobacterianos.

O método do ELISA consiste basicamente na adsorção de antígenos a uma superfície sólida e adição do soro de pacientes com TB, supostamente contendo anticorpos contra os antígenos em questão. Utilizando conjugados de anticorpos capazes de reconhecer esses anticorpos humanos e ligados à peroxidase e, posteriormente, substrato enzimático específico, é possível detectar e quantificar a ligação antígeno:anticorpo. Tal técnica é amplamente utilizada em estudos epidemiológicos e no diagnóstico de diversas doenças infecciosas (Böttcher & Gangl, 2004; Beck *et al.*, 2005; Lequin, 2005).

A conclusão do projeto genoma de *Mtb* e sua melhor compreensão (Cole *et al.*, 1998; Paine & Flower, 2002; Tekaiia *et al.*, 1999; McDonough *et al.*, 2008), permitiram a identificação de diversos antígenos específicos para estudo. Neste sentido, muitos estudos vêm tentando identificar antígenos específicos expressos principalmente quando *Mtb* se replica ativamente, mas a infecção ainda não progrediu para uma doença com sintomas clínicos, como no caso da LTBI. Tais antígenos específicos poderão possibilitar um diagnóstico precoce e confiável. Além disso, outros grupos problemáticos para o diagnóstico da doença, como os imunossuprimidos (como co-infectados por HIV), casos de TB extrapulmonar, crianças e idosos (que possuem dificuldade de produção de escarro), poderão se beneficiar dos testes sorológicos como auxiliar no diagnóstico da TB (Hopewell *et al.*, 2006; Horsburgh, 2004, Castelo-Filho *et al.*, 2004).

Um importante fator que interfere na sensibilidade dos ensaios sorológicos é a heterogeneidade da resposta humoral em pessoas infectadas por *Mtb*. Sendo assim, tem sido sugerida a combinação de vários antígenos purificados na constituição de um coquetel, para melhorar a sensibilidade desse tipo de ensaio (Amadori *et al.*, 2002; Kanaujia *et al.*, 2003; Weldingh *et al.*, 2004; Dillon *et al.*, 2000). A natureza desses antígenos é bastante variada,

mas os antígenos protéicos estão entre os mais bem estudados. Diversas proteínas recombinantes isoladas ou constituindo *pools* estão sendo propostas para utilização em testes sorológicos. Além disso, pesquisadores vêm utilizando também a técnica de construção de poliproteínas recombinantes, que consiste na montagem de ORFs em “tandem” de mais de uma proteína recombinante, reguladas por apenas um promotor, sendo capaz assim de gerar antígenos multiepítotos, aumentando a sensibilidade dos testes sorológicos (Houghton *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2004; Kamath *et al.*, 2008).

1.2.11.1-Antígenos utilizados em sorodiagnóstico

Diversos antígenos têm sido testados para sorodiagnóstico, dentre eles as proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock protein*), capazes de estimular a resposta por linfócitos T e B, encontradas em níveis elevados em pacientes com tuberculose ativa. Entretanto, testes sorológicos com as HSP's mais estudadas até hoje (HSP 60, 65, 71) são propensos à reatividade cruzada. Os antígenos diaciltrealose (DAT) e triaciltrealose (TAT), estão presentes apenas em *Mtb* e na cepa ambiental *M. fortuitum* e estudos utilizando esses compostos mostraram sensibilidade entre 44 e 93%, com elevada especificidade, 99,1% (Verma & Jain, 2007).

O antígeno sulfolipídico (SL-1) é exclusivo de cepas virulentas de *Mtb* e seu uso tem mostrado sensibilidade e especificidade em torno de 80%, sendo o antígeno não-protéico mais promissor atualmente (Julián *et al.*, 2002). Diversos outros antígenos com resultados ainda não satisfatórios vêm sendo alvos de estudo, como o antígeno 60, a lipoarabinomanana e a família das trealoses acetiladas (Verma & Jain, 2007).

Atualmente, um dos antígenos protéicos mais promissores no sorodiagnóstico da TB é a lipoglicoproteína de 38 kDa. A sensibilidade varia de 16 a 94%, dependendo do estágio de manifestação da doença e principalmente da população de pacientes utilizada nos estudos, o que, aliado à baixa reatividade deste antígeno nos casos de pacientes incapazes de produzir escarro (21%), faz com que a busca de novos antígenos para sorodiagnóstico continue em pauta em meio à comunidade científica (Weldingh *et al.*, 2004).

Alguns antígenos de *Mtb* já descritos mostraram-se eficientes em ensaios sorológicos realizados tanto em países de áreas não endêmicas (como na Europa), quanto em países de áreas endêmicas, localizados principalmente na África e na América do Sul,

incluindo o Brasil (Moran *et al.*, 2001; Beck *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008). Em alguns desses antígenos está focado o presente trabalho:

ESAT-6 (*early secreted antigenic target*) é um antígeno protéico de 9,9 quilodaltons (kDa), composto por 95 aminoácidos. Este antígeno é codificado pelo gene *esxA* (Rv3875), presente na região de diferença RD1, sendo expresso e secretado precocemente por *Mtb* (Andersen *et al.*, 2000). ESAT-6 é essencial para a sobrevivência e disseminação de *Mtb in vivo*. Esse antígeno se mostrou um potente estimulador da produção de INF- γ por linfócitos T, em estudos realizados em ratos, desencadeando uma resposta imunológica protetora (Andersen *et al.*, 1995, Cardoso *et al.*, 2002). Por esse motivo, ESAT-6 vem sendo proposto em testes sorológicos, mostrando elevada reatividade com soros de indivíduos com TB, sendo indicado para identificação de estágios de progressão da doença (Kanaujia *et al.*, 2003). Contraditoriamente, estudos em áreas não endêmicas como o Canadá, relacionaram a reatividade desse antígeno a soros de pacientes com LTBI, mas com diversos fatores de risco para desenvolvimento da doença ativa (Silva *et al.*, 2003). Este antígeno é de grande utilidade também no teste IGRA, sendo apontado como um potente indutor da resposta celular dos linfócitos via IFN- γ (Chee *et al.*, 2008).

CFP-10 (*culture filtrate protein*) é uma proteína de filtrado de cultura de 100 aminoácidos e 10,8 kDa, codificada pelo gene *esxB* (Rv3874) que também faz parte da RD1 e é codificada conjuntamente com o ESAT-6 através do operon *esx-lhp* (Figura 2). A associação deste antígeno com o antígeno 38 kDa, aumentou em média em 10% a sensibilidade para sorodiagnóstico da TB, sendo praticamente duplicada em pacientes incapazes de produzir escarro, em estudos realizados com pacientes de diversos países, incluindo áreas endêmicas e não endêmicas; o que sugere o uso do CFP-10 em coquetéis antigênicos possibilitando o aumento da sensibilidade dos testes sorológicos (Dillon *et al.*, 2000; Weldingh *et al.*, 2004).

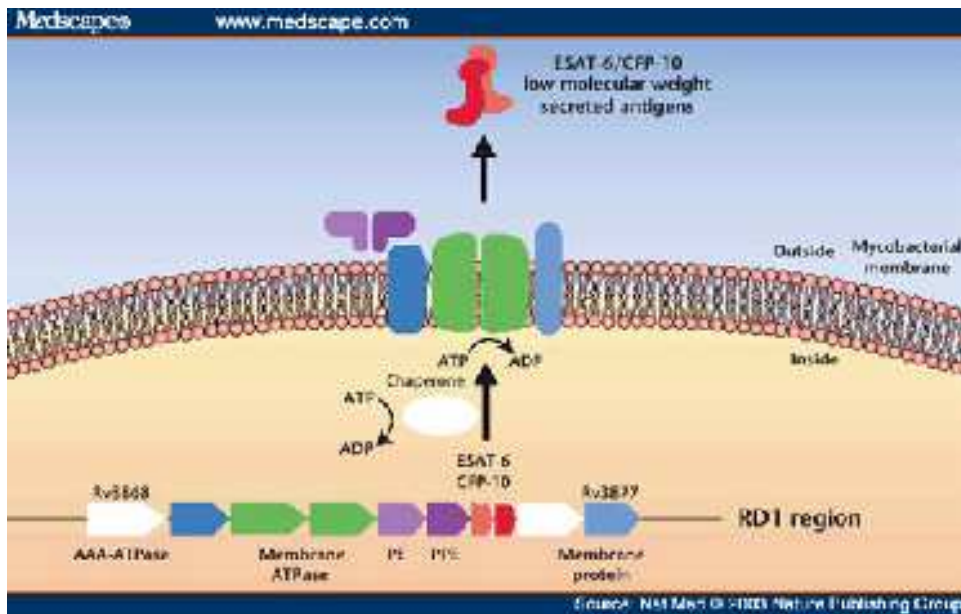


Figura 2: Organização genômica dos genes que codificam para ESAT-6 e CFP-10 (adaptado de Berthet et al, 1998 e Young, 2003).

O antígeno Tb9.7 possui aproximadamente 13 kDa e é constituído de 129 aminoácidos. Esta proteína é codificada pelo gene *TB9.7* (Rv3354) e apesar de sua atividade ainda não ter sido completamente caracterizada, sua presença em filtrados de cultura sugere que seja secretada (Rosenkrands, *et al.* 2000). Estudos indicam grande variação de sensibilidade em soros de pacientes com TB de áreas endêmicas e não-endêmicas (de 36% a 85%) e uma sensibilidade muito promissora com soros de indivíduos co-infectados pelo HIV. Apesar da ausência de estudos nacionais, Tb9.7 já é indicado como um importante antígeno para detecção de TB extrapulmonar (Abebe *et al.* 2007).

O antígeno Tb16.3 é uma proteína de 144 aminoácidos e 16,3 kDa, codificada pelo gene *TB16.3* (Rv2185c), específica da parede celular de *Mtb* que se mostrou altamente imunogênica em regiões endêmicas e não-endêmicas, bem como em pacientes co-infectados com HIV. Nestes casos, foi reconhecido em mais de 85% dos pacientes testados, mais uma vez incluindo residentes em áreas endêmicas e não endêmicas. Este antígeno se estabeleceu como um dos mais promissores individualmente nos estudos envolvendo sorologia de tuberculose até hoje, principalmente em relação aos portadores de HIV (Weldingh *et al.*, 2004).

A isocitrato desidrogenase 2 (ICD-2) é uma enzima monomérica (de 82 kDa) dependente de NADP^+ que possui papel regulatório chave no ciclo do ácido cítrico. Essa

enzima imunogênica possui 745 aminoácidos e é codificada pelo gene *icd-2* (Rv0066c) presente na cepa vacinal *M. bovis* BCG e em *Mtb* com diferença de apenas dois nucleotídeos entre cada espécie (Banerjee *et al.*, 2004). ICD-2 se mostrou promissor em estudo realizado com soros de pacientes com TB de áreas não endêmicas. Em diferentes diluições de soro, a sensibilidade variou de 51% à 100% e a especificidade de 65,3% à 86,9% (Fiorio *et al.*, 2002). Até o momento não há relatos de uso deste antígeno no diagnóstico da TB no Brasil.

O antígeno PPE-55 é uma proteína de 309 kDa, codificada pelo gene *ppe-55* (Rv3347c). Esta proteína possui um fragmento de 978 aminoácidos da porção C-terminal que em estudos preliminares se mostrou extremamente imunogênico (Figura 3). Anticorpos contra esta região parecem estar presentes apenas em indivíduos com LTBI, e por não terem sido reconhecidos em indivíduos sensibilizados, podem se estabelecer como um marcador entre esses dois panoramas diagnósticos. Em estudos realizados em área endêmica para TB, este antígeno tem mostrado sensibilidade superior a 97% em pacientes TB positivos (Singh *et al.*, 2005).

005).

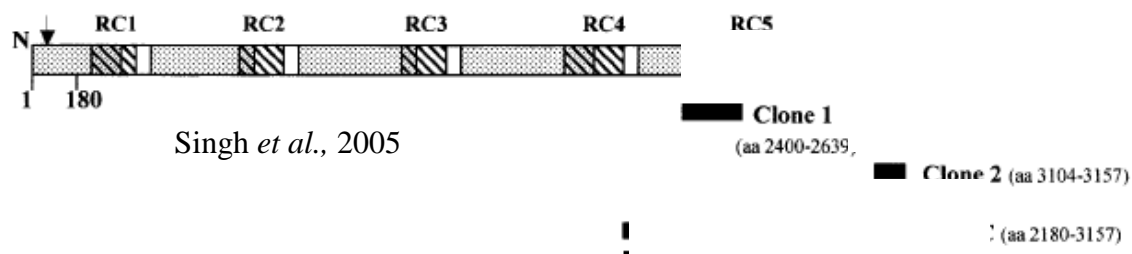


Figura 3: Representação esquemática da proteína PPE55 de *Mtb* H37Rv. As regiões pontilhadas indicam regiões hidrofóbicas. Áreas hachuradas indicam posições de *clusters* repetitivos (RC1 a RC5).

2-OBJETIVOS

Tendo em vista as limitações das abordagens diagnósticas para TB disponíveis atualmente e a descrição na literatura de antígenos específicos de *Mtb* que podem atuar como marcadores da doença, os objetivos do presente estudo foram:

2.1-Geral:

Clonar e expressar dos antígenos protéicos de *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6, CFP-10, Tb 9.7, Tb 16.3, ICD-2 e PPE-55, para análise de potenciais para sorodiagnóstico da tuberculose.

2.2-Específicos:

1-Definir de um fragmento de PPE-55 (Rv3347c) específico de *Mtb* com potencial para sorodiagnóstico, com o auxílio de ferramentas de bioinformática.

2-Amplificar os genes codificantes para proteínas ESAT-6 (Rv3875), CFP-10 (Rv3874), Tb 9.7 (Rv3354), Tb 16.3 (Rv2185c), ICD-2 (Rv0066c) e PPE-55 (Rv3347c).

3-Clonar, expressar e purificar das proteínas recombinantes de interesse

4-Avaliar a reatividade dos antígenos recombinantes obtidos por ELISA, frente a *pools* de soros de pacientes com tuberculose e de indivíduos sadios reatores ou não no teste da PT.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Análises de Bioinformática

A análise do genoma de *Mtb* foi realizada através do site: <<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>>.

Os estudos de bioinformática foram realizados a partir de ferramentas *online*:

-NEB cutter da New England Biolabs (www.neb.com) para construção de mapas de restrição

-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para análises de similaridade em comparação a bancos de dados.

-CLUSTAL (www.ebi.ac.uk/clustalw/) para alinhamentos de sequências de aminoácidos

Com estas ferramentas, similaridades entre subfragmentos de PPE-55 de *Mtb* e todo o banco de dados de outras micobacterias foram avaliadas.

As seqüências completas dos clones foram montadas pelo site da Invitrogen (www.invitrogen.com). Em seguida, utilizando o programa NEB cutter da New England Biolabs (www.neb.com)

3.2-Fluxograma do delineamento experimental

De maneira resumida, as atividades desenvolvidas no presente trabalho atendem ao fluxograma a seguir:

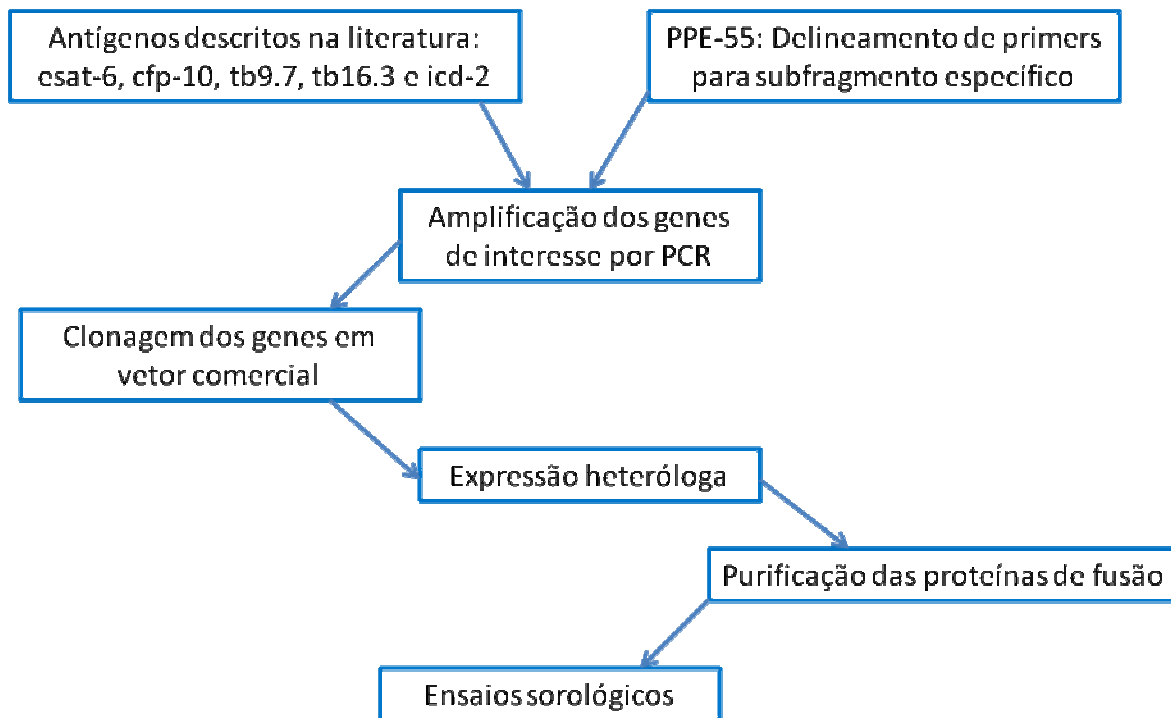


Figura 4: fluxograma do delineamento experimental contendo, resumidamente, as etapas do estudo.

3.3-Obtenção do DNA genômico de *Mtb*

Os experimentos foram realizados com DNA genômico da cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. O DNA foi isolado a partir da raspagem de colônias de *Mtb* crescidas em meio LJ durante 3 a 4 semanas à 35°C e tratado com o surfactante catiônico CTAB (brometo de cetilmetil amônia) seguindo o protocolo de Soolingen *et al.*, 1991, gentilmente cedido pelo laboratório de Micobacterias do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.4-Eletroforese em gel de agarose

No presente estudo, os DNAs extraídos conforme citado acima, foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 2%, com corrida constante a 100 V, durante o tempo necessário para que o marcador azul de bromofenol (presente no tampão de amostra) tivesse percorrido aproximadamente 75% do gel. O tampão utilizado para corrida

eletroforética foi o Tris-Borato com EDTA (89mM Tris, 89 mM ácido bórico e 2mM de EDTA, com pH ajustado para 8,0)

3.5-Células utilizadas na clonagem

Os experimentos de clonagem e expressão dos produtos de PCR foram realizados com células de *E. coli*, cepa TOP10. Esta cepa possui elevada eficiência nos processos de clonagem e expressão dos genes de interesse. A clonagem foi realizada no vetor plasmidial pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen, Estados Unidos)

3.6-Amplificação dos genes de interesse por PCR

Os genes codificantes dos antígenos clonados foram amplificados pela técnica da reação em cadeia da Polimerase (PCR). A temperatura para hibridização dos iniciadores foi estabelecida de acordo com cada par de iniciadores, estando entre 5 e 10 °C abaixo da menor temperatura de desnaturação (do inglês: *melting temperature* – Tm) do par de iniciadores e dificultar a ocorrência de hibridizações inespecíficas. A amplificação foi realizada a partir de 10 ng do DNA genômico *Mtb* cepa H37 Rv, utilizando iniciadores já descritos na literatura, específicos para cada gene. Os iniciadores utilizados, os tamanhos dos amplicons, e as temperaturas de hibridização para cada gene estão representados a seguir, segundo os estudos de Weldingh *et al.*, 2004 e Singh *et al.*, 2005.

Todos os iniciadores utilizados neste estudo foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (Coralville IA, EUA) ou pela empresa Bioneer Inc. (Alameda CA, EUA).

ESAT-6 (*esxA*) (Rv3875):

Senso: 5'-GAT GTG TAC ACA TGA CAG AGC AGC AGT GG-3'; Tm: 64,8°C

Antisenso: 5'-GAT GTG TAC ACT GAG CGA ACA TCC CAG TGA CG-3'; Tm: 66,1°C

Tamanho esperado do amplicon: 288pb

CFP-10 (*esxB*) (Rv3874):

Senso: 5'-ATG GCA GAG ATG AAG ACC GAT GCC-3'; Tm: 64,4°C

Antisenso: 5'-GAA GCC CAT TTG CGA GGA CAG CGC-3'; Tm: 67,8°C

Tamanho esperado do amplicon: 303 pb

TB 9.7 (Rv3354):

Senso: 5'-ATG AAC CTA AGG CGC C-3'; Tm: 55,3°C

Antisenso: 5'-GCA CCC GGG CAG CCC CGG C-3'; Tm: 72,3°C

Tamanho esperado do amplicon: 390pb

TB 16.3 (Rv2185c):

Senso: 5'-GCG GAC AAG ACG ACA CAG-3'; Tm: 56,2°C

Antisenso: 5'-GCC CTC GAC TCG TTT CTT CAG-3'; Tm: 57,8°C

Tamanho esperado do amplicon: 435 pb

ICD-2 (Rv0066c):

Senso: 5'-GCC TTG GAC AGC CTC CAG CGC TGC-3'; Tm: 71,3°C

Antisenso: 5'-ATG AGC GCC GAA CAG CCG ACC ATC A-3'; Tm: 67,9°C

Tamanho esperado do amplicon: 2238pb

PPE55 (Rv3347c):

Senso:5'-CCC TCA ATC CGA ACG TCA C-3'; Tm: 54,8°C

Antisenso: 5'-CCA ACG GGA TCT GGT GAA TA-3'; Tm: 64,4°C

Tamanho esperado do amplicon: 300pb

A reação da PCR continha 25µL totais, contendo 0,3 µM de cada iniciador, 1,5 mM de MgSO₄, 200 µM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl e 1,25 unidade de *Taq* polimerase *high fidelity* (Invitrogen). Após desnaturação inicial a 94°C por 2', foram realizados 30 ciclos de 94°C, 55°C e 72°C, respectivamente por 30, 30 e 120 segundos, seguidos por uma extensão final por 7' a 72°C. Ao final da reação, 10 µL do amplicon foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, conforme descrito no item 3.4 (Biorad, Estados Unidos).

3.7-Clonagem

Quatro microlitros de cada amplicon foram misturados com 1 μ L do vetor de clonagem pBAD/TOPO Thiofusion (Invitrogen) (Figuras 4 e 5) e 1 μ L de salina, conforme instruções do fabricante. A ligação ocorreu após incubação a temperatura ambiente por 20 minutos.

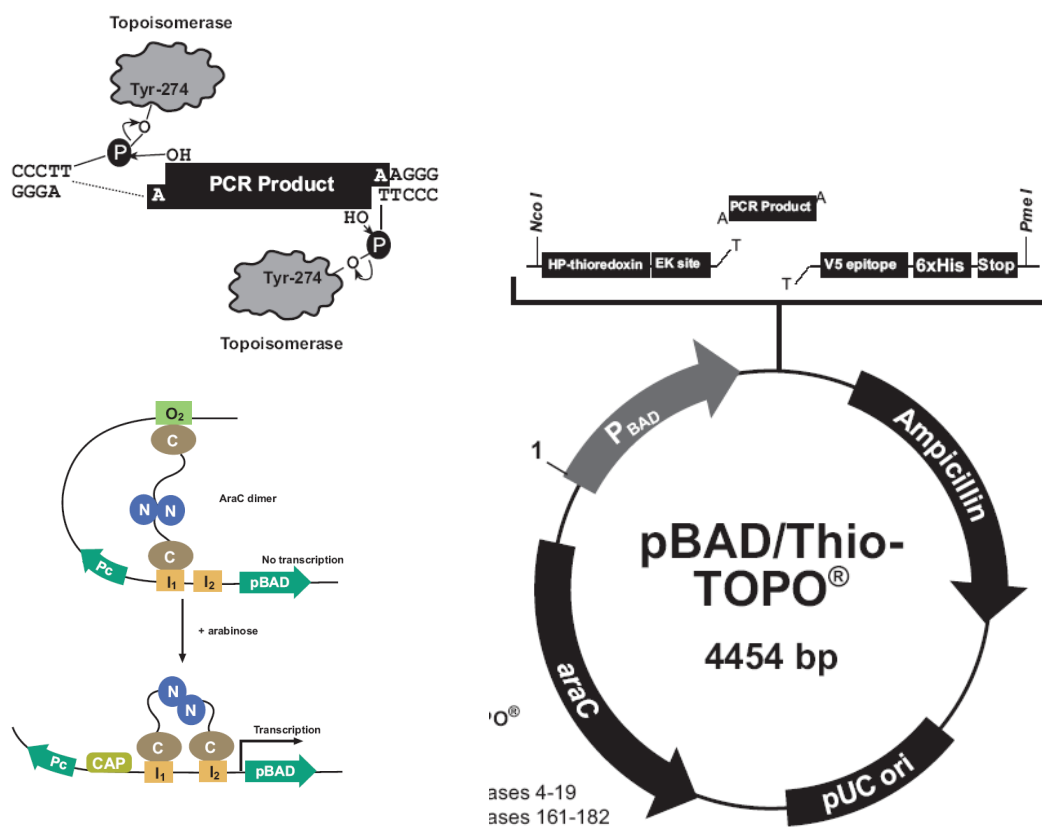


Figura 5: Representação esquemática do mapa do vetor pBAD/TOPO Thiofusion, da estratégia de clonagem utilizando a topoisomerase ligada às extremidades do vetor linearizado, e o mecanismo de repressão e indução da expressão gênica por L-arabinose (adaptado do manual do fabricante) (Invitrogen, EUA)

A construção final foi representada pela seqüência do antígeno fusionada ao gene da tiorredoxina (uma proteína de 11,7 kDa) na porção N-terminal e na parte C-terminal a região que codifica uma cauda de 6 histidinas. A expressão da proteína de fusão foi realizada com o intuito de aumentar a eficiência da tradução e possibilitar a solubilidade do antígeno protéico fusionado, enquanto a cauda de polihistidina possibilita a purificação em resina de metal, com base em sua afinidade por cátions bivalentes.

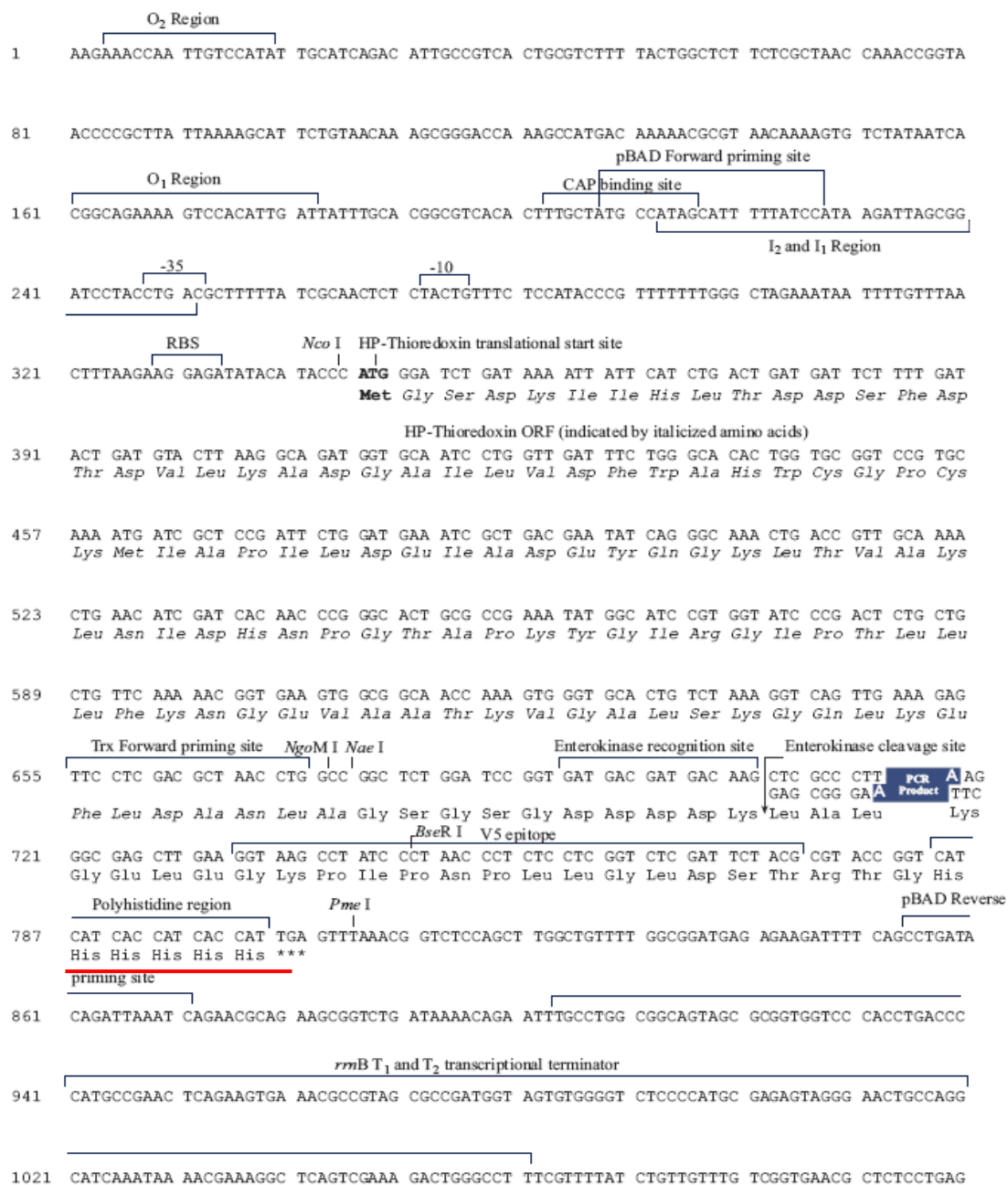


Figura 6:

Seqüência da região do sítio de clonagem do vetor pBADThio TOPO. RBS = sítio de ligação do ribossomo (adaptado do manual do fabricante), com destaque para o local de clonagem do inserto em azul e de polihistidinas em vermelho.

Para obtenção de células de *E. coli* cepa TOP10 competentes uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) durante 16 horas a temperatura de 37°C sob agitação moderada. Após esse período, 1 mL da cultura crescida foi inoculada em 200 mL de meio LB, seguindo-se agitação intensa em temperatura de 37°C até que a densidade óptica à 540nm atinja entre 0,5 e 0,6 (cerca de 2 horas). Alíquotas de 50 mL foram mantidas por 15 minutos no gelo e em seguida, centrifugados por 20 minutos a 5.000×g a 4°C. Os sedimentos obtidos foram suspensos em 5 mL de água destilada estéril gelada (em banho de gelo) e, então, foram acrescentados mais 45 mL de água destilada estéril, totalizando 50 mL. Novamente foi realizada centrifugação sob as mesmas condições. O sedimento foi, então, suspenso no líquido restante ao tubo (após o descarte do sobrenadante) e mais 25 mL de água destilada estéril refrigerada foram adicionados a cada tubo, os quais foram submetidos a mais uma centrifugação sob as mesmas condições das citadas anteriormente. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento (de cada tubo) foi suspenso em 1 mL de glicerol 10% gelado e transferido para um tubo estéril menor (ou um microtubo estéril). Após a transferência, (sob condições estéreis) do sedimento suspenso em 1 mL de glicerol aos microtubos, esses foram centrifugados a 10.000×g por 20 minutos a 4°C. Os novos sedimentos foram, então, suspensos em 80 µl de glicerol 10% estéril gelado e armazenados em criotubos a -70°C. Caso as células eletrocompetentes fossem eletroporadas no mesmo dia de sua preparação, o glicerol 10% estéril gelado era substituído por água destilada estéril gelada.

3.9-Transformação de células competentes

Após a ligação, 3 µL de cada reação foram adicionados a 50 µL de células de *E. coli* eletrocompetentes. Após 10 minutos de incubação em gelo, foi realizada transformação por eletroporação a 1,8 Kvolts em aparelho eletroporador(BioRad Gene Pulser, EUA). Após a transformação, as células foram incubadas em 1 mL de meio LB por 90 minutos a 37°C para recuperação do estresse causado pela eletroporação e voltar a apresentar seu

metabolismo normal. Em seguida, foram cultivadas em placas de LB suplementado com ampicilina a 100 µg/ml (LB/Amp), para seleção dos clones positivos, uma vez que o vetor confere resistência a este antibiótico.

3.10-Seleção dos clones positivos

A confirmação dos clones expressantes foi realizada por nova PCR a partir das inúmeras colônias obtidas após a clonagem e plaqueamento. Havia produtos amplificados somente em clones nos quais o vetor tenha recebido o inserto na direção correta de clonagem, uma vez que este PCR utiliza como iniciador *forward* o oligonucleotídeo que hibridiza na “pBAD Forward priming site”, e como iniciador reverso o próprio iniciador reverso do gene de interesse, como indicado na Figura 5.

O iniciador pBAD *forward* possui a seguinte seqüência: 5'-ATGCCATAGCATT TTTTATCCA-3'.

3.11-Extração do DNA plasmidial dos clones positivos

A obtenção de DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina. Para isso as colônias bacterianas selecionadas foram inoculadas em 5 ml de LB/Amp e incubadas a 37°C sob agitação moderada, até atingirem a densidade óptica de 0,4 à 540nm. Um mililitro e meio foram coletados e microcentrifugados a 10.000×g (por 20 segundos). O sedimento foi suspenso em 100 µl de GTE (50 mM glicose, 25 mM TrisHCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) na situação de repouso. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de solução de NaOH/SDS (0,2M NaOH / 1% (p/v) SDS), misturando-se em vórtex e deixando, em seguida, 5 minutos em banho de gelo. Cento e cinquenta microlitros de solução de acetato de potássio (3M, pH 4,8) foram adicionados, com posterior homogeneização e novamente resfriadas em banho de gelo por mais 5 minutos. Foi realizada, então, uma microcentrifugação por 3 minutos e 400µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, com posterior adição de 800 µL de etanol 95%, seguindo incubação por 2 minutos a temperatura ambiente em repouso. Em seguida, foi realizada microcentrifugação por 3 minutos e lavagem do sedimento com 1

mL de etanol 70% com secagem a vácuo. Por fim, o sedimento foi suspenso em 30 µL de tampão TE e armazenado a -20°C.

3.12-Confirmação da clonagem por digestão enzimática

A confirmação da clonagem correta dos antígenos de interesse no vetor utilizado foi realizada através da digestão dos clones com a enzima de restrição *AccI* (Sigma, EUA), que cliva os insertos clonados em dois sítios (2,7 e 2,0 Kb para esxB e 2,6 e 2,2Kb para TB 16.3). Com o vetor, foi realizada digestão dupla, com *AccI* e *SmaI* (Sigma, EUA), digerindo o DNA em fragmentos de 2,7 e 1,7 Kb. Em ambos os casos, 5 µL de DNA foram digeridos com 1 µL (10 unidades) de cada enzima, adicionados de 3 µL de seus respectivos tampões específicos, conforme instruções do fabricante, completando-se com água destilada estéril o volume para 30 µL de solução. No caso da digestão dupla (para o vetor pBAD/Thio-TOPO), os volumes foram corretamente ajustados. Após a digestão a 37°C por 1 hora, a solução foi incubada por 10 minutos a 72°C para desnaturação das enzimas, desligando-se do DNA digerido e permitindo a corrida eletroforética deste DNA digerido em gel de agarose 2%.

3.13-Indução da expressão das proteínas de fusão

Os clones selecionados foram inoculados em meio líquido LB com ampicilina à 100 µg/ml (LB/Amp) à 37°C durante 16 horas, suficientes para atingir a fase estacionária. Posteriormente, foram então diluídas 1/10, em meio LB/Amp a, e novamente incubados sob mesma temperatura durante aproximadamente 3 horas, para se manterem na fase logarítmica de crescimento. Após esse período, um terço da suspensão celular foi separada como controle (ponto Zero) e ao restante acrescentou-se L-arabinose (concentração final de 0,02%) e incubado por 4 horas para que as células passassem a expressar as proteínas de fusão. Na ausência da L-arabinose, o produto do gene *araC* (presente no vetor de clonagem) se liga a 2 sítios do operon *araBAD*, formando uma alça de DNA de 210 pares de bases que

impede a transcrição do gene da proteína de fusão. Porém, em presença de L-arabinose o produto AraC se liga ao açúcar, e se desliga de um dos sítios do operon, ligando a outro adjacente, desfazendo a alça e permitindo a transcrição. Ao final as suspensões celulares (induzidas e ponto Zero) foram centrifugadas à $5.000\times g$, e os sedimentos analisados através de eletroforese em SDS-PAGE.

Paralelamente, aos experimentos com os genes e proteínas de interesse, foram realizadas as mesmas metodologias com o vetor sem inserto (pBAD/Thio-TOPO) (Invitrogen, EUA). Isto porque ele expressa a proteína carreadora, tiorredoxina, como representado na Figura 4. A tiorredoxina sem antígeno fusionado foi usada como controle para validação das reatividades dos antígenos estudados.

3.14-Lise mecânica desnaturante

As culturas obtidas em meio sólido foram semeadas em 200 mL de meio líquido LB/Amp por 18 horas a 37°C . Em seguida, foram obtidas massas celulares dessas culturas por centrifugação a $5.000\times g$ por 10 minutos. O sedimento obtido foi então suspenso em 10 mL de tampão de lise (Tris-HCl, pH 7,5 20 mM; KCl 100 mM; EDTA 5 mM). Essa suspensão bacteriana foi colocada juntamente com 7,5 mL de microesferas de ZrO_2 no aparelho “Bead-Beater” (modelo 1107900, Biospec, EUA). Este aparelho possui um rotor com lâmina cega, capaz de promover choques entre as microesferas de ZrO_2 e as células bacterianas. Foram realizados 3 pulsos de 1 minuto com intervalo de 1 minuto entre cada pulso, mantendo a suspensão sempre no gelo.

Após decantação das microesferas, o sobrenadante contendo as células lisadas, foi homogeneizado em tubo Dounce por 10 vezes, e em seguida clarificado por centrifugação (centrífuga Eppendorf, modelo 5804R, $5.000\times g$, 10 minutos, 4°C). O precipitado desta etapa continha então as proteínas de interesse sob a forma de corpos de inclusão. O mesmo foi, então, suspenso em 10 mL de tampão de lavagem (Tris-HCl pH 8,5, 50 mM; Triton X-100 0,5%; EDTA 5mM; NaCl 150 mM) e novamente homogeneizado em tubo de Dounce, seguida por centrifugação em microcentrífuga de Eppendorf a $10.000\times g$ por 15 minutos a 4°C . Esta etapa de lavagem foi repetida 3 vezes e serve para a retirada dos ácidos nucléicos e lipopolissacarídeos bacterianos. Após a quarta lavagem, os corpos de inclusão foram suspensos em solução desnaturante (uréia 8M; NaCl 0,3M; 50mM Tris-HCl pH 8,5),

homogeneizados no tubo Dounce e, em seguida, incubados a 4°C durante 18 horas. O sucesso da desintegração dos corpos de inclusão foi verificado, centrifugando-se uma alíquota de 50 µL por 10 minutos a 10.000×g (em microcentrífuga) e analisando-se o sedimento e o sobrenadante em SDS-PAGE.

3.15-SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (*SDS-PAGE*, Laemmli *et al.*, 1970), pelo método vertical com placas de 10×8 cm² (BioRad, EUA), com gel de empilhamento de 4 % e gel de separação das proteínas de 10 à 12% de acrilamida, dependendo do tamanho das proteínas esperadas. Foi utilizada corrente constante de 150V, por aproximadamente 90 minutos. Cada 10 µL de amostra foram misturados a mesma quantidade de tampão de desnaturação de amostra (Tris-HCl 62,5 mM/ pH 6,8; SDS 2%; glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,002%). Para a desnaturação das proteínas, as amostras foram incubadas a 95°C por 5 minutos e resfriadas à 0°C por outros 5, antes de sua aplicação no gel. Para avaliação de peso molecular foi utilizado o marcador Roti-Mark, com pesos entre 17 e 254 kDa (Roth, Alemanha). A coloração dos géis foi realizada utilizando o corante Azul Brilhante de Coomassie R-250 (0,12% em Metanol 50% e Ácido acético 10%), em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C por até 18 horas).

Sua descoloração foi realizada através de lavagens contínuas (três a cinco) com solução descolorante (Metanol 5%, ácido acético 7%) sob agitação. A secagem dos géis foi realizada após sua re-hidratação em água deionizada por 30 minutos, seguido por incubação em solução de secagem (Metanol 50%, glicerol 0,5%) por 20 minutos. Por final, os géis foram colocados entre duas folhas de papel celofane e secos à temperatura ambiente por 18 horas.

3.16-Purificação das proteínas fusionadas

As proteínas de fusão foram expressas de maneira a possuir uma cauda de seis histidinas, codificada pelo vetor de clonagem utilizado e resistente a lise desnaturante. As

histidinas possuem afinidade por cátions bivalentes de níquel, que foi utilizado na resina, com que formam um complexo, permitindo desta maneira uma purificação através de coluna de afinidade (Figura 6).

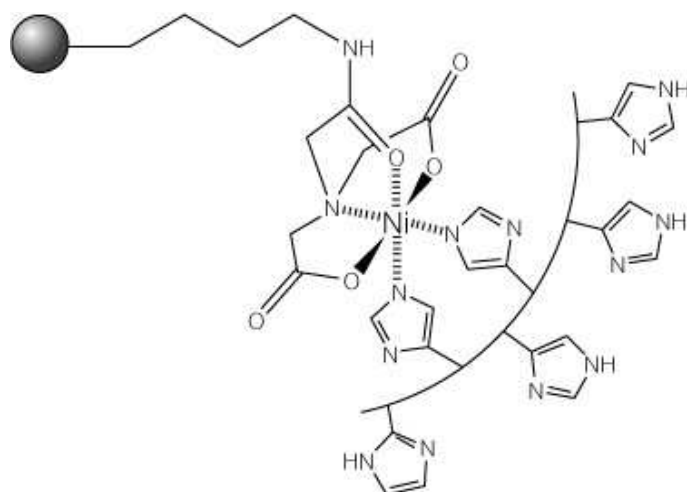


Figura 7: esquema da interação entre a resina utilizada e a cauda de polihistidinas das proteínas de fusão. Adaptado do site do fabricante. (Invitrogen)

A resina em solução preparada pelo fabricante foi lavada com água deionizada estéril e equilibrada no tampão de ligação (NaPO_4 20mM, NaCl 500mM, 10mM de imidazol, pH 7.8). Em seguida, a resina foi incubada juntamente com as proteínas de interesse por uma hora com rotação, para se ligarem. Após a ligação, o material foi depositado na coluna com a utilização de pipetas *Pasteur*.

3.17-Lavagem com gradiente de uréia

Após sucesso na lise desnaturante e a consequente solubilização das proteínas, foi necessário remover a uréia da solução contendo as proteínas de interesse. Realizou-se então uma lavagem com gradiente decrescente de uréia, realizado na própria coluna (com as proteínas ligadas), a fim de impossibilitar que durante a remoção da uréia, as porções hidrofóbicas das proteínas fossem expostas, levando novamente à formação de corpos de inclusão. Utilizou-se um misturador com 2 poços interligados e uma saída acoplada a um deles. O poço sem a saída acoplada foi preenchido com 10mL de tampão de ligação não desnaturante, proposto pelo fabricante do kit de purificação (NaPO_4 20 mM, NaCl 0,5M, pH 8), enquanto o poço com saída acoplada contém 10 mL de tampão de ligação desnaturante (uréia 8M, NaPO_4 20 mM, NaCl 0,5M, pH 7.8). A comunicação entre os dois poços foi estabelecida no momento da abertura da válvula de saída e a solução foi

direcionada diretamente à coluna contendo as proteínas de interesse ligadas à resina. A solução decrescente em uréia foi coletada em frações de 2 mL e posteriormente analisadas em SDS-PAGE, mostrando ausência de proteína.

Em seguida foi realizada uma lavagem com tampão de lavagem (composição igual ao tampão de ligação, mas com imidazol a 20 mM), para retirar as proteínas de baixa afinidade. Após a lavagem foram realizadas 8 eluições de 3 mL cada, com gradiente crescente de imidazol, sendo 2 para cada concentração de imidazol. O tampão utilizado para eluição das proteínas de interesse, possui a mesma composição do tampão de ligação, e concentrações crescentes de imidazol (60, 100, 200 e 300 mM). Todos os volumes que passaram pela coluna em cada etapa foram coletados para posterior análise em SDS-PAGE.

3.18-Precipitação de proteínas

Proteínas purificadas em baixas concentrações foram concentradas por meio de precipitação e suspensão subsequente em volume menor. Para isso, adicionou-se 3 vezes o volume de suspensão protéica de acetona absoluta a 4°C, deixando a mistura em repouso por 1 hora à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Após essa incubação, foi realizada centrifugação a 5.000xg durante 10 minutos. O precipitado foi, então, suspenso em 1/10 do volume original anterior à adição de acetona.

3.19-Dosagem das proteínas de fusão

A dosagem protéica dos antígenos de interesse foi realizada através do aparelho Qubit fluorometer (Invitrogen, EUA), utilizando o protocolo do fabricante.

3.20-Testes Sorológicos

3.20.1-Soros utilizados

Para o estabelecimento dos parâmetros dos testes sorológicos, foram utilizados *pools* de soros de pacientes com TB e de indivíduos saudáveis, reatores ou não no teste de PPD:

“Pool 55 TB+”: consistindo de 55 soros de pacientes com TB pulmonar atendidos na Policlínica Augusto Amaral Peixoto (SMS, Guadalupe, RJ) (título do Projeto: "Tuberculose infecção e doença entre sintomáticos respiratórios, contatos intra-domiciliares e validação/custo-efetividade de diferentes técnicas diagnósticas em diferentes cenários clínico-epidemiológico."; Protocolo de Aprovação: 019/07 - CEP). O diagnóstico da TB foi confirmado por cultura na Unidade de Pesquisa em TB do HUCFF. Os soros foram cedidos pela Dr^a Martha Oliveira (UPT/HUCFF)

“Pool Positivo APJK”, “Pool Negativo/PPD negativo APJK” e “Pool negativo/PPD positivo APJK”: consistindo em soros de, 25 pacientes com TB confirmada por cultura, e de indivíduos sem TB reativos ou não com PPD. Estes pools foram cedidos pela Professora Ana Paula Junqueira Kipnis do Departamento de Imunologia da Universidade Federal de Goiás (UFGO) (título do Projeto: "Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes de *Mtb* induzidos em condições de estresse pela resposta imune de pacientes tuberculosos”; Protocolo de Aprovação: 002/26/01/2005 - CEP-UFG).

“Pool Pos MHS” consistindo de soros de 10 pacientes com TB confirmada e “Pool Neg MHS” consistindo de soros de 10 indivíduos sem TB, todos residentes de área endêmica para TB no Rio de Janeiro. Os pacientes se apresentaram com sintomas respiratórios ao Centro Municipal de Saúde Heitor Beltrão. Os soros foram gentilmente cedidos pela Dr^a Maria Helena Feres Saad, do Laboratório de Microbiologia Molecular, IOC/FIOCRUZ. Tais soros foram utilizados nos experimentos comparativos entre os antígenos recombinantes obtidos aqui descritos e ESAT-6 do grupo da Dr^a Maria Helena Feres Saad (Protocolo de Aprovação: 411/07 - CEP-FIOCRUZ).

3.20.2-Western Blotting

Após a corrida eletroforética em SDS-PAGE dos antígenos em questão, foi realizada a transferência das proteínas de interesse para membrana de nitrocelulose com montagem do sanduíche de transferência: A partir do polo negativo até o positivo foi colocada uma esponja, seguida por 2 folhas de papel filtro, o gel de acrilamida ressecado, a membrana de nitrocelulose, outras 2 folhas de papel filtro e outra esponja. Esse ‘sanduíche’ foi submetido a uma corrente elétrica de 395mA, com aproximadamente 135V durante 90 minutos em tampão de transferência (Tris 48mM, glicose 39mM, metanol 20%, pH 9,2) na

presença de gelo para manter a temperatura o mais baixo possível. Em seguida, as membranas foram bloqueadas a 4°C até o dia seguinte em tampão de bloqueio (PBS 1×, tween 0,05%, 10% SFB).

Os *pools* de soros positivos e negativos foram diluídos em solução de bloqueio para 1:100 e 1:200 e colocados em contato com a membrana sob agitação por 60 minutos. Foram realizadas, então, 3 lavagens de 10 minutos com tampão de lavagem (TBS 1× com Tween 20 0,05%). As membranas foram então incubadas com conjugado anti-IgG humana fosfatase alcalina (Sigma, EUA), diluído 1:3000 em tampão de bloqueio, durante 60 minutos. Novamente foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos e posteriormente a última lavagem foi realizada com H₂O destilada. O substrato BCIP + NBT foi colocado em contato com as membranas por, aproximadamente, 10 minutos, visualizando-se a reação a olho nu. Ao final foram realizadas outras 3 lavagens de 10 minutos com H₂O destilada, para interrupção da reação enzimática.

3.20.3-ELISA *in-house* com as proteínas de fusão

Em uma primeira fase, os diferentes parâmetros do ELISA foram otimizados em conjunto, a fim de determinar as concentrações ideais de cada reagente. Dessa forma, foi possível iniciar a padronização do protocolo visando à obtenção da diferença máxima das densidades ópticas obtidas para o *pool* de soros positivos (TB+) e o *pool* de soros negativos (TB-).

As proteínas de fusão foram analisadas em diferentes concentrações (2,0 µg/gL, 1,0 µg/mL e 0,5 µg/mL) O conjugado anti-IgG-HRP (Pierce) foi avaliado nas diluições 50.000, 1/750.000, 1/100.000 e 1/150.000. O conjugado anti-IgA-HRP (KPL) foi avaliado nas diluições 1/1.000, 1/2.000, 1/3.000, e 1/4.000 Além disso, os *pools* de soro utilizados foram avaliados em diluições em série de 1/50 até 1/3.200. A partir destes experimentos iniciais foram definidas como melhores condições: antígeno recombinante a 0,5 µg/mL; soro nas diluições 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400; e os conjugados anti-IgG-HRP (1/75.000) e anti-IgA-HRP (1/2.000)

Para o ELISA, placas de microtitulação Maxisorb® (Nunc) foram sensibilizadas com as diferentes proteínas de fusão dissolvidas em tampão carbonato (50 mM, pH 9,6) a 0,5 µg/mL (50 µL/poço). Após incubação à 8°C durante 18 horas, as placas foram lavadas com tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). Em

seguida, foram bloqueadas com PBST/soro fetal bovino (SFB) 5% (100 µL/poço) à 8°C durante 18 horas. Após três lavagens com PBST, os *pools* de soros de pacientes com TB e de pessoas saudáveis e PPD negativas foram adicionados em diluições seriadas (1/50, 1/100, 1/200 e 1/400) em PBST/SFB 5% (50µL/poço). Após 1 hora e à 37°C, as placas foram lavadas cinco vezes com PBST e incubadas com os conjugados anti-IgG-HRP ou anti-IgA-HRP na diluição previamente estabelecida em PBST/SFB 5%, (50µL/poço). Após 1 hora à 37°C, as placas foram lavadas cinco vezes com PBST, e o substrato (TMB-tetrametilbenzidina [10 mg/mL] dissolvido em tampão citrato (20 mM, pH 6,8) foi adicionado (50µL/poço). Após incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, a reação foi interrompida através da adição de HCl 2N (30µL/poço) e o resultado lido em leitor de placa de ELISA (Biorad) a um comprimento de onda de 450nm.

4-RESULTADOS

4.1-PPE-55 (Rv3347c): Escolha de subfragmento gênico para expressão de peptídeo recombinante

Sendo um gene extremamente grande (55kDa), a amplificação e clonagem de PPE-55 ou mesmo de sua porção C-terminal seriam laboriosas. Além disso, nossas análises preliminares da seqüência de aminoácidos da porção C-terminal mostraram que havia homologias significativas com proteínas de outras micobactérias (*M. bovis* e *M. bovis* BCG, principalmente). Neste sentido decidimos realizar análises de bioinformática a fim de buscar alguma região da porção C-terminal que não tivesse homologias significativas com proteínas da mesma família ou família semelhante em outras micobactérias.

O primeiro passo das análises *in silico* foi, então, dividir a seqüência de aminoácidos da porção C-terminal em dez fragmentos menores, de 100 aminoácidos cada um, denominados arbitrariamente fragmentos C-terminal 1 a 10. Em seguida foram realizadas análises de similaridade (BLAST) contra o banco de dados contendo as seqüências de todas as micobactérias. Nesta análise, oito dos dez fragmentos mostraram similaridade significativa com proteínas de outras micobactérias e, portanto, esses oito fragmentos foram excluídos de análises posteriores.

As seqüências dos dois fragmentos com menor grau de similaridade com proteínas de outras micobactérias (fragmentos 2 e 3) foram submetidos à comparação com seqüências com as proteínas de *M. bovis* e *M. bovis* BCG de maior “score”. Foram incluídas neste alinhamento também as proteínas de *M. avium* e de *M. fortuitum* com maior similaridade com cada fragmento, ainda que não fosse um resultado significativo. Desta maneira nos certificaríamos da distância filogenética entre os fragmentos da porção C-terminal de PPE-55 e todas as proteínas de micobactérias, possibilitando confiabilidade em testes sorológicos futuros.

Verificando o alinhamento dos fragmentos 2 e 3, foi possível localizar a região dentro do fragmento que possuía aminoácidos iguais ou semelhantes (em relação a fatores como hidrofobicidade e acidez). Desta maneira, identificamos que a região inicial do fragmento 2 e a região final do fragmento 3 eram aonde se encontrava grande parte da similaridade com proteínas de outras micobactérias. Um fragmento “híbrido” 2,3 foi determinado e novamente submetido a análises de similaridade através do BLAST,

mostrando resultados não expressivos de similaridade com outras proteínas de micobactérias. Sendo assim, identificamos um fragmento da porção C-terminal de 100 aminoácidos altamente específico de *Mtb* que poderá ser posteriormente utilizado em testes sorológicos para diagnóstico da tuberculose. Os gráficos estão representados na figura a seguir:

Blast da porção C-terminal de PPE-55

Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref ZP_00876516.1 COG5651: PPE-repeat proteins [Mycobacterium t	1283	0.0
ref YP_177963.1 PPE FAMILY PROTEIN [Mycobacterium tuberculos...	1283	0.0
ref YP_001284732.1 PPE family protein [Mycobacterium tubercu...	1281	0.0
ref YP_001289307.1 PPE family protein [Mycobacterium tubercu...	1280	0.0
ref YP_001289313.1 PPE family protein [Mycobacterium tubercu...	901	0.0
ref YP_177964.1 PPE FAMILY PROTEIN [Mycobacterium tuberculos...	891	0.0
ref YP_001284735.1 PPE family protein [Mycobacterium tubercu...	889	0.0
ref YP_177960.1 PPE FAMILY PROTEIN [Mycobacterium tuberculos...	689	0.0
ref NP_857020.1 PPE FAMILY PROTEIN [Mycobacterium bovis AF21...	686	0.0
ref YP_979495.1 PPE family protein [Mycobacterium bovis BCG ...	685	0.0

Blast do fragmento híbrido 2,3

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
ref YP_001284732.1 PPE family protein [Mycobacterium tubercu...	162	4e-41
ref YP_177963.1 PPE FAMILY PROTEIN [Mycobacterium tuberculos...	162	4e-41
ref YP_001289307.1 PPE family protein [Mycobacterium tubercu...	161	1e-40
ref ZP_00876516.1 COG5651: PPE-repeat proteins [Mycobacterium t	161	1e-40
ref ZP_00876525.1 COG3210: Large exoproteins involved in hem...	31.2	0.20
ref YP_001289313.1 PPE family protein [Mycobacterium tubercu...	29.6	0.55
ref YP_001284735.1 PPE family protein [Mycobacterium tubercu...	29.3	0.65
ref YP_177964.1 PPE FAMILY PROTEIN [Mycobacterium tuberculos...	29.3	0.65
ref NP_337609.1 DNA ligase [Mycobacterium tuberculosis CDC15...	26.9	3.5
ref NP_217530.1 DNA ligase [Mycobacterium tuberculosis H37Rv...	26.9	3.9
ref YP_905859.1 DNA ligase [NAD dependent] LigA [Mycobacteri...	26.6	5.1
gb AAP31469.1 putative transport protein [Mycobacterium avium]	26.2	5.6
ref ZP_00877513.1 COG0272: NAD-dependent DNA ligase (contain...	26.2	6.3

Figura 8: Análise BLAST da porção C-terminal inteira de PPE-55 mostrando similaridades significativas com diversas proteínas da família PPE de *Mtb* e de algumas proteínas de outras micobactérias (*M. bovis* e *M. bovis BCG*). A mesma análise com o fragmento híbrido, não mostrou tais similaridades, sugerindo potencial do fragmento identificado em testes sorológicos.

Após o desenho dos iniciadores conforme descrito, foi feita a amplificação por PCR do subfragmento de PPE-55. E os resultados (não mostrados) apontaram para a amplificação de bandas específicas no tamanho esperado (300pb). Futuramente este subfragmento foi clonado e expresso em sistema heterólogo de maneira similar aos demais

antígenos descritos. Posteriormente, testes sorológicos poderão elucidar o possível potencial deste novo antígeno para o sorodigianóstico da TB.

4.2-Obtenção e clonagem dos genes codificadores de ESAT-6, CFP-10, Tb 9.7, Tb 16.3 e ICD-2:

4.2.1-Amplificação

Os genes codificadores para os antígenos de interesse foram amplificados pela técnica de PCR, apresentando bandas nos tamanhos esperados: esat-6: 288pb; cfp-10: 303pb; tb9.7: 390pb; tb16.3: 435pb; icd-2: 2238pb; conforme demonstrado na Figura 9.

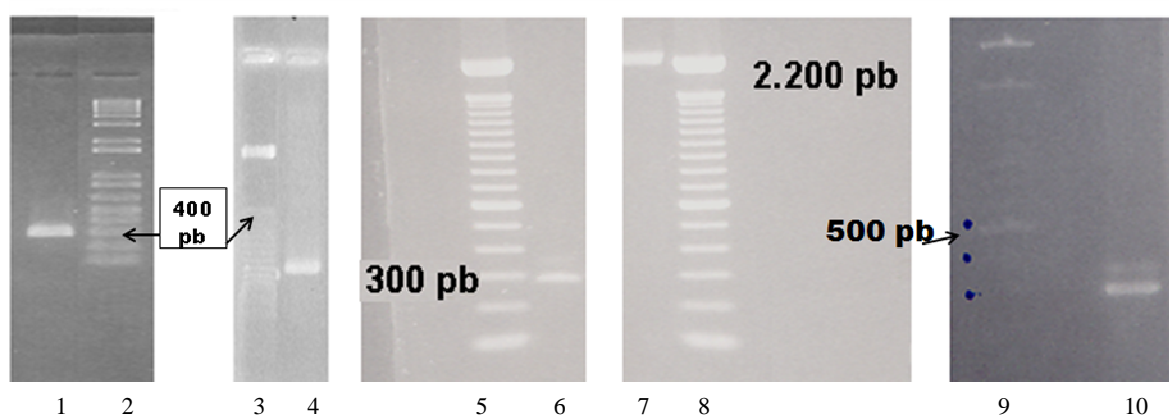


Figura 9: Amplificação de esat-6, cfp-10, tb9.7, tb16.3 e icd-2: eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Brometo de etídio:

Linha 1: produto de PCR de CFP-10; Linhas 2, 3, 5, 8, 9: marcador 100pb; Linha 4: produto de PCR de TB16.3; Linha 6: produto de PCR de Esat-6; Linha 7: produto de PCR de ICD-2; Linha 10: produto de PCR de Tb 9.7

Após ligação dos amplicons em vetor pBAD/Thio-TOPO, foi realizada a transformação de células eletrocompetentes por eletroporação, com posterior plaqueamento em meio seletivo contendo ampicilina. Foram observadas inúmeras colônias para todos os clones. No intuito de isolar clones que continham o inserto na orientação certa para sua expressão posterior, foi feita uma triagem por PCR, utilizando como iniciador senso o iniciador TRX, fornecido junto ao kit, e o iniciador reverso dos respectivos insertos. O iniciador TRX hibridizava no vetor de clonagem a 42 pb à montante do local de inserção do inserto. Desta maneira, clones que continham os insertos na orientação correta, apresentam

um amplicon do tamanho do inserto mais 60 pb (iniciador TRX + 42 pb). Em seguida, o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina para posterior análise de restrição.

4.2.2-Confirmação da clonagem por análise de restrição

Utilizando as seqüências dos antígenos e do vetor de clonagem, disponíveis nos sites do genoma de *Mycobacterium tuberculosis* e da Invitrogen, respectivamente, foram montadas as seqüências completas dos clones. Em seguida, utilizando o programa NEB cutter da New England Biolabs, os mapas dos clones foram gerados, conforme demonstrado nas figuras a seguir:

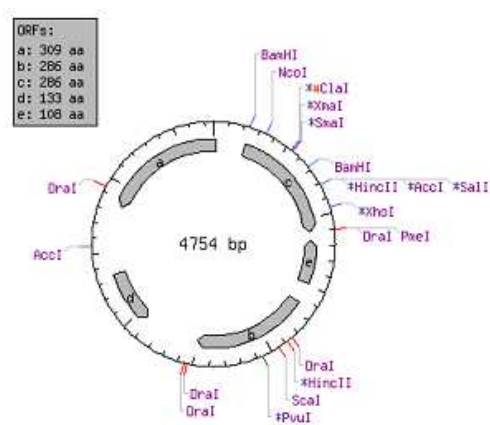


FIGURA 10:
Mapa de restrição de pBAD Thio-CFP-10

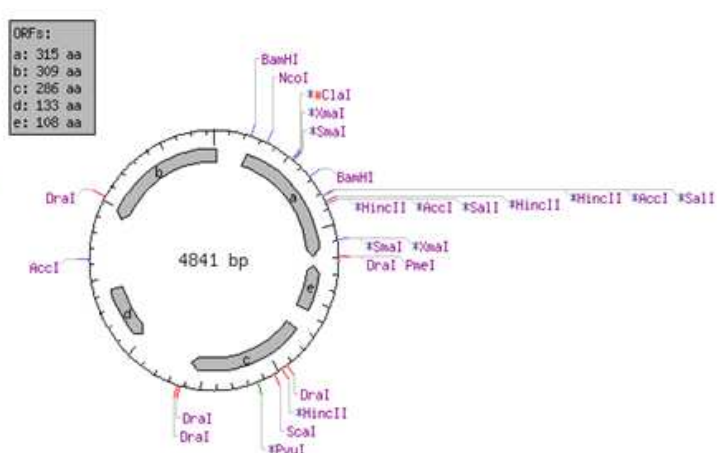


FIGURA 11:
Mapa de restrição de pBAD Thio-Tb16.3

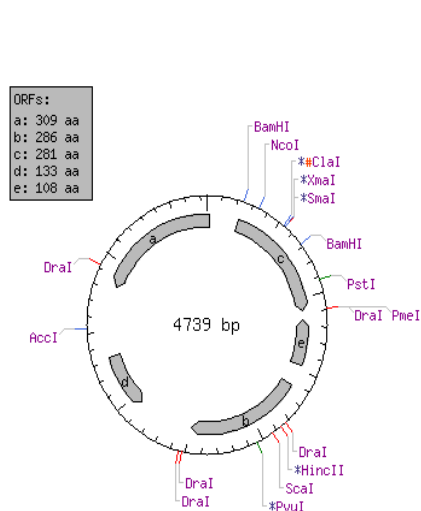


FIGURA 12:
Mapa de restrição de pBAD Thio-ESAT-6

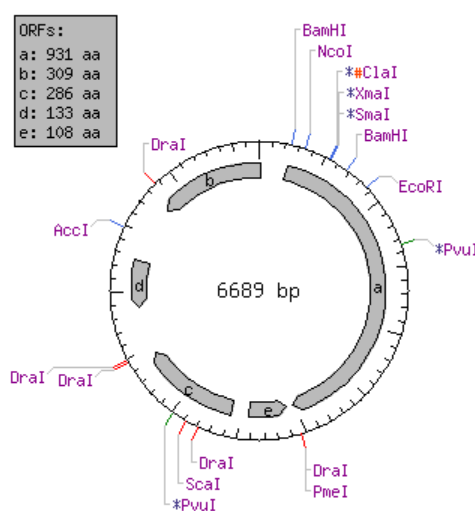


FIGURA 13:
Mapa de restrição de pBAD Thio-ICD-2

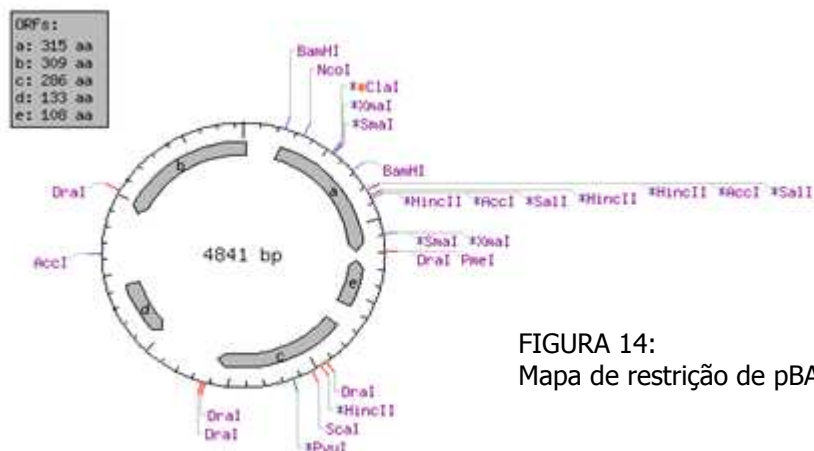


FIGURA 14:
Mapa de restrição de pBAD THIO-Tb9.7

Os clones foram digeridos com a enzima de restrição *AccI* (Sigma, EUA) para a confirmação da clonagem, conforme o exemplo a seguir representado, referente a Tb16.3:

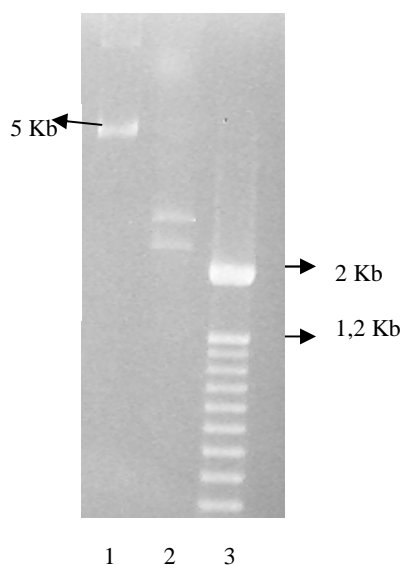


Figura 15: Produtos da restrição do vetor pBAD/Thio-TOPO clonado com Tb 16.3.

Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Brometo de etídio:

Linha 1: TB16.3 não digerido

Linha 2: TB16.3 digerido

Linha 3: marcador 100 pb

Através da figura 15 é possível observar que o vetor não digerido possui peso molecular de aproximadamente 5 kb e, após a digestão, há o aparecimento de 2 bandas de pesos moleculares inferiores, de aproximadamente 2,3 e 2,5 kb, confirmando a presença do inserto em questão.

4.3-Indução da expressão das proteínas de fusão

As células albergando as construções plasmidiais, bem como células transformadas com o vetor de controle do kit pBAD/Thio-TOPO, que expressa somente a tiorredoxina, foram induzidas a expressar as proteínas de interesse. Todos os clones, inclusive o clone pBAD/Thio-TOPO, expressavam as respectivas proteínas de interesse (bandas mais fortes), cujos exemplos estão representados a seguir:

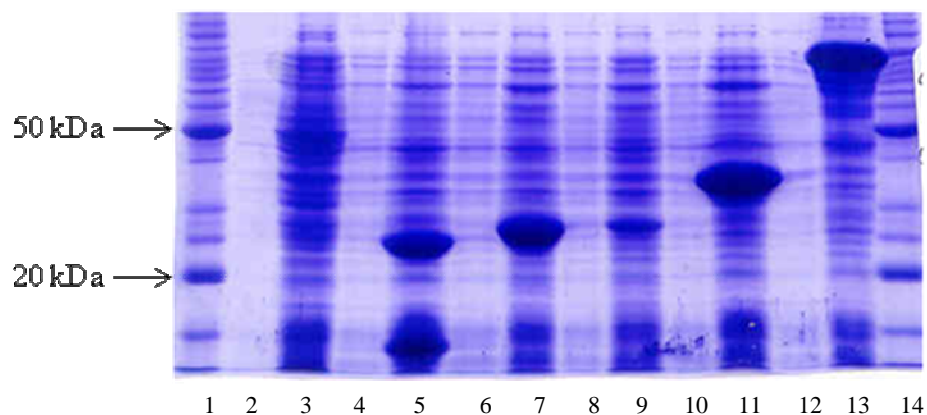


Figura 16: Indução da expressão das proteínas de fusão. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% corado com *coomassie blue*:

Linha 1: marcador 1; Linha 2: Tiorred não induzido; Linha 3: Tiorred induzido; Linha 4: ESAT-6 não induzido; Linha 5: ESAT-6 induzido; Linha 6: CFP-10 não induzido; Linha 7: CFP-10 induzido; Linha 8: Tb9.7 não induzido; Linha 9: Tb 9.7 induzido; Linha 10: Tb16.3 não induzido; Linha 11: Tb 16.3 induzido; Linha 12: ICD-2 não induzido; Linha 13: ICD-2 induzido; Linha 14: marcador 1

4.4-Solubilização por lise mecânica desnaturante

Resultados preliminares (não mostrados) e relatos da literatura, sugeriram que as proteínas de interesse (à exceção de ESAT-6) estavam sob forma de corpos de inclusão, impossibilitando sua purificação a partir do sobrenadante citossólico da lise, tornando necessária sua solubilização prévia. Neste sentido, as células recombinantes expressando os antígenos foram então submetidas a protocolo de lise desnaturante com uréia, a qual foi posteriormente retirada por lavagem com gradiente. Vale lembrar que para o vetor sem inserto (Tiorred) este protocolo é desnecessário, uma vez que esta proteína, nativa de *E. coli*, não forma copos de inclusão. A presença majoritária das proteínas de interesse no

sobrenadante (proteínas solubilizadas) em relação ao precipitado (contendo os corpos de inclusão remanescentes) após a lise, evidencia a solubilização conforme o exemplo de CFP-10 na Figura 17.

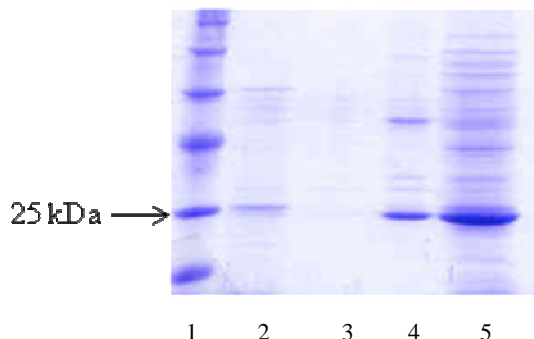


Figura 17: Lise desnaturante de CFP-10. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% corado com *coomassie blue*:

Linha 1: marcador 1; Linha 2: CFP-10 clarificado; Linha 3: CFP-10 lavagens; Linha 4: CFP-10 pellet; Linha 5: CFP-10 sobrenadante

4.5-Purificação das proteínas de fusão:

As proteínas de interesse foram purificadas através de colunas de íons de níquel que possuem afinidade pela cauda de poli-histidinas presentes nas proteínas de fusão. Após a ligação entre o níquel e as histidinas, foram realizadas etapas de lavagens com baixas concentrações de imizadol, a fim de se retirar contaminantes capazes de se ligar de maneira instável à coluna. Posteriormente, as proteínas de interesse foram eluídas, com tampão contendo crescentes concentrações de imidazol, obtendo-se frações protéicas passíveis de utilização em testes sorológicos posteriores, condizentes com os tamanho esperados para cada antígeno (ESAT-6: 26,1kDa; CFP-10: 26,9kDa; Tb9.7: 29kDa; Tb16.3: 32kDa; ICD-2: 98kDa). A Figura 18 representa o exemplo das etapas de purificação e as frações eluídas para ESAT-6.

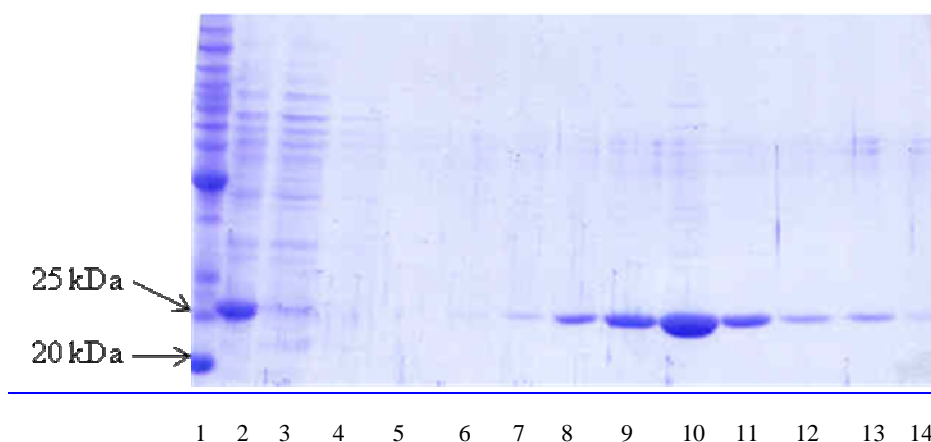


Figura 18: Purificação de ESAT-6. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% corado com *coomassie blue*: Linha 1: marcador 1; ; linha 2: clarificado; linha 3: pós-coluna; linha 4: 1ª lavagem; linha 5: 2ª lavagem; linha 6: 1ª fração eluída; linha 7: 2ª fração eluída; linha 8: 3ª fração eluída; linha 9: 4ª fração eluída; linha 10: 5ª fração eluída; linha 11: 6ª fração eluída; linha 12: 7ª fração eluída; linha 13: 8ª fração eluída; linha 14: pós álcool

Para concentrar as proteínas, as frações contendo proteínas de fusão com mesmos pesos moleculares foram unidas.

4.5-Concentração dos antígenos recombinantes com acetona

Com os objetivos de concentrar as proteínas de interesse e promover a troca de tampão, as frações contendo a proteína de fusão foram precipitadas com acetona. Em seguida, os precipitados foram dissolvidos em 15 mL de PBS 0,1×. A figura 19 apresenta o SDS-PAGE de todos os antígenos solubilizados após precipitação. A inspeção visual mostra que não há proteínas contaminantes presentes em níveis detectáveis pela coloração com azul de Commassie R250 (limite de detecção de 0,3-1,0 µg/banda de proteína).

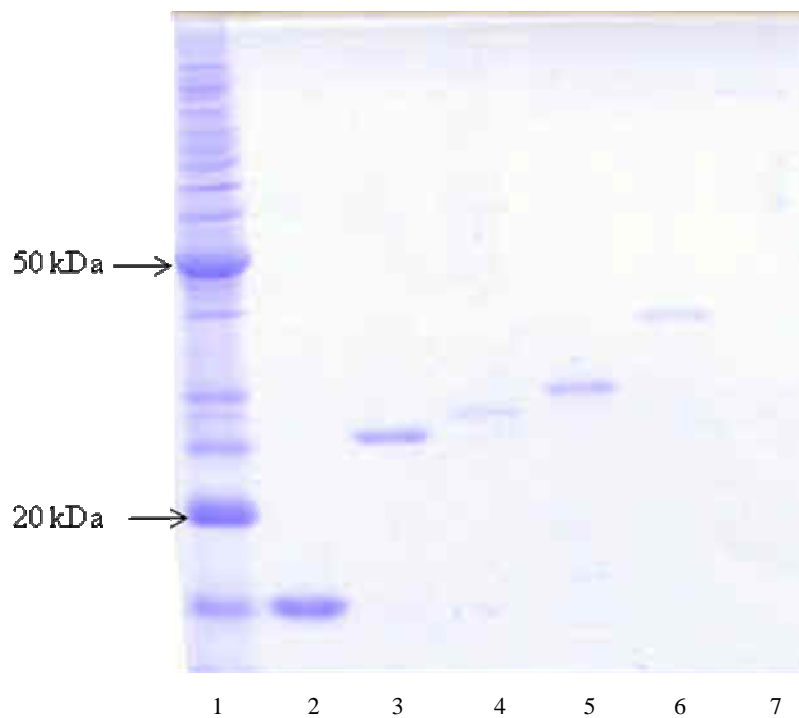


Figura 19: Concentração dos antígenos com acetona. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% corado com *coomassie blue*: Linha 1: marcador 1; linha 2: tiorred; linha 3: ESAT-6; linha 4: CFP-10; linha 5: Tb9.7; linha 6: Tb 16.3; linha 7: ICD-2

As concentrações de cada antígeno purificado, medidas pela aparelho, estão listadas a seguir:

Tiorredoxina (Vetor traduzido sem inserto): 410 $\mu\text{g/ml}$

ESAT-6: 65 $\mu\text{g/ml}$

CFP-10: 50 $\mu\text{g/ml}$

Tb9.7: 55 $\mu\text{g/ml}$

Tb16.3: 40 $\mu\text{g/ml}$

ICD-2: 35 $\mu\text{g/ml}$

4.7-Avaliação da reatividade dos antígenos recombinantes obtidos frente a soros tuberculose positivos

4.7.1-Western-blotting

A fim de realizar uma análise prévia qualitativa da reatividade dos antígenos frente a soros de indivíduos com tuberculose, foi realizado Western Blotting a partir de gel de poliacrilamida exatamente igual ao anteriormente apresentado. Após a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose, foram realizadas incubações com diferentes soros de indivíduos com tuberculose. Após tentativas de sucessivas diluições de conjugado e adição do substrato, os resultados (dados não apresentados) não foram conclusivos.

4.7.2-Avaliação sorológica dos antígenos recombinantes com pools de soros por ELISA

Os antígenos recombinantes purificados foram empregados em ensaios sorológicos iniciais utilizando a técnica de ELISA. Inicialmente estabelecemos as concentrações de antígeno e a diluição dos soros e dos conjugados, a fim de maximizar a diferença entre as absorbâncias medidas para diferentes *pools* de soro de pacientes com TB confirmada e um *pool* de soro de indivíduos sadios e PPD negativos e outro *pool* de indivíduos sadios e PPD positivos. Para aferir a possível reatividade sorológica da tiorredoxina, foi incluída nas placas de microtitulação poços sensibilizados com a tiorredoxina, expressa e purificada junto com os antígenos recombinantes, bem como um extrato citosólico bruto das células *E. coli* que expressam esta tiorredoxina.

Ainda que iniciais, os principais resultados obtidos durante a padronização do ELISA permitem algumas suposições a respeito do potencial de cada antígeno, bem como da necessidade de futuras alterações no protocolo.

Os primeiros experimentos foram realizados com cada um dos antígenos adsorvidos separadamente às placas de microtitulação, avaliando-se suas reatividades contra anticorpos da classe IgG presente no soro de indivíduos tuberculose-positivos e -negativos. Após a etapa de bloqueio, os soros foram adicionados em 4 diluições seriadas (1/100; 1/200; 1/400; 1/800). Além disso, foi comparada a reatividade dos soros com e sem pré-adsorção utilizando o extrato citossólico de *E. coli* que expressa tiorredoxina (extrato *E. coli*/tiorredoxina). Os resultados estão apresentados na figura 24, indicando que (a) os antígenos recombinantes são capazes de diferenciar entre os *pools* positivo e negativo; (b) a pré-adsorção com o extrato diminui a reatividade de ambos os *pools*; (c) o extrato *E. coli*/tiorredoxina,

quando usado como antígeno, mostra reatividade inespecífica que não é alterada pela pré-adsorção.

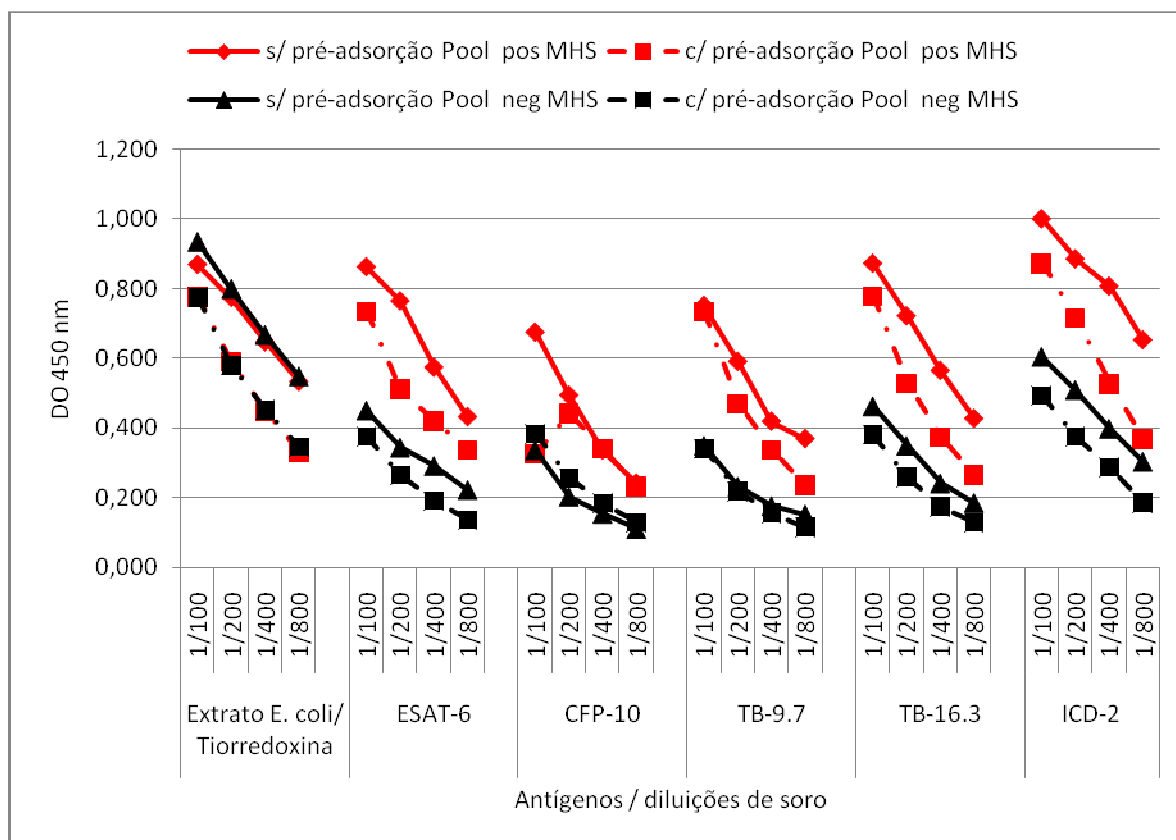


Figura 20:

Gráfico da absorbância medida para cada antígeno nas diluições de soro 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 incubados com anti-IgG

Em seguida, foi realizado novo ELISA com os antígenos recombinantes, incluindo (a) ESAT-6 recombinante sem tiorredoxina, gentilmente cedido por Maria Helena Saad, Fiocruz; e (b) tiorredoxina obtida pelo mesmo protocolo de purificação empregado para os demais antígenos recombinantes. Além disso, diferentes *pools* foram testados em duplicata na diluição de 1/100. A intenção foi avaliar os parâmetros do ELISA, utilizando como controle um antígeno sem tiorredoxina cujos resultados eram sabidamente satisfatórios. Além dos *pools* de soros cujos resultados com o ESAT-6 sem tiorredoxina já eram conhecidos, foram incluídos também os *pools* de soros positivos e negativos APJK. Mais uma vez, o conjugado utilizado foi anti-IgG na diluição de 1/75.000. As médias dos

resultados de absorbância medida para cada antígeno, bem como os valores de desvio padrão, estão representados no gráfico a seguir:

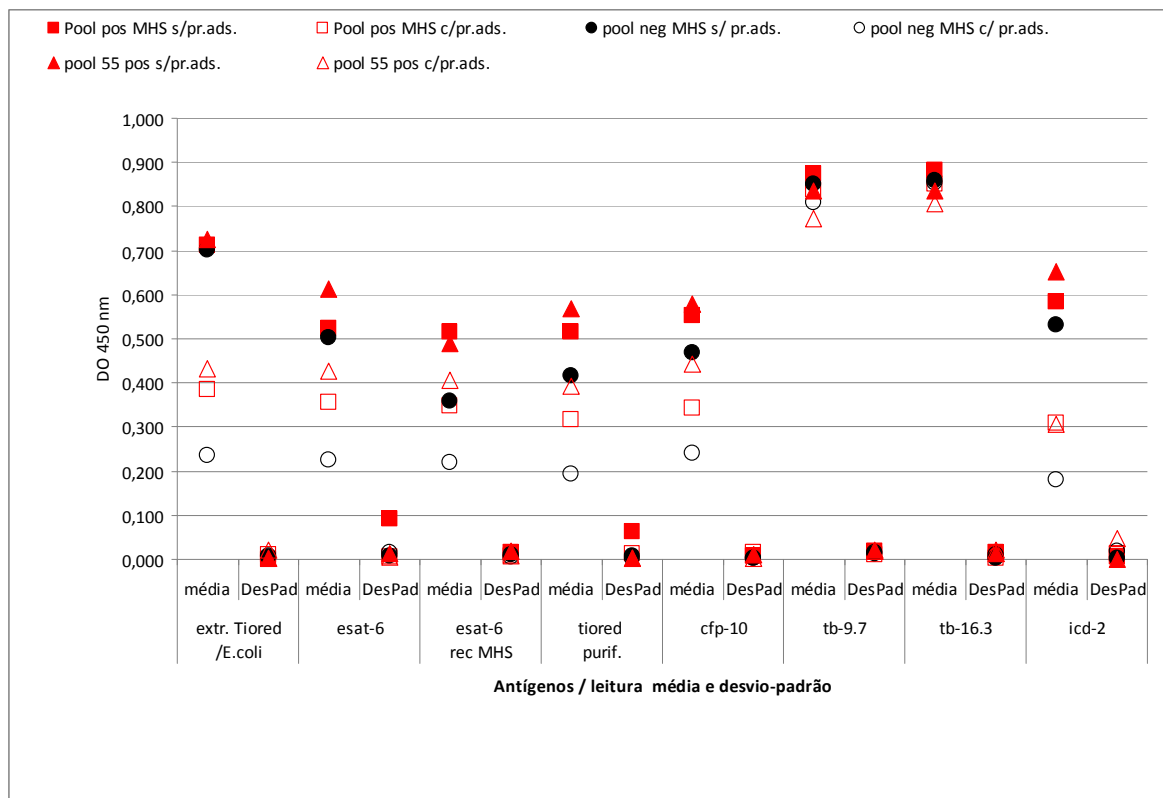


Figura 21:

Gráfico da absorbância medida para cada antígeno em diluição de soro 1/100, em duplicatas e seus respectivos desvios padrão., incubados com anti-IgG

Os resultados mostram que a reatividade é levemente superior para todos os *pools* positivos, quando comparados com os *pools* negativos. Comparando ESAT-6 fusionado com tiorredoxina e ESAT-6 recombinante-controle, observa-se que sem pré-adsorção, a fusão com tiorredoxina diferencia melhor todos os *pools* positivos dos *pools* negativos.

De maneira similar, os experimentos seguintes consistiram na avaliação de combinações de antígenos, já propostas na literatura, bem como do potencial de um *pool* com os 5 antígenos recombinantes obtidos, frente a *pools* de soros de indivíduos saudáveis e com tuberculose. O mesmo protocolo de ELISA foi aplicado para os conjugados anti-IgA-HRP e anti-IgG-HRP, sendo suas respectivas diluições 1/2.000 e 1/75.000, e os resultados estão demonstrados nos seis gráficos a seguir:

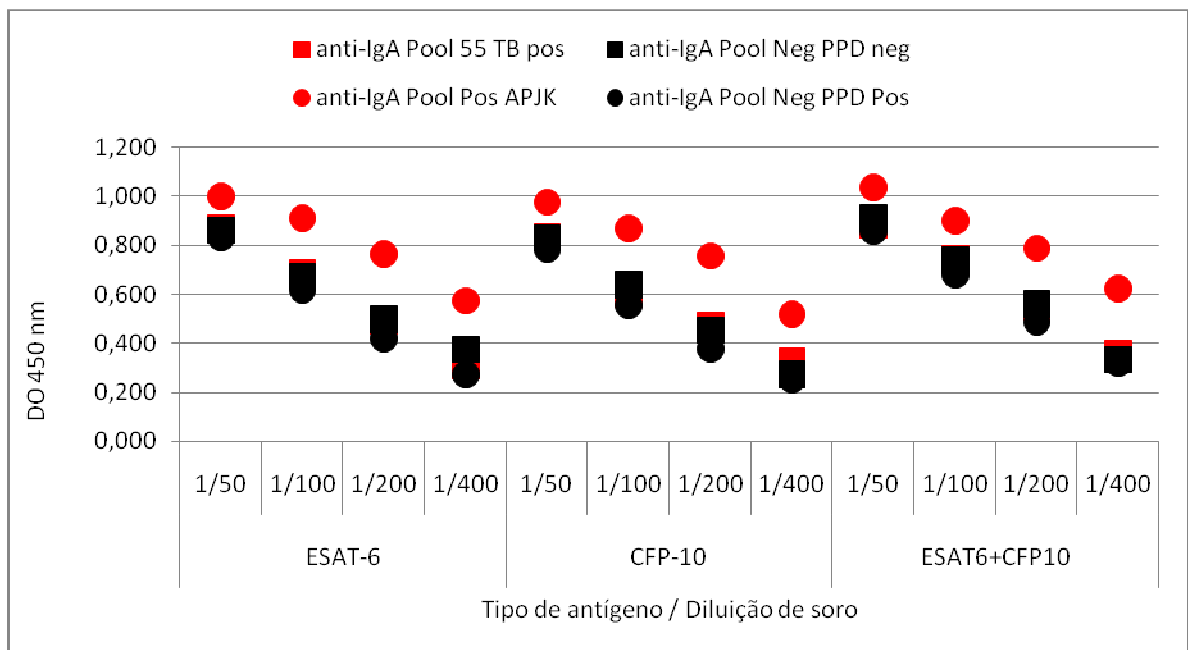


Figura 22 a:

Gráfico da absorbância medida para ESAT-6, CFP-10 e ambos combinados frente a IgA presente nos soros nas diluições seriadas de 1/50 até 1/400

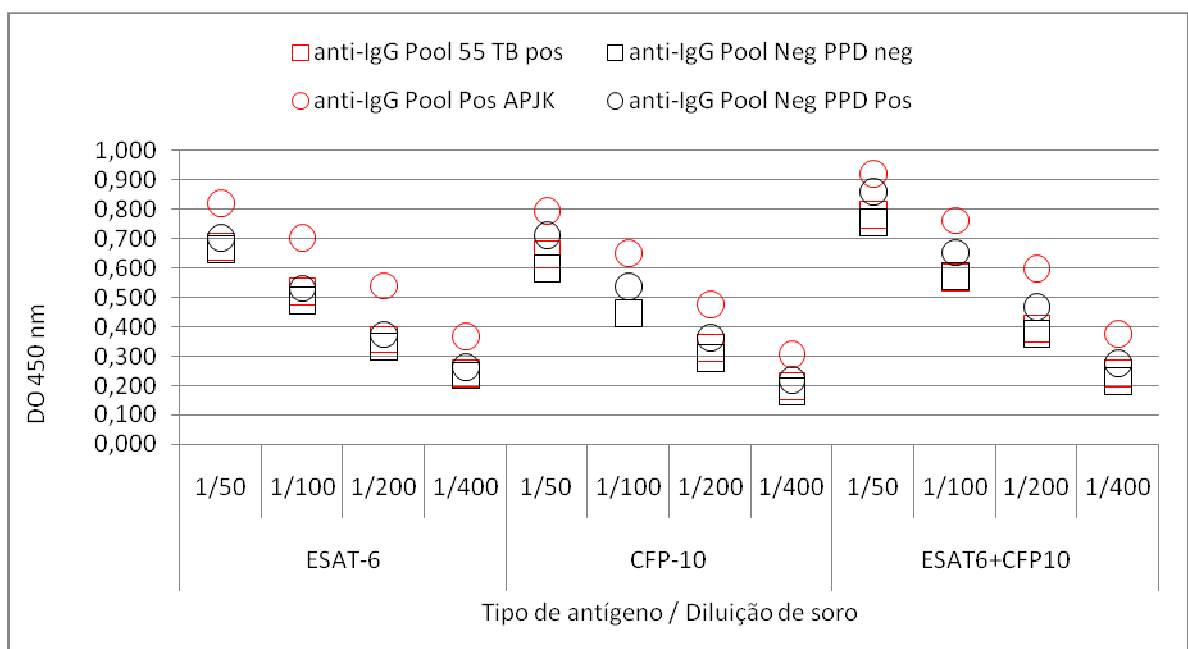


Figura 22 b:

Gráfico da absorbância medida para ESAT-6, CFP-10 e ambos combinados frente a IgG presente nos soros nas diluições seriadas de 1/50 até 1/400

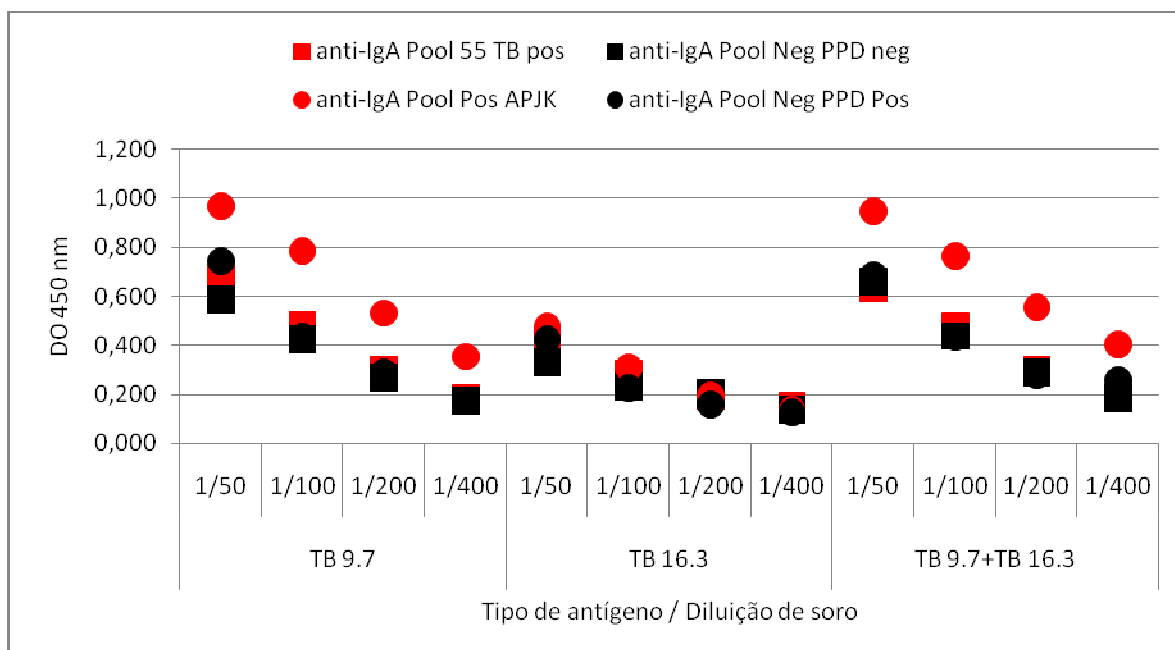


Figura 23 a:

Gráfico da absorbância medida para Tb 9.7, Tb 16.3 e ambos combinados frente a IgA presente nos soros nas diluições em série de 1/50 até 1/400

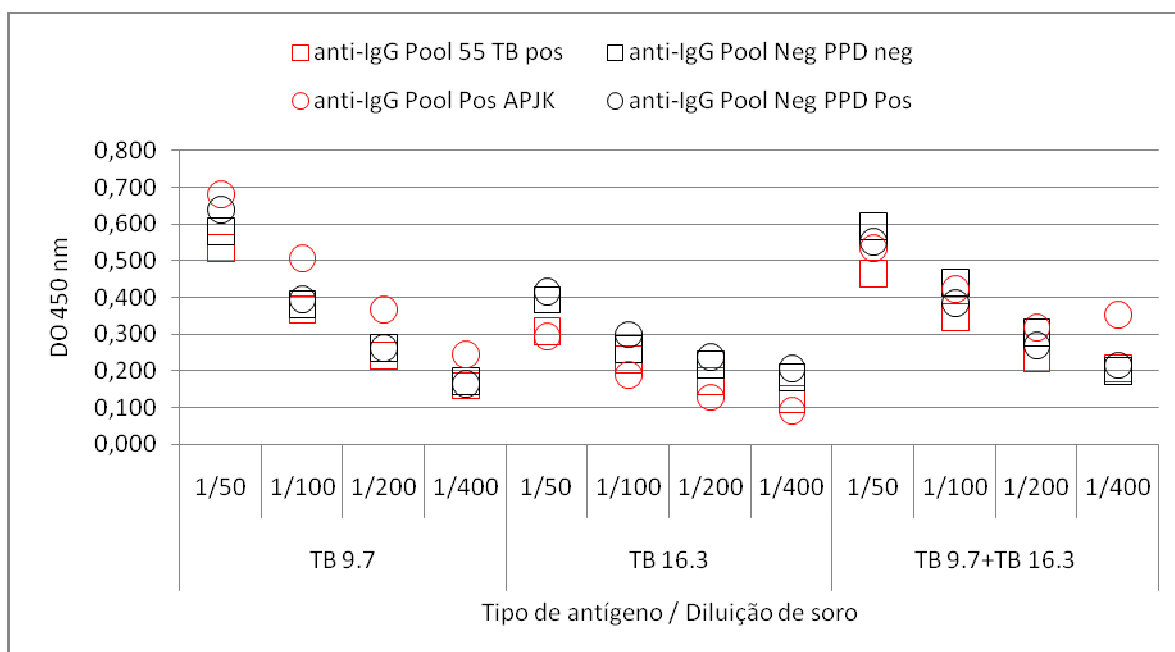


Figura 23 b:

Gráfico da absorbância medida para Tb 9.7, Tb 16.3 e ambos combinados frente a IgG presente nos soros nas diluições em série de 1/50 até 1/400

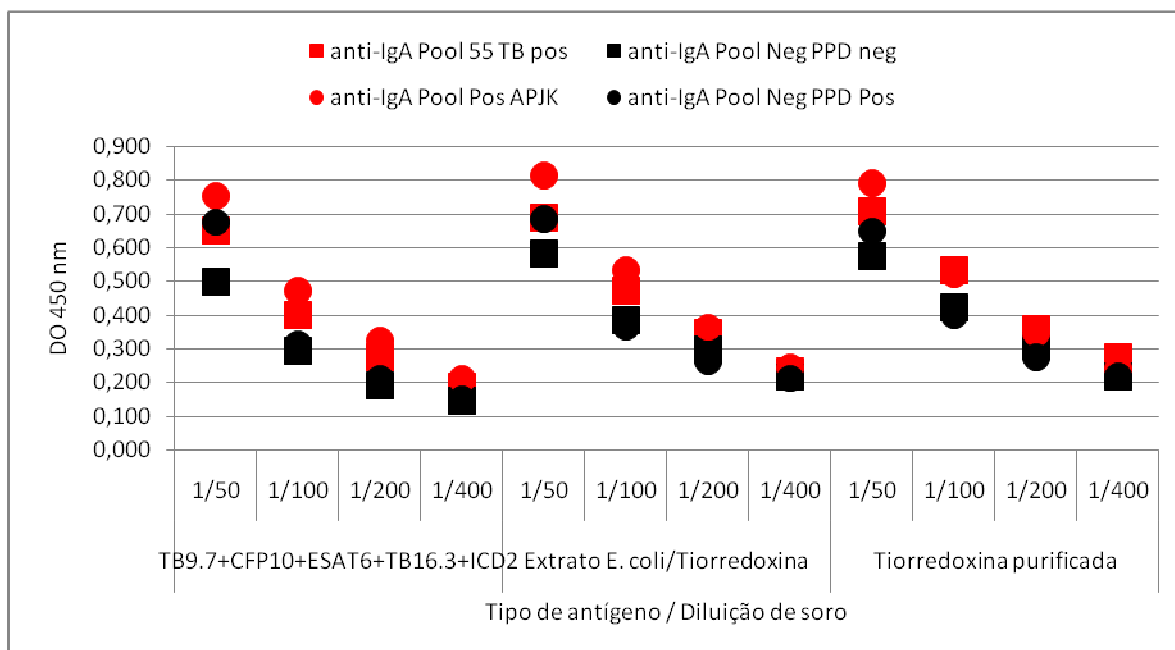


Figura 24 a:

Gráfico da absorvância medida para o *pool* dos 5 antígenos, e tiorredoxina frente a IgA presente nos soros nas diluições em série de 1/50 até 1/400

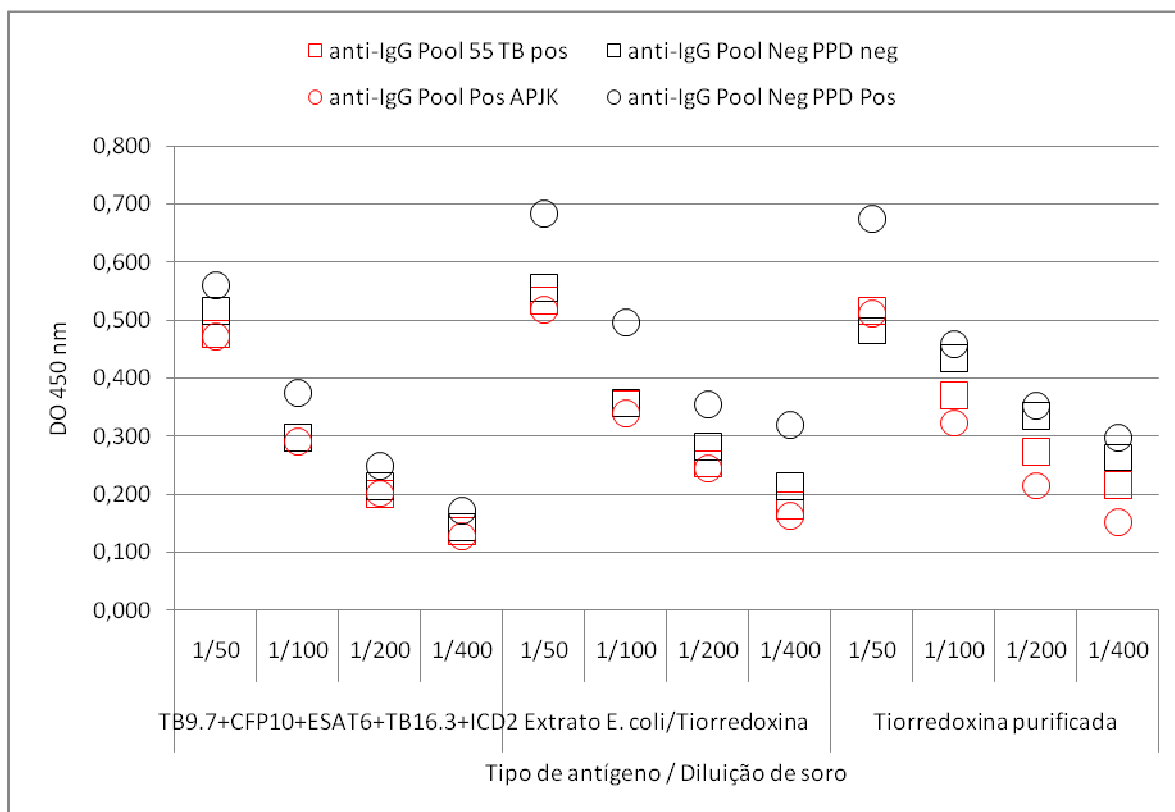


Figura 24 b:

Gráfico da absorvância medida para o *pool* dos 5 antígenos, e tiorredoxina frente a IgG presente nos soros nas diluições em série de 1/50 até 1/400

Os resultados sugerem que ESAT-6, CFP-10 e Tb9.7 diferenciam claramente entre soros TB-positivos e –negativos, tanto para IgG quanto IgA. A combinação de ESAT-6 e CFP-10 leva a um aumento das absorvâncias medidas para todos os *pools* testados. Os resultados obtidos para Tb16.3 não foram satisfatórios. A combinação de todos os cinco antígenos distinguiu bem entre *pools* positivos e negativos quando testada com IgA, mas não com IgG. Mais uma vez, resultados semelhantes foram observados na avaliação da tiorredoxina tanto presente no extrato de *E. coli*, quanto purificada.

5-DISCUSSÃO

A emergência global da tuberculose e seu caráter endêmico no Brasil e em diversas áreas do mundo remetem a uma necessidade de diagnóstico rápido e eficiente. Além disso, a concentração de casos de TB em populações de países em desenvolvimento, implica em métodos economicamente viáveis para sua detecção.

Os avanços da era genômica permitiram o sequenciamento do genoma de diversos micro-organismos de importância médica, entre eles *Mtb*. Por sua vez, a era proteômica, tem elucidado diferentes proteínas importantes na patogenicidade deste micro-organismo, além de relatar antígenos específicos, que podem ser utilizados para sorodiagnóstico da TB.

A utilização de testes sorológicos no auxílio ao diagnóstico da TB vem sendo sugerida com base em propósitos já discutidos aqui. Entretanto, a variabilidade na resposta do hospedeiro ao *Mtb* e diversos fatores ambientais são responsáveis por grande variação na reatividade a antígenos em diversas regiões do mundo. Além disso ainda que seja proposto um *pool* de antígenos eficiente no diagnóstico de TB em habitantes de áreas endêmicas e não endêmicas, a utilização comercial em larga escala em países menos favorecidos como o Brasil seria economicamente inviável.

Desta maneira, fazem-se necessárias pesquisas envolvendo a obtenção de antígenos específicos de *Mtb*, a avaliação de seu potencial imunogênico, bem como a realização de testes sorológicos com pacientes do Brasil.

Dados da literatura indicam a tendência de antígenos recombinantes expressos em sistemas heterólogos a formarem corpos de inclusão insolúveis. Neste sentido, a escolha do plasmídeo pBAD/THIO-TOPO foi baseada não só na facilidade que este vetor comercial oferece para clonagem e expressão, mas principalmente pela presença da tiorredoxina, capaz de conferir maior solubilidade às proteínas de fusão, além de facilitar que a proteína heteróloga assuma dentro da bactéria expressante uma conformação tridimensional estável.

Desta maneira, fez-se necessária a expressão separada da tiorredoxina pura em células de *E. coli* TOP 10, como controle dos experimentos com os antígenos recombinantes de interesse. Posteriormente, sua reatividade frente a soros de pacientes com tuberculose também foi mensurada, revelando valores acima do esperado, mesmo com etapas de pré-adsorção, sugerindo a necessidade de clivagem da tiorredoxina.

Todos os antígenos relatados no presente estudo (ESAT-6, CFP-10, Tb 9.7, Tb 16.3 e ICD-2) são específicos de *Mtb* com comprovado potencial para sorodiagnóstico (Dillon *et al.*, 2000; Fiorio & al, 2002; Weldingh *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2005; Abebe, 2007). Após o êxito na clonagem e expressão destes antígenos, há perspectivas de potencializar as etapas de purificação realizadas.

Novas modificações do protocolo de purificação, tais como incluir etapas de passagem por coluna de exclusão por tamanho e cromatografia de troca aniônica foram relatadas (Colangeli *et al.*, 1998) e os antígenos recombinantes de interesse podem futuramente ser submetidos a tais protocolos, a fim de se obter frações ainda mais puras para avaliação sorológica. Embora as proteínas recombinantes obtidas neste trabalho não tenham apresentado bandas contaminantes na SDS-PAGE quando corada com azul de Coomassie, não podemos excluir a possibilidade da presença de contaminantes, o que poderia explicar a alta reatividade sorológica tanto dos antígenos recombinantes quanto do extrato quando este é utilizado como antígeno.

Em relação à sorologia, o antígeno ESAT-6 já tinha sido descrito como um importante alvo da resposta imunológica celular de linfócitos T e excelente estimulante da sua produção de INF- γ , desencadeando uma resposta imunológica protetora (Andersen & al, 1995). Por esse motivo, esse antígeno vem sendo testado em testes sorológicos revelando consideráveis níveis de especificidade (Lopez-Vidal *et al.*, 2004; Kanaujia *et al.*, 2003), principalmente na identificação de casos em estágios iniciais da doença ativa. Nossos resultados apontam grande potencial deste antígeno para diferenciar soros de indivíduos com e sem tuberculose, tanto para IgA como para IgG, principalmente quando combinado com CFP-10.

O antígeno CFP-10 por sua vez, tem mostrado elevada reatividade frente a soros de pacientes de áreas endêmicas e não endêmicas incapazes de produzir escarro (Dillon *et al.*, 2000; Weldingh *et al.*, 2004). Estes pacientes caracterizam um diferenciado grupo para diagnóstico. Por serem incapazes de fornecer o espécime clínico utilizado nos testes empregados atualmente, testes sorológicos aparecem como uma importante alternativa, o que realça a importância de CFP-10. Em nossos estudos iniciais, este antígeno mostrou-se significativamente capaz de reconhecer soros tuberculose positivo. A avaliação promissora quanto à reatividade com IgA e IgG parece ser ainda potencializada quando associada a ESAT-6.

Estudos publicados (Abebe *et al.*, 2007) com o antígeno Tb 9.7 indicaram grande variação de sensibilidade em soros de pacientes de áreas endêmicas e não-endêmicas (de 36% a 85%) e uma sensibilidade muito promissora com soros de indivíduos com TB co-infectados pelo HIV. Em combinação com outro antígeno (Tb16.3), o Tb9.7 demonstrou bons resultados, principalmente quando ambos foram expressos sob a forma de poliproteína. Ainda em relação a Tb 9.7, os relatos sugerem relevância nos testes com soros de TB extrapulmonar (Abebe, 2007). No presente trabalho, os resultados de Tb 9.7 sugerem uma capacidade significativa de diferenciar entre todos *pools* de soro de indivíduos saudáveis e daqueles com tuberculose, tanto para IgA quanto para IgG

Já o antígeno Tb 16.3 é o antígeno mais eficiente que se conhece até hoje para diagnosticar TB em outro importante grupo problemático: os coinfectedos com HIV (Weldingh *et al.*, 2004). Esses indivíduos necessitam de um diagnóstico o mais rápido possível, visto a gravidade que a infecção pode alcançar. Além disso não respondem à Prova Tuberculínica, o que mais uma vez remete à importância do sorodiagnóstico. Neste sentido, nossos estudos com o Tb 16.3 mostraram diferenciação de soros tuberculose positivos e negativos satisfatória para IgG, mas ainda inconclusiva para IgA. Novas tentativas de utilização deste antígeno testado separadamente ou em combinação com Tb 9.7 deverão ser realizadas.

Já o antígeno ICD-2, se mostrou promissor em estudo realizado com soros de pacientes de áreas não endêmicas com TB, onde a especificidade foi de 65,3% e a sensibilidade chegou a 100% (Fiorio, *et al.*, 2002). Por haver apenas este único relato da literatura para este antígeno e nunca ter sido testado em áreas endêmicas, nossos relatos são inovadores em relação a ICD-2: os resultados com IgG mostraram índices elevados de reatividade frente a soros de indivíduos com tuberculose, quando comparados aos saudáveis. Novos experimentos com IgA serão desenvolvidos para este antígeno que, seguindo o padrão encontrado para IgG, pode se estabelecer como inédito marcador para esta doença em áreas endêmicas.

Análises da proteína PPE-55 resultaram na identificação de uma porção C-terminal de aproximadamente 1000 aminoácidos extremamente imunogênica, principalmente em pacientes com tuberculose infecção latente (Singh *et al.*, 2005). Entretanto trata-se ainda de uma região grande de aminoácidos que pode remeter a menor especificidade e dificuldade de obtenção da proteína. Neste sentido, nossos procedimentos relacionados a

bioinformática possibilitaram, por análises de similaridade, a identificação da sequência de aminoácidos dentro da porção C-terminal mais indicada para obtenção, caracterização e testes sorológicos. Desta maneira pode-se supor que o fragmento identificado ser passível de eficiente utilização em testes sorológicos para TB. De maneira similar à realizada para os demais antígenos, este fragmento de PPE-55 foi amplificado por PCR. Entretanto, devido aos resultados obtidos na sorologia dos antígenos recombinantes fusionados à tiorredoxina, optamos por não clonar o amplicon no vetor pBAD/THIO-TOPO. Pretendemos cloná-lo, bem como todos os outros antígenos deste trabalho, no vetor pBAD-TOPO que expressa a proteína somente com uma cauda C-terminal de seis histidinas para posterior purificação. Futuramente, esperamos que, após avaliação sorológica deste fragmento, PPE-55 possa ser indicado para compor um *pool* de antígenos utilizado para diagnóstico da tuberculose .

De maneira geral, ESAT-6, CFP-10, Tb9.7, Tb16.3 e ICD-2 são reconhecidos por soros de indivíduos tuberculosos, o que sustenta a importância de testes dos referidos antígenos no Brasil, fato ainda não observado para todos esses antígenos na literatura. Ainda no contexto nacional, vale a pena enfatizar que a escassez de recursos dos serviços públicos de saúde e a necessidade de realização de testes diagnósticos em massa, remetem a adequação entre eficiência do teste, abrangência e viabilidade. Estas exigências foram atendidas tanto pela abordagem sorológica quanto pela realização de todos os processos de obtenção dos antígenos no próprio laboratório.

Nossos resultados avaliando cada antígeno separadamente e algumas combinações de antígenos, mostraram capacidade de diferenciar *pools* de soros tuberculose positivos e negativos de maneira significativa. No entanto, a reatividade de soros negativos foi levemente superior aos níveis relatados na literatura, muito provavelmente devido à presença de anticorpos presentes nos soros capazes de reagir com epítomos da tiorredoxina.

Na tentativa de resolver este problema, foi realizada uma etapa de pré-adsorção dos soros com extrato de *E. coli* expressando tiorredoxina. A massa de extrato usada na pré-adsorção foi, aproximadamente, 1000 vezes maior do que a massa de antígeno recombinante usada na etapa de sensibilização. Os resultados obtidos permitiram observar que a pré-adsorção com tiorredoxina diminuiu a reatividade de todos os soros. No entanto, ainda assim, a reatividade do extrato frente a soros tuberculose positivos e negativos foi maior do que a encontrada para os antígenos recombinantes. Neste sentido, a clivagem da

proteína de fusão com uma enteroquinase que cliva entre a tiorredoxina e a parte fusionada, pode significar outra importante alternativa no objetivo de anular a possível reatividade dos soros contra a tiorredoxina. Desta maneira, novos ensaios de ELISA poderão ser realizados, avaliando-se apenas a reatividade dos soros contra os antígenos propriamente ditos.

Os próximos passos do presente trabalho incluem a avaliação da reatividade de um painel de soros tuberculose positivos e negativos, contra cada um dos antígenos de interesse, bem como um *pool* de todos eles. Um painel de aproximadamente 100 soros de pacientes com informações sobre radiografia do tórax, PPD e tempo de tratamento, permitirá uma avaliação e diferenciação de diferentes padrões de resposta a diversos estágios da infecção.

Desde já, os resultados obtidos na avaliação por ELISA de antígenos recombinantes obtidos e avaliados em soros de pacientes com tuberculose, permitem supor que tais antígenos poderão eventualmente integrar um *pool* de antígenos a ser utilizado em uma metodologia alternativa de sorologia para diagnóstico da tuberculose.

6-BIBLIOGRAFIA

ABEBE, F.; HOLM-HANSEN, C.; WIKER, H.G.; BIUNE, G. 2007. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand. J. Immunol.*; 66: 176-191

ADAMS LB, MASON CM, KOLLS JK, SCOLLARD D, KRAHENBUHL JL, NELSON S. 1995. Exacerbation of acute and chronic murine tuberculosis by administration of a tumor necrosis factor receptor-expressing adenovirus. *J. Infect. Dis.*; 171: 400-5

ALCAIS A, FIESCHI C, ABEL L, CASANOVA JL. 2005. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J. Exp. Med.*; 202: 1617-21.

ALMEIDA, E.A.; SANTOS, M.A.A.; AFIUNE, J.B.; SPADA, D.T.A. & MELO, F.A.F. 2005. Rendimento da cultura de escarro na comparação de um sistema de diagnóstico automatizado com o meio de Lowenstein-Jensen para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. *J. Bras. Pneumol.*; 31: 231-236.

AMADORI, M.; LYASHCHENKO, K.P.; GENNARO, M.L.; POLLOCK, J.M. & ZERBINI, I. 2002. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.*; 85: 379-389.

ANDERSEN P.; MUNK M.E.; POLLOCK T.M.; DOHERTY T.M..2000. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*; 356:1099-104.

ANDERSEN P.; ANDERSEN A.B.; SORENSEN A.L.; NAGAI S..1995. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol.*; 154:3359-72.

APPELBERG R, CASTRO AG, GOMES S, PEDROSA J, SILVA MT. 1995. Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium*: role of neutrophils. *Infect. Immun.*; 63: 3381-7.

BA, F. & RIEDER, H.L. 1999. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*; 3: 1101-1105.

BANERJEE, S.; NANDYLA, A.; PODILI, R.; KATOCH, V.M.; MURTHY, K.J.; HASNAIN, S.E. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate dehydrogenases show strong B-cell response and distinguish vaccinated controls from TB patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 101: 12652-7.

BECK, S.T.; LEITE, O.M.; ARRUDA, R.S.; FERREIRA, A.W. 2005. Combined use of Western blot/ELISA to improve the serological diagnosis of human tuberculosis. *Braz. J. Infect. Dis.*; 9 (1): 35-43.

BOSHOFF, H.I.; BARRY, C.E.. 2006. Is the mycobacterial cell wall a hopeless drug target for latent tuberculosis? *Infect. Dis.*; 3: 237-245.

BOYTON, R.J.; OPENSHAW, P.J. 2002. Pulmonary defences to acute respiratory infection. *Br. Med. Bull.*; 61: 1-12.

- BOTHANLEY, G.H. 1995. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur. Respir. J. Suppl.*; 20: 676-688.
- BÖTTCHER, J. & GANGL, A. 2004. *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis – combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J. Vet. Med.*; 51: 443-448.
- BRICKS, L.F. 2004. Vacina BCG: via percutânea ou intradérmica? *J. Pediatr.*; 80: 93-98.
- BROSH, R.; PYM, A.S.; GORDON, S.V. & COLE, S.T. 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *TRENDS in Microbiol.*; 9: 452-458.
- CAMPOS, H.S. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência? *Boletim de Pneumol. Sanit.*; 7: 51-64.
- CARDOSO, F.L.L.; ANTAS, P.R.Z.; MILAGRES, A.S.; GELUK, A.; FRANKEN, K.L.M.C.; OLIVEIRA, E.B.; TEIXEIRA, H.C.; NOGUEIRA, S.A.; SARNO, E.N.; KLAFTER, P.; OTTENHOFF, T.H.M.; SAMPAIO, E.P. 2002. T-Cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 in brazilian tuberculosis patients. *Infect. Immun.*; 70(12): 6707-6714
- CASTELO-FILHO, A.; KRITSKI, A.L.; BARRETO, A.W. 2004. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *J. Bras. Pneumol.*; 30 (1): 57-86.
- CAVALCANTE, S.C. 2007. Abordagens inovadoras para o controle da tuberculose na cidade do Rio de Janeiro. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em medicina – Doenças infecciosas e parasitárias – UFRJ.
- CHEE, C.B.; BARKHAM, T.M.; KHINMAR, K.W.; GAN, S.H.; WANG, Y.T. 2008. Quantitative T-cell interferon-gamma response in *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in active and latent tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*; 20: 120-128.
- CHEN, Q.; ZHU, D.Y.; LUO, X.D.; JIANG, Y.; JIANG, S. 2004. Preparation and application of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10-ESAT-6 fusion protein. *Pulm. Med.*; 27(4): 244-248.
- CHEN J. M., ISLAM S. T., REN H. & LIU J. 2007. Differential productions of lipid virulence factors among BCG vaccine strains and implications on BCG safety. *Vaccine*; 25: 8114-8122.
- CHERIAN T. & VERGHESE V. P. 2000. Tuberculosis with human immunodeficiency virus infection. *Indian J. Pediatr.*; 67:S47-52
- COLANGELI, R.; HEIJBEL, A.; WILLIAMS, A.M.; MANCA, C.; CHAN, J.; LYASHCHENKO, K.; GENNARO, M.L. 1998. Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polihistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Chromat.*; 714: 223-235.
- COLE, S.T. BROSH, R. PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.;

CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; McLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S. & BARRELL, B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*; 393: 515-516.

COLLINS, M.T. 1996. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin.. North America: Food Animal Practice*; 12: 357-371.

CRUZ, A.M.; BARBOSA, L.S. & OLIVEIRA J.N.F. 2005. From algebras to objects: generation and composition. *J. Univ. Comp. Science*; 11: 1580-1612.

DANIEL, T.M. 2006. The history of tuberculosis. *Respir. Med.*; 100: 1862-70.

DANNENBERG JR. AM 1991. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today*; 12: 228-33.

DEMISSIE, A.; RAVNC, P.; OLOBO, J.; DOHERTY, T.M.; EQUALE, T.; GELUTU, M.; HAILU, W.; ANDERSEN, P. & BRITTON, S. 1999. T-Cell recognition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate fractions in tuberculosis patients and their household contacts. *Infect. Immun.*; 67(11): 5967-5971.

DILLON, D.C.; ALDERSON, M.R.; DAY, C.H.; BEMENT, T.; CAMPOS-NETO, A.; SKEIKY, Y.A.W.; VEDVICK, T. BADARO, R.; REED, S.G. & HOUGHTON, R. 2000. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Clin. Microbiol.*; 38: 3285-3290.

DROBNIIEWSKI, F.A.; CAWS, M.; GIBSON, A & YOUNG, D. 2003. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.*; 3: 141-147.

EISENSTADT, J.; HAAL, G.S. 1995. Microbiology and classification of mycobacteria. *Clin. in Dermatol.*; 13: 197-206.

ERUSLANOV EB, LYADOVA IV, KONDRATIEVA TK, MAJOROV KB, SCHEGLOV IV, ORLOVA, M O, APT AS. 2005. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect. Immun.*; 73: 1744-53.

FIORIO W. ; D. BOTTAI, G. BATONI, S. ESIN, M. POARDINI, G. MAISETTA, & M.CAMPA 2002. Identification, molecular cloning, and evaluation of potential use of isocitrate dehydrogenase II of *Mycobacterium bovis* BCG in serodiagnosis of tuberculosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*; 9: 846-851.

GEIJTENBEEK TB, VAN VLIET SJ, KOPPEL EA, SANCHEZ-HERNANDEZ M, VANDENBROUCKE-GRAULS CM, APPELMELK B, VAN KOOYK Y. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.*; 197: 7-17.

GHOSHAL, U.; KISHORE, J.; KUMAR, B.; AYYAGARI, A. 2003. Serodiagnosis of smear and culture-negative neurotuberculosis with enzyme linked immunosorbent assay for anti A-60 immunoglobulins. *Indian J. Pathol. Microbiol.*; 46 (3): 530-534.

GLATMAM-FREEDMAN, A. 2003. Advances in antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for a novel vaccine strategy. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*; 39: 9-16.

HAAS, W.D; MANDEL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. 2000. *Mycobacterium tuberculosis*. Princ. and Pract. of Infec. Dis.; 2576-2607.

HARBOE, M.; WIKER, H.G.; DUCAN, R.; GARCIA, M.M.; DUKS, T.W.; BROOK, B.H.; TURCOTEE, C. & NASGAI, S. 1990. Protein G-based Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*; 28: 913-921.

HOPEWELL, P.C.; MIGLIORI, G.B.; RAVIGLIONE, M.C. 2006. Tuberculosis care and control. *Bull World. Health Organ.*; 84: 428.

HORSBURGH, C.R. 2004. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *N. Engl. J. Med.*; 350: 2060-7.

HOUGHTON, R.L.; LODES, M.J.; DILLON, D.C.; REYNOLDS, L.D.; DAY, C.H.; McNEILL, P.D.; HENDRICKSON, R.C.; SKEIKY, Y.A.W.; SAMPAIO, D.P.; BADARO, R.; LYASHCHENKO, K.P. & REED, S.G. 2002. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. *Clin. Diagn. Labor. Immun.*; 9: 883-891.

HUMPHREYS IR, STEWART GR, TURNER DJ, PATEL J, KARAMANOU D, SNELGROVE RJ, YOUNG DB. 2006. A role for dendritic cells in the dissemination of mycobacterial infection. *Microbes Infect.*; 8: 1339-46.

IMAZ, M.S.; SCHMELLING, M.F.; KAEMPFER, S.; SPALLEK, R.; SINGH, M. 2008. Serodiagnosis of tuberculosis: specific detection of free and complex-dissociated antibodies anti-mycobacterium tuberculosis recombinant antigens. *Braz. J. Infect. Dis.*; 12(3): 234-244.

JACKETT, P.S.; BOTHAMLEY, G.H.; BATRA, H.V.; MISTRY, A.; YOUNG, D.B.; IVANYI J. 1988. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*; 26: 2313-2318

JULIAN, E.; MATAS, L.; PÉREZ, A.; ALCAIDE, A.; LANÉLLE, M. & LUQUIN, M. 2002. Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3-diacyltrehalose, 2,3,6-triacyltrehalose, and cord factor antigens. *J. Clin. Microbiol.*; 40(10): 3782-3788

JUNQUEIRA-KIPNIS AP, KIPNIS A, JAMIESON A, JUARRERO MG, DIEFENBACH A, RAULET DH, TURNER J, ORME IM. 2003. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J. Immunol.*; 171: 6039-45.

KAMATH, A.T.; ROCHAT, A.F.; VALENTI, M.P.; AGGER, E.M.; LINGNAU, K.; ANDERSEN, P.; LAMBERT, P.H.; SIEGRIST, C.A. 2008. Adult-like anti-mycobacterial T cell and *in vivo* dendritic cell responses following neonatal immunization with Ag85B-ESAT-6 in the IC31 adjuvant. Plos ONE; 3 (11): 3683-3688.

KANAUJIA G.V.; GARCIA M.A.; BOULEY D.M.; PETERS R.; GENNARO M.L.. 2003. Detection of early secretory antigenic target-6 antibody for diagnosis of tuberculosis in non-human primates. Comp. Med.; 53: 602-6.

KARAKOUSIS, P.C., BIASHAI, W.R. e DORMAN, S.E. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. Cel. Microbiol.; 6: 105-116.

KNUTSON K.L.; HMAMA Z.; HERRERA-VELIT P.; ROCHFORD R. & REINER N.E. 1998. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. J. Biol. Chem.; 273: 645-652.

KONOMI N., LEBWOHL E., MOWBRAY K., TATTERSALL I. & ZHANG D. 2002. Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. J. Clin. Microbiol.; 40: 4738-40.

LAEMMLI. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature; 227: 680-685.

LEQUIN, R.M. 2005. Enzyme Immunoassay (EIA)/ Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clin. Chem.; 51: 2415-2418

LIMA, D.M.; COLARES, J.K. & FONSECA, B.A. 2003. Combined use of the polymerase chain reaction and detection of adenosine deaminase activity on pleural fluid improves the rate of diagnosis of pleural tuberculosis. Chest; 124: 909-914.

LODHA, R.; KABRA, S.K. 2004. Newer diagnostic modalities for tuberculosis. Indian J. Pediatr.; 71(3): 221-227.

LYASHCENKO, K.P.; POLLOCK, J.M.; COLANGELI, R. & GENNARO A.M. 1998. Diversity of antigen Recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. Infect. Immun.; 66: 5344-5349.

MAWUENYEGA, K.G.; FORST, C.V.; DOBOS, K.M.; BELISLE, J.T.; CHEN, J.; BRADBURY, E.M.; BRADBURY, A.R.M. & CHEN, X. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. Mol. Biol. Cell; 16 (1): 396-404.

McDONOGH, J.A.; McCANN, J.R.; TEKIPPE, E.M.; SILVERMAN, J.S.; RIGEL, N.W.; BRAUNSTEIN, M. 2008. Identification of functional Tat signal sequences in *Mycobacterium tuberculosis* proteins. J. Bacteriol.; 190 (19): 6428-6438.

MORAN, A.J.; TREIT, J.D.; WHITNEY, J.L.; ABOMOELAK, B.; HOUGHTON, R.; SKEIKY, Y.A.; SAMPAIO, D.P.; BADARÓ, R.; NANO, F.E. 2001. Assessment of the serodiagnostic potential of nine novel proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Lett.*; 198(1): 31-36.

MUKHERJEE, P.; DUTTA, M.; DATTA, P.; DASGUPTA, A.; PRADHAN, R.; KUNDU, M.; BASU, J. & CHAKRABARTI, P. 2006. The RD1- encoded antigen Rv3872 of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential candidate for serodiagnosis of tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infec.*; 13: 146-152.

MUNOZ S, HERNANDEZ-PANDO R, ABRAHAM SN, ENCISO JA. 2003. Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J Immunol*; 170: 5590-6.

MURRAY, P.J. 1999. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *TRENDS in Microbiol.*; 7: 320-333.

OKKELS, L.M.; BROCK, I.; FOLLMANN, F.; AGGER, E.M.; AREND, S.M.; OTTENHOFF, T.H.M.; OFTUNG, F.; ROSENKRANDS, I. & ANDERSEN, P. 2003. PPE protein from DNA segment RD1 of *Mycobacterium tuberculosis*: strong recognition of both specific T-Cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family. *Inf. Immun*; 71: 6116-6123.

PAINE, K.; FLOWER, D.R. 2002. Bacterial bioinformatics: pathogenesis and the genome. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*; 4(4): 357-365.

PALOMINO, J.C. 2005. Nonconventional and new methods in diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur. Respir. J*; 26: 1-12.

PALOMINO, J.C.; LEÃO, S.C.; RITACCO V. em: Tuberculosis 2007, from basic science to patient care. Tuberculosis text book. 1ª edição. www.bourcillierkamps.com

PETHE K.; ALONSO S.; BIER F. 2001. The heparin-binding haemagglutinin of *M. Tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature*; 412: 190-4.

PIETERS J. 2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect.*; 3: 249-55.

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A. & FALKINHAM, J.O. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*; 17: 98-106.

QUIRÓS-ROLDÁN, E.; AIROLDI, M. & MORETTI, F. 2001. Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Diagn. Biol. Dic*; 50(4): 200-203.

RAVIGLIONE M. C. & O'BRIEN R. J.. 2004. Tuberculosis. In: Harrison's Principles of Internal Medicine; Kasper; Braunwald; Fauci; Hauser; Longo; Jameson.; 16: 946-966.

RELJIC R, CLARK SO, WILLIAMS A, FALERO-DIAZ G, SINGH M, CHALLACOMBE S, MARSH P D, IVANYI J. 2006. Intranasal IFN γ extends passive IgA antibody protection of mice against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection. *Clin Exp Immunol*; 143: 467-73.

ROSENKRANDS J. , A. KING, K. WELDINGH, M. MONIATTE, E. MOERTZ, & P. ANDERSEN. 2000. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis*; 21: 3740-3756

ROSSETTI, M.L.R.; VALIM, A.R.M.; SILVA, M.S.N. & RODRIGUES, V.S. 2002. Resistant tuberculosis: a molecular review. *Rev. S. Púb.*; 36: 525-532.

SAEGERMAN, C.; DELVILLE, J.; DEWAELE, L.C. & CILSON, D. 1995. Serological and cutaneous testing of bovine tuberculosis with the A60 antigen complex from BCG. *Prevent. Vet. Med*; 23: 239-248.

SCANGA, C.A.; MOHAN, V.P.; YU, K. 2000. Depletion of CD4 (+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J. Exp. Med.*; 192: 347-58.

SCHLUGER, N. W.; ROM, W.N. 1998. The host immune response to tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*; 157 (3): 679-691

SERBINA, N.V.; LAZAREVIC, V.; FLYNN, J.L. 2001. CD4 (+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8 (+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*; 167: 6991-7000.

SHINNICK, T.M. & GOOD, R.C. 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*; 13: 884-901.

SILVA V.M.; KANAUIAG.; GENNARO M.L.; MENZIES D. 2003. Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 KDa and 14 KDa in patients with a spectrum of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*; 7:478-84.

SILVA, V.M.; SARDELLA, I.G.; LUIZ, R.R.; CUNHA, A.J.; CAVALCANTI, A.H.; MAHAVIR, S.; BARRETO, M.M.; RODRIGUES, R.S.; CARVALHO, T.F.; SAAD, M.H. 2008. Immunoreactivity of five antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in patients attending a public health care facility in an area with high endemicity for TB. *Microbiol. Immunol.*; 52 (11): 544-550

SINGH, K.K.; DONG, Y.; PATIBANDLA, S.A.; McMURRAY, D.N.; ARORA, V.K. & LAAL S. 2005. Immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE55 (Rv3347c) protein during incipient and clinical tuberculosis. *Inf. Immun*; 73: 5004-5014.

SMITH, N.H. 2006. A Re-Evaluation of *M. prototuberculosis*. *PLoS Pathog.*; 2(9): 98-99.

SOOLINGEN, D.V.; HERMANS, P.W.M.; de HAAS, P.E.W.; SOLL, D.R.; van EMBDEN, J.D.A. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*; 29(11): 2578-2586.

SPITZNAGEL, J.K. 1999. Mycobacteria: Tuberculosis and Leprosy. In: Schaechter, M.; Engleberg, N.C.; Eisenstein, B.I.; Medoff, G. Mechanisms of Microbial Dis.; 3: 230 -242.

SREEVATSAN, S.; PAN, X.; ZHANG, Y.; KREISWIRTH, B.N. & MUSSER, J.M. 1997. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. Antimic. Ag. Chemot.; 41: 636-640.

TAN, B.H.; MEINKEN, C.; BASTIAN, M.; BRUNS, H.; LEGASPI, A.; OCHOA, M.T.; KRUTZIK, S.R.; BLOOM, B.R.; GANZ, T.; MODLIN, R.L.; STENGER, S. 2006. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. J. Immunol.; 177: 1864-71.

TEKAIA, F.; GORDON, S.V.; GARNIER, T.; BROSH, R.; BARREL, B.G.; COLE, S.T. 1999. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis in silico*. Tuber. Lung Dis.; 79 (6): 329-342.

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

TRAJMAN, A.; KAISERMANN, M.C.; LUIS, R.R.; SPERHACKE, R.D.; ROSSETI, M.L.; SAAD, M.H.F.; SARDELLA, I.G.; KRITSKI, A.L. 2007. Pleural Fluid ADA, IgA ELISA and PCR sensitivities for the diagnosis of pleural tuberculosis. Scand. J. Clin. Microbiol.; 10:1-8.

VALLIERE, S.; ABATE, G.; BLAZEVIC, A.; HEUERTZ, R.M.; HOFT, D.F. 2005. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. Infect. Immun.; 73: 6711-20.

VANKAYALAPATI R, WIZEL B, WEIS SE, SAFI H, LAKEY DL, MANDELBOIM O, SAMTEN B, PORGADOR A, BARNES PF. 2002. The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. J. Immunol.; 168: 3451-7.

VAN EMBDEN, J.D.A.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.T. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol.; 31: 406-409.

VAN SOOLINEGN, D.; VAN DER ZANDEN, A.G.; DE HAAS, P.E..1998. Diagnosis of *Mycobacterium* infections among humans by using novel genetic markers. J. Clin. Microbiol.; 36: 1840-5.

VERMA, R.K. & JAIN, K. 2007. Antibodies to micobacterial antigens for diagnosis of tuberculosis. Immun. & Med. Microbiol.; 51(3): 453-461.

WELDINGH, K.; ROSENKRANDS, I.; OKKELS, L.M.; DOHERTY, T.M. & ANDERSEN, P. 2005. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. J. Clin. Microbiol.; 43: 57-65.

WILLIAMS A, RELJIC R, NAYLOR I, CLARK SO, FALERO-DIAZ G, SINGH M, CHALLACOMBE S, MARSH PD, IVANYI J. 2004. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculosis early infection of the lungs. Immunology; 111: 328-33.

WILLIAMS CM, GALLI SJ. 2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.*; 105: 847-59.

WILSHER, M.L.; HAGAN, C.; PRESTIDGE, R.; WELLS, A.U. & MURISON, G. 1999. Human in vitro immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung Dis.*; 79: 371-377.

YOSHIKAI, Y. 2006. Immunological protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Crit. Rev. in Immun.*; 26(6): 515-526.

ZELINA, M.R, Caldeira. 2004. Controle de crianças e adolescentes comunicantes de tuberculosos. *Rev. Saúde Pública*; 38 (3):339-45.

ZINK A. R., GRABNER W., REISCHL U., WOLF H. & NERLICH A. G. Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. *Epidemiol. Infect.*; 2003; 130: 239-49.

6.2-Documentos eletrônicos

Centro de Vacinação de Adultos (CVA-UFRJ). Set.2004. Disponível em: <<http://cva.ufrj.br/vacinas/tb-v.html>> Acesso em: Set 2008.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Set.2009. Disponível em: <<http://www.who.com>> Acesso em: Fev 2009.

Portal da Saúde – Ministério da Saúde. Set.2009. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=25311> Acesso em: Jan 2009.

TB Alliance. Set. 2009. Set.2009. Disponível em: <<http://www.tballiance.org/why/mdr-tb.php>> Acesso em: Jun. 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)