

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUDMILLA DELA COLETTA TROIANO ARAUJO

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES DE *Mycobacterium tuberculosis* EM *Escherichia coli* PARA USO
EM DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE

CURITIBA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUDMILLA DELA COLETTA TROIANO ARAUJO

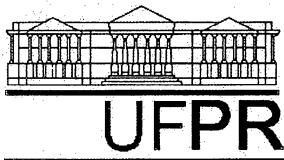
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES DE *Mycobacterium tuberculosis* EM *Escherichia coli* PARA USO
EM DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração Saúde Humana e Animal, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de doutor.

Orientadora: Profª Drª Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2014



RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

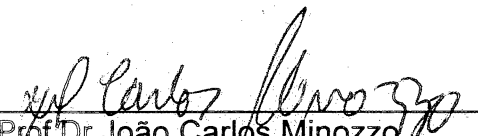
Aos dezessete dias do mês de abril de 2014, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, Segundo Andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Nonagésima Primeira Defesa de Tese de Doutorado, Área de Concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, ficou constituída pelos Professores Doutores Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR), João Carlos Minozzo (CPPI), Daniel Ernesto Rodríguez Fernández (UFRJ), Maria Fátima Grossi de Sá (EMBRAPA-CENARGEN), e Vanete Thomaz Soccol (UFPR- orientadora da tese).

Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Ludmilla Dela Coletta Troiano Araujo** a fazer a apresentação da Tese intitulada: "OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Mycobacterium tuberculosis* EM *Escherichia.coli* PARA USO EM DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE". Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

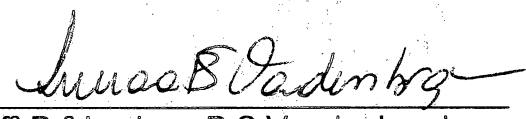
Tendo em vista a tese e a arguição, a banca composta pelos professores Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Dr João Carlos Minozzo, Dr Daniel Ernesto Rodríguez Fernández, Drª Maria Fátima Grossi de Sá, e Drª Vanete Thomaz Soccol declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da resolução 65/09 de 30.10.09).

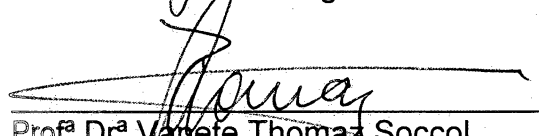
Curitiba, 17 de abril de 2014


Profª Dr João Carlos Minozzo


Profª Drª Maria Fátima Grossi de Sá


Profª Dr Daniel E Rodríguez Fernández


Profª Drª Luciana P S Vandenberghe


Profª Drª Vanete Thomaz Soccol

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todos os Espíritos de luz, por toda proteção, iluminação e sabedoria concedida a cada passo de minha vida e por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais Celso Gonçalves Troiano e Ivete de Fátima Dela Coletta Troiano, pelo amor incondicional e apoio. Por terem me ensinado os reais valores da vida.

Ao meu esposo Otávio Cesar Araujo, pelo amor, parceria, carinho e por sempre viver comigo cada sonho.

À professora Dr^a. Vanete Thomaz Soccol, todo meu carinho, pela oportunidade, paciência e orientação, e também pela construção e ensinamentos. Crescimento pessoal e profissional que seguirão comigo sempre.

Ao meu amigo especial Daniel Ernesto Rodríguez Fernández, pelo carinho, colaboração e auxílio na composição do planejamento experimental realizado neste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, pelo tempo dedicado ao aprimoramento deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná, em especial o Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e ao diretor de produção Júlio Salomão, pela colaboração e apoio deste projeto.

À Aline Cristine dos Santos e Marina Vencato (TECPAR), pela disposição e auxílio nos experimentos utilizando animais.

Ao professor Dr. Emanuel Maltempi de Souza e a técnica Caroline Kukolj (Departamento de Bioquímica UFPR), pelo auxílio, disponibilização de materiais e o uso do equipamento de espectrometria de massa.

Ao Professor Dr. Paulo Guimarães (Departamento de estatística UFPR), pelo auxílio das análises estatísticas neste trabalho.

Ao Hospital Regional da Lapa São Sebastião, por permitir o acesso a suas dependências para coleta de amostras de pacientes.

A todos os voluntários, que se dispuseram em contribuir com a doação de sangue para a execução deste trabalho

Ao Laboratório Central do estado do Paraná (LACEN), pelo treinamento e disponibilização da cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, indispensáveis para execução deste trabalho.

Ao Dr. Christian Macagnan Probst, pesquisador do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), por disponibilizar as cepas de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho.

À Diretora Suzan Mirian da Central de Medicamentos do Paraná (CEMEPAR), pela disponibilização da vacina BCG e do PPDRT23 utilizados neste trabalho.

Aos professores do programa de pós-graduação em Processos biotecnológicos, Dr. Carlos Ricardo Soccol, Dr^a.Luciana Vandenberghe, Dr^a Michele Spier, Luiz Alberto Junior Letti, Dr^a Adenise Woiciechowski, Dr. Julio C. de Carvalho e Dr^a Adriane B. P. Medeiros.

À Lígia Barizon pela amizade e por ter me dado força sempre, muitas vezes até de madrugada.

Aos amigos e colegas de Laboratório, especialmente Gilbero Delinski, Renata Abreu, Silvana Alban, Ricardo Fendrich, Guilherme Morais, Ryo Massaki, Joelma Leão Buchir, Juliana Seger, Paulo Urbano e Francisco Vitola.

Aos animais, pois sem eles não seria possível realizar este trabalho.

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio e familiares que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

A todos muito obrigada!

“Wherever you go, go with all your heart”

Confucius

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	15
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 MICOBACTÉRIAS E O COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
3.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e TUBERCULOSE	24
3.3 TRASMISSÃO E PATOGENIA	25
3.4 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DA TUBERCULOSE.....	26
3.5 IMUNOGENICIDADE DOS ANTÍGENOS DE SECREÇÃO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
3.6 PREVALÊNCIA DA TUBERCULOSE NO MUNDO	30
3.7 DIAGNÓSTICO	33
3.7.1 Baciloscopia.....	33
3.7.2 Cultura.....	34
3.7.3 Diagnóstico radiológico	35
3.7.4 Prova tuberculínica	36
3.7.5 Testes imunológicos – Ensaio para detecção de Interferon gama (IGRAs)	38
3.7.6 Teste plataforma GeneXpert.....	39
3.8 TRATAMENTO	41
3.9 EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM <i>Escherichia coli</i>	42
3.9.1 Corpúsculos de inclusão e remoção de lipopolissacarídeos.....	43
3.9.2 Estratégias para uma eficiente expressão de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	44
3.9.2.1 Promotores.....	45
3.9.2.2 Estabilidade do plasmídeo	45

3.9.2.3	Condições de cultivo	46
3.10	BIOTECNOLOGIA E PERSPECTIVAS PARA O BRASIL.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DOS VETORES PARA A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CFP10 E ESAT6 DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	51
4.1.1	Preparo de células competentes <i>Escherichia coli</i> linhagem <i>DH5αTM</i> e <i>BL21 pLysS</i> com cloreto de cálcio (CaCl ₂).	51
4.1.2	Amplificação dos plasmídeos recombinantes <i>pDEST17(+):CFP10</i> e <i>pDEST17(+):ESAT6</i>	52
4.1.2.1	Transformação da bactéria competente <i>Escherichia coli</i> <i>DH5αTM</i> com <i>pDEST17(+):CFP10</i> e <i>pDEST17(+):ESAT6</i>	52
4.1.2.2	Extração e purificação dos plasmídeos <i>pDEST17(+):CFP10</i> e <i>pDEST17(+):ESAT6</i>	52
4.1.3	Transformação da bactéria competente <i>Escherichia coli</i> <i>BL21 pLysS</i>	53
4.2	PADRONIZAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO	53
4.2.1	Preparo de banco de inóculo <i>BL21-CFP10</i> e <i>BL21-ESAT6</i>	53
4.2.2	Padronização Pré – inóculo	53
4.2.2.1	Concentração celular	54
4.2.2.2	Estabilidade plasmidial.....	54
4.3	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10	54
4.3.1	Padronização da concentração de biomassa e ciclos de sonicação para ruptura celular e liberação das proteínas	55
4.3.1.3	Dosagem de proteína pelo método de Bradford	58
4.3.2	Padronização da temperatura de crescimento, temperatura de indução e concentração de IPTG.....	59
4.4	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTE CFP10 E ESAT6 EM BIORREATOR.....	60
4.4.1	Preparo do inóculo para cultivo celular em biorreator	60
4.4.2	Preparo do biorreator e condições de cultivo para <i>BL21-CFP10</i> e <i>BL21- ESAT6</i>	60
4.4.3	Determinação de parâmetros cinéticos do cultivo celular	62
4.4.4	Remoção e dosagem de endotoxinas.....	63

4.4.5 Estimativa do rendimento das proteínas recombinantes e custo de produção.....	63
4.4.6 Identificação das proteínas recombinantes produzidas por espectrometria de massa.....	64
4.4.6.1 Processamento e preparação das proteínas.....	64
4.4.6.2 Análise MALDI TOF – TOF	65
4.5 FORMULAÇÃO DO PPD RECOMBINANTE	65
4.5.1 Liofilização	66
4.5.2 Ensaio físico-químico para determinação da estabilidade do produto.....	66
4.5.2.1 Estudo de estabilidade do PPD recombinante	67
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HUMORAL DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 FRENTE A SORO POLICLONAL PRODUZIDO EM COELHO	68
4.6.1 Produção de anticorpos policlonais contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	68
4.6.1.1 Preparo do inóculo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e sensibilização dos coelhos para produção de anticorpos policlonais contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	68
4.6.2 Teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos contra às proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6 usando anticorpos policlonais.....	69
4.6.2.1 Cinética da produção dos anticorpos policlonais contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	70
4.6.3 Western Blot dos anticorpos policlonais de coelho frente às proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6.	70
4.7 DOSAGEM INTERFERON GAMA	71
4.7.1 Coleta de sangue de pacientes infectados e não infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	71
4.7.2 Isolamento e cultivo de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	72
4.7.3 Dosagem Interferon Gama de indivíduos com TB	72
4.8 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR EM MODELO ANIMAL	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 AMPLIFICAÇÃO DOS VETORES PARA A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	75
5.2 PADRONIZAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO	76
5.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10	78

5.3.1	Padronização da recuperação da proteína recombinante	Erro! Indicador não definido.
5.3.2	Padronização da temperatura de crescimento bacteriano, temperatura de indução e concentração de IPTG	85
5.4	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10 E ESAT6 EM BIORREATOR	92
5.4.1	Rendimento do cultivo celular em biorreator e estimativa de custo	92
5.4.2	Caracterização das proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6 por espectrometria de Massa	98
5.4.3	Remoção de endotoxinas	103
5.5	FORMULAÇÃO, LIOFILIZAÇÃO E TESTE DE ESTABILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	104
5.6	AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 FRENTE AO SORO POLICLONAL DE COELHO	108
5.7	QUANTIFICAÇÃO DE INTERFERON GAMA (IFN- γ)	112
5.8	AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 EM MODELO ANIMAL <i>Cavia. porcellus</i>	114
	CONCLUSÃO	119
	PERSPECTIVAS	121
	APÊNDICES	134
	ANEXOS	136

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO ENVOLVIDO NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS T POR MICOBACTÉRIAS.....	28
FIGURA 2 –	DIAGRAMA DA REGIÃO GENÔMICA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV.....	29
FIGURA 3 –	ESTIMATIVA DAS TAXAS DE MORTALIDADE POR TUBERCULOSE EXCLUINDO INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS (2012).....	30
FIGURA 4 –	ESTIMATIVA DAS TAXAS DE INCIDÊNCIA DE NOVOS CASOS DE TUBERCULOSE (2012).....	31
FIGURA 5 –	ESTIMATIVA DAS TAXAS DE PREVALÊNCIA DE TUBERCULOSE NO BRASIL (2012)	32
FIGURA 6 –	ESTIMATIVA DAS TAXAS DE MORTALIDADE POR TUBERCULOSE NO BRASIL (2012)	32
FIGURA 7 –	REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA	36
FIGURA 8 –	FLUXOGRAMA DA ABORDAGEM METODOLÓGICA DA TESE.....	49
FIGURA 9 –	LIGAÇÃO QUÍMICA DO Ni ²⁺ COM RESÍDUOS DE HISTIDINA.....	57
FIGURA 10 –	REPRESENTAÇÃO DOS LOCAIS DE APLICAÇÕES DAS FORMULAÇÕES DO PPD EM <i>Cavia porcellus</i>	74
FIGURA 11 –	PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE 1% DO PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS	76
FIGURA 12 –	CONCENTRAÇÃO ADIMENSIONAL DA BIOMASSA ESTIMADA PELA ABSORBÂNCIA DO CALDO DE CULTIVO (A _{600nm}) PARA BL21-CFP10 EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	77
FIGURA 13 –	PERCENTUAL DA ESTABILIDADE PLASMIDIAL DA BL21-CFP10 EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO.....	77

FIGURA 14 –	ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15% DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CPF10 (FRAÇÃO TOTAL) NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	83
FIGURA 15 –	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) APRESENTANDO OS FATORES CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E CICLOS DE ROMPIMENTO.....	84
FIGURA 16 –	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) APRESENTANDO OS FATORES CONCENTRAÇÃO DE IPTG E TEMPERATURA DE INDUÇÃO.....	89
FIGURA 17 –	PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15% DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CPF10.....	92
FIGURA 18 –	GRÁFICO A – AVALIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA (A_{600nm}); GRÁFICO B – PH; GRÁFICO C – OXIGÊNIO DISSOLVIDO; GRÁFICO D1–BL21-CFP10 E GRÁFICO D2–BL21-ESAT6 – % DE CÉLULAS ANCORADAS NO PLASMÍDEO E BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO CELULAR EM BIORREATOR.....	93
FIGURA 19 –	PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 PRODUZIDAS EM BIORREATOR.....	99
FIGURA 20 –	ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO SPOT CORRESPONTE À PROTEÍNA CFP10.....	100
FIGURA 21 –	ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO PICO 1142,677 CORRESPONDENTE À PROTEÍNA CFP10.....	101
FIGURA 22 –	ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO SPOT CORRESPONDENTE À PROTEÍNA ESAT6.....	102
FIGURA 23 –	VERIFICAÇÃO DOS VALORES DE PH NO PPD RECOMBINANTE SOLÚVEL EM DIFERENTES TEMPERATURAS ANALISADAS.....	107
FIGURA 24 –	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE NO PPD SOLÚVEL EM DIFERENTES TEMPERATURAS ANALISADAS.....	107
FIGURA 25 –	AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA DE ABSORBÂNCIA DO SORO POLICLONAL E DO SORO NEGATIVO EM NÚMERO DE VEZES FRENTE ÀS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CFP10.....	110
FIGURA 26 –	AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA DE ABSORBÂNCIA DO SORO POLICLONAL E DO SORO NEGATIVO EM NÚMERO DE VEZES FRENTE ÀS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ESAT6.....	111

FIGURA 27 –	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , APÓS IMUNIZAÇÃO COM 1 mg E REFORÇO COM A MESMA QUANTIDADE AO 15°, 30°, 45° E 60° DIAS FRENTE ÀS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CFP10 E ESAT6.....	111
FIGURA 28 –	A ESPECIFICIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CF10 E ESAT6 AVALIADAS POR WESTERN BLOT USANDO SORO NEGATIVO E O ANTICORPO POLICLONAL DE COELHO.....	112
FIGURA 29 –	RESPOSTA INDIVIDUAL DE IFN- γ PRODUZIDO APÓS ESTÍMULO COM OS ANTÍGENOS CFP10; ESAT6; CFP10 + ESAT6; PPDRT23 E NEG (SEM ESTÍMULO) EM 29 INDIVÍDUOS TUBERCULOSE PULMONAR (a) E EM 13 INDIVÍDUOS SADIOS (b).....	113
FIGURA 30 –	REAÇÃO DE ENDURAÇÃO, PRODUZIDA NO LOCAL DE APLICAÇÃO DA FORMULAÇÃO COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ANIMAIS SENSIBILIZADOS COM O ANTÍGENO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	115
FIGURA 31 –	DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DE DIÂMETRO DE ENDURAÇÃO PRODUZIDOS PELAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES INOCULADAS EM COBAIAS <i>Cavia porcellus</i> PREVIAMENTE SENSIBILIZADOS COM <i>Mycobacterium tuberculosis</i> EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES (0,0004 mg/mL; 0,004 mg/mL; 0,04 mg/mL; 0,4 mg/mL).....	117

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	SEMELHANÇAS E DIFERENÇAS ENTRE O ELISPOT-TB E QUANTIFERON TB GOLD in tube.....	39
TABELA 2 –	NÍVEIS E VALORES DOS FATORES ESCOLHIDOS NO PLANEJAMENTO 2 ³ DE CICLOS DE ROMPIMENTO CELULAR.....	55
TABELA 3 –	NÍVEIS E VALORES DOS FATORES DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL DE CICLO DE ROMPIMENTO CELULAR.....	56
TABELA 4 –	NÍVEIS E VALORES DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO 2 ³ PARA A PADRONIZAÇÃO DA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, TEMPERATURA DE INDUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE IPTG.....	59
TABELA 5 –	NÍVEIS E VALORES DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL. PARA A PADRONIZAÇÃO DA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, TEMPERATURA DE INDUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE IPTG.....	60
TABELA 6 –	CONDIÇÕES DE CULTIVO DA BACTÉRIA RECOMBINANTE BL21-CFP10 E BL21-ESAT6 EM BIORREATOR DE 10 LITROS.....	61
TABELA 7 –	FORMULAÇÃO 1 – PPD RECOMBINANTE.....	66
TABELA 8 –	FORMULAÇÃO 2 – PPD RECOMBINANTE.....	66
TABELA 9 –	RELAÇÃO DAS 25 PROTEÍNAS DE SECREÇÃO EM CULTURA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> SELECIONADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE SEUS REPECTIVOS GENES.....	75
TABELA 10 –	VALORES DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10 NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COM RÉPLICAS NO PONTO CENTRAL.....	79
TABELA 11 –	VALORES DOS COEFICIENTES DE REGRESSÃO E DA PROBABILIDADE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ PARA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10.....	80

TABELA 12 –	VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10 NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	82
TABELA 13 –	VALORES DOS COEFICIENTES E DA PROBABILIDADE DA ANÁLISE DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	82
TABELA 14 –	VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COM RÉPLICAS NO PONTO CENTRAL.....	86
TABELA 15 –	VALORES DOS COEFICIENTES DE REGRESSÃO E DA PROBABILIDADE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	86
TABELA 16 –	VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	88
TABELA 17 –	VALORES DOS COEFICIENTES E DA PROBABILIDADE DA ANÁLISE DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	88
TABELA 18 –	VELOCIDADE ESPECÍFICA, PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA E PRODUTO DO CULTIVO CELULAR DAS BACTÉRIAS RECOMBINANTES BL21-CFP10 E BL21-ESAT6 EM BIORREATOR.....	94
TABELA 19 –	ESTIMATIVA DE CUSTOS PARA PROCESSAMENTO DE 1L DE FERMENTADO PARA A PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10 E ESAT6 EM BIORREATOR DE 10L (ESCALA PILOTO).....	97
TABELA 20 –	DADOS DA IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	102
TABELA 21 –	DADOS DA ESTABILIDADE DO PPD RECOMBINANTE FRENTE A DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA.....	106
TABELA 22 –	ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10 EM SORO DE COELHO POLICLONAL anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	109
TABELA 23 –	ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ESAT6 EM SORO DE COELHO POLICLONAL anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	109
TABELA 24 –	RESULTADO DO TESTE DE DOSAGEM DE IFN- γ NOS INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE PULMONAR (DOENÇA PRESENTE) E NOS INDIVÍDUOS SADIÓS (DOENÇA AUSENTE).....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAAR	–	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	–	Bacilo Calmette-Guérin
BHK	–	Rim de Filhote de Hamster
BSA	–	Soro Albumina Bovina
CD4	–	Marcador de membrana de linfócitos T auxiliares
CD8	–	Marcador de membrana de linfócitos T citotóxicos
CFP10	–	Cultura de proteína filtrada 10 kDA
CHO	–	Ovário de Hamster Chinês
cm	–	Centímetros
CMA	–	Complexo <i>Mycobacterium leprae</i>
CMT	–	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CR	–	Receptor para proteína do sistema complemento
CRPHF	–	Centro de Referência Professor Hélio Fraga
DAB	–	Diaminobenzidina
DCCR	–	Delineamento Composto Central Rotacional
DNA	–	Ácido Desoxirribonucléico
TDO	–	Tratamento Diretamente Supervisionado
EDTA	–	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	–	Ensaio Imunoenzimático
ESAT6	–	<i>Early Secretory Antigenic Target 6</i>
EU	–	Unidade de Endotoxinas
FDA	–	<i>Food and Drug Administration</i>
g	–	Gramas
h	–	Hora
hab	–	Habitantes
HIV	–	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBMP	–	Instituto de Biologia Molecular do Paraná

IFN- γ	–	Interferon Gama
IgG	–	Imunoglobulina G
IGRA	–	Ensaio para Detecção de Interferon Gama
IL	–	Interleucina
IMAC	–	Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados
IPTG	–	Isopropil-b-D-Tiogalactopiranosídeo
kDa	–	Kilodalton
kg	–	Kilograma
L	–	Litro
LAL	–	Lisado de Amebócito de <i>Limulus</i>
LAM	–	Lipoarabinomanana
LB	–	Luria-Bertani
LB _A	–	Luria-Bertani com Antibiótico
LPS	–	Lipopolissacarídeos
MM	–	Marcador massa molecular
mg	–	Miligrama
MHC	–	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	–	Mililitro
mm	–	Milímetro
mM	–	Milimolar
MS	–	Espectrometria de Massa
Mtb	–	<i>Micobacterium tuberculosis</i>
MyD88	–	Fator 88 de diferenciação mielóide
n	–	Número de indivíduos
NCBI	–	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NF- κ B	–	Fator Nuclear κ B
ng	–	Nanograma
NK	–	Células <i>Natural Killer</i>
nm	–	Nanômetro
NTA	–	Ácido Nitrilo Acético
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
OPAS	–	Organização Panamericana de Saúde
OPD	–	Ortofenilenodiamino

pb	–	Pares de Base
PBMC	–	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	–	Salina Tamponada com Fosfato
PCR	–	Reação em Cadeia da Polimerase
PHB	–	Ácido 3-hidroxibutírico
PMF	–	<i>Fingerprinting</i> de Massa Peptídica
PNCT	–	Plano Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	–	Derivado Protéico Purificado
PT	–	Prova Tuberculínica
PVDF	–	Polivinil Difloro
QCL	–	Método Quantitativo Cromogênico em <i>Limulus</i>
qsp	–	Quantidade Suficiente Para
RD	–	Região de Diferença
RNA	–	Ácido Ribonucléico
RHZ	–	Rifampicina, Isoniazida e Pirazinamida
RHZE	–	Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol
EET		Etambutol, Etionamida
SZEET		Estreptomicina, Pirazinamida, Etambutol e Etionamida
rpm	–	Rotações por Minuto
SDS-PAGE	–	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SF	–	Salina Fenolada
SFC	–	Células Formadoras de <i>Spot</i>
SMDFA	–	Sistema Micelar de Duas Fases Aquosa
SUS	–	Sistema Único de Saúde
TB	–	Tuberculose
TB-MDR	–	Tuberculose Multidroga Resistente
TECPAR	–	Instituto de Tecnologia do Paraná
TIR	–	Receptor Toll II-1
TLR	–	Receptor Toll-like
TNF- α	–	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOF	–	Tempo de Voo
TRAM	–	Molécula Adaptadora do TRIF
TRIF	–	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

UFC	–	Unidade Formadoras de Colônias
UI	–	Unidade Internacional
UT	–	Unidade Tuberculínica
WHO	–	Organização Mundial da Saúde
ZN	–	Ziehl-Neelsen
μ	–	Velocidade específica de crescimento
μg	–	Micrograma
μL	–	Microlitro
μm	–	Micrometro

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo produzir insumos para auxílio no diagnóstico de tuberculose, elaborados a partir de proteínas recombinantes específicas de *Mycobacterium tuberculosis* (CFP10 e ESAT6), obtidas por expressão heteróloga em *Escherichia coli* e aplicáveis em produção industrial. Para parametrização da fase inicial de cultivo celular definiu-se a concentração do pré-inóculo (1:10000) e o tempo de fermentação (12 horas) garantindo a maior porcentagem de viabilidade do plasmídeo ancorada à bactéria. Os valores de ciclos de rompimento celular, solubilização e as condições de cultivo (concentração IPTG, temperatura de crescimento e indução) foram determinados a partir de planejamento experimental fatorial completo 2³, avaliando como variável resposta a concentração das proteínas recombinantes. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 12 ciclos de rompimento e sete ciclos de solubilização. Para as condições de cultivo celular definiu-se a concentração de 0,1 mM de IPTG e a temperatura de fermentação de 26°C. Na produção em biorreator de 10L obteve-se concentrações de 232,59 mg/mL e 120,79 mg/mL das proteínas CFP10 e ESAT6, respectivamente. A estimativa de custo foi de R\$ 0,46 por mg de proteína para a primeira e de R\$1,11 por mg de proteína para a segunda. Para estudo da estabilidade a apresentação liofilizada apresentou melhor resultado. A avaliação de resposta imune humoral das proteínas recombinantes produzidas foi realizada com testes ELISA e Western blot. As duas proteínas avaliadas por ELISA apresentaram valores 51,0 e 41,4 vezes a diferença entre o controle positivo e negativo. E sua especificidade foi comprovada em Western Blot. As proteínas recombinantes também foram capazes de produzir IFN- γ quando utilizadas na estimulação de células mononucleares de pacientes infectados com *M. tuberculosis*. A resposta celular de intradermorreação em cobaios (*Cavia porcellus*) foi avaliada para as duas proteínas recombinantes que produziram reação positiva de endureção nos animais sensibilizados com *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Nos animais não sensibilizados e sensibilizados com *M. avium* e *M. bovis* BCG não houve reação, mostrando a alta especificidade das proteínas. Quando aplicadas combinadas, na concentração de 0,04 mg/mL, os resultados de endureção foram significativamente superiores aos obtido pelo PPD padrão. O alto rendimento obtido no cultivo celular e a estabilidade da forma de apresentação liofilizada tornam a

metodologia aplicável industrialmente. Estes insumos têm aplicação em diagnósticos, além de fomentar o desenvolvimento tecnológico nacional com a produção de um teste nacional com alta especificidade e sensibilidade.

Palavras chaves: Proteínas recombinantes; *Mycobacterium tuberculosis*; PPD recombinante; tuberculose; diagnóstico.

ABSTRACT

The present work aims producing inputs to support tuberculosis diagnosis, elaborated from specific *Mycobacterium tuberculosis* recombinant proteins (CFP10 and ESAT6), obtained by heterologous expression in *Escherichia coli* to an applicable industrial production. To parameterize the initial phase of the fermentation, the pre-inoculum concentration (1:10000) and the fermentation time (12 hours) were defined, securing greater percentage of feasibility from the plasmid anchored to the bacteria. The cell disruption cycle, solubilization and the growth conditions (IPTG concentration, growth and induction temperatures) were determined by the 2^3 in a complete factorial experimental planning, evaluating as variable the concentration of recombinant proteins. The best results were obtained by using 12 disruption cycles and seven solubilization cycles. For the fermentation conditions, it was defined a concentration of 0.1 mM IPTG and 26°C as fermentation temperature. The production of heterologous proteins conducted in bioreactor was successfully performed, and concentrations of 232.59 mg/mL and 120.79 mg/mL were respectively obtained for proteins CFP10 and ESAT6. The cost estimate per protein mg was R\$ 0.46 for the first one, and R\$ 1.11 for the second one. The lyophilized presentation form showed greater stability. The humoral immune response evaluation to the produced recombinant proteins was performed through ELISA and Western blot tests. The first two evaluated proteins by ELISA presented values of 51 and 41.4 times the difference between positive and negative controls. Its specificity was also proved in Blot. The recombinant proteins were also capable of producing IFN- γ when used in the stimulation of mononuclear cells from infected patients. The intradermoreaction cellular response in guinea pigs (*Cavia porcellus*) was evaluated, both recombinant proteins produced positive induration reaction in the sensitized animals with *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Nevertheless, in non-sensitized and sensitized animals with *M. avium* e *M. bovis* BCG there was no reaction. When combined, at the concentration of 0.04 mg/mL, the induration results were significantly higher than the ones obtained by standard PPD. The fermentation high yield and the lyophilized form stability make the methodology applicable at the industry.

These inputs can be applied to diagnosis, besides fomenting the national technological development by the production of a national test with high specificity and sensitivity.

Keywords: recombinant proteins; *Mycobacterium tuberculosis*; recombinant PPD; tuberculosis; diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica, constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública, e afeta cerca de um terço da população no mundo. É classificada como a segunda principal causa de morte, por doença infecciosa, e estima-se 8,6 milhões de novos casos e 1,3 milhões de mortes por ano. O Brasil ocupa o 19º lugar num ranking de 22 nações consideradas de alta carga, onde há grande circulação da doença (WHO, 2010).

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) é o agente responsável pela doença, acomete primordialmente os pulmões em 85% dos indivíduos imunocompetentes, entretanto, naqueles que apresentam comprometimento do sistema imunitário, a doença frequentemente dissemina-se em outros tecidos (WHO, 2010). As dificuldades para controle mundial da TB são atribuídas a desigualdades sociais, insuficiência de tratamentos, de vacinas e de pesquisas visando o desenvolvimento de novos diagnósticos mais sensíveis e baratos que possam estar disponíveis para toda a população.

O rápido e acurado diagnóstico da tuberculose é fundamental no controle da doença. Entretanto, os atuais métodos e técnicas de identificação apresentam diversas limitações como a baixa sensibilidade da baciloscopia, o longo tempo de espera das culturas microbianas e a baixa especificidade do teste cutâneo com PPD produzido a partir de proteínas purificados de cultivo de Mtb (Teixeira *et al.*, 2007). Os insumos e kits para diagnóstico existentes são em sua maioria importados e de custo elevado. Muitos destes são de uso específico em laboratório e demandam técnicos qualificados, equipamentos caros e instalações laboratoriais. Outro problema vinculado é o custo e a dificuldade de coleta, armazenagem e transporte de amostras em regiões de difícil acesso.

O estudo e a produção de antígenos recombinantes específicos empregados em reações sorológicas e celulares são fundamentais para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. A região RD1 contém genes estruturais para onze proteínas específicas de *M. tuberculosis* (38 kDa, Mtb81, ESAT6, CFP10, complexo Ag85, TB16.3) e ausente em *M. bovis bacilo Calmette-Guérin* (BCG), *M. avium* e na maioria das outras micobactérias do grupo não tuberculosas. Particularmente as proteínas CFP10 (*Culture Filtrate Protein*, Rv3874) e ESAT6 (*Early Secretory*

Antigenic Target-6, Rv3875) têm recebido maior atenção por serem antígenos imunodominantes secretados pelo Mtb (Bottai & Brosch, 2009; Malaghini *et al.*, 2011).

A produção heteróloga de proteínas de uso industrial e farmacêutico em bactérias oferece uma série de vantagens sobre a obtenção de proteínas oriundas do cultivo de microrganismos, principalmente os patogênicos. Entretanto, a tecnologia recombinante pode apresentar algumas limitações como: o alto custo de produção, baixos níveis de expressão e necessidade de meios de cultivo complexos. Portanto, para um processo de produção ser viável, economicamente, diversos pontos devem ser criteriosamente otimizados na escolha do sistema de produção. A célula deve ser capaz de produzir a proteína recombinante com correta qualidade e nos mais altos níveis possíveis. Além disso, deve ser robusta o suficiente para permitir o seu cultivo em biorreatores, semelhantes aos empregados em escala industrial.

A viabilização da produção em larga escala de kits e de seus insumos estratégicos, aliada às vantagens da baixa complexidade de aplicação e praticidade do produto, resulta numa redução dos custos por teste, facilitando o seu emprego na vigilância e controle da tuberculose (Stavri *et al.*, 2012).

O Brasil, até o presente, não possui nenhum teste de intradermorreação com tecnologia nacional para o diagnóstico da tuberculose. Atualmente, o teste utilizado (PPDRT23), é produzido pelo *Statens Serum Institut* da Dinamarca. O PPDRT23 é uma mistura bruta de centenas de antígenos protéicos e polissacarídeos obtidos de culturas de Mtb. Este teste carece de especificidade devido a frequentes reações cruzadas contra antígenos presentes em micobactérias não patogênicas e na vacina com *BCG* que é produzida a partir de cepa com virulência atenuada empregada de *M. bovis* e usada como vacina contra tuberculose. Dados do Ministério da Saúde e do Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF) estimaram a compra de aproximadamente um milhão de doses, no ano de 2012. Entretanto, esta demanda não supriu a necessidade brasileira.

Tendo em vista a necessidade de desenvolvimento de novos testes para diagnóstico e que atendam a demanda nacional, este trabalho propõe a produção em biorreatores de proteínas recombinantes específicas para identificação de *M. tuberculosis*. Além do desenvolvimento de um produto para intradermorreação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Expressar antígenos recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis*, e que possam ser produzidos em escala industrial com nível de pureza adequado para potencial auxílio no diagnóstico da tuberculose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar e purificar os plasmídeos pDEST17(+):CFP10 e pDEST17(+):ESAT6;
- Padronizar a produção de pré-inóculo de *E.coli* ancorada com os plasmídeos codificantes das proteínas CFP10 e ESAT6;
- Otimizar a produção das proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6;
- Avaliar a expressão das proteínas recombinantes em biorreator,
- Realizar a análise de rendimento e custo de produção das proteínas;
- Purificar as proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade e determinar a massa molecular das mesmas, por espectrometria de massa;
- Purificar e remover endotoxinas de *E. coli* para uso injetável;
- Formular produto para uso em PPD com as proteínas recombinantes e avaliar formulação, forma de apresentação e estabilidade do produto final;
- Avaliar a imunidade humoral, em modelo animal, frente às proteínas produzidas;
- Avaliar a atividade biológica do PPD produzido, em modelo animal experimental;
- Avaliar a capacidade de estímulo de produção IFN- γ das proteínas CFP10, ESAT6 e ambas juntas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MICOBACTÉRIAS E O COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

As micobactérias estão classificadas na ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. O gênero *Mycobacterium* é composto por 150 espécies, das quais mais de 30 podem causar doenças em animais domésticos, animais selvagens e seres humanos (Machado *et al.*, 2014). As micobactérias são divididas em três grupos principais, o complexo *M. tuberculosis* (CMT), complexo *M. leprae* (CMA) e micobactérias atípicas presentes na água e no solo (Jagielski *et al.*, 2014).

O complexo *M. tuberculosis* é composto por sete espécies similares:

- *Mycobacterium tuberculosis* é o principal agente responsável pela tuberculose em humanos e também responsável por casos notificados em primatas não humanos (macacos), caninos, suínos e cobaias, sendo que bovinos e gatos são mais resistentes à doença (LoBue *et al.*, 2010; Ravindran *et al.*, 2014).

- *Mycobacterium bovis* é agente etiológico da tuberculose bovina, infecta grande variedade de espécies de mamíferos, incluindo humanos. O bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG) é uma estirpe desta espécie, atenuada em laboratório e utilizada desde 1920 como vacina contra a tuberculose em humanos. Entretanto, outras variantes de *M. bovis* adaptaram-se a outros hospedeiros tais como *M. pinnipedii* (adaptado aos pinípedes – mamíferos marinhos) e o *M. caprae* (adaptado aos caprinos).

- *Mycobacterium microti* é uma micobactéria exclusiva de roedores (gênero *Microtus*) produz uma tuberculose pouco frequente. Esta bactéria tem sido utilizada com êxito como vacina viva contra tuberculose (Brodin *et al.*, 2004).

- *Mycobacterium africanum* causa a tuberculose humana com as mesmas características do *M. tuberculosis*, mas apresenta uma distribuição geográfica mais restrita. É constituída por dois subtipos e tem propriedades intermédias entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*, tipo I, predominante na África ocidental, e tipo II na África oriental respectivamente (Niemann *et al.*, 2002; Gehre *et al.*, 2013).

- *Mycobacterium canneti* foi descrito como subespécie dentro do CMT, responsável por alguns casos de tuberculose em humanos na região da península Somali (Fabre *et al.*, 2010).

O número de espécies do CMT tende a aumentar com a identificação de novas diferenças genéticas entre estirpes de espécies já conhecidas (Chen *et al.*, 2013). Estudo realizado por Alexander *et al.* (2010) descreve o isolamento e caracterização de uma oitava espécie chamada *M. mungi*. Um agente patogênico que foi encontrado numa população de mangustos (gênero *Mungos*) em Botswana. Tem a particularidade de ter uma progressão extremamente rápida e de causar elevada mortalidade.

O CMT é constituído por organismos que apresentam mais de 99,9% de homologia ao nível do DNA e sequências idênticas no gene de 16S RNA ribossomal (rRNA) (Mostowy *et al.*, 2005). Estes exibem diferentes características fenotípicas e representam um dos exemplos mais extremos de homogeneidade genética, com 0,01% - 0,03% de variação no nucleotídeo sinônimo (Gutacker *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2005; Mulenga *et al.*, 2011).

3.2 *Mycobacterium tuberculosis* e TUBERCULOSE

A tuberculose é uma doença infecto contagiosa causada por *M. tuberculosis*, descoberto por Robert Koch em 1882. São organismos aeróbios, não esporulados e de crescimento lento. Possui forma de bacilos curvos ou retos de 1 a 4 µm de comprimento por 0,3 a 0,6 µm de largura. Possuem a propriedade de álcool-ácido resistência (BAAR) devido ao alto conteúdo lipídico de sua parede celular (cerca de 60% de sua massa seca) que contém ácidos graxos de cadeia longa, incluindo LAM (lipoarabinomanana) e ácido micólico (Shinnick *et al.*, 1995; Collins & Kaufmann, 2001).

A tuberculose pulmonar é a forma mais frequente e generalizada da doença. Pode ser subdividida em: 1) primária (mais comum em crianças) normalmente assintomática, subclínicas e não detectáveis por procedimentos comuns; 2) pós-primária (mais comum em adolescentes e adultos) e 3) miliar. A TB miliar é uma das formas mais graves da doença. Ocorre quando o bacilo entra na corrente sanguínea e pode ser disseminado a vários outros órgãos. O bacilo da tuberculose também pode afetar outras áreas do organismo, como, por exemplo, laringe, ossos e articulações, pele, gânglios linfáticos, intestinos, rins e o sistema nervoso (Golden & Vikram, 2005; Varahram *et al.*, 2014).

3.3 TRASMISSÃO E PATOGENIA

A difusão da tuberculose está intimamente ligada às condições socioeconômicas da população. Possui maior incidência em áreas de grande concentração humana, com precários serviços de infraestrutura urbana, como saneamento e habitação, onde coexistem a fome e a miséria (BRASIL, 2002).

A fonte de infecção primária é o indivíduo com a forma pulmonar da doença, eliminando bacilos geralmente pela tosse, espirro ou fala. A infecção ocorre pela inalação de aerossóis contendo partículas de 1-5 μm de tamanho que são constituídas de dois a três bacilos viáveis, envolvidos por secreção pulmonar desidratada, denominadas núcleos de Wells. Somente esses núcleos são capazes de atingir bronquíolos e alvéolos pelas vias aéreas distais (Dietze, 2009). As gotículas médias são, na maioria, retidas pela mucosa do trato respiratório superior e removidas dos brônquios por meio de mecanismo mucociliar. Devido ao seu pequeno tamanho, esses aerossóis podem permanecer em suspensão por minutos ou até horas. O risco de infecção depende de fatores tais como, o contato entre indivíduos infectados, a carga bacilar inalada, e o sistema imune do potencial hospedeiro (Ahmad, 2011).

A patogenicidade de Mtb depende de sua capacidade de sobreviver e crescer dentro das células do hospedeiro. O crescimento deste microrganismo é lento e as divisões ocorrem em intervalos de 25 a 32 horas dentro do macrófago. Os microrganismos se multiplicam pelo período de duas a 12 semanas até atingirem o número de 10^3 a 10^4 bacilos, quantidade suficiente para induzir uma resposta imune-celular (Smith & Wiegshaus, 1989; Montessori *et al.*, 1996).

A tuberculose pode ser dividida em primária (primo-infecção) e secundária. A forma primária é a que ocorre em indivíduos que ainda não tiveram contato prévio com o bacilo, sendo, portanto, mais comum em crianças. A forma secundária desenvolve-se a partir de uma nova infecção (reinfecção exógena) ou da reativação de bacilos latentes (reinfecção endógena) (Bombarda *et al.*, 2001).

Em geral, uma pequena proporção de pessoas infectadas por Mtb irá desenvolver a tuberculose doença. O indivíduo infectado pode sofrer redução da sua capacidade de resposta à infecção sob algumas condições. Dentre elas estão o uso de corticóides, drogas imunossupressoras, doenças como diabetes *mellitus* e infecção pelo vírus HIV. Nestes casos a probabilidade de desenvolvimento da forma

ativa da doença é maior. Todos os grupos etários são atingidos, embora cerca de 85% dos casos ocorram em adultos e 90% em sua forma pulmonar (Society, 2000; Fiske *et al.*, 2014).

O bacilo tem capacidade de permanecer em estado de latência fisiológica durante longo tempo, dentro de granulomas, assumindo uma condição de parasitismo intracelular. Os indivíduos com infecção latente, ou seja, que não apresentam a doença em sua forma ativa, não podem transmitir os bacilos. Estima-se que 10% das pessoas que adquirem a infecção e não recebem a terapia preventiva irão desenvolver a doença. Para os 90% restantes a infecção permanecerá latente ou será eliminada pelas defesas do organismo (Flynn & Chan, 2005).

3.4 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DA TUBERCULOSE

Após a inalação os bacilos alcançam os alvéolos pulmonares do indivíduo, onde ocorre a fagocitose dos mesmos por macrófagos alveolares e células dendríticas. As células de defesa migram para os linfonodos drenantes e iniciam a tarefa de recrutar e estimular os linfócitos T. Quando as células fagocíticas penetram no parênquima pulmonar, iniciam um foco inflamatório, para onde outros macrófagos serão atraídos. Nesse caso, o acúmulo de células inflamatórias ao redor do microrganismo origina um granuloma. As células T se tornam indispensáveis para a formação de granulomas estáveis, ficando em contato com fagócitos mononucleares e influenciando seu estado de diferenciação e ativação. *Mycobacterium tuberculosis* é contido no granuloma, podendo persistir por décadas, em uma forma latente, sem desencadear a doença (Teixeira *et al.*, 2007). O granuloma é crucial para limitar não só o crescimento das bactérias, mas também danos nos tecidos e sua disseminação.

A fagocitose inicia o estágio de vida intracelular de *M. tuberculosis* dentro do fagossomo. O reconhecimento destas bactérias por células da imunidade inata se dá via receptores de reconhecimento. Os receptores para proteínas do sistema complemento (CR1, CR3 e CR4) podem ser ativados pela ligação da proteína C3b na superfície da bactéria, ativando assim a via alternativa (Aderem & Underhill, 1999). Os receptores de manose também possuem fundamental importância na indução da resposta imune ao interagirem com a lipoarabinomanana presentes na

superfície de Mtb (Aderem & Underhill, 1999). A interação de componentes de Mtb com receptores Toll like (TLR2, TLR4 e TLR9) estimula o recrutamento de moléculas adaptadoras que contém o domínio N-terminal TIR (Receptor Toll II-1). A translocação do fator de transcrição NF- κ B (nuclear fator κ B) para o núcleo pode ser desencadeada por um sinal proveniente de TLR e a via de sinalização pode ser dependente ou independente da proteína adaptadora, denominada fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88). A sinalização MyD88 dependente é compartilhada por todos os TLRs e a ativação independente promove a ativação do NF- κ B por meio de outras duas moléculas adaptadoras TRIF e TRAM. A partir da fusão do fagossomo e do lisossomo, antígenos podem ser processados e posteriormente apresentados aos linfócitos T auxiliares. A ativação dos linfócitos CD4 envolve o reconhecimento do peptídeo ligado ao MHC de classe II e a interação entre moléculas co-estimuladoras, como a interação CD80/CD86-CD28. As células TCD4 são divididas de acordo com o padrão de citocinas que secretam. As células Th1 secretam interleucinas (IL-2, IL-12, IL-18), fator de necrose tumoral (TNF α e TNF β) e interferon-gama (IFN- γ). As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e TGF- β que induzem a diferenciação de linfócitos B, responsáveis pela imunidade humoral, além de regular negativamente a resposta Th1. A IL-12 induz a produção de IFN- γ em células NK, na fase inicial da resposta imune, e também induz a ativação, diferenciação, produção de IFN- γ e expansão de células Th1 antígeno-específicas. Embora a produção de IFN- γ isolada seja insuficiente para controle do Mtb, ele é o principal e mais potente mediador da ativação da capacidade bactericida do macrófago (Doherty & Arditi, 2004; Teixeira *et al.*, 2007; Kawai & Akira, 2010) (FIGURA 1).

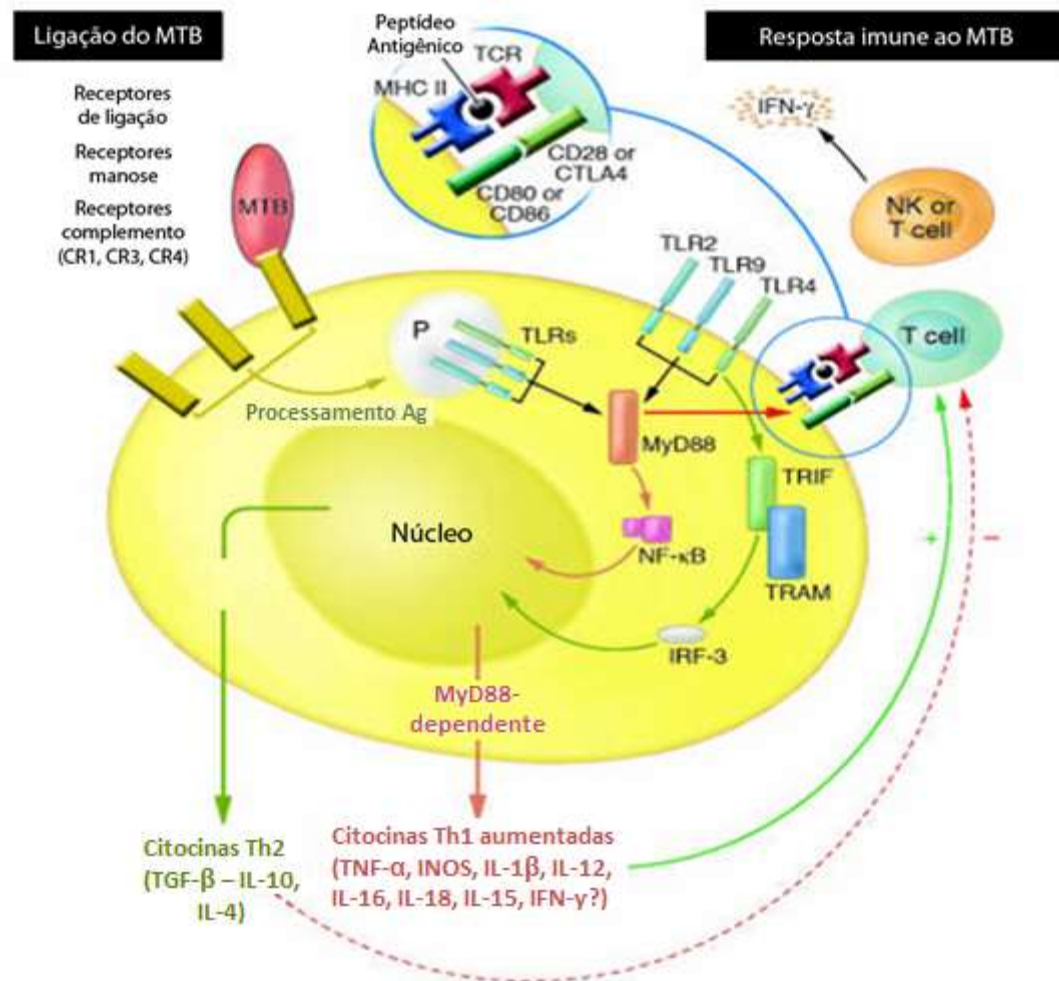


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO ENVOLVIDO NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS T POR MICOBACTÉRIAS
 FONTE: ADAPTADO (Doherty & Arditi, 2004)

3.5 IMUNOGENICIDADE DOS ANTÍGENOS DE SECREÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis*

O genoma de *M. tuberculosis* contém genes para sintetizar aproximadamente 4.000 proteínas. O processo infeccioso da tuberculose e, conseqüentemente, suas respectivas funções e mecanismos de ação se devem a ações de proteínas secretadas por Mtb. Algumas destas proteínas são codificadas na região genômica de *Mycobacterium* sp. A Região de Diferença 1 (RD1) é responsável por parte da virulência bacteriana. Esta região está presente em micobactérias patogênicas, como *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*, e ausente na vacina *M. bovis bacille Calmette-Guérin (BCG)*, *M. avium* e outras micobactérias. A RD1 compreende os genes Rv3871 a Rv3879c, o que inclui os genes codificantes para proteínas CFP10 e ESAT6 (FIGURA 2) (Pym *et al.*, 2002).

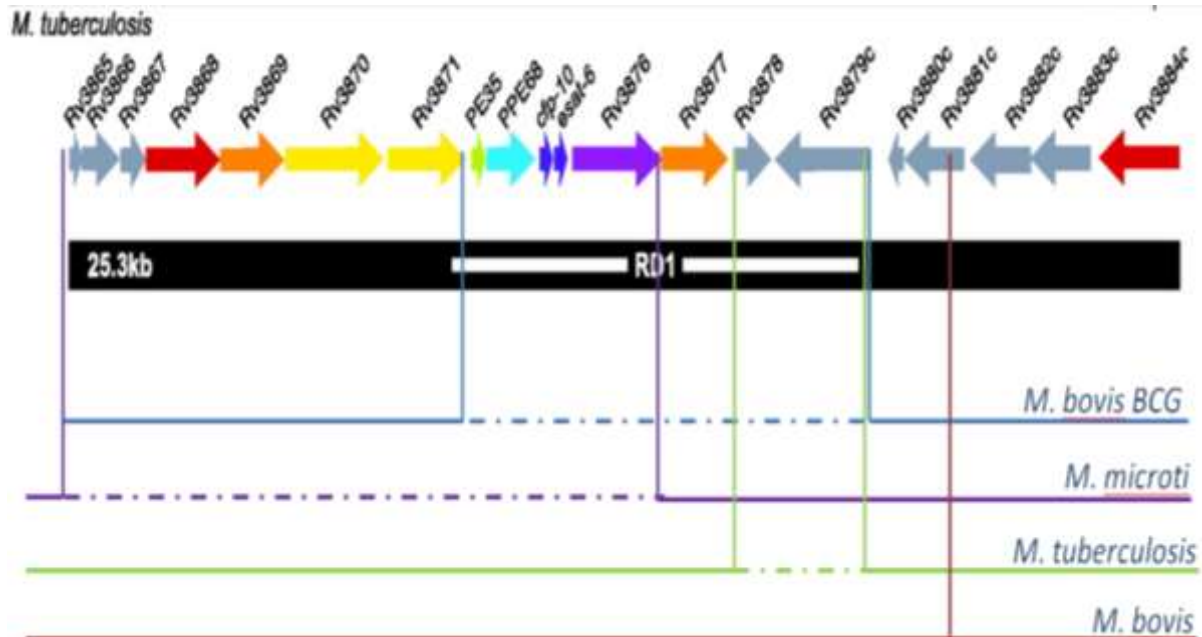


FIGURA 2 - DIAGRAMA DA REGIÃO GENÔMICA DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
 FONTE: O AUTOR

As duas proteínas codificadas, ESAT6 e CFP10, são utilizadas como antígenos específicos, devido a sua capacidade de induzir a ativação de células T durante o início da TB. Estas moléculas apresentam papel em certos estágios do crescimento da micobactéria e na sobrevivência intracelular. Vários estudos demonstram que estes antígenos peptídicos estimulam a resposta de IFN- γ nas células-T de indivíduos infectados com Mtb. Mas, normalmente não em pessoas não infectadas ou vacinadas com BCG, sem a doença ou risco de tuberculose latente (Scholvinck *et al.*, 2004; Lewinsohn *et al.*, 2008; Malaghini *et al.*, 2011). Os indivíduos infectados com organismos do CMT possuem linfócitos no sangue que reconhecem estes e outros antígenos de micobactérias. Este processo de reconhecimento envolve a produção e secreção da citocina IFN- γ . Testes imunológicos relacionados com a quantificação de IFN- γ e resposta celular a antígenos presentes de *M. tuberculosis* e ausentes em *M. bovis* (BCG), vêm sendo desenvolvidos na tentativa de contornar a falta de sensibilidade e especificidade do diagnóstico da tuberculose (Abramo *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2014; Borkowska *et al.*, 2014; Hangai *et al.*, 2014; Pai *et al.*, 2014).

3.6 PREVALÊNCIA DA TUBERCULOSE NO MUNDO

A tuberculose continua sendo um grande problema de saúde pública, acometendo milhões de pessoas a cada ano. É classificada como a segunda principal causa de morte por doenças infecciosas em todo o mundo, atrás somente da infecção por HIV. De acordo com dados do relatório da OMS, em 2012, estimativas globais apontaram 8,6 milhões de novos casos de tuberculose e 1,3 milhões de mortes por tuberculose. A maioria destes casos de tuberculose e mortes ocorreu entre homens, mas a taxa de mulheres infectadas também foi alta. A incidência foi de 2,9 milhões de casos e 410 mil mortes por TB entre mulheres, e 530 mil casos e 74 mil mortes entre crianças (WHO, 2013).

Em 2012, a média mundial do número de mortes foi de (13/100.000 hab.) em pacientes com tuberculose e (17,6/100.000 hab.) em pacientes associados TB-HIV. A variação entre a taxa de mortalidade é considerável entre os países, e vão desde menos de (1/100.000 hab.) em populações dos países da Europa Ocidental, Canadá, Estados Unidos, Austrália e Nova Zelândia. E em outros mais de 40/100.000 hab. como em parte do continente africano, tendo maior incidência na Ásia (Bangladesh, Camboja e Myanmar) (FIGURA 3) (WHO, 2013).

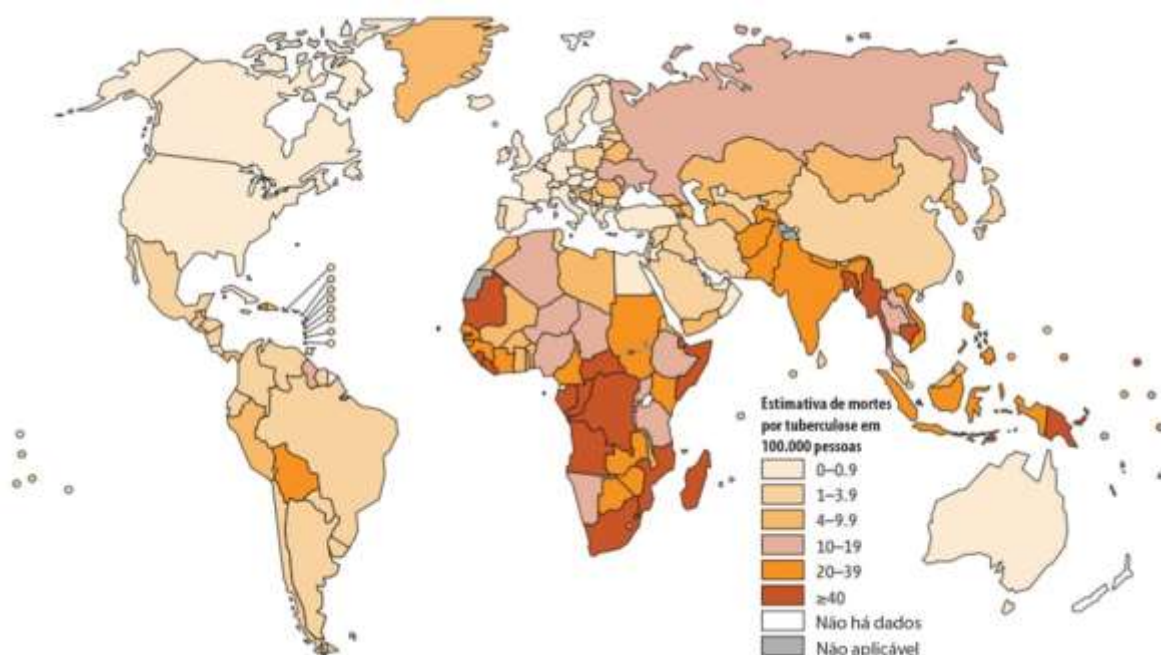


FIGURA 3 – ESTIMATIVA DAS TAXAS DE MORTALIDADE POR TUBERCULOSE EXCLUINDO INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS (2012)

FONTE: (WHO, 2013)

A taxa anual mundial de mortalidade por tuberculose caiu 45% desde 1990, e as taxas de incidência de tuberculose estão caindo na maior parte do mundo. A queda destas taxas vem ocorrendo desde o lançamento de uma nova estratégia internacional para o tratamento e controle da TB pela OMS (1990), chamada estratégia de Tratamento Diretamente Supervisionado (TDO) e o posterior lançamento mundial do plano Stop TB. O TDO constitui uma mudança na forma de administrar o medicamento, sem mudanças no esquema terapêutico. O profissional treinado passa a observar a tomada da medicação do paciente desde o início do tratamento até a sua cura. Estes programas foram responsáveis pelo tratamento de 56 milhões de pessoas com sucesso, entre 1995 e 2012, salvando aproximadamente 22 milhões de vidas (WHO, 2013).

Os cinco países com o maior número de casos incidentes em 2012 foram a Índia (2 a 2,4 milhões), China (0.9 a 1.1 milhões), África do Sul (de 0.4 a 0.6 milhões), Indonésia (0.4 a 0.5 milhões) e Paquistão (0.3 a 0.5 milhões). A Índia e China sozinhas foram responsáveis por 26% e 12% dos casos mundiais respectivamente (FIGURA 4). A proporção de casos de TB associados com HIV foi maior nos países africanos. Segundo a OMS 37% dos casos de tuberculose nesta região são associados com HIV, o que corresponde a 75% dos casos de tuberculose entre pessoas portadoras HIV em todo o mundo (WHO, 2013).

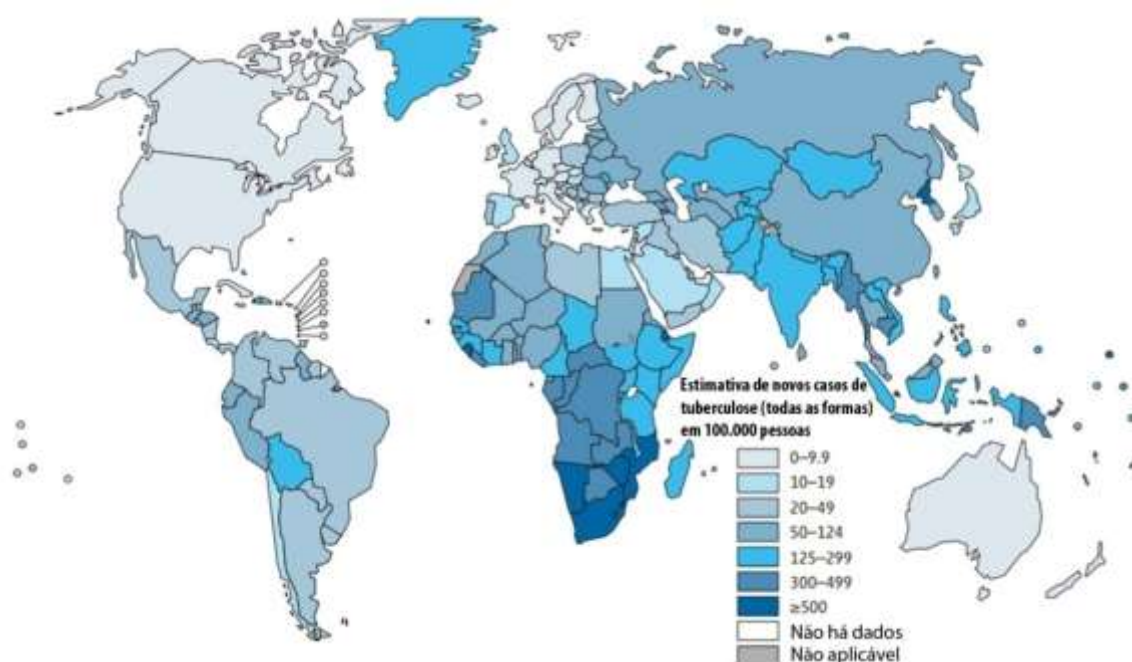


FIGURA 4 – ESTIMATIVA DAS TAXAS DE INCIDÊNCIA DE NOVOS CASOS DE TUBERCULOSE (2012)

FONTE: (WHO, 2013)

Embora o Brasil ocupe a 19ª colocação entre os 22 países que concentram 82% dos casos da doença, o fortalecimento do Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) e do SUS junto com a estratégia TDO trouxeram reduções nas taxas que avaliam a carga da doença na população. Segundo a OMS, em 2012, os coeficientes de incidência e prevalência da doença no Brasil foram de 46/100.000 hab. e 59/100.000 hab. respectivamente. O coeficiente de mortalidade por tuberculose foi de 2,5/100.000 hab. e o percentual de tuberculose/HIV foi de 17%. As FIGURAS 5 e 6 mostram, respectivamente, a prevalência e a mortalidade por tuberculose no Brasil no período de 1990 a 2010 (WHO, 2013).

Dos casos notificados no país, 86,5% são novos, 6,7% são recidiva, 6,6% são reingressos, após abandono do tratamento, e 0,2% fracasso (WHO, 2013). Em 2010, houve aumento na taxa de detecção para 88% dos casos e de cura de 73,6%, uma vez que 62% dos municípios estão aptos para realizar ações de diagnóstico e 75,2% realizaram pelo TDO. Também foi diagnosticado e iniciado o tratamento de 660 casos confirmados de TB multidroga resistente (TB- MDR) (OPAS/OMS, 2010).

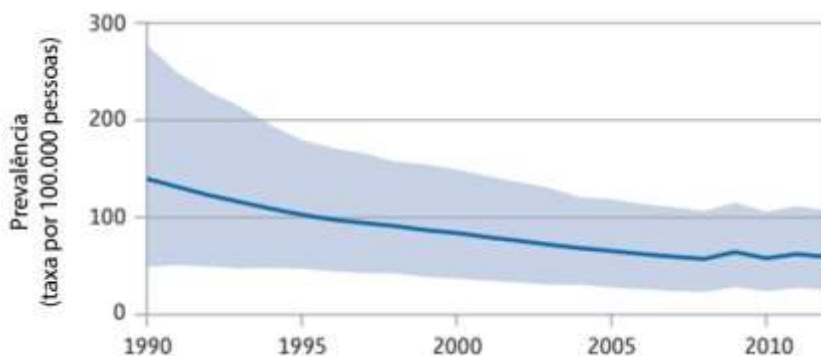


FIGURA 5 – ESTIMATIVA DAS TAXAS DE PREVALÊNCIA DE TUBERCULOSE NO BRASIL (2012)
FONTE: (WHO, 2013)

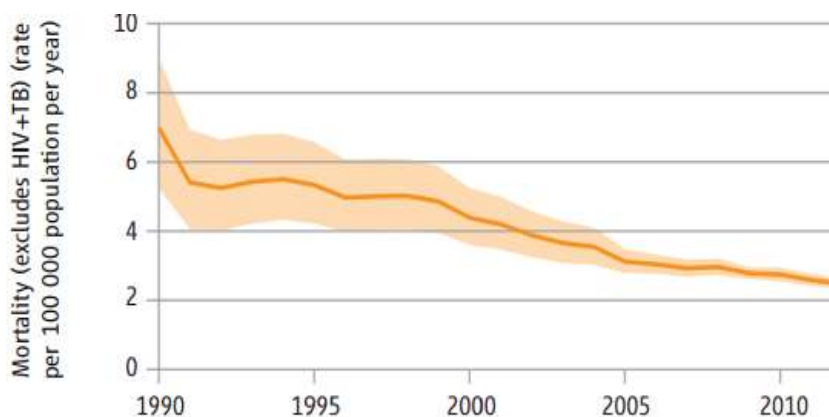


FIGURA 6 – ESTIMATIVA DAS TAXAS DE MORTALIDADE POR TUBERCULOSE NO BRASIL (2012)
FONTE: (WHO, 2013)

3.7 DIAGNÓSTICO

Os sintomas da tuberculose são semelhantes ao de várias outras doenças respiratórias menos graves, o que torna o seu diagnóstico complexo e pode ter um quadro clínico inespecífico. No que concernem os sintomas, a pessoa com tuberculose latente é assintomática, ao passo que a pessoa que desenvolve a tuberculose doença apresenta um quadro clínico que pode ser caracterizado por: tosse ao longo de três semanas, tosse com sangue ou muco, dor no peito, fraqueza ou muito cansaço, perda de peso, falta de apetite, calafrios e febre (Stefan *et al.*, 2008).

O diagnóstico precoce da TB é importante para diminuir a transmissão do agente patogênico e para que a resposta terapêutica ao uso de antimicrobianos seja satisfatória. Especialmente em pacientes imunossuprimidos, como aqueles co-infectados pelo HIV. Entretanto, os avanços realizados nos últimos 50 anos, ainda não solucionaram algumas deficiências no diagnóstico para uso rotineiro. O diagnóstico da tuberculose pode ser obtido por diversos métodos, tais como histórico clínico, baciloscopia, cultivo, exame radiológico, teste tuberculínico, dentre outros. O diagnóstico da tuberculose pulmonar baseia-se no encontro de duas baciloscopias diretas positivas no escarro, uma cultura positiva para *Mtb* ou ainda imagem radiológica sugestiva ou outros exames complementares que, associados a achados clínicos, sugiram a doença. O adequado conhecimento das imagens compatíveis com atividade da tuberculose é, portanto, um recurso importante para o diagnóstico precoce e início de tratamento (Garay, 2004).

3.7.1 Baciloscopia

A baciloscopia do escarro é o método utilizado rotineiramente para a identificação do bacilo álcool-ácido resistente causador da TB. Por ser de execução rápida, fácil e de baixo custo, favorece uma ampla cobertura diagnóstica, identificando a principal fonte de infecção (doentes bacilíferos), permitindo atuação na interrupção da cadeia de transmissão. A baciloscopia, apesar de sua simplicidade e baixo custo, tem a desvantagem de ser negativa em 30 a 50% dos casos de pessoas infectadas. Em parte devido à necessidade da presença de pelo menos 5000 bacilos por mililitro de escarro. Embora menos sensível que a cultura, a

baciloscopia permite a detecção precoce de micobactérias e possibilita ao clínico direcionar os procedimentos necessários, ainda que não possibilite a diferenciação entre espécies. Também é utilizada para acompanhar a eficácia do tratamento por meio da redução bacilar e negatificação do escarro em exames mensais, enquanto o paciente tiver expectoração. No entanto, o exame microscópio do escarro é considerado a mais importante atividade do Programa Nacional de Controle a Tuberculose (PNCT), na busca e detecção de pacientes bacilíferos (BRASIL, 2011).

A pesquisa de bacilos no escarro é feita pela técnica de coloração específica Ziehl-Neelsen (ZN). O ZN é a coloração a quente, com fucsina fenicada, seguida de descoloração com álcool-ácido, fazendo com que somente as micobactérias mantenham a coloração. Devido à capacidade ácido resistente, as micobactérias apresentam-se como bastonetes delgados, ligeiramente curvos, isolados ou em grupos, corados em vermelho com fundo azul. A técnica de fluorescência com auramina apresenta a mesma acurácia do ZN, com tempo de leitura menor. Porém, pouco empregada, pois exige pessoal treinado e tem custo mais elevado. Além disso, as lâminas positivas pela técnica de fluorescência precisam ser confirmadas pelo ZN (Teixeira *et al.*, 2007).

3.7.2 Cultura

A cultura microbiológica é o método bacteriológico mais acurado disponível até o momento para o diagnóstico da tuberculose pulmonar e extrapulmonar. O diagnóstico por meio da cultura pode ser realizado a partir de 10 bacilos por mililitro, geralmente é empregada em casos pulmonares suspeitos e negativos à baciloscopia. Possui a vantagem de permitir a detecção e o isolamento da micobactéria, a identificação da espécie e/ou do complexo isolado, e a determinação da sensibilidade do microrganismo aos quimioterápicos para TB. Os principais meios de cultura utilizados são o de Löwenstein-Jensen e o Middlebrook. Apesar de sua importância, a cultura de Mtb é um processo demorado, pois o bacilo tem um crescimento lento (15-20 h), a detecção ocorre de três a oito semanas e o teste nem sempre apresenta 100% de positividade (Frieden *et al.*, 2003).

Os sistemas automatizados para detecção de micobactérias como o BACTEC e o MGIT são promissores, utilizam meios enriquecidos que promovem a aceleração do crescimento bacteriano, mas podem também indicar resultados falso-

positivos devido à contaminação por outras bactérias. O método automatizado BACTEC 460, possui sistema de detecção radiométrico e utiliza o meio líquido Middlebrook 7H12, acrescido de ácido palmítico marcado com radioisótopos carbono 14 (^{14}C), proporcionando resposta em aproximadamente 7 a 10 dias. Durante o crescimento bacilar, o bacilo utiliza o ácido palmítico no seu metabolismo, liberando CO_2 , cuja concentração é convertida em unidades de crescimento pelo equipamento. Entretanto, apresenta desvantagens, entre estas são relatados resultados falso positivos entre 1,4 e 4%, devido à contaminação com outras espécies durante a leitura pelo equipamento, além do problema em relação ao material radioativo de descarte do teste. O sistema MGIT analisa a detecção do consumo de oxigênio das micobactérias em tubos de ensaio contendo meio líquido Middlebrook 7H9 e o rutênio, metal que funciona como sensor químico fluorescente. Com a redução da concentração de O_2 devido à multiplicação microbiana, o rutênio emite luminescências, detectadas pelo equipamento e convertidas em sinal positivo pelo sistema (Conde, 2009). Resultados descritos por Machado *et al.* (2014), demonstraram a sensibilidade de 90,14%, especificidade de 100% para o teste MAGIT.

3.7.3 Diagnóstico radiológico

O exame radiológico é auxiliar no diagnóstico da tuberculose justificando sua utilização em indivíduos sintomáticos respiratórios, nos casos suspeitos de serem portadores de tuberculose extrapulmonar, nos portadores de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e nos contactantes (intradomiciliar ou extradomiciliar) de pacientes com tuberculose pulmonar. Nos pacientes com suspeita clínica, o exame radiológico permite a diferenciação de imagens sugestivas de TB ou de outra doença, sendo indispensável submetê-los a exame bacteriológico (Conde *et al.*, 2000).

A radiografia de tórax é um método diagnóstico de grande importância na investigação da tuberculose. Diferentes achados radiológicos apontam para a suspeita de doença em atividade ou doença no passado, além do tipo e extensão do comprometimento pulmonar. Deve ser solicitada para todo paciente com suspeita clínica de TB pulmonar. No entanto, até 15% dos casos de TB pulmonar não apresentam alterações radiológicas, principalmente pacientes imunodeprimidos. A

tomografia computadorizada pode ser utilizada para auxiliar, em casos de resultado impreciso na radiografia de tórax, por alterações parenquimatosas mínimas ou por não permitir distinguir lesões antigas das lesões da tuberculose ativa. No entanto, é método de maior custo, restrito aos centros de referência (Teixeira *et al.*, 2007).

3.7.4 Prova tuberculínica

A prova tuberculínica (PT) é um dos exames complementares utilizados no diagnóstico da tuberculose. Consiste na inoculação intradérmica de um derivado de proteína purificado (PPD) de *M. tuberculosis* para medir a resposta imune celular a estes antígenos. Quando positiva após 12 horas da inoculação ocorre o desenvolvimento de eritema e enduração, sendo caracterizada pelo acúmulo perivascular de células T auxiliares CD4 e macrófagos. A secreção local de citocinas (TNF α , IFN- γ e IL8) por essas células inflamatórias mononucleares leva aumento na permeabilidade de microvasculatura, causando edema dérmico e depósito de fibrina; esta é a responsável pela enduração de tecido nessa resposta (FIGURA 7) (Pai *et al.*, 2004).

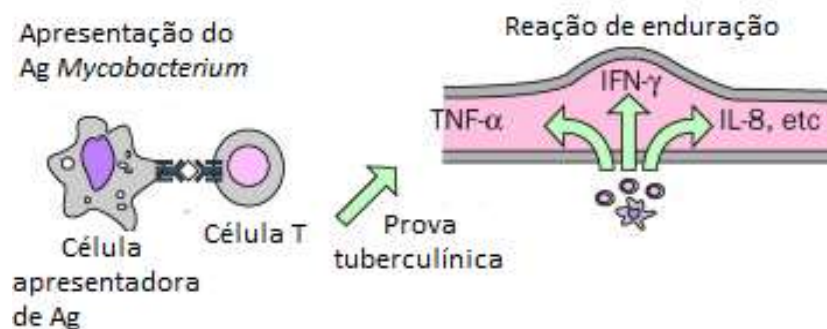


FIGURA 7 – REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA
 FONTE: ADAPTADO (Pai *et al.*, 2004)

No Brasil, a tuberculina utilizada (PPDRT23) é aplicada segundo técnica e material preconizados pela Organização Mundial da Saúde, por via intradérmica, no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, na dose de 0,1 mL equivalente a 2UT (Unidade Tuberculínica) (WHO, 2010).

Esta técnica pode ser utilizada, em adultos e crianças, para o diagnóstico de infecção latente por *M. tuberculosis*. A PT positiva evidencia apenas a infecção por micobactérias, não caracterizando a presença de doença. O resultado do teste deve ser registrado em milímetros. A classificação isolada do resultado em: não reator, reator fraco e reator forte, não é mais recomendada, pois a interpretação do teste e seus valores de corte podem variar de acordo com a população e o risco de adoecimento. Reações falso-positivas podem ocorrer em indivíduos infectados por outras micobactérias ou vacinados pelo BCG, principalmente se vacinados (ou revacinados) após o primeiro ano de vida, quando o BCG produz reações maiores e mais duradouras. Entretanto, a reação tende a diminuir com o passar do tempo, caso a PT for realizada dez anos ou mais após a última vacinação, o efeito da BCG sobre ela poderá ser mínimo (BRASIL, 2011).

A maior desvantagem do PPD é o fato de que a maioria dos componentes protéicos nesta substância é compartilhada entre as espécies de micobactérias ou com espécies não relacionadas de bactérias. A prova tuberculínica quando combinada com exame direto, permite um diagnóstico imediato de infecção TB. No entanto, a interpretação pode apresentar falhas, sendo a maior desvantagem a baixa especificidade do teste e fato que 10-25 % dos pacientes com tuberculose não reagem ao PPD, diminuindo assim a sensibilidade do teste para menos de 50 % em pacientes com doença avançada (Edwards *et al.*, 1969; Huebner *et al.*, 1993).

O produto comercial atualmente disponível para teste cutâneo no Brasil (PPDRT23) é importado da Dinamarca e produzido por meio do cultivo de *M. tuberculosis*. O Mtb é altamente infeccioso e necessita de diversos cuidados relacionados à biossegurança para o cultivo. Além disso, este organismo tem um tempo de replicação bastante longo (60 dias), encarecendo a produção. As dificuldades de obtenção de proteínas a partir de suas fontes naturais propiciam a escolha de outras metodologias de obtenção destas proteínas (Dall' Stella *et al.*, 2007; Malaghini *et al.*, 2011). A produção de proteínas por tecnologia recombinante oferece uma plataforma relativamente barata, aplicável industrialmente podendo ser realizada em células bacteriana convencionais sem risco infeccioso (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de testes de pele para diagnóstico *in vivo* de TB com maior especificidade e sensibilidade, utilizando antígenos recombinantes específicos para *M. tuberculosis* e não encontrados em *M. bovis* BCG ou micobactérias do meio

ambiente, pode representar uma ferramenta útil para um diagnóstico preciso e pode ajudar na prevenção e controle da doença. Estudos relatam o desenvolvimento de tuberculina composta por proteínas recombinantes específicas para Mtb, que permite a discriminação de tuberculose latente e a vacinação com BCG, evidenciando bons resultados de sensibilidade e especificidade (Lyashchenko *et al.*, 1998; Stavri *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014).

3.7.5 Testes imunológicos – Ensaio para detecção de Interferon gama (IGRAs)

A nova geração de testes de base imunológica que utiliza amostras de sangue para o diagnóstico da tuberculose latente denomina-se teste de interferon-gama (IGRAs). O IGRAs depende da resposta do hospedeiro à infecção pelo Mtb, que consiste na dosagem da produção de IFN- γ em resposta à estimulação por antígenos específicos de Mtb, como a proteína CFP10, ESAT6 e TB7.7 (Pai *et al.*, 2004). Os kits reconhecidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) são: Elispot-TB e o Quantiferon TB GOLD e sua variável, Quantiferon TB GOLD *in tube* (forma do Quantiferon QTF) (TABELA 1).

Embora o campo de pesquisa para o IGRAs esteja expandindo e evoluindo rapidamente, uma série de conclusões gerais pode ser retirada a partir de dados disponíveis na literatura. Estudo publicado demonstrou claramente que o IGRAs não reage com a vacina BCG e são mais específicos que a PT no diagnóstico de doença Latente. Em indivíduos imunocomprometidos infectados por HIV, o Elispot é superior ao Quantiferon, devido à sensibilidade mais elevada e resultados indeterminados inferiores. Em indivíduos com doenças inflamatórias imunes, submetidos à terapia imunossupressora, os kits Elispot e Quantiferon parecem ter eficácia comparável (Lalvani & Pareek, 2010).

As principais vantagens em relação ao teste IGRAs seriam a obtenção do diagnóstico, de no máximo 24 horas, com uma coleta de sangue apenas na primeira consulta, ausência do efeito *booster* do teste tuberculínico, não interferência do tempo de aplicação da vacina BCG e melhor sensibilidade que a prova tuberculínica (Babayigit *et al.*, 2014). No caso do kit Quantiferon, as sensibilidades variam de 58% a 80% e do kit Elispot de 62% a 93%, com especificidade de 97% e 92% respectivamente. Porém considera-se que estas sensibilidades sejam sub ótimas. É

difícil determinar a sensibilidade do IGRAs, pela falta de padrão ouro para o diagnóstico da tuberculose latente. Em áreas endêmicas para a TB, sua utilização para o diagnóstico é inviável, devido a sua incapacidade de discriminar a TB Ativa da TB latente (Pai *et al.*, 2004).

Esses testes ainda não são recomendados para uso na rotina diagnóstica de TB ativa e/ou latente em nosso meio.

TABELA 1 - SEMELHANÇAS E DIFERENÇAS ENTRE O ELISPOT-TB E QUANTIFERON TB GOLD *in tube*

Característica	Elispot-TB	Quantiferon TB GOLD <i>in tube</i>
Antígeno	ESAT6 e CFP10	ESAT6, CFP10 e TB 7.7
Controle Positivo	Sim	Sim
Unidades de Leitura	Células formadoras de <i>spot</i> (SFC) IFN- γ	Unidades internacionais (UI) de IFN- γ
Plataforma Tecnológica	Elispot	ELISA
Amostra	Células mononucleares de sangue periférico	Sangue total
Medição de Resultado	Número de células T produzindo IFN- γ	Concentração de IFN- γ produzido por células T
Sistema de Leitura	Contagem de <i>spots</i> a olho nu, lentes de aumento ou leitora automatizada	Leitura de valores de densidade óptica usando uma leitora automatizada
Procedimentos Técnicos em Laboratório de Diagnóstico	Separação, contagem e dosagem de células mononucleares de sangue periférico em poços de Elispot são necessárias antes da incubação	Tubos nos quais foi feita a retirada de sangue são incubados diretamente sem procedimentos adicionais
Especificidade	93%	96%
Sensibilidade	90% (maior que a prova tuberculínica)	70% (similar à prova tuberculínica)
Resultados Indeterminados	0.5–4% (menos afetados por imunossupressão)	5–40% (mais indeterminados se imunossuprimidos ou idosos)

FONTE: (Lalvani & Pareek, 2010)

3.7.6 Teste plataforma GeneXpert

Desenvolvido pela empresa norte-americana Cepheid em parceria com uma organização internacional sem fins lucrativos, o diagnóstico *GeneXpert*, consiste em uma máquina e um recipiente onde é colocada a amostra com secreção respiratória do paciente. O *GeneXpert*, é indicado tanto para o diagnóstico da tuberculose

multirresistente quanto para a doença em pacientes também infectados pelo HIV, constitui a tecnologia mais recente descoberta e endossada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013).

O *Xpert® MTB/RIF*, é um teste molecular e atualmente único. Consiste na amplificação de ácidos nucleicos por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para detecção de *M. tuberculosis*, especificamente do gene *rpoβ*, além de triar cepas resistentes a fármacos (rifampicina). A diferença deste para os demais testes de amplificação de ácidos nucleicos utilizados, para detecção de TB, é que a plataforma do dispositivo de teste o *GeneXpert*, integra e automatiza os três processos (preparação de amostras, amplificação e detecção), necessários para a PCR em tempo real baseada em testes moleculares. O teste pode fornecer resultados em menos de 2 horas, sem necessitar de tratamento da amostra ou de recursos humanos especializados em biologia molecular. Os resultados são gerados automaticamente na tela e relatados como *M. tuberculosis* negativos ou positivos (com estimativas semi-quantitativas da concentração de Mtb relatadas como baixa, média ou alta) e sensível ou resistente à rifampicina. Um resultado positivo não necessariamente indica a presença de organismos viáveis, tendo em vista que a PCR identifica material genético de microrganismos vivos ou mortos.

Os resultados de sensibilidade e especificidade para o teste *Xpert® MTB/RIF*, apresentados no Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologia em Saúde (2011), variaram conforme o status dos exames bacteriológicos (baciloscopia e cultura) realizados com as amostras. A sensibilidade do teste no grupo de amostras com resultados positivos para baciloscopia e para cultura variou de 98,0% a 100%. No grupo de amostras com resultado negativo para baciloscopia e positivo para cultura, a sensibilidade do *Xpert® MTB/RIF* foi menor, variando de 57% a 78%.

Esses testes já são comercializados na área privada em países de nível intermediário de desenvolvimento econômico, e estão sendo implementados em centros nacionais de referência para tuberculose (SUS) no Brasil (BRATS, 2011; Osman *et al.*, 2014).

3.8 TRATAMENTO

A prevenção da tuberculose é feita com a vacina BCG e é motivo de controvérsias entre diversos estudos (Dourado *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2007). Entretanto, no Brasil esta é utilizada para prevenir os tipos graves de tuberculose, fazendo parte do calendário de vacinação.

A tuberculose é uma doença curável em praticamente 100% dos casos novos, sensíveis aos medicamentos anti-TB, desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e a adequada operacionalização do tratamento. A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os princípios básicos para o adequado tratamento evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, assegurando, assim, a cura do paciente. A esses princípios soma-se o tratamento diretamente observado como estratégia fundamental para o sucesso do mesmo.

O tratamento dos bacilíferos é a atividade prioritária de controle da tuberculose, uma vez que permite interromper a cadeia de transmissão (Lehninger, 2011). Em 1979, o Brasil preconizou um sistema de tratamento para a TB composto pelos fármacos: Rifampicina (R), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z), Etambutol (E) Etreptomicina (S), Etionamida (ET). Seguido pelos tratamentos, Esquema I (2RHZ/4RH) para os casos novos; Esquema I reforçado (2RHZE/4RHE) para retratamentos; Esquema II (2RHZ/7RH) para a forma meningo-encefálica e; Esquema III (3SZEET/9EET) para tratamento de falências terapêuticas. Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, juntamente com o seu comitê técnico assessor reviu o sistema de tratamento da TB no Brasil. Com base nos resultados preliminares do segundo inquérito nacional de resistência aos medicamentos antiTB, que mostrou aumento da resistência primária à Isoniazida de 4,4 para 6,0%, introduz o Etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do esquema básico. A apresentação farmacológica deste esquema passou a ser em comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos (RHZE), nas dosagens: Rifampicina 150 mg, Isoniazida 75 mg, Pirazinamida 400 mg e Etambutol 275 mg. Essa recomendação e apresentação farmacológica são as preconizadas pela OMS e utilizadas na maioria dos países, para adultos e adolescentes. Para as crianças (abaixo de 10 anos), permanece a recomendação do Esquema (RHZ). Outras mudanças no sistema de

tratamento da tuberculose são a extinção do Esquema I reforçado e do Esquema III. Para todos os casos de re-tratamento é solicitada cultura, identificação e teste de sensibilidade, iniciando-se o tratamento com o Esquema básico, até o resultado desses. Os casos que evoluem para falência do tratamento devem ser criteriosamente avaliados quanto ao histórico terapêutico, adesão aos tratamentos anteriores e comprovação de resistência aos medicamentos. Tais casos receberão o Esquema Padronizado para Multirresistência ou Esquemas Especiais individualizados segundo a combinação de resistências apresentadas pelo teste de sensibilidade (BRASIL, 2011).

3.9 EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM *Escherichia coli*

A Tecnologia do DNA recombinante é um importante mecanismo de junção ou combinação de dois fragmentos de DNA de dois organismos diferentes. Com esse processo é possível produzir diversas substâncias em larga escala. A síntese de proteínas recombinantes é induzida por fatores de expressão que fornecem instruções para que os genes sejam transcritos e traduzidos pela célula. Estes fatores incluem um promotor, um local de ligação no ribossomo e um terminador, contidos em vetores de expressão (Lehninger, 2011).

Os sistemas de expressão mais utilizados na indústria farmacêutica são os procariontes, representados por *Escherichia coli*, eucariontes por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*) e células de mamífero (*CHO* e *BHK*) (Kleinberg & Mosdell, 2004). A *E. coli* é o microrganismo de primeira escolha para expressão heteróloga. Comparado aos demais, oferece diversas vantagens: cresce em meio de cultivo de baixo custo, possui rápido acúmulo de biomassa, alto rendimento de produção, podem ser modificadas e não são patogênicas, além de permitirem um processo de escalonamento simplificado. Contudo, devido a sua natureza procariótica, o sistema apresenta limitações no processo de modificações pós-traducionais de proteínas, o que limita o tipo farmacoterápico produzido. Além disso, muitas vezes em um processo de expressão citoplasmática há dificuldade em obter a proteína em sua conformação correta original, além da proteína não sofrer glicosilação (Sawers & Jarsch, 1996; Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). Para muitos produtos, esse processo de glicosilação não é necessário, tornando a *E. coli* um

excelente sistema de expressão citoplasmático, como é o caso das proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6 de *M. tuberculosis*.

3.9.1 Corpúsculos de inclusão e remoção de lipopolissacarídeos

No processo de expressão protéica em *E. coli*, o mais desejável é obter a proteína recombinante na sua forma solúvel e com sua conformação estrutural correta. O alto nível de expressão citoplasmática pode resultar na formação de agregados insolúveis conhecidos como corpúsculos de inclusão. No caso da expressão ocorrer na forma de corpúsculo de inclusão, uma tentativa é solubilizar a proteína recombinante a partir do material insolúvel e modificar as estratégias de expressão para se obter maior quantidade de proteína solúvel. Em *E. coli* recombinantes, a proteína alvo é o componente básico dos corpos de inclusão, contudo, outras proteínas contribuem para a sua formação, ainda que em menor quantidade. A agregação de proteínas recombinantes está envolvida com a presença limitada de chaperonas quando ocorre alto nível de expressão. A alta quantidade de proteína produzida conduz a deposição, que ocorre devido à associação intermolecular entre as superfícies hidrofóbicas expostas antes da conformação final da proteína. Soma-se a isto o fato de que estas proteínas não processadas são resistentes à degradação proteolítica o que acelera a formação destes corpúsculos (Villaverde & Carrio, 2003; Sorensen & Mortensen, 2005).

O processo de rompimento celular, para solubilização dos corpúsculos de inclusão, gera uma grande quantidade de lipopolissacarídeos (LPS), derivados da membrana celular de *E. coli*. Um problema frequente da produção de proteínas recombinantes por bactérias é a presença de altas concentrações de endotoxinas. Embora as endotoxinas estejam ligadas no interior da parede bacteriana, sua liberação não ocorre somente com a ruptura e morte celular, mas também durante o crescimento e divisão celular. A presença de endotoxinas induz uma grande variedade de efeitos patofisiológicos. Quando presente em biofármacos pode induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos, ocasionando no paciente reações inflamatórias sistêmicas, febres, choque séptico e até a morte (Magalhaes *et al.*, 2007).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o limite estabelecido de endotoxinas em preparações injetáveis para uso humano é de 5,0

Unidades de Endotoxinas (EU) por mililitro (mL). A quantidade de LPS necessários para uma resposta pirogênica, corresponde a doses de 1 a 10 ng/Kg (Daneshian *et al.*, 2006). Diferentes processos têm sido desenvolvidos para a remoção de LPS a partir de proteínas com base nas propriedades moleculares únicas das moléculas de endotoxina. Estes incluem resinas de afinidade à LPS, extrações em duas fases, ultrafiltração, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca iônica, e membranas adsorventes (Lin *et al.*, 2005).

Dentre as técnicas de purificação mais utilizadas estão as colunas de afinidade que utilizam esferas porosas de celulose ligada com ϵ -poli-L-lisina, a polisina tem uma elevada afinidade para endotoxinas com capacidade de ligação de 2 milhões unidades de endotoxina (UE)/mL e a extração em sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA). Este método de extração líquido-líquido explora o fato de algumas moléculas de tensoativos, sob determinadas condições, serem capazes de se separarem espontaneamente em duas fases aquosas, ainda que imiscíveis, sendo uma destas fases rica em micelas e a outra não. As endotoxinas são acomodadas na estrutura micelar por interações não-polares de cadeias do componente lipídico (A) e os grupos de cauda surfactante são conseqüentemente separados da fase aquosa (Magalhaes *et al.*, 2007).

Devido à heterogeneidade dos produtos de uso farmacêutico com potencial presença de LPS, diferentes técnicas foram desenvolvidas com o intuito de dosar endotoxina. Dentre estas o teste de LPS por meio do Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL), LAL por *gel clot* e LAL método turbidimétrico e cromogênico.

3.9.2 Estratégias para uma eficiente expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

A expressão de genes heterólogos é influenciada por diversos fatores dentre os quais se destacam a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA), a força do promotor, a eficiência de transcrição e tradução, as modificações pós-traducionais, a estabilidade e solubilidade da proteína recombinante, a estabilidade do plasmídeo, o número de cópias do plasmídeo, bem como a célula hospedeira e as condições de cultivo (Sawers & Jarsch, 1996; Popov *et al.*, 2011).

3.9.2.1 Promotores

A regulação da expressão gênica requer um sistema de indução ou repressão, portanto, todos os sistemas de expressão estão sob controle de promotores.

A produção de proteínas recombinantes por em *E. coli* pode ser reduzida devido a ação de proteases e ou degradação do mRNA da proteína. Linhagens como *BL21* são mutantes no gene que codifica a RNase E (*rne 131*), ou seja, esses sistemas recombinantes de expressão apresentam maior estabilidade do mRNA, favorecendo a tradução da proteína (Lopez *et al.*, 1999). Outro ponto importante para obter elevadas quantidades de proteínas recombinantes está relacionado aos sistemas de expressão fortes, os quais são regulados ao nível da transcrição e utilizam promotores de indução tais como P_{lac} , λP_L e λP_R ou o promotor da T7 RNA polimerase (Vicente *et al.*, 1999). Um bom promotor deve ser forte, regulado, de simples indução, baixo custo e independente dos componentes normalmente utilizados no meio de cultura. Para alcançar altas concentrações de proteína, vários plasmídeos utilizam o sistema de promotor do bacteriófago T7 RNA polimerase.

3.9.2.2 Estabilidade do plasmídeo

A principal dificuldade na aplicação de cepas recombinantes para produção de proteínas é a estabilidade do plasmídeo, durante um longo período de cultivo. A estabilidade do plasmídeo e o número de cópias são um dos fatores cruciais do rendimento de proteínas recombinantes. O número de cópias do plasmídeo determina a quantidade de genes disponíveis para a expressão, portanto alto número de cópias do plasmídeo proporciona maior produtividade. Entretanto, a grande quantidade de plasmídeo aumenta a carga metabólica da célula levando a instabilidade do mesmo. A instabilidade plasmidial pode ser dividida em duas categorias. A primeira, instabilidade segregacional, surge devido a perda completa do plasmídeo por um defeito na segregação do DNA plasmidial entre as células filhas durante a divisão celular, resultando na perda desse plasmídeo para uma das células. A segunda é a instabilidade estrutural, definida pela mudança da estrutura do plasmídeo, devido à inserção, deleção ou rearranjo do DNA, que pode resultar na

perda da função desejada do gene. A desigual distribuição desses plasmídeos durante a divisão celular resulta no aumento de células sem plasmídeo. As células livres de plasmídeos ancorados apresentam vantagem na velocidade de crescimento sobre as células com plasmídeo (Nayak & Vyas, 1999; Popov *et al.*, 2011).

Algumas metodologias são utilizadas para amenizar os problemas da instabilidade segregacional. O uso de alguns genes de resistência a antibióticos no plasmídeo, seguido pela adição do antibiótico correspondente ao meio de cultura permite a pressão seletiva das células com plasmídeo. Entretanto, o crescimento de células sem plasmídeo ancorado não é totalmente inibido, uma vez que a concentração do antibiótico utilizado para a seleção do plasmídeo diminui durante o cultivo a longo prazo. Como resultado da diluição e/ou degradação enzimática por células em crescimento (Hagg *et al.*, 2004).

Há uma forma indireta de se quantificar células com e sem plasmídeo, que consiste no crescimento das bactérias, fermentadas em meio solidificado, com e sem seletores de crescimento, que geralmente são antibióticos. As células que crescem em meio com seletores possuem o plasmídeo ancorado, as células que crescem em meio sem seletores são o total. Relacionando esses valores, determina-se a porcentagem de células capazes de expressar proteína (Yee & Blanch, 1993).

3.9.2.3 Condições de cultivo

Além de explorar as características genéticas das cepas de *E. coli* e dos plasmídeos utilizados, técnicas de melhoramento das condições de cultivo de alta densidade celular tem sido desenvolvidas para maximizar o rendimento da proteína de interesse. Alguns destes fatores são relacionados às condições de cultivo: concentração de IPTG, temperatura, concentração do indutor, meio e concentração de oxigênio dissolvido, pH e o modo de operação do cultivo.

A composição do meio de cultivo pode afetar a estabilidade plasmidial por meio de diferentes rotas metabólicas e sistemas regulatórios, isto porque a composição do meio influencia as atividades metabólicas da célula. Segundo Gupta *et al.* (1995), meios de cultura mais complexos levam a diminuição da estabilidade plasmidial. Sabe-se também que cultivos em meios mínimos apresentam menor segregação plasmidial que aqueles em meios com aminoácidos e glicose (Friebs,

2004). Quando adicionado IPTG, ao meio de cultura para indução da expressão da proteína recombinante, pode ocorrer diminuição da estabilidade plasmidial, devido ao seu efeito tóxico para a célula. O que pode acarretar na diminuição da velocidade de crescimento e uma elevada síntese de proteínas de estresse. Os dados mostrados por Xu *et al.* (2006), indicam que a instabilidade plasmidial é muito mais dependente da indução em si do que da presença do antibiótico (pressão seletiva). Além disso, o modo de indução do promotor também tem grande influência sobre a estabilidade.

A temperatura é outra importante variável que pode ser utilizada no controle do metabolismo celular. Quando ocorre diminuição da temperatura no meio de cultivo, ocorre uma redução na captação de nutrientes, na velocidade de crescimento do microrganismo, diminuição da formação de metabólitos e redução da demanda de oxigênio. O nível de oxigênio e pH do meio têm igualmente grande efeito no metabolismo dos microrganismos. De um modo geral, a perda do plasmídeo aumenta com a diminuição da taxa de oxigenação (Lee, 1996).

3.10 BIOTECNOLOGIA E PERSPECTIVAS PARA O BRASIL

Existem diversas definições para Biotecnologia, como "Se trata da aplicação de princípios científicos e de engenharia no processamento de materiais por agentes biológicos". Ou, da aplicação industrial de organismos, sistemas e componentes biológicos para produção de bens e serviços de valor agregado. Suas principais aplicações na indústria farmacêutica são: desenvolvimento e produção de biofármacos; desenvolvimento e produção de kits e reagentes para diagnóstico; desenvolvimento e produção de vacinas; terapia gênica; e terapia celular ou de reposição de órgãos e tecidos (Fardelone & Branchi, 2006).

A biotecnologia no Brasil tem se mostrado predominantemente acadêmica e as empresas são em sua maioria pequenas, nascidas em universidades ou incubadoras (Fardelone, 2006). A falta de competitividade em produtos de alto valor agregado fez com que o mercado nacional se tornasse totalmente dependente das importações. A dependência tecnológica produtiva e, conseqüentemente econômica, com relação aos insumos e produtos estratégicos para a saúde tem se acentuado de forma crítica na última década. O déficit da balança comercial aumentou de US\$ 700 milhões por ano no final dos anos 80, para um patamar superior a US\$ 5 bilhões ao

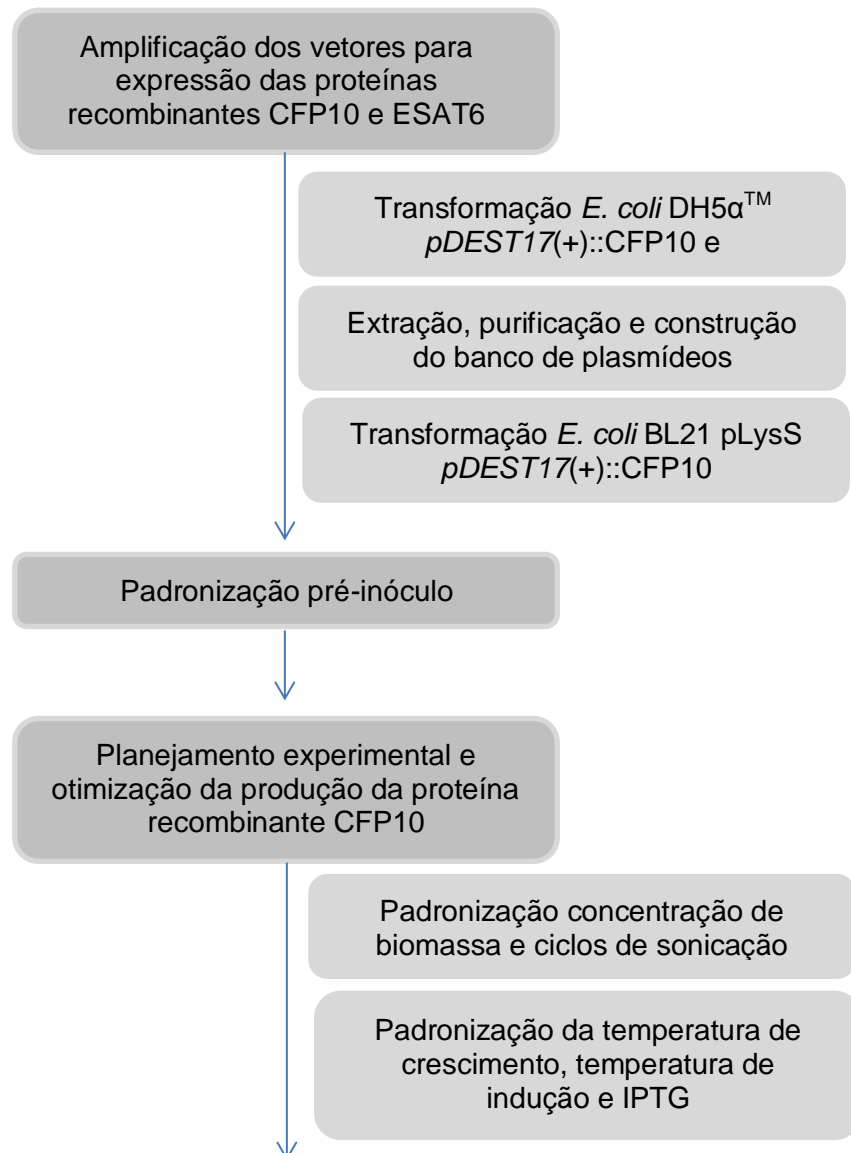
ano na atualidade. Devido a estes problemas, em 2012, o programa de Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação reafirmou a prioridade do segmento de fármacos e do complexo produtivo da saúde como um todo. A Estratégia enfatiza a necessidade de promoção de mecanismos de estímulo à inovação em saúde e de intensificação da transferência tecnológica para os laboratórios públicos nacionais. Além disso, aponta uma série de lacunas da base produtiva inovativa nacional que precisam ser superadas (Gadelha & Costa, 2012).

O Brasil é autossuficiente na produção de vacinas contra sarampo, difteria, tétano, coqueluche, caxumba, hepatite B meningite meningocócica A e C e febre amarela. Os únicos biofármacos nacionais são alfaepoetina (indicada no tratamento da anemia associada à insuficiência renal crônica) por BioManguinhos e alfainterferona 2b (tratamento de hepatites crônicas) pela Fundação Fiocruz, sendo os demais medicamentos comercializados para o Brasil por empresas transnacionais, como é o caso do INF- β 1b produzido pela Bayer. O Brasil também tem procurado incorporar as novas tecnologias na produção de vacinas, a exemplo da técnica do DNA recombinante (MS, 2010). Pesquisadores da Fiocruz estão desenvolvendo uma vacina gênica contra a dengue. Existem ainda iniciativas no setor privado, como é o caso da empresa RD Biotec que, em parceria com a Universidade de São Paulo, está desenvolvendo uma vacina gênica contra a tuberculose. Porém a grande maioria de imunobiológicos ainda são importados. Isto também se aplica às doenças tropicais – como, malária, tuberculose, dengue dentre outras que, de forma geral, são negligenciadas por grandes laboratórios (Fardelone & Branchi, 2006).

Outro fator de dificuldade que os pesquisadores se deparam é com a burocracia e o tempo para desenvolvimento de novos insumos ou fármacos. Normalmente o desenvolvimento de um novo produto demanda um longo período, que chega até 10 anos, e esse tem que passar por avaliações severas e regulamentadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Visando a expressão em biorreator das proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6, para utilizá-las no diagnóstico da tuberculose. O fluxograma abaixo descreve resumidamente as etapas deste trabalho apresentado na FIGURA 8.



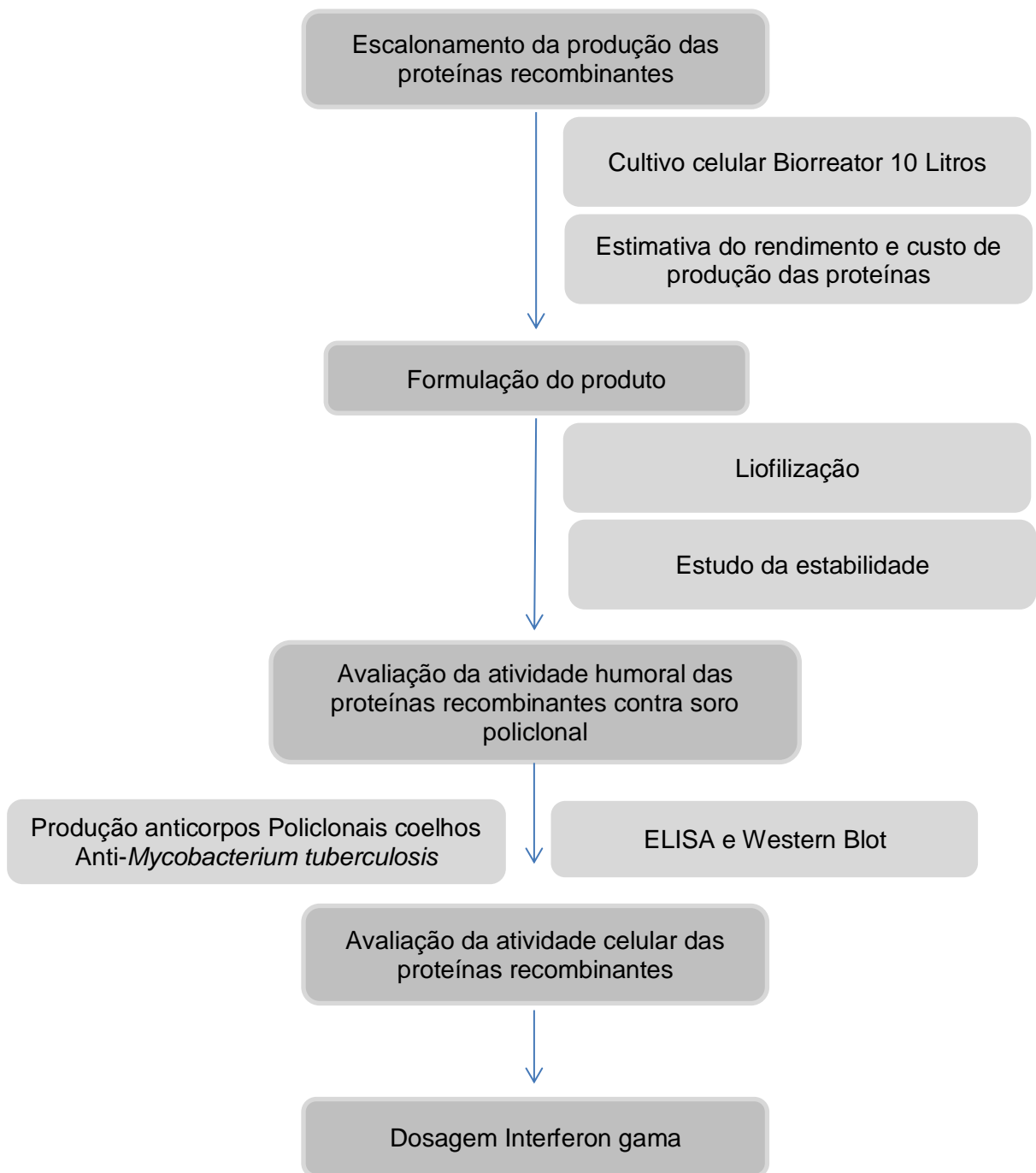


FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DA ABORDAGEM METODOLÓGICA DA TESE

4.1 OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DOS VETORES PARA A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CFP10 E ESAT6 DE *Mycobacterium tuberculosis*

Os plasmídeos de expressão, com as sequências codificantes das proteínas CFP10 e ESAT6 de *M. tuberculosis* foram desenvolvidos por Malaghini *et al.* (2008) e Malaghini *et al.* (2011) e fornecidos pela Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol, do Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. As sequências nucleotídicas dos insertos clonados são reportados no ANEXO 5.

Para a expressão heteróloga destas proteínas em *E. coli*, Malaghini *et al.* (2011) utilizaram o vetor de destino *pDEST™17* (Invitrogen). Estes plasmídeos foram amplificados e purificados com auxílio do kit comercial QIAGEN Maxi Plasmid Kit, conforme protocolo descrito pelo fabricante.

4.1.1 Preparo de células competentes *Escherichia coli* linhagem *DH5α™* e *BL21 pLysS* com cloreto de cálcio (CaCl_2).

Para amplificação dos plasmídeos de expressão das proteínas CFP10 e ESAT6, fez-se necessário a construção de um banco de células competentes. Para tornar as células quimiocompetentes, uma única colônia (*DH5α™* e *BL21 pLysS*) oriundas do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), foram inoculadas separadamente em 20 mL de meio LB (10 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ de NaCl), e incubadas a 37°C, com agitação de 150 rpm até atingirem absorvância de $0,5 \pm 0,1$ ($A_{600\text{nm}}$). O fermentado foi centrifugado a 3.000 g, 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspenso em 20 mL de solução (0,1 M de MgCl_2) a 4°C. Nova centrifugação, nas mesmas condições citadas acima, foi realizada e o sedimento ressuspendido em 20 mL de 0,1 M de CaCl_2 . A solução foi mantida durante 30 minutos a 4°C com agitação eventual, seguida de centrifugação 3.000 g. Ao sedimento foi acrescido 1 mL de LB e 150 µL de glicerol anidro (15%). A solução foi homogeneizada e alíquotas contendo 100 µL foram congeladas a -80°C (Graham & van der Eb, 1973).

4.1.2 Amplificação dos plasmídeos recombinantes *pDEST17(+):CFP10* e *pDEST17(+):ESAT6*

4.1.2.1 Transformação da bactéria competente *Escherichia coli* DH5 α TM com *pDEST17(+):CFP10* e *pDEST17(+):ESAT6*

A transformação da *E. coli* foi realizada partindo-se de 100 μ L de uma ampola (*DH5 α TM* competente) e adicionou-se 10 ng do plasmídeo *pDEST17(+):CFP10* e 10 ng do plasmídeo *pDEST17(+):ESAT6*, separadamente.

As células foram então mantidas por 30 minutos em banho de gelo, incubadas em banho-maria a 42°C durante 90 segundos e retornando ao gelo por mais três minutos. Após a transformação as células foram cultivadas em 1 mL de meio LB, agitação de 150 rpm, a 37°C durante 1 hora. Em seguida 100 μ L da cultura foi semeada, por técnica de espalhamento, em placa de Petri contendo ágar LB_A (Cloranfenicol 25 mg.L⁻¹ e ampicilina 100 mg.L⁻¹) e incubada a 37°C durante 24 horas. Uma das colônias, crescidas em placa de Petri, foi inoculada em 2 mL de meio LB_A, incubada nas mesmas condições de temperatura e agitação descritas acima durante 8 horas.

4.1.2.2 Extração e purificação dos plasmídeos *pDEST17(+):CFP10* e *pDEST17(+):ESAT6*

A cultura de clones selecionados foi centrifugada a 6.000 g, 4°C durante 15 minutos. Para purificação do plasmídeo utilizou-se o kit (QIAGEN Plasmid Maxi Purification Handbook), segundo protocolo descrito pelo fabricante. A análise da purificação foi realizada por meio do tamanho do DNA plasmidial. Utilizou-se 2 μ L das diferentes frações do processo de purificação em gel de agarose 1%, utilizou-se 1,0 μ g/L de brometo de etídio em água deionizada durante 20 minutos para coloração, seguido de descoloração em água deionizada durante 15 minutos. Após a análise da purificação dos plasmídeos estes foram utilizados no processo de transformação da BL21 *pLysS*.

Os plasmídeos foram quantificados utilizando espectrofotômetro GeneQuant DNA/RNA (Pharmacia, LKB Biotechnology, USA) nos comprimentos de onda 260 e

280 nm, aliquotados para montagem do banco de plasmídeos e armazenados a -80°C.

4.1.3 Transformação da bactéria competente *Escherichia coli* BL21 pLysS.

As células utilizadas para a transformação e expressão das proteínas recombinantes (CFP10 e ESAT6) foram *E. coli* BL21pLysS. O procedimento empregado na transformação destas células competentes foi o mesmo descrito no item 4.1.2.1.

4.2 PADRONIZAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO

Devido à influência da preparação do pré-inóculo nos resultados do crescimento celular, torna-se importante e necessária a padronização das operações envolvidas neste processo.

O conjunto de ensaios foi realizado com o objetivo de conhecer a cinética de crescimento dos clones recombinantes, analisar a estabilidade plasmidial e verificar o melhor tempo para inoculação. Foram utilizadas duas concentrações de bactérias recombinantes (A – 1:1000 e B – 1:10000) nos inóculos fermentados.

4.2.1 Preparo de banco de inóculo BL21-CFP10 e BL21-ESAT6.

Uma colônia das células transformadas proveniente do cultivo em ágar LB_A foi distintamente inoculada em 10 mL de meio líquido LB_A, incubada sob agitação de 150 rpm, 37°C até atingir absorvância de $0,6 \pm 0,1$ (A_{600nm}). O fermentado foi centrifugado a 3.000 g, 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de LB. A esta solução adicionou-se 150µL de glicerol anidro (15%), e foram aliquotadas em ampolas com 100 µL (10^5 UFC.mL⁻¹), e armazenadas a -80°C.

4.2.2 Padronização Pré – inóculo

Para a padronização do pré-inóculo foram realizados cultivos submersos em triplicata partindo do inóculo armazenado em freezer -80°C. Duas diferentes

concentrações (1:1000 e 10000 µL) do inóculo (*BL21-CFP10*) foram diluídos em 600 mL de meio LB_A. Os frascos foram incubados a 37°C e agitação de 150 rpm durante 16 horas.

Parâmetros como concentração celular e estabilidade plasmidial foram analisados a partir da retirada de 1 mL de amostras do fermentado, a cada hora e a cada 4 horas respectivamente.

4.2.2.1 Concentração celular

A concentração celular foi determinada em espectrofotômetro (A_{600nm}) para averiguar níveis apropriados de absorbância para a determinação da concentração inicial de biomassa do cultivo e avaliação de curvas de crescimento.

4.2.2.2 Estabilidade plasmidial

A estabilidade plasmidial (segregacional) foi realizada por meio da comparação entre o número de colônias que crescem em placa contendo ágar LB e ágar LB_A. Analisou-se a relação entre o número de células totais (placa sem antibiótico) e o número de células contendo plasmídeo (as únicas capazes de crescer no meio com antibiótico), em função do tempo de cultivo de *E. coli* recombinante (Xu *et al.*, 2006).

Para todos os ensaios de expressão de proteína recombinante um mesmo procedimento de preparação do inóculo foi adotado.

4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10

Em processos fermentativos, em que cada variável pode interagir ou influenciar no efeito de outras variáveis, é essencial a utilização de técnicas de planejamento e otimização de experimentos, como ferramenta capaz de avaliar a interação entre variáveis e otimizar a produção de um produto de interesse (neste caso proteínas recombinantes). Neste define-se os parâmetros estatisticamente significativos na produção, para obter assim sua melhor combinação para atingir o resultado desejado. As análises estatísticas foram feitas por meio do programa

STATISTICA 7. O uso de experimentos planejados estatisticamente permite a determinação rápida e econômica de condições ótimas de cultura com menos repetições de experimentos e com recursos mínimos.

Neste trabalho a expressão das proteínas foi dividida em duas etapas: Fase teste e a fase de cultivo em biorreator. Na fase de menor escala o objetivo foi otimizar o processo e a fase de produção em biorreator visou produzir proteínas recombinantes em 10L.

4.3.1 Padronização da concentração de biomassa e ciclos de sonicação para ruptura celular e liberação das proteínas

As proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6 geralmente encontram-se na forma de corpos de inclusão (Malaghini *et al.*, 2011), havendo desta forma a necessidade do rompimento das bactérias e solubilização dos corpos de inclusão para sua obtenção. O rompimento celular foi realizado mecanicamente por ultrassom. A escolha da metodologia teve por base o custo, a simplicidade do método, a rapidez e a preservação da atividade biológica do produto.

Para otimizar o processo de sonicação foi realizado um planejamento fatorial (2^3) com réplicas no ponto central. As três variáveis independentes selecionadas foram: concentração de biomassa (g/L), ciclo de rompimento (n^0) e ciclo de solubilização (n^0) que geralmente apresentam influência significativa neste tipo de rompimento celular.

A matriz do planejamento fatorial possui todas as combinações possíveis entre os níveis e os fatores (TABELA 2).

TABELA 2 – NÍVEIS E VALORES DOS FATORES ESCOLHIDOS NO PLANEJAMENTO 2^3 DE CICLOS DE ROMPIMENTO CELULAR

Fator Independente	-1	0	+1
[Biomassa] (g/biomassa na base úmida p/ 150mL)	5	10	15
ciclos rompimento (n^0)	8	12	16
ciclos solubilização (n^0)	4	6	8

A partir dos resultados obtidos na análise estatística foram adicionados seis pontos axiais para complementar o desenho fatorial e gerar uma superfície de resposta otimizável mediante um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (TABELA 3).

TABELA 3 – NÍVEIS E VALORES DOS FATORES DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL DE CICLO DE ROMPIMENTO CELULAR

Fator Independente	- α	-1	0	+1	α
[Biomassa] (g/biomassa úmida p/ 150mL)	7	10	15	20	23
ciclos rompimento (n ^o)	5	8	12	16	19
ciclos solubilização (n ^o)	9	4	6	8	3

Os cultivo celulares foram realizados utilizando sempre a proporção de 1:10000 entre pré-inóculo e o meio LB_A respectivamente. O inóculo foi incubado em agitador rotacional 37°C, com agitação de 150 rpm durante 12 horas. A partir do inóculo utilizou-se, 1 mL do inóculo/10mL de meio LB_A que foi fermentado nas mesmas condições de agitação e temperatura citadas acima. A concentração celular foi monitorada por meio de absorbância até que se obtivesse um valor de $0,7 \pm 0,1$ (A_{600nm}). Em seguida foi adicionado IPTG 0,1 mM ao cultivo, visando à indução da produção das proteínas. O tempo de fermentação a partir da indução foi de 4 horas.

Para recuperação das proteínas o fermentado obtido foi submetido à centrifugação 8.000 g, 4°C, durante 20 minutos, o sobrenadante foi descartado. O sedimento formado foi lavado quatro vezes com 100 mL de tampão PBS (140 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄.12 H₂O; 2,7 mM KCl; pH 7,4) para remoção de impurezas. Após a lavagem o sedimento foi pesado em diferentes concentrações: 5; 10 e 15 g de biomassa úmida. Cada concentração foi ressuspensa em 150 mL tampão sonicação (Tris-HCl 50 mM pH 8), e submetida a diferentes ciclos de rompimento celular por sonicação (desruptor de célula ultra sônico – UNIQUE / Freq US: 19kHz-99%). Cada ciclo foi composto por pulsos contínuos de 30 segundos de duração com intervalos de 30 segundos mantidos em banho de gelo. Foi retirada uma alíquota de 500 μ L, denominada de amostra total. O restante foi centrifugado a 8.000 g durante 20 minutos a 4°C para obtenção da fração solúvel e insolúvel. O sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C, sendo esta porção denominada

de fração solúvel. O sedimento resultante foi ressuspenso em 50 mL de tampão de solubilização (uréia 8 M, imidazol 10 mM, NaCl 300 mM, pH 7,4) e submetido ao processo de sonicação para solubilização dos corpos de inclusão. A amostra foi centrifugada 8.000 g e o sobrenadante foi armazenado a temperatura de -20°C, denominado de fração insolúvel. As frações solúveis e insolúveis foram posteriormente submetidas à purificação por técnica de cromatografia de afinidade.

4.3.1.1 Purificação das proteínas

O plasmídeo *pDEST™17* permite a expressão de proteínas modificadas pela adição de seis resíduos de aminoácidos na porção carboxi-terminal. Isto é possível porque o sítio de clonagem do plasmídeo está localizado entre a região promotora e uma série de 6 códons CAT, codificadores de uma sequência de seis aminoácidos de histidina. Após serem expressas as proteínas recombinantes podem ser separadas das demais por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre o íon metálico, níquel, e resíduos de aminoácidos, como o imidazol da histidina. As moléculas adsorvidas podem ser eluídas por competição com outras espécies doadoras de elétrons como imidazol que possui maior afinidade de ligação ao complexo Ni^{2+} do que a histidina (FIGURA 9).

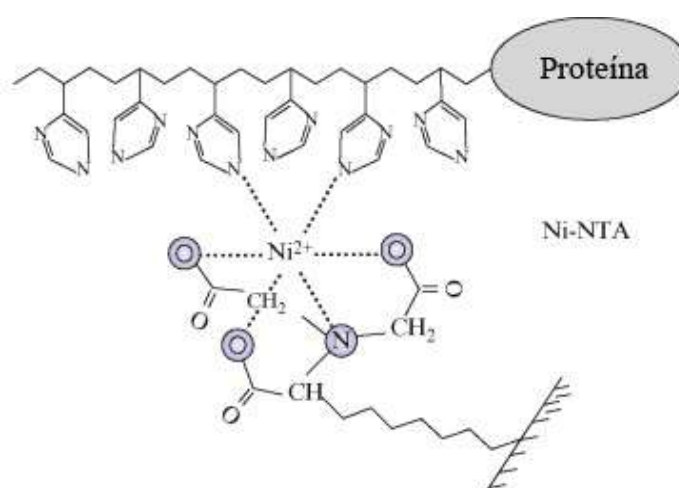


FIGURA 9 – LIGAÇÃO QUÍMICA DO Ni^{2+} COM RESÍDUOS DE HISTIDINA
 FONTE: (Block *et al.*, 2009)

As proteínas recombinantes obtidas no cultivo celular e sonicadas (fração solúvel e insolúvel) foram purificadas por meio de coluna de afinidade HisTrap FF de

5 mL (GE Healthcare Life sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 50 mL de tampão de equilíbrio (20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl e 20 mM imidazol, pH 7.4). Os extratos protéicos foram adicionados na coluna permitindo a fixação das proteínas marcadas com histidina à resina, sendo o fluido restante coletado e denominado de fração não-ligada. Para retirar as proteínas contaminantes da resina, foram realizadas lavagens com 50 mL do tampão de equilíbrio e os fluidos resultantes das lavagens também foram armazenados para posterior verificação da qualidade do processo de purificação.

A eluição foi feita com base no aumento de molaridade de imidazol. Realizou-se eluições utilizando 10 mL de solução de eluição (20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl e 500 mM imidazol), sendo que a fração de interesse purificada foi armazenada a -80°C .

Todas as amostras obtidas na purificação (fração não ligada, lavagem, fração total, fração solúvel e fração insolúvel) foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE.

4.3.1.2 Preparo gel SDS-PAGE

Para avaliar a pureza das proteínas recombinantes purificadas estas foram submetidas à SDS-PAGE em gel preparativo sob condições redutoras (Laemmli, 1970). Foram preparados dois géis com diferentes concentrações de acrilamida/bis-acrilamida, sendo o gel de empilhamento com concentração de 5% e o de separação 15%. Após a corrida eletroforética das amostras os géis foram corados com solução Coomassie Blue R-250, por uma hora. Em seguida foram descorados com solução descorante até visualização da banda característica de cada umas das proteínas recombinantes. A descrição das soluções encontra-se no APÊNDICE1.

4.3.1.3 Dosagem de proteína pelo método de Bradford

Além da análise por eletroforese em gel SDS-PAGE, foi necessária a determinação da concentração de proteína de todas as amostras. Estas foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976), que permite grande sensibilidade na dosagem das proteínas.

Para a dosagem utilizou-se o reagente de Bradford (Sigma Aldrich). Inicialmente uma curva padrão foi preparada a partir de uma solução estoque de BSA 1 mg/mL. Diluições seriadas foram realizadas para a obtenção das demais concentrações (branco; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mg/mL). A cada 5 µL de cada uma das diluições da curva padrão foram adicionados 250 µL do reagente de Bradford. As amostras testadas foram diluídas na mesma proporção citada acima com o reagente e incubadas durante 15 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (A_{595nm}).

4.3.2 Padronização da temperatura de crescimento, temperatura de indução e concentração de IPTG

As condições de crescimento do microrganismo assim como a indução da proteína foram avaliadas com base no planejamento fatorial 2^3 com replicatas no ponto central. Os fatores independentes foram: a temperatura de crescimento ($^{\circ}C$), temperatura de indução ($^{\circ}C$) e concentração de IPTG (mM). Na TABELA 4 são mostrados os níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial.

TABELA 4 – NÍVEIS E VALORES DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO 2^3 PARA A PADRONIZAÇÃO DA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, TEMPERATURA DE INDUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE IPTG

Fator Independente	-1	0	+1
IPTG (mM)	0,21	0,5	0,79
$T_{\text{crescimento}}$ ($^{\circ}C$)	30	33,5	37
$T_{\text{Indução}}$ ($^{\circ}C$)	30	33,5	37

A partir dos resultados obtidos na análise estatística foram adicionados quatro pontos axiais para complementar o desenho fatorial e gerar uma superfície de resposta otimizável mediante um planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (TABELA 5).

TABELA 5 – NÍVEIS E VALORES DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL. PARA A PADRONIZAÇÃO DA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, TEMPERATURA DE INDUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE IPTG

Fator Independente	- α	-1	0	+1	α
IPTG (mM)	0,016	0,05	0,1	0,15	0,184
T _{Ind.} (°C)	20	22	26	30	32

4.4 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTE CFP10 E ESAT6 EM BIORREATOR

A melhor resposta para as variáveis IPTG, temperatura de crescimento e indução foi determinada com o suporte do planejamento fatorial acima e cujas condições foram empregadas para o cultivo celular em biorreator.

Os experimentos foram conduzidos em biorreator de 10 L instrumentado modelo New Brunswick Scientific (Bioflo 110).

4.4.1 Preparo do inóculo para cultivo celular em biorreator

Uma ampola de pré-inóculo de cada bactéria recombinante (*BL21-CFP10* e *BL21-ESAT6*), foi descongelada e o conteúdo de 70 μL (10^5 UFC.mL⁻¹) de cada uma delas foi adicionado a distintos frascos Erlenmeyers, de 1 L, contendo 700 mL de meio LB_A. Os frascos contendo os meios de cultivo foram incubados a 37 °C, 150 rpm durante 12 horas.

4.4.2 Preparo do biorreator e condições de cultivo para *BL21-CFP10* e *BL21-ESAT6*

O biorreator foi preparado juntamente com todos os acessórios e com 7,5 L de meio LB. O conjunto foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 40 minutos. Após resfriamento da dorna, contendo o meio de cultivo, as condições de cultivo

foram ajustadas. Adicionou-se 0,3 mL de antiespumante dimetilpolisiloxano (Sigma Aldrich), cloranfenicol 25 mg.L⁻¹ e ampicilina 100 mg.L⁻¹ ao fermentado, seguido do inóculo de 700 mL (10% do volume final do biorreator) descrito no item 4.4.1. Amostras de 1 mL foram coletadas de hora em hora, para análise de pH, oxigênio dissolvido, absorvância (600 nm) e percentual de estabilidade plasmidial conforme descrito no item 4.2.2.2.

Ao final do cultivo, 100 mL da cultura (em triplicata) foi centrifugada a 3000 g durante 10 minutos e o sedimento formado foi lavado quatro vezes com 100 mL de tampão PBS, e novamente centrifugado. Os tubos de centrifuga foram previamente pesados e os 100 mL da cultura com PBS foram centrifugados a 3000 g durante 10 minutos e incubados a 75°C por 72 horas. Após este período os tubos foram pesados até manterem massa constante. A partir da diferença entre o tubo vazio e com células determinou-se a concentração celular (grama de biomassa seca/L). Uma curva padrão foi gerada entre a absorvância obtida e o peso seco das células. Este cultivo celular foi realizado em duplicata para cada bactéria recombinante *BL21-CFP10* e *BL21-ESAT6*.

As condições de cultivo celular estão descritas na TABELA 6. A metodologia ciclos de rompimentos e purificação foram descritas no ítem 4.3.1.

TABELA 6 - CONDIÇÕES DE CULTIVO DA BACTÉRIA RECOMBINANTE *BL21-CFP10* E *BL21-ESAT6* EM BIORREATOR DE 10 LITROS

Condições de cultivo	
Temperatura de crescimento	37°C
Temperatura de Indução	26°C
Tempo de fermentação antes indução	até A _{600nm} =0,8
Concentração IPTG	0,1 mM
Tempo de fermentação após indução	4 horas
Volume inicial do meio sem inóculo	7L
Volume do pré-inóculo	700 mL
pH do meio de cultura inicial	6,7 ± 0,2
Agitação	300 rpm
Volume de oxigênio dissolvido (%OD)	0,5L. Min ⁻¹
Antiespumante	0,3 mL

4.4.3 Determinação de parâmetros cinéticos do cultivo celular

O uso de modelos matemáticos de crescimento celular é uma estratégia para se planejar e alcançar bons resultados em cultivo microbiano. Os modelos quantificam a relação entre velocidade específica de crescimento do microrganismo, velocidades de consumo de substrato e de produção de produtos, e a concentração de substrato limitante (Yurt *et al.*, 2003).

O enfoque clássico utiliza modelos simples: não-estruturados e não-segregados. Muitas vezes, um modelo mais simples é capaz de chegar a resultados mais satisfatórios que modelos complexos, devido à dificuldade de se ajustar o maior número de parâmetros dos modelos estruturados do que usando apenas dados de concentração no meio externo de cultivo. Esses parâmetros serão em geral altamente correlacionados, apresentando um conjunto de soluções estatisticamente equivalentes, porém biologicamente inválidas (Horta, 2008).

Quando utilizado o modelo batelada o balanço de massa do substrato e do crescimento de biomassa pode ser representado pela equação abaixo. A equação (Eq 4.1) representa o modelo de crescimento celular para produção de biomassa.

$$dC_x/dt = C_x \quad \text{Eq 4.1}$$

Aplicando a definição de Monod para a velocidade específica de crescimento:

$$\mu = 1/X (dX/dt) \quad \text{Eq. 4.2}$$

Ao integrar a equação diferencial (Eq 4.2) a velocidade específica de crescimento celular é:

$$\mu_{\text{Max}} \cdot t = \ln (C_{X0} / C_x) \quad \text{Eq 4.3}$$

μ = velocidade específica de crescimento (h⁻¹)

C_{X0} = concentração celular inicial em base seca (g/L)

C_x = concentração celular no tempo t em base seca (g/L)

t = tempo final (h) - tempo inicial (h)

4.4.4 Remoção e dosagem de endotoxinas

A ruptura de células bacterianas gram-negativas (*E. coli*), para recuperação da proteína de interesse, leva a liberação de grande quantidade de endotoxinas (LPS). Para remover esta contaminação utilizou-se a coluna Pierce (ThermoScientific) segundo instrução do fabricante e o método de extração líquido-líquido em sistemas micelares de duas fases, utilizando Triton X114 (Sigma Aldrich), de acordo com o protocolo de Liu *et al.* (1997).

O volume de 1% v/v de Triton X114 foi adicionado à solução protéica contendo 20 mg/mL de proteína, a mistura foi incubada a 4°C, durante 30 minutos em constante agitação, seguida de incubação a 37°C por 10 minutos. A solução foi centrifugada a 5.000 g durante 15 minutos. A fase superior aquosa com as proteínas foi retirada cuidadosamente e o processo de remoção de endotoxinas foi repetido por mais três vezes.

Previamente a dosagem de endotoxina as amostras das proteínas recombinantes foram submetidas à diálise em tampão (Tris-HCl 10 mM, NaCl 20 mM e glicina 0,1%, pH 8,0), com 4 trocas. A dosagem de endotoxina foi realizada pelo Instituto de Tecnologia do Paraná, utilizando o método quantitativo cromogênico em *Limulus* (QCL-cinético).

4.4.5 Estimativa do rendimento das proteínas recombinantes e custo de produção

Para avaliação do rendimento final das proteínas recombinantes foi realizada uma coleta de todo o fermentado produzido no biorreator de 10 L. Esse material foi reservado em frascos de 500 mL, centrifugado a 8.000 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi sonificado e purificado conforme metodologia descrita no item 4.3.1.

A concentração de proteína recombinante presente em cada cultivo celular foi determinada pelo método Lowry (Lowry *et al.*, 1951), em triplicata. Este método é altamente sensível e apresenta uma melhor exatidão em relação a outros. Apesar desta vantagem o método apresenta longo tempo de análise, por isto foi utilizado apenas para avaliação do rendimento final das proteínas recombinantes.

Para construção da curva analítica padrão foi utilizado BSA 1 mg/mL e preparadas diluições nas concentrações de: 0; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 µg e

as amostras diluídas 1:10. Em uma placa de polietileno adicionou-se 20 µL das diluições da curva e das amostras, sob este volume acrescentou-se 200µL da solução E. A solução E foi formulada a partir de outras três soluções, A, B e C. Inicialmente volumes iguais da solução B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5%) e solução C ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 1%) foram unidos formando assim a solução D. Um volume da solução D foi adicionado a 50 volumes da solução A (Na_2CO_3 a 2% em NaOH 0,1 N) originando a solução E.

As amostras juntamente com a solução E foram incubadas durante 10 minutos e adicionou-se 20 µL do reagente de *Folin Ciocauteau* 1:1 em água destilada em cada amostra. Terminada a adição a placa foi mantida em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ($A_{750\text{nm}}$).

Realizou-se uma estimativa de custo de produção das duas proteínas, levando-se em consideração o custo dos insumos utilizados no cultivo celular, purificação e formulação.

4.4.6 Identificação das proteínas recombinantes produzidas por espectrometria de massa

4.4.6.1 Processamento e preparação das proteínas

Foram recortados do gel (SDS-PAGE 15%) fragmentos de 1 mm² referente às proteínas purificadas (CFP10 e ESAT6) e colocados em microtubos. Os spots foram lavados com 400 µL de solução de 50% bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mM pH 7,8 e 50% acetonitrila (ACN) 100%, agitou-se de 10 em 10 minutos durante 30 minutos. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes, até o descoramento completo.

Para desidratar o gel, 200 µL de ACN 100% foi adicionado em cada tubo de 2 mL e incubado durante 30 minutos em temperatura ambiente até secar completamente o gel.

A digestão das proteínas foi realizada por hidrólise em gel. Foram diluídos 2 µL da solução estoque (100 µg Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade - Promega e 100µL ácido acético) em 144 µL de bicarbonato de amônio 50 mM, 20 µL de acetonitrila e 36 µL de água. Colocou-se em cada tubo, 10 µL da solução de

digestão. Então os tubos foram incubados em estufa a 37°C, durante 24 horas para a extração de peptídeos.

4.4.6.2 Análise MALDI TOF – TOF

Para análise no espectrômetro de massa MALDI-Tof/Tof *Autoflex II* da *BrukerDaltonics*, pelo método *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) e MS/MS, 0,5 µL de cada amostra de proteína digerida (CFP10 e ESAT6) item 4.4.5.1, foi homogeneizada em 0,5 µL de matriz ácido α-cyano-4-hydroxicinamico (CHCA) (Sigma) que se encontrava 10 mg/mL em solução 50% ACN e 2,5% de TFA. O volume final de 1 µL foi aplicado em placa para MALDI (*MTP 384 targetplategroundsteel - BrukerDaltonics*) e mantidos à temperatura ambiente até que os peptídeos co-cristalizassem por secagem.

Os espectros foram obtidos utilizando o software *FlexControl 2.0* (*BrukerDaltonics*) e analisados no programa *Flex Analysis 2.0* (*BrukerDaltonics*). A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (angiotensina, substância P, bombesina, ACTH e somatostatina). Para identificação das proteínas por MS, uma lista de massas moleculares dos peptídeos gerados experimentalmente de uma amostra foi comparada com massas moleculares de peptídeos deduzidos *in silico* a partir de sequências genômicas presentes nos bancos de dados. Dessa forma, foi possível buscar e identificar as proteínas que mais se aproximam do padrão de espectro de peptídeos da amostra analisada.

O programa de busca utilizado foi o MASCOT (*Matrix Science, UK*-http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), associado aos bancos de dados de *Mycobacterium tuberculosis SwissProt* e NCBI (Centro Nacional de Informação Biotecnológica).

As amostras não identificadas por PMF foram submetidas ao método de MS/MS.

4.5 FORMULAÇÃO DO PPD RECOMBINANTE

Foram elaboradas duas diferentes formulações do PPD recombinante, a partir das duas proteínas recombinantes aqui produzidas para uso em intradermorreação, como meio de diagnóstico da TB. Para cada formulação utilizou-

se quatro diferentes concentrações de proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6. As concentrações utilizadas e formulação estão descritas nas TABELAS 7 e 8.

TABELA 7 – FORMULAÇÃO 1 - PPD RECOMBINANTE

CFP10 ou ESAT6	0,04 ug /0,4 µg/ 40 µg/ 400 µg
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	7,6 mg
KH ₂ PO ₄	1,5 mg
Cloreto de sódio	4,8 mg
Sulfato de Hidroxiquinolina potássica	100 µg
Tween 20	80 µg
H ₂ O q.s.p	1,0 mL

TABELA 8 – FORMULAÇÃO 2 - PPD RECOMBINANTE

CFP10 ou ESAT6	0,04 µg /0,4 µg/ 40 µg/ 400 µg
Salina fenolada 0,4% q.s.p	1,0 mL

4.5.1 Liofilização

A liofilização do PPD formulado foi conduzida em liofilizador (ModulyoD, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). Em pequenos frascos de vidro foram inseridos 5 mL de cada amostra isoladamente. Os frascos foram pré-congelados à -80°C durante 16 horas, sendo então colocados nas bandejas do liofilizador. A liofilização foi realizada a temperatura de -45°C até que se atingisse a pressão de vácuo de 50 mbar em tempo de 24 horas.

4.5.2 Ensaio físico-químico para determinação da estabilidade do produto.

O estudo da estabilidade de fármacos e medicamentos está descrito na resolução RE nº1/05 ANVISA. Esta tem por finalidade garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo, são preconizados estudos de estabilidade (Matthews, 1999; Lucas et al., 2004; Ansel et al., 2007).

4.5.2.1 Estudo de estabilidade do PPD recombinante

Para os testes de estabilidade, foram selecionadas duas formulações propostas no item 4.5, porém utilizou-se apenas a concentração de 400 mg/mL de proteína recombinante (CFP10 e ESAT6). O teste de estabilidade foi realizado com a formulação do PPD recombinante na forma liofilizada e solúvel.

Após as amostras serem submetidas a diferentes condições de estabilidade, no período de tempo (t(0); t(30); t(60); t(90) dias foram analisados os seguintes parâmetros: aspecto, cor, pH, esterilidade, porcentagem de perda da concentração protéica e atividade humoral pelo método de ELISA.

As verificações de alteração do aspecto do produto e cor foram feitas visualmente por meio do equipamento de visualização de produtos farmacêuticos (Ecrã).

O teste de esterilidade foi realizado conforme dois métodos oficiais descritos na farmacopeia o método de Inoculação do produto diretamente no meio (Método Direto) e pelo método de filtração por membrana. Os dois métodos usam como meios de cultura o meio de tioglicolato líquido para bactérias, incubado a 30-35°C e o meio de caseína-soja para fungos, incubado a 20-25°C. As amostras permanecem em contato com o meio durante 14 dias (período de incubação) para posterior verificação do crescimento microbiano.

A concentração proteica foi determinada pelo método descrito no item 4.4.5.

4.5.2.1.1 Estabilidade do PPD recombinante frente a diferentes condições de temperatura:

As amostras foram acondicionadas em frasco de vidro neutro, transparente com tampa de vedação e submetidas a diferentes condições de temperatura, temperatura ambiente (20°C ± 2°C), temperatura elevada (40°C ± 2°C), temperatura de refrigeração (5°C ± 2°C), temperaturas de congelamento (-20°C e -80°C ± 2°C).

4.5.2.1.2 Exposição à radiação luminosa

Para avaliação da foto-sensibilidade as amostras foram expostas frente a luz durante 72 horas.

4.5.2.1.3 Ciclos de congelamento e descongelamento

Nesta condição as amostras foram armazenadas em temperaturas alternadas, porém em tempo regulares. Foram realizados ciclos de 24 horas à temperatura ambiente e 24 horas a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O ciclo foi repetido por três vezes.

4.5.2.1.4 Teste de prateleira

No teste de estabilidade de prateleira somente a formulação liofilizada do PPD recombinante foi avaliada, esta amostra foi armazenada a temperatura ambiente, durante nove meses, seguido de teste de atividade biológica e concentração protéica.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HUMORAL DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 FRENTE A SORO POLICLONAL PRODUZIDO EM COELHO

Para avaliação da atividade imunológica humoral das proteínas recombinantes, foi realizado o teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e Western Blot para pesquisa de anticorpos em soro. Para obter grande quantidade de soros para as diferentes etapas de padronização foi produzido soro policlonal em coelho.

4.6.1 Produção de anticorpos policlonais contra *Mycobacterium tuberculosis*

4.6.1.1 Preparo do inóculo de *Mycobacterium tuberculosis* e sensibilização dos coelhos para produção de anticorpos policlonais contra *Mycobacterium tuberculosis*

O inóculo foi preparado a partir da biomassa úmida de Mtb crescidas em meio de cultivo *Middlebrook*, incubada a 37°C , durante 60 dias. A quantidade de 100 mg de biomassa foi macerada juntamente com pó de pedra Pome adicionado na mesma proporção e acrescido de 50 mL de óleo mineral, obtendo a concentração final de 2 mg/mL. A solução foi homogeneizada, filtrada e esterilizada em autoclave a 121°C durante 1 hora.

Dois coelhos da raça Nova Zelândia com aproximadamente seis meses de idade, do sexo masculino, com peso de 2 a 3 kg foram sensibilizados com o antígeno de Mtb, por via subcutânea, nos dias 0, 15, 30, 45, 60 e 90. Injetou-se 0,5 mL de antígeno mais adjuvante, por animal, com concentração de 1 mg de *M. tuberculosis*. Na primeira inoculação usou-se adjuvante de Freund completo e nas demais imunizações foi empregado adjuvante de Freund incompleto.

Após todas as imunizações foi coletado sangue, para verificação da cinética de produção de anticorpos policlonais. O soro obtido de cada coleta foi armazenado a -20°C até seu uso. Os animais foram anestesiados previamente a todas as coletas por meio de injeção intramuscular de cloridrato de Ketamina (20 mg/Kg) e cloridrato de Xilazina (3 mg/Kg). A veia marginal da orelha dos coelhos foi puncionada e foram coletados cerca de 5 mL de sangue. Este sangue foi centrifugado a 3.000 g durante 15 minutos para separação do soro, que foi devidamente identificado e armazenado a -20°C até seu uso.

4.6.2 Teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos contra às proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6 usando anticorpos policlonais

Otimização da técnica: determinação das concentrações e diluições ideais dos reagentes:

a) Concentração de antígeno: Foram testadas as duas proteínas recombinantes (CFP10 e ESAT6) em três concentrações (250 ng; 500 ng e 1000 ng). A concentração ótima foi determinada pela mais baixa concentração que pode demonstrar positividade da reação para qualquer diluição do soro positivo.

b) Diluição de soro e conjugado: Foram testadas três diluições de soro (1:25; 1:50 e 1:100), controle positivo (*pool* de soros hiperimunes) e controle negativo (*pool* de soros não imunes), frente a diluição do conjugado anti-IgG marcado com *peroxidase Rabbit anti-Mouse IgG* (Sigma) nas diluições (1:2500; 1:5000; 1:10000 e 1:20000). A diluição ótima do soro juntamente com o conjugado foi a que apresentou a maior diferença em número de vezes de leitura entre positivo e negativo na concentração ótima do antígeno. Os soros foram testados em duplicatas.

Para padronização do teste ELISA, Placas de 96 cavidades (Corning Incorporated Costar, USA) foram sensibilizadas com 100 µL de diferentes

concentrações da proteína recombinante diluídas em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,16%, NaHCO_3 0,29%, pH 9,6), e incubadas durante 16 horas a 4°C. Os poços foram lavados com solução de lavagem (NaCl 0,9%, Tween20 0,05%), e bloqueados com 100 μL do tampão bloqueio (BSA 1% em PBS), seguida de incubação durante 1 hora, 37°C. Após bloqueio adicionou-se 100 μL do soro, dos animais, diluído em tampão bloqueio. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas com solução de lavagem e incubadas durante 1 hora a 37°C com conjugado. Após nova lavagem, foram adicionados 100 μL de solução cromógena de ortofenilenodiamino (OPD 0,2%, H_2O_2 , Tampão Citrato pH 5,0 contendo 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de H_2O_2 a 30%) e as placas incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com adição de 10 μL do inibidor (H_2SO_4 4N). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro.

4.6.2.1 Cinética da produção dos anticorpos policlonais contra *Mycobacterium tuberculosis*

A cinética de produção de anticorpos presentes no soro dos animais experimentalmente inoculados com *M. tuberculosis* foi avaliada pelo método descrito acima, com as concentrações ótimas já definidas, e os soros das imunizações dos dias 0, 15, 30, 45 e 60 visando determinar o tempo ótimo da coleta do soro para armazenamento e utilização nos demais testes.

4.6.3 Western Blot dos anticorpos policlonais de coelho frente às proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6.

Para o experimento de imunodeteção (Western blot) das proteínas recombinantes, foi utilizada a metodologia padrão conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). Cinquenta microgramas de cada uma das proteínas (CFP10 e ESAT6) foram separadas em gel SDS a 15% sob condições redutoras conforme descrito no item (4.3.1.2). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF em tampão de transferência (25 mM de Tris, 192 mM glicina, e 20% de metanol), durante 16 horas a 24 V seguido de uma hora a 48 V. Após a transferência a membrana foi bloqueada com 0,3% de Tween20 em PBS, seguida de lavagem com PBS Tween20 a 0,05% e incubadas com o soro policlonal diluído (1:50). A

membrana foi novamente lavada e incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído 1:5000 (*Anti-Rabbit IgG – Sigma Aldrich*). O substrato DAB (tetrahydroclorato de 3,3'-Diaminobenzidina) combinado com o peróxido foi utilizado para coloração da reação, que foi avaliada visualmente.

4.7 DOSAGEM INTERFERON GAMA

4.7.1 Coleta de sangue de pacientes infectados e não infectados com *Mycobacterium tuberculosis*.

Sangue de pacientes com tuberculose foram coletados em dois postos de coleta: Hospital São Sebastião da Lapa e a Universidade Federal do Paraná. Foram coletadas amostras de sangue de 40 indivíduos, ao total, por punção venosa. Estes indivíduos foram inicialmente esclarecidos em relação a este projeto de pesquisa, e quanto a certificação que o projeto possui no comitê de ética humano (ANEXO 3) e a opção da participação voluntária, com a assinatura do termo livre de consentimento esclarecido (ANEXO 4).

Os critérios de inclusão no estudo foram: idade mínima de 18 anos, com diagnóstico comprovado para *M. tuberculosis*, em tratamento e sem tratamento. Indivíduos com infecção latente com PT ≥ 5 mm e indivíduos controle negativo. Foram excluídos do estudo os pacientes que se negaram a participar, os com tuberculose extra pulmonar e os pacientes com tuberculose pulmonar associada à HIV-AIDS.

O Grupo1 era constituído por pacientes com TB doença em tratamento composto por 17 indivíduos, com confirmação de tuberculose pulmonar (com base no diagnóstico clínico, baciloscopia positiva e ou isolamento do *M. tuberculosis* em cultura, PPD com reatividade ≥ 5 mm e que estavam em tratamento para tuberculose) e 5 indivíduos recém diagnosticados com tuberculose pulmonar (baciloscopia positiva, radiografia de tórax compatível com tuberculose e PT ≥ 5 mm, sem tratamento) e 5 indivíduos tuberculose latente.

O Grupo 2 representado por 13 indivíduos serviu como controle negativo; participaram deste grupo indivíduos assintomáticos e sem história clínica de tuberculose.

Para coleta do sangue, por punção venosa a vácuo, foram utilizados tubos PPT, sem anticoagulante e com anticoagulante Heparina. Inicialmente os tubos foram identificados, o ante braço garroteado e em seguida foi realizada a assepsia, com álcool 70° GL no local a ser puncionado com movimentos centrífugo. O cateter foi introduzido seguido da introdução dos tubos à vácuo, o tubo foi preenchido com 5 mL de sangue cada e homogeneizado por inversão de 5 a 8 vezes e mantido em posição vertical durante 30 minutos em grade de acondicionamento. Para cada indivíduo foram coletados 10 mL de sangue.

Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados 3000 g durante 15 minutos, o soro foi armazenado à -20 °C para testes sorológicos.

4.7.2 Isolamento e cultivo de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue total foi diluído em solução salina 0,9% estéril (1:2), em seguida esta diluição foi cuidadosamente adicionada sobre três vezes o volume correspondente ao sangue total diluído de solução Ficoll–Paque (Amersham Biosciences). Após esta etapa foi centrifugado a 2.000 g durante 20 minutos a 4°C. Formou-se uma interface entre os líquidos e o anel branco leucocitário, foi coletado com uma pipeta de Pasteur. Transferiu-se a solução contendo os linfócitos para um novo tubo e adicionou-se salina a 0,9% p/v. Os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 1.000 g a 4°C. Após ressuspender as células em meio RPMI completo a concentração celular foi ajustada para 1×10^6 linfócitos por poço. Foram pipetados 1 mL/poço da suspensão celular em placa de cultura celular de 48 poços, com: 3 µg/mL de ESAT6; 3 µg/mL de CFP10; 3 µg/mL CFP10 e ESAT6; e 0,4 µg/mL PPDRT23 frente a cada paciente. As placas de cultivo foram incubadas a 37°C durante 5 dias. Após a incubação o sobrenadante do cultivo foi retirado e congelado à -80°C, até a dosagem de interferon gama.

4.7.3 Dosagem Interferon Gama de indivíduos com TB

Para pesquisa de Interferon gama, foi utilizado o kit de detecção DuoSet ELISA – Human IFN- γ (R&D systems), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Inicialmente uma placa de polietileno com alta adsorção (Imunolon-Greiner) foi

sensibilizada com 100 µL do anticorpo de captura (4,0 µg/mL) e incubada durante 16 horas. Os poços foram lavados com 200 µL de tampão (0,05% Tween20 em PBS) e bloqueados (1% BSA em PBS), seguido da adição de 100 µL de cada amostra de sobrenadante do cultivo células mononucleares do sangue periférico descrito no item (4.7.2), as amostras foram incubadas durante duas horas. Nova lavagem foi realizada e adicionou-se 100 µL do anticorpo de detecção (200 ng/mL), incubou-se por mais duas horas. Repetiu-se o procedimento de lavagem e foram adicionados 100 µL do conjugado diluído 1:200 (streptavidin–HRP) em cada poço com incubação de 20 minutos. Após lavagem para revelação da reação adicionou-se 100 µL do substrato (1:1 da mistura do reagente A (H₂O₂) e o reagente B (tetrametilbenzidina). Todos os procedimentos de incubação foram realizados em temperatura ambiente. A leitura da absorbância de cada poço foi realizada no comprimento de onda de 450 nm.

4.8 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR EM MODELO ANIMAL

Utilizou-se a quantidade mínima de animais estaticamente necessários para o experimento. Trinta e seis fêmeas adultas da espécie *Cavia porcellus*, pesando entre 250 e 350 g, foram sensibilizadas, por via intramuscular, com 0,5 mL (2 mg/mL) dos seguintes antígenos: massa bacteriana inativada de *M. tuberculosis*; *M.bovis*, *M avium* e *M. bovis* (BCG). É importante ressaltar que dois destes animais (não sensibilizados), procedentes do mesmo biotério e mantidos sob idênticas condições ambientais e nutricionais, foram utilizados como controle negativo.

Após a imunização os animais ficaram mantidos em biotério durante 30 dias, segregados em quatro caixas, identificados segundo o tipo de inóculo e a data de sensibilização. Estes animais foram acompanhados durante todo o ensaio biológico e foram mantidos com água e alimentos *ad libitum*.

Seguido os trinta dias da sensibilização, os cobaios foram depilados na região intercostal com auxílio de tosquiadeira e creme depilatório. Testou-se a imunidade celular de todas as formulações por meio da inoculação de 0,2 mL de cada amostra por via intradérmica. Os trinta e seis animais, sensibilizados foram inoculados com os antígenos recombinantes, obedecendo o seguinte padrão de inoculação: oito sítios de inoculação utilizados e distribuídos em sentido oral-caudal, sendo quatro aplicações no flanco direito, quatro no flanco esquerdo e o controle

positivo na região caudal. Como controle positivo utilizou-se o PPDRT23 e como controles negativos foram usados solução fenolada e solução fosfato (FIGURA 10). O delineamento encontra-se em anexo (ANEXO 1).

Cada local de aplicação foi demarcado com, caneta azul, um ponto e realizou-se a leitura após 24 horas, 48 horas e 72 horas. A reação foi analisada pela leitura do diâmetro da área da endureção palpável utilizando uma régua com diversas circunferências graduadas. O resultado das leituras foi avaliado conforme especificações do órgão regulamentador brasileiro (BRASIL, 2002), considerando o tamanho da reação de endureção produzida por cada amostra testada. Seguindo os seguintes critérios de leitura: não reator 0 a 4 mm; reator fraco 5 a 9 mm; e reator forte igual ou maior que 10 mm.

Todos os animais foram mantidos em observação, passado o período de 96 horas estes animais foram previamente anestesiados com cloridrato de Ketamina (20 mg/Kg), cloridrato de Xilazina (3 mg/Kg) e sacrificados em câmara de gás carbônico. Conforme protocolo aprovado pelo comitê de ética sob número 469 (ANEXO 2).

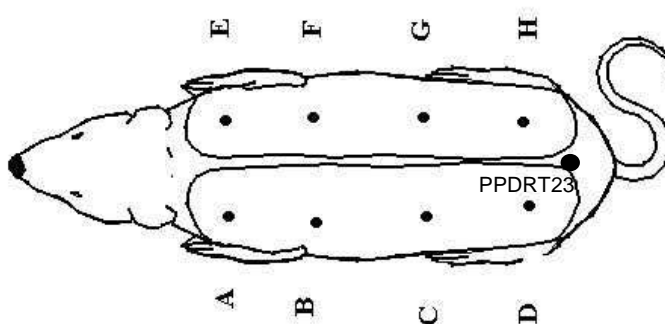


FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO DOS LOCAIS DE APLICAÇÕES DAS FORMULAÇÕES DO PPD EM *Cavia Porcellus*.
LEGENDA: OITO REGIÕES DE APLICAÇÕES, IDENTIFICADAS PELAS LETRAS A à H.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AMPLIFICAÇÃO DOS VETORES PARA A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 DE *Mycobacterium tuberculosis*.

Dois genes codificantes de proteínas de secreção de *M. tuberculosis* foram selecionados para este trabalho (TABELA 9). A escolha dos plasmídeos contendo genes que codificam as proteínas CFP10 e ESAT6 ocorreu devido à procura de antígenos específicos. Várias regiões do genoma de Mtb foram definidas como sendo unicamente expressas por cepas de *M. tuberculosis*. Portanto, não são encontradas em cepas de *M. bovis* BCG ou outras espécies de *Mycobacterium* (Sorensen *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 2007). Desta forma, estas regiões genômicas que codificam antígenos específicos para *M. tuberculosis* é importante para o diagnóstico de tuberculose humana, pois possuem grande potencial de distinção de indivíduos infectados e vacinados (BCG) apresentando respostas imunes específicas.

TABELA 9 – RELAÇÃO DAS 25 PROTEÍNAS DE SECREÇÃO EM CULTURA DE *Mycobacterium tuberculosis* SELECIONADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE SEUS REPECTIVOS GENES

PROTEÍNA	GENE	Tamanho (pares de base)
CFP10	Rv3874	303
CFP6	Rv3004	339

Os dois plasmídeos selecionados foram amplificados e purificados. Cada etapa da purificação, dos plasmídeos foi visualizada em gel de agarose 1%. Observou-se na etapa de eluição do processo de purificação, o plasmídeo em sua forma circular aberta (banda superior) e na sua forma supercoloidal (banda inferior). A massa molecular do plasmídeo apresentou tamanho de aproximadamente 6354 pb (FIGURA 11). Os plasmídeos *pDest17* contendo os genes inseridos (Rv3874 e Rv3875) possuem tamanhos similares (303 e 339 pb respectivamente), assegurando igualdade no processo de replicação, transformação e expressão.

O processo de purificação apresentou alto grau de pureza e não houve perdas significativas, uma vez que não foram identificadas bandas na fração não

ligada. A dosagem foi realizada por meio de leitura em espectrofotômetro e obteve-se 1250 µg do plasmídeo *Rv3874* (*CFP10*) e 1058 µg do plasmídeo *Rv3875* (*ESAT6*). Estes valores condizem com a referência citada pelo protocolo do kit utilizado (QIAGEN Plasmid Maxi Kit).

Os plasmídeos foram sequenciados, comprovando a sequência de interesse (ANEXO5).

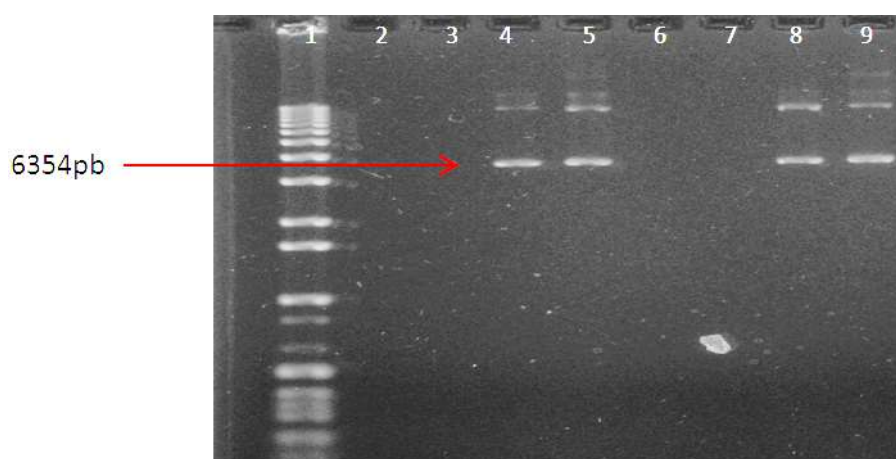


FIGURA 11 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE 1% DO PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS.

LEGENDA: coluna 1: Marcador 1 KB Plus DNA Ladder (Invitrogen); coluna 2: Fração NL – ESAT6; coluna 3: Lavagem – ESAT6; coluna 4: Eluição – ESAT6; coluna 5: Fração Total – ESAT6; coluna 6: Fração NL – CFP10; coluna 7: Lavagem – CFP10; coluna 8: Eluição – CFP10; coluna 9: Fração Total – CFP10

5.2 PADRONIZAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO

A fase lag do cultivo A de BL21-CFP10 é duas horas mais demorada quando comparada com o cultivo B. Isto pode estar relacionado com a quantidade de inóculo adicionada. As condições em que se encontra o inóculo inicial têm uma forte influência na duração desta fase. No ensaio A utilizou-se a concentração de 1:1000 e o ensaio B 1:10000. Observa-se após a fase lag o crescimento constante do número de células na cultura. Na condição mais concentrada de bactéria recombinante (ensaio B) a fase exponencial apresentou-se mais curta, com duração de 10 horas de cultivo e o ensaio A aproximadamente 14 horas. A duração da fase exponencial depende da concentração do inóculo e o declínio no crescimento da cultura ocorre quando um requisito para divisão celular se torna limitante. Nesta fase as concentrações celulares mais altas tendem causar a exaustão de nutrientes,

aumento de metabólitos tóxicos e limitação de oxigênio chegando na fase de desaceleração de crescimento rapidamente (FIGURA 12).

Foi possível verificar, no percentual da estabilidade plasmidial, que nas primeiras oito horas não houve variação da estabilidade, de modo que ambos permaneceram 100% estáveis. Após este tempo percebe-se um decréscimo das unidades formadoras de colônias, carregando plasmídeos, em função do tempo. A queda de estabilidade foi de 11,6% no ensaio A e 54% no ensaio B até às 16 horas (FIGURA 13).

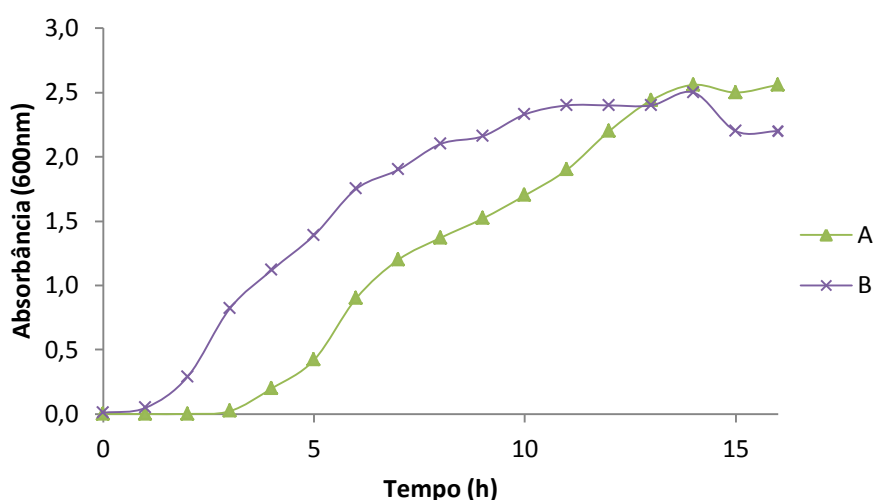


FIGURA 12 – CONCENTRAÇÃO ADIMENSIONAL DA BIOMASSA ESTIMADA PELA ABSORBÂNCIA DO CALDO DE CULTIVO (A_{600nm}) PARA BL21-CFP10 EM FUNÇÃO DO TEMPO. LEGENDA: (A) 60 μ L BL21-CFP10; (B) 600 μ L BL21-CFP10.

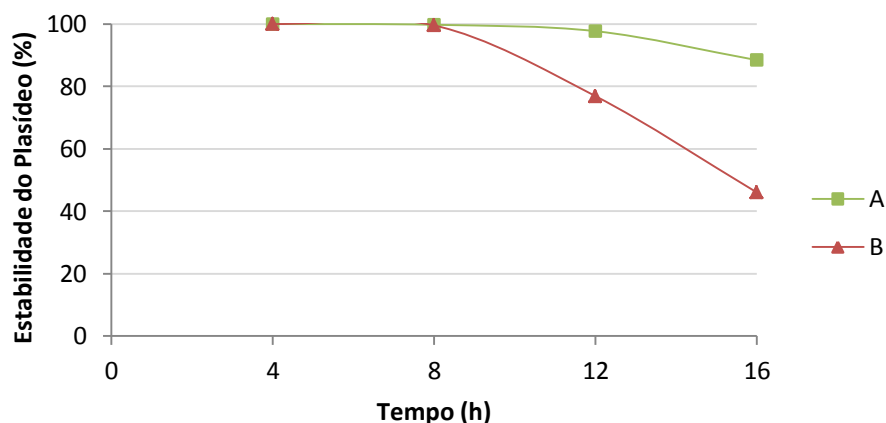


FIGURA 13 – PERCENTUAL DA ESTABILIDADE PLASMIDIAL DA BL21-CFP10 EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO. LEGENDA: (A) 6 μ L BL21-CFP10; (B) 60 μ L BL21-CFP10

Optou-se por trabalhar com a concentração do ensaio A (1:10000) e o tempo de 12 horas de fermentação, devido ao melhor percentual de estabilidade das células recombinantes e as etapas subsequentes de cultivo celular. Quando realizada em shaker o pré-inóculo foi cultivado *overnight* e as etapas subsequentes foram realizadas manualmente no laboratório. O tempo de 12 horas favorece este processo de cultivo que necessita de manipulação, além de garantir 97,7% de viabilidade do plasmídeo ancorado a célula.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a melhor estratégia para a escolha do tempo de fermentação do pré-inóculo seja realizada enquanto a célula possui maior percentual de viabilidade. A concentração e a estabilidade do pré-inóculo têm efeito significativo e refletem na produtividade do produto de interesse no processo fermentativo (Pio *et al.*, 2008).

Segundo Lee *et al.* (2007), este é o período onde as condições de cultivo são mais propícias, as células são mais jovens, o meio possui uma maior quantidade de nutrientes, pois neste momento o mais importante para a célula é garantir sua replicação. Após este período as células sendo mais velhas e tendo acumulado um percentual de polímeros passam a ter dificuldade de replicação e se replicam apenas para garantir a sobrevivência.

5.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10

Foram selecionados seis parâmetros importantes para experimentação: concentração de biomassa, ciclos de rompimento, ciclos de solubilização, concentração de IPTG, temperatura de crescimento e de indução. A escolha dos fatores e níveis de trabalho se deu devido ao fato da literatura trazê-los como os principais parâmetros relacionados à obtenção de proteína recombinante, influenciando diretamente o rendimento do cultivo celular, bem como a estabilidade da bactéria recombinante.

Realizou-se este planejamento somente com a proteína recombinante *BL21-CFP10* devido a utilização do plasmídeo (*pDEST17*) em ambas e a grande similaridade do tamanho do gene clonado, assegurando igualdade no processo de replicação, transformação e expressão.

5.3.1 Padronização da recuperação da proteína recombinante

Na TABELA 10 são mostrados os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^3 com três replicatas no ponto central para o estudo dos ciclos de rompimento celular e solubilização. Os experimentos foram realizados de forma aleatória para eliminar possíveis efeitos de bloco e analisados pelo programa estatístico Statistica 7.0.

TABELA 10 – VALORES DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10 NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM RÉPLICAS NO PONTO CENTRAL

N. Exp.	*Conc. Biomassa	Num. Ciclos de rompimento	Num. Ciclos de solubilização	**Conc. Proteína
1	10	8	4	9,0
2	20	8	4	10,2
3	10	16	4	12,3
4	20	16	4	10,6
5	10	8	8	12,6
6	20	8	8	11,5
7	10	16	8	12,4
8	20	16	8	11,9
9	15	12	6	17,7
10	15	12	6	18
11	15	12	6	17,8

*g/biomassa úmida p/ 150mL

**mg proteína / g biomassa

A partir da análise estatística são descritos os coeficientes de regressão e os seus níveis de influência correspondente ao planejamento fatorial desenvolvido. Os efeitos e/ou as interações que apresentam valores de ($p < 0,05$) são estatisticamente significativos (TABELA 11).

A interação entre a concentração de biomassa e ciclos de solubilização não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no processo. Porém, as outras duas interações foram significativas. As três variáveis independentes (concentração de biomassa, ciclo de rompimento celular e solubilização) apresentaram influência significativa sobre a concentração de proteína recombinante produzida, sendo o

ciclo de solubilização altamente significativo ($p < 0,005$). A maior concentração de proteína recombinante foi obtida no ponto central (17,8 mg proteína/g biomassa). Esta concentração foi duas vezes superior à menor concentração (9 mg proteína/g biomassa) obtida no ensaio 1 do planejamento fatorial 2^3 . Os pontos centrais para ambas as respostas apresentaram pequena variação (0,4 mg proteína/g biomassa).

TABELA 11 – VALORES DOS COEFICIENTES DE REGRESSÃO E DA PROBABILIDADE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3 PARA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10

Fator	Coeficiente de regressão	p-valor
Mean/Interc.	13,09091	0,000012*
(1)CON_BIO	-0,26250	0,039817*
(2)CICL_ROM	0,48750	0,012051*
(3)CICL_SOL	0,78750	0,00467*
1by 2	-0,28750	0,033522*
1by 3	-0,13750	0,125809
2by 3	-0,43750	0,014898*
Lack of Fit		0,000495*

* variáveis e interações significativas

As proteínas recombinantes obtidas estiveram presentes em sua quase totalidade na fração insolúvel havendo, desta forma, a necessidade do rompimento da parede bacteriana e a solubilização dos corpos de inclusão para a sua obtenção.

O processo de expressão protéica em *E. coli*, o mais desejável é a obtenção da proteína recombinante na sua forma solúvel e com sua conformação correta. Porém, muitas destas proteínas possuem alto nível de expressão citoplasmática ocasionando formação de corpos de inclusão (Baneyx, 1999; Costa *et al.*, 2014).

Apesar da produção dos corpos de inclusão ser, de modo geral, considerada indesejável, sua formação pode ser vantajosa em relação ao alto nível de expressão e por serem estoques relativamente puros de proteínas. Estes estoques podem representar até 95% do conteúdo total de proteínas além de serem facilmente

separadas de outras proteínas bacterianas (Villaverde & Carrio, 2003; Zhao *et al.*, 2012).

A melhor condição para ciclo de solubilização dos corpos de inclusão apresentou-se com seis ciclos contínuos de 30 segundos, sendo esta a variável que apresentou maior significância ($p < 0.05$). Este parâmetro também foi evidenciado significativo no processo de obtenção de proteínas recombinantes, por Peternel (2013), que relata que a produção de proteínas recombinantes melhorou significativamente nas últimas décadas, pois diversos parâmetros foram otimizados. No entanto, os estudos de lise celular bacteriana foram negligenciados. Para solubilização dos corpos de inclusão a célula deve ser rompida. Porém, se deve observar as propriedades de solubilidade e fragilidade. Por conseguinte, o método de sonicação e de solubilização devem ser cuidadosamente testados e otimizados, pois a qualidade do produto final pode ser significativamente afetada. Rodriguez-Carmona *et al.* (2010), descrevem que a combinação adequada de métodos de rompimento celular beneficia a recuperação de proteínas insolúveis mantendo a organização dimensional e características de dobramento.

Nesta primeira fase de estudo para rompimento e obtenção da proteína recombinante do planejamento fatorial, pode-se verificar que há falta de ajuste significativa do modelo linear. Este fato indica que, possivelmente se esteja trabalhando em uma zona de curvatura, onde existe um possível ponto otimizável. Para comprovar esta hipótese o planejamento anterior foi complementado adicionando seis pontos axiais para criar um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) capaz de gerar uma região ótima no gráfico de superfície de resposta. Nas TABELAS 12 e 13, são mostrados os níveis de trabalho com o rendimento protéico obtido e os coeficientes de regressão e probabilidade com nível de confiança de 95% para o desenho realizado.

O perfil da proteína recombinante (fração total), de cada ensaio do DCCR foi analisado em eletroforese gel SDS-PAGE (15%) (FIGURA 14). Observou-se a diferença de intensidade das bandas referente à proteína CFP10 nos ensaios. Esta diferença pôde ser comparada aos valores de concentração de proteína recombinante purificada, dispostos na TABELA 12. A quantificação de proteína neste trabalho foi realizada a partir da proteína pura com precisão e confiabilidade, de modo que quantificações realizadas por meio de géis SDS-PAGE não são exatas e podem apresentar divergências e influência de diversos fatores no resultado final.

TABELA 12 – VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10 NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

N. Exp.	*Conc. Biomassa	Num. Ciclos de rompimento	Num. Ciclos de solubilização	**Conc. Proteína
1	10	8	4	9,0
2	20	8	4	10,2
3	10	16	4	12,3
4	20	16	4	10,6
5	10	8	8	12,6
6	20	8	8	11,5
7	10	16	8	12,4
8	20	16	8	11,9
9	15	12	6	17,9
10	15	12	6	18,1
11	15	12	6	17,8
12	7	12	6	9,0
13	23	12	6	10,1
14	15	5	6	10,4
15	15	19	6	13,3
16	15	12	9	14,2
17	15	12	3	15,1

*g/biomassa úmida p/ 150mL

**mg proteína / g biomassa

TABELA 13 – VALORES DOS COEFICIENTES E DA PROBABILIDADE DA ANÁLISE DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Fator	Coefficiente de regressão	p-valor
Mean/Interc (β_0)	17,95546	0,000024*
(1)CON_BIO (L) (β_1)	-0,01847	0,763094
(1)CON_BIO (Q) (β_{11})	-3,04433	0,000223*
(2)CICL_ROM (L) (β_2)	0,64288	0,004079*
(2)CICL_ROM (Q) (β_{22})	-2,22942	0,000409*
(3)CICL_SOL (L) (β_3)	0,57253	0,005245*
(3)CICL_SOL (Q) (β_{33})	-1,23736	0,001268*
1 (L) by 2 (L) (β_{12})	-0,28750	0,033522*
1 (L) by 3 (L) (β_{13})	-0,13750	0,125809
2 (L) by 3 (L) (β_{23})	-0,43750	0,014898*

* variáveis e interações significativas

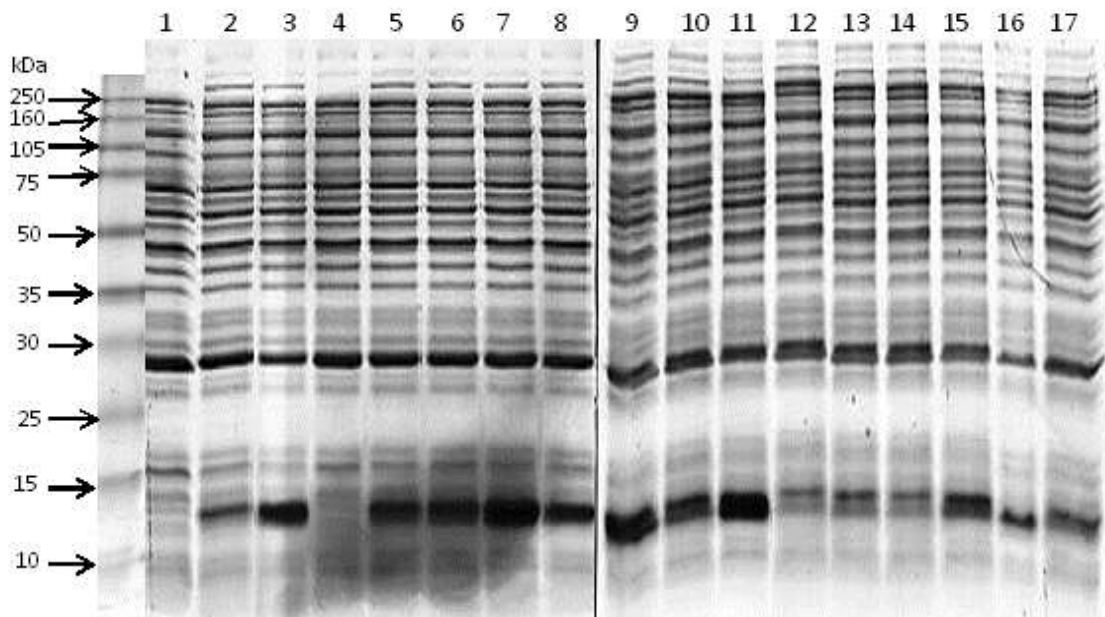


FIGURA 14 – ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15% DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CPF10 (FRAÇÃO TOTAL) NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

LEGENDA: ENSAIO 1-17; M – marcador Amersham Full-Range Rainbow (GE Healthcare) 250 kDa – 10 kDa;

A melhor concentração de proteína recombinante foi obtida nos pontos centrais, a média aritmética dessas concentrações foi de 17,8 mg proteína/g biomassa, comparando este valor com as menores concentrações (9,0 mg proteína/g biomassa) obtidas no ensaio 1 e 12 do DCCR. Observa-se a concentração de proteína duas vezes maior. Os valores das respostas obtidas a partir dos experimentos contendo os pontos axiais são inferiores aos valores da resposta no ponto central, indicando um efeito de curvatura ilustrado pela superfície de resposta (FIGURA 15) e representado pela equação do modelo (Eq 5.1).

Uma vez realizada a análise estatística pode-se observar que os três fatores são significativos nos seus respectivos termos quadráticos ao nível de 95% de significância. Para calcular os valores foi gerada uma equação de segunda ordem (Eq. 5.1), onde Y a variável dependente ou resposta (concentração de proteína), e as variáveis independentes (fatores) X_1 , concentração de biomassa, X_2 , ciclos de rompimento e X_3 , ciclos de solubilização.

$$Y = 17,96 - 0,018X_1 + 0,64X_2 + 0,57X_3 - 0,29X_1X_2 - 0,14X_1X_3 - 0,44X_2X_3 - 3,04X_1^2 - 2,23X_2^2 - 1,24X_3^2$$

Eq. 5.1

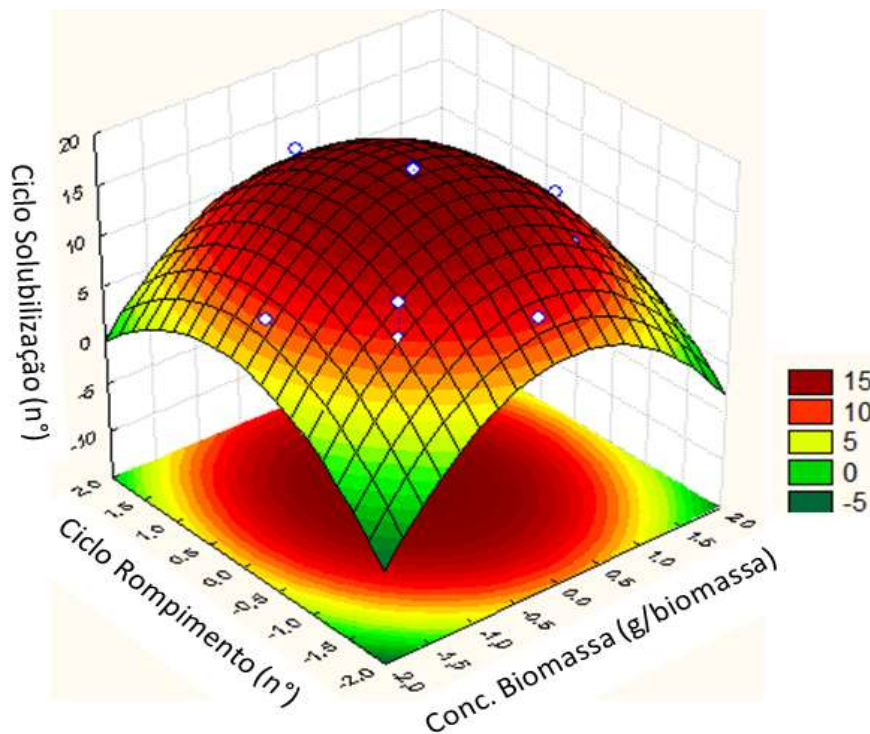


FIGURA 15 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) APRESENTANDO OS FATORES CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E CICLOS DE ROMPIMENTO

O modelo apresentou a determinação do coeficiente de correlação ($R^2=0,96198$) e ($R^2_{ajustado}=0,9131$) demonstrando que 96,8% dos dados experimentais são explicados pela equação do modelo (Eq.5.1). Desta forma, considerou-se que o modelo estatístico obtido foi adequado e explica a variação das concentrações de proteína recombinante em função dos níveis das variáveis avaliadas.

A solução analítica para obter os pontos ótimos da concentração de biomassa e os ciclos de sonicação e solubilização foi calculada a partir das derivadas de primeira ordem para cada fator independente (Eq .5.2 – Eq. 5.4) :

$$\frac{dY}{dX_1} = -0,018 - 0,29X_2 - 0,14X_3 - 6,08X_1 \quad \text{Eq.5.2}$$

$$\frac{dY}{dX_2} = -0,64 - 0,29X_1 - 0,44X_3 - 4,46X_2 \quad \text{Eq.5.3}$$

$$\frac{dY}{dX_3} = -0,57 - 0,14X_1 - 0,44X_2 - 2,48X_3 \quad \text{Eq.5.4}$$

Os valores codificados foram calculados a partir da solução do sistema de três equações obtido acima igualando cada derivada a zero. Os valores das variáveis independentes decodificados, após a resolução do sistema de equações, foram: concentração de biomassa de 15 g utilizando-se 12 ciclos de rompimento e 7 ciclos solubilização.

5.3.2 Padronização da temperatura de crescimento bacteriano, temperatura de indução e concentração de IPTG

Na literatura são descritas diversas estratégias de otimização da expressão de proteínas recombinantes, por meio de experimentos direcionados ou parâmetros de processos produtivos.

Para análise da melhor condição de temperatura de crescimento, temperatura de indução e concentração do indutor IPTG um novo planejamento fatorial (2^3) foi realizado, com três replicatas no ponto central. As condições empregadas em cada um dos experimentos do planejamento fatorial são mostradas na TABELA 14, e os valores dos coeficientes de regressão obtidos da análise estatística estão dispostos TABELA 15.

TABELA 14 – VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ COM RÉPLICAS NO PONTO CENTRAL

N.	IPTG mM	Temp.crescimento °C	Temp. indução °C	*Prot.
1	0,21	30	30	0,183
2	0,79	30	30	0,084
3	0,21	37	30	0,188
4	0,79	37	30	0,087
5	0,21	30	37	0,101
6	0,79	30	37	0,026
7	0,21	37	37	0,107
8	0,79	37	37	0,031
PC	0,5	33,5	33,5	0,168
PC	0,5	33,5	33,5	0,159
PC	0,5	33,5	33,5	0,166

*mg proteína / mL

TABELA 15 – VALORES DOS COEFICIENTES DE REGRESSÃO E DA PROBABILIDADE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2³ PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

Fatores	Coefficiente de regressão	p-valor
Mean/Interc. (β_0)	0,118182	0,000145*
(1)[IPTG] (β_1)	-0,043875	0,002320*
(2)TEMP_CRESC (β_2)	0,002375	0,291091
(3)TEMP_IND (β_3)	-0,034625	0,001447*
1by 2 (β_{12})	-0,000375	0,843259
1by 3 (β_{13})	0,006125	0,067019
2by 3 (β_{23})	0,000375	0,843259
Lack of Fit	-	0,005058*

* variáveis e interações significativas

Na TABELA 15, é possível observar que a concentração de IPTG e a temperatura de indução tiveram influência significativa na resposta concentração de proteínas (mg/mL). Porém, é importante observar que a temperatura do meio de cultivo não foi significativa ($p > 0,05$) na produção da proteína de interesse. Isto indica que antes de adicionar o indutor (IPTG), a temperatura de crescimento não interferiu na concentração de proteína obtida. As interações entre os fatores também não apresentaram influência estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Deve-se salientar que os maiores valores de rendimento da proteína recombinante foram obtidos nos ensaios 1 e 3, em que alcançaram as concentrações proteicas de 0,183 mg/mL e 0,188 mg/mL respectivamente. Nestes ensaios trabalhou-se com o menor nível de concentração de IPTG e temperatura de indução. A menor concentração foi de 0,026 mg/mL encontrado no ensaio 6, sendo 7,2 vezes menor que a maior concentração.

Entretanto, o modelo linear apresentou falta de ajuste significativo e a ANOVA (ANEXO 6) indica que um modelo de ordem maior pode ajustar os dados a uma superfície mais representativa. Desta forma foi aplicado novamente o Delineamento Composto Central Rotacional, com a matriz experimental expandida para se obter os termos quadráticos do polinômio, a variável independente temperatura de crescimento não foi estudada neste planejamento devido sua falta de significância.

Nas TABELAS 16 e 17, estão descritos os níveis decodificados de trabalho e os coeficientes de regressão correspondentes ao planejamento fatorial desenvolvido respectivamente.

Pôde-se verificar que todos os fatores foram significativos nos termos lineares e quadráticos. Porém, comprovou-se que as interações entre os fatores não apresentaram influência significativa. A superfície de resposta do DCCR é ilustrada na FIGURA 16 e identifica graficamente quais os níveis do ponto ótimo para produção da proteína recombinante.

TABELA 16 – VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

N.	IPTG mM	Temp indução °C	*Prot.
1	0,05	22	0,033
2	0,15	22	0,086
3	0,05	30	0,047
4	0,15	30	0,167
5	0,016	26	0,034
6	0,184	26	0,276
7	0,1	20	0,072
8	0,1	32	0,163
PC	0,1	26	0,282
PC	0,1	26	0,286
PC	0,1	26	0,298

*mg proteína / mL

TABELA 17 – VALORES DOS COEFICIENTES E DA PROBABILIDADE DA ANÁLISE DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Fatores	Coefficiente de Regressão	p-valores
Mean/Interc. (β_0)	0,288873	0,000277*
(1)[IPTG] (L) (β_1)	0,064469	0,002085*
(1)[IPTG] (Q) (β_{11})	-0,080437	0,001908*
(2)TEMP_IND (L) (β_2)	0,027997	0,010909*
(2)TEMP_IND (Q) (β_{22})	-0,099299	0,001253*
1by 2 (β_{12})	0,016750	0,056588

* variáveis e interações significativas

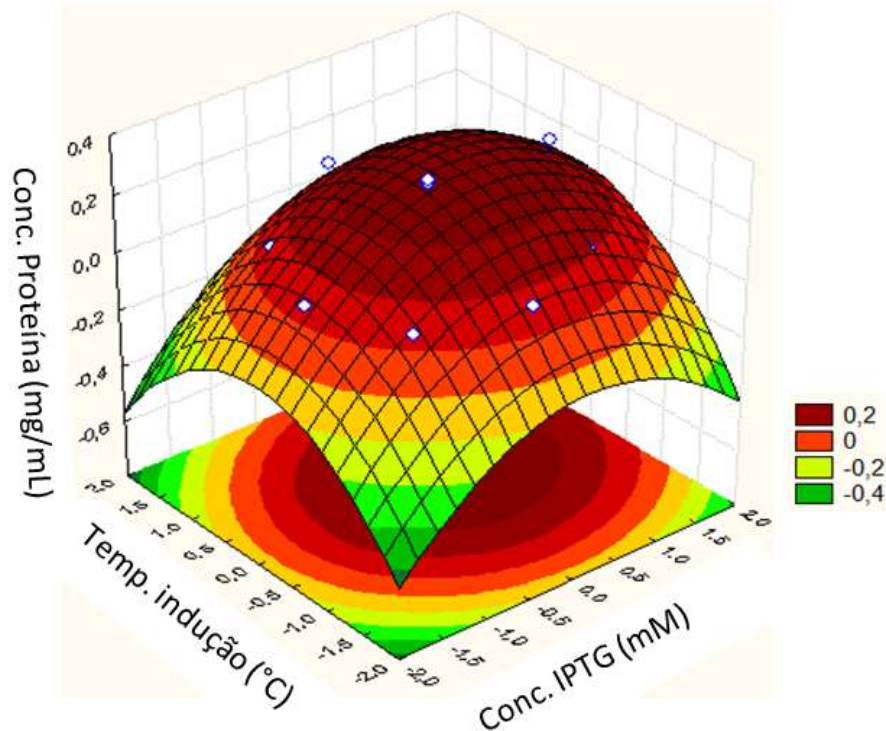


FIGURA 16 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) APRESENTANDO OS FATORES CONCENTRAÇÃO DE IPTG E TEMPERATURA DE INDUÇÃO

Com o planejamento do composto central foi obtida uma equação de segunda ordem (Eq. 5.5), onde Y é a variável dependente (concentração de proteína), X_1 , concentração de IPTG e X_2 temperatura de indução.

$$Y = 0,29 + 0,06X_1 + 0,028X_2 + 0,017X_1X_2 - 0,08X_1^2 - 0,10X_2^2 \quad \text{Eq. 5.5}$$

O modelo apresentou baixa falta de ajuste e a determinação do coeficiente de correlação ($R^2=0,92341$) e ($R^2_{\text{ajustado}}=0,84681$) mostram que 92,3% dos dados experimentais são explicados pela equação do modelo (Eq.5.5). Desta forma, considerou-se que o modelo estatístico obtido foi adequado e explica a variação das concentrações de proteína recombinante em função dos níveis das variáveis avaliadas.

A solução analítica para obter os pontos ótimos da concentração de IPTG e temperatura de indução foi realizada de forma similar a descrita para a solubilização dos corpos de inclusão (Eq 1.6 – Eq 1.7) :

$$\frac{dY}{dX_1} = -0,06 + 0,017X_2 - 0,16X_1 \quad \text{Eq. 5.6}$$

$$\frac{dY}{dX_2} = -0,028 + 0,17X_1 - 0,20X_2 \quad \text{Eq. 5.7}$$

As decodificações dos valores para a concentração de IPTG e a temperatura de indução foram: 0,12 mM e 26°C respectivamente são as condições ótimas para a obtenção da máxima concentração das proteínas recombinantes. Conforme o cálculo realizado pela solução analítica das equações (Eq. 5.6 e Eq. 5.7), a concentração teórica máxima de proteínas obtida é de 0,300 mg/mL.

A maior concentração de proteína encontrada no DCCR foi de 0,288 mg/proteína, este ensaio utilizou baixo nível de IPTG e temperatura (TABELA 16).

O efeito da temperatura e do IPTG sobre o rendimento de proteínas recombinantes é relatado na literatura. Alguns trabalhos discutem a influência negativa da concentração de IPTG utilizado em promotores baseado no *operon lac* (Friehs, 2004). A alta concentração de IPTG pode diminuir drasticamente a divisão ordenada de células recombinantes, devido ao aumento da manutenção do metabolismo e a lise de células, a concentração do indutor também influencia na localização do acúmulo de proteínas extras ou intracelulares (Andersson *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2013). Xu *et al.* (2006), revelaram que a estabilidade plasmidial em culturas não induzidas apresentou valores em torno de 95% com antibiótico e 90% sem antibiótico; já em culturas induzidas, a estabilidade diminuiu drasticamente, em torno de 15% com antibiótico e 10% sem antibiótico.

Por meio destes resultados obtidos foi possível indicar que, nas condições estudadas, pôde-se diminuir a concentração do indutor em oito vezes, uma vez que a alta concentração do mesmo mostrou desvantagem em relação ao rendimento da proteína. A utilização de quantidades menores de indutor favorece também os custos de produção da proteína recombinante alvo, uma vez que o IPTG possui alto valor agregado.

O resultado obtido para a concentração do indutor IPTG de 0,1mM pode ser considerado excelente quando comparados a valores 10 vezes mais concentrados relatados na literatura para produção das proteínas CFP10 e ESAT6 de *M. tuberculosis* (de Jonge *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; De Leon *et al.*, 2012).

Os níveis testados de temperatura de produção da proteína recombinante variaram de 20°C a 37°C, e o melhor resultado foi obtido com a temperatura de indução de 26°C.

A temperatura ótima de crescimento da *E. coli* encontra-se entre 37 a 39 °C, que coincide com a temperatura ótima de indução do *operon lac*. No entanto, (Donovan *et al.*, 1996), descrevem que o uso de temperaturas menores, indo de 20 a 30°C durante a fase de indução, pode promover uma melhora na expressão da proteína solúvel, bem como a redução de alterações metabólicas indesejáveis como, a síntese de proteases ou *heat shock proteins*, aumentando assim o rendimento do produto alvo. Outro benefício é o aumento da solubilidade e a redução da formação de corpos de inclusão (Niiranen *et al.*, 2007).

A temperatura é uma importante variável que pode ser utilizada no controle do metabolismo celular, pois quando ocorre diminuição da temperatura de 37 °C para a faixa entre 26°C – 30°C ocorre uma redução na captação de nutrientes, na velocidade de crescimento do microrganismo, diminuição da formação de metabólitos secundários além da redução do consumo de oxigênio (Lee, 1996; Ongkudon *et al.*, 2011)

A escolha da temperatura de 26°C justifica-se pela relação existente com a taxa de crescimento, que se demonstram menores em temperaturas mais baixas. Assim, a probabilidade de perda segregacional diminui, dado que esta pode ocorrer em virtude da alta velocidade de replicação que impede a cópia adequada e divisão ordenada dos plasmídeos entre células mãe e filha (Popov *et al.*, 2011).

Com base em todos os ensaios descritos acima foi obtido o ponto ótimo de cada variável analisada.

A diferença da concentração da proteína obtida em duas temperaturas diferentes testadas ressalta a eficácia da metodologia de purificação utilizada nos planejamentos fatoriais apresentados. Pois o rendimento de cada ensaio analisado foi realizado no final do processo de purificação, sendo avaliada somente a concentração da proteína recombinante pura, fato que aumenta a precisão e confiabilidade do trabalho (FIGURA 17).

Pode-se verificar que a intensidade da banda da proteína CFP10 obtida no processo de indução a 26°C é significativamente maior do que a obtida a 37°C,

comportamento semelhante descrito com as concentrações de proteína recombinante em temperaturas menos elevadas.

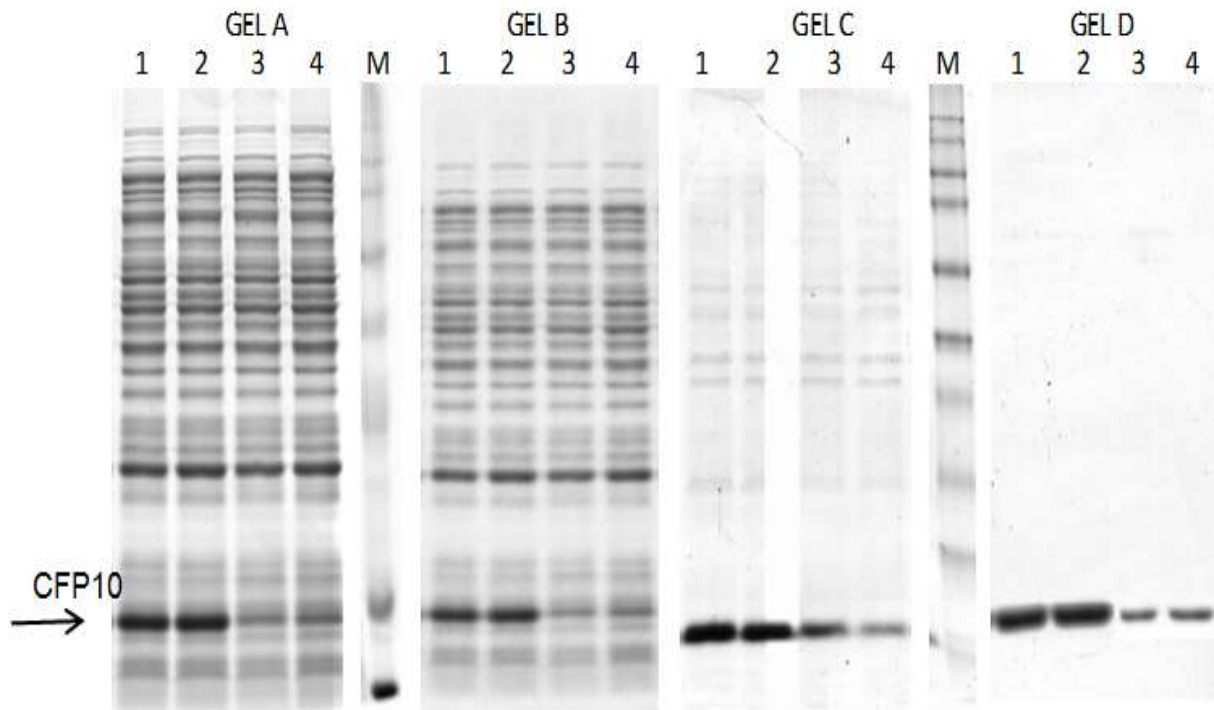


FIGURA 17 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 15% DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10.

LEGENDA: M – marcador Amersham Full-Range Rainbow (GE Healthcare) 250 kDa – 10 kDa; Gel A – Fração total; Gel B – Fração solúvel; Gel C – Fração insolúvel e Gel D – Fração Purificada. Colunas 1 e 2 CFP10 26°C / 0,1mM IPTG; 2 e 3 CFP10 37°C / 0,1mM IPTG.

5.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10 E ESAT6 EM BIORREATOR

5.4.1 Rendimento do cultivo celular em biorreator e estimativa de custo

Depois de ter determinadas as melhores condições de expressão da proteína recombinante realizou-se cultivo celular em biorreator de 10 L com o intuito de avaliar a expressão das proteínas heteróloga em maior escala. Foram realizadas fermentações (duplicata) utilizando as bactérias recombinantes *BL21-CFP10* e *BL21-ESAT6*. A média dos resultados foi apresentada em cinco gráficos: gráfico A - absorbância, gráfico B - pH, gráfico C - oxigênio dissolvido e gráfico D1 e D2 - percentual de estabilidade do plasmídeos e biomassa, todos em função do tempo (FIGURA 18).

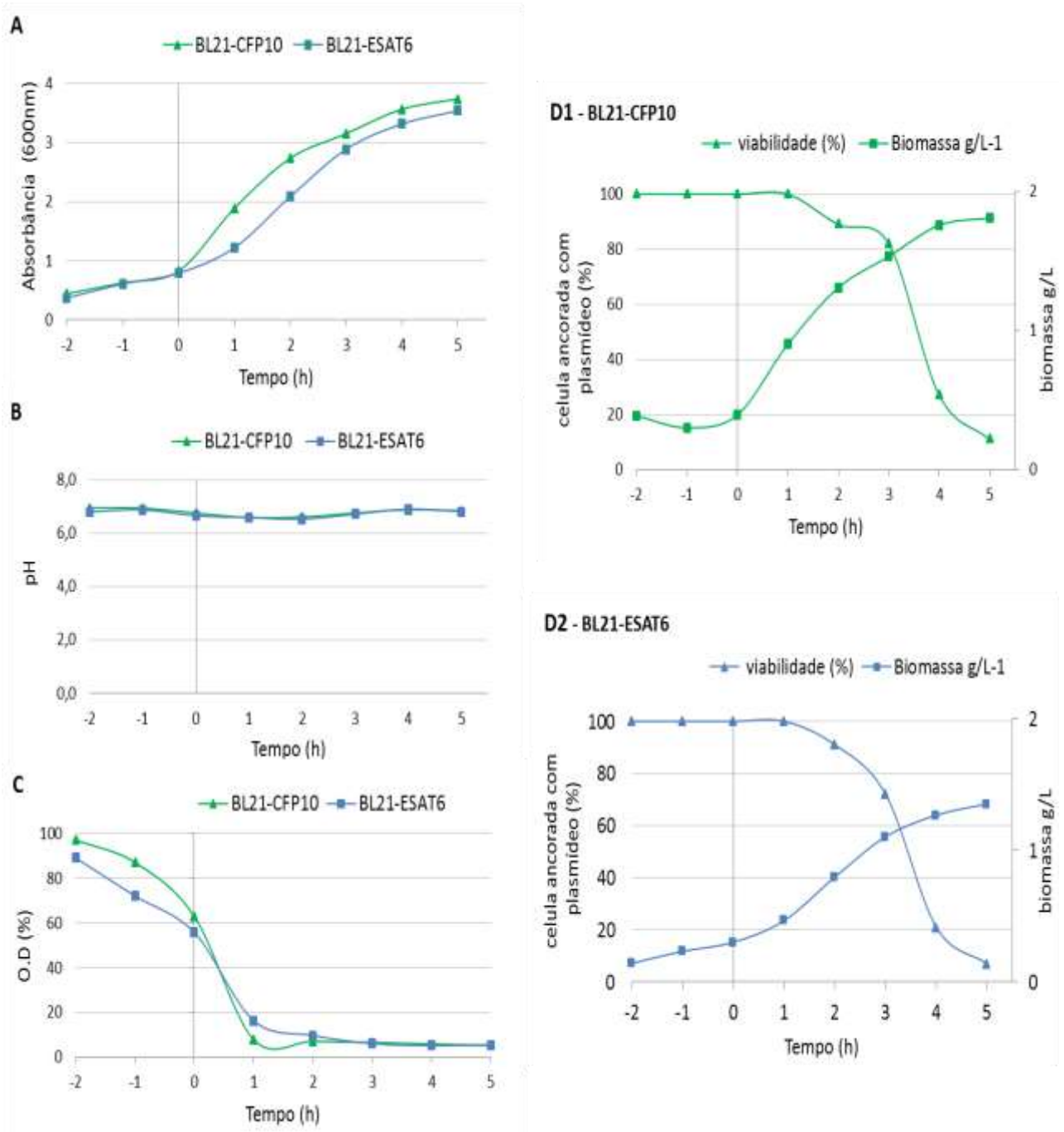


FIGURA 18 – GRÁFICO A – AVALIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA (A_{600nm}); GRÁFICO B – PH; GRÁFICO C – OXIGÊNIO DISSOLVIDO; GRÁFICO D1-BL21-CFP10 E GRÁFICO D2-BL21-ESAT6 – % DE CÉLULAS ANCORADAS NO PLASMÍDEO E BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO CELULAR EM BIORREATOR

Na TABELA 18 são descritos os valores da velocidade específica de crescimento, de produtividade em biomassa e produto do cultivo celular das bactérias recombinantes cultivadas em biorreator.

TABELA 18 – VELOCIDADE ESPECÍFICA, PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA E PRODUTO DO CULTIVO CELULAR DAS BACTÉRIAS RECOMBINANTES BL21-CFP10 E BL21-ESAT6 EM BIORREATOR.

	BL21-CFP10	BL21-ESAT6
Velocidade específica (μ)	0,315 h ⁻¹	0,318 h ⁻¹
Produtividade em biomassa (px)	0,362 g/L.h	0,27 g/L.h
Produtividade em produto (pp)	58,14 mg/mL.h	30,19 mg/mL.h

Na curva de crescimento de ambas as bactérias recombinantes, pode-se verificar que foram necessárias duas horas de crescimento até atingirem a absorbância de 0,800 nm, para posterior indução com IPTG (FIGURA 18 A). O tempo (0) foi o momento em que as células foram induzidas e a temperatura rapidamente reduzida para 26°C. Comparando o crescimento das bactérias após a indução não houve uma diferença significativa entre elas. Entretanto, a bactéria recombinante BL21-CFP10 apresentou, nas duas primeiras horas de indução, a taxa de crescimento 1,5 vezes maior em relação à bactéria recombinante BL21-ESAT6. Percebe-se que após cinco horas de indução as células ainda não se encontram em fase estacionária, continuando a multiplicação. Porém, o cultivo foi interrompido devido à estabilidade plasmidial apresentar-se baixa com apenas 5% de viabilidade (FIGURA 18 D1 e D2). Tempos mais longos de expressão, neste caso, não são vantajosos, pois a maioria das células viáveis não mantém o plasmídeo ancorado e não possuem capacidade de produção de proteínas recombinantes. Outro fator importante que deve ser levado em consideração é que estas células que não possuem capacidade de expressão dificultam o processo de recuperação das proteínas.

Ao analisar o comportamento da estabilidade plasmidial em relação à concentração de biomassa (FIGURA 18 D1 e D2) no cultivo em biorreator, verificou-se que o aumento da biomassa não foi proporcional à viabilidade plasmidial, uma vez que a fração de células com plasmídeo foi 100% viável somente até a primeira hora de indução. Depois deste período, a biomassa bacteriana sofreu decréscimo das células recombinantes para 5%. Esta queda indica instabilidade plasmidial à medida que as células começam a acumular polímeros e apresentam-se em maior

concentração. Este comportamento também foi observado no trabalho de Lee *et al.* (1994) que relataram a instabilidade da *E. coli* recombinante ancorada com plasmídeos contendo *Alcaligenes eutrophus* poly (3-hydroxybutyric acid) (PHB). A perda de estabilidade durante a divisão celular por partição desigual da bactéria carreadora do plasmídeo é agravada pelo fato de que as células sem plasmídeo crescem mais rapidamente do que as células recombinantes (Popov *et al.*, 2011). Fato este que ocasionou o aumento de biomassa de bactérias não recombinantes.

A composição da construção do vetor e os promotores utilizados podem influenciar a segregação. Toksoy *et al.* (2002) obtiveram níveis de estabilidade plasmidial de 80, 72 e 0,1% ao final de 4 horas de indução, variando as construções (plasmídeo/gene) e plasmídeos utilizados. O plasmídeo, derivado do vetor *pET28a* sob controle do promotor T7, foi o que apresentou maior estabilidade no trabalho acima citado.

A análise dos efeitos do pH mostra uma variação de 0,4 do início ao fim do cultivo. Este resultado indica baixa produção de acetato, mostrando-se maior apenas no período de maior metabolismo do microrganismo (FIGURA 18 B). Com relação ao oxigênio dissolvido (FIGURA 18 C), observou-se elevada queda até sua estabilidade em cerca de 5%. Foram utilizados níveis menores de oxigênio dissolvido ($0,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$), uma vez que a velocidade de crescimento, em temperaturas mais baixas se apresenta menor. O maior problema dos cultivos celulares de altas densidades é a formação de acetato. O acetato é produzido sob condições anaeróbias ou de limitação de oxigênio no meio de cultivo. Entretanto, cultivos de *E. coli* conduzidos com excesso de glicose também podem levar à formação de acetato, mesmo em condições aeróbias. O acetato é produzido quando o fluxo de carbono para a rota metabólica central excede a demanda de biossíntese e a capacidade de geração de energia dentro da célula. Concentrações de acetato superiores a 5 g/L em pH 7 inibem o crescimento de *E. coli* (Han *et al.*, 1992; Carlson & Srienc, 2004; Suryadarma *et al.*, 2012).

O cultivo celular em biorreator apresenta várias vantagens em relação aos experimentos em frascos Erlenmeyer, pois permite estabelecer controle e monitoramento de algumas variáveis do processo, tais como temperatura, aeração, pH e oxigênio dissolvido, além de permitir a produção em maior escala.

Há um desafio considerável na transposição de experimentos realizados em escala laboratorial (5 L) para piloto (reator 50 L) e desta para a escala industrial

(reator 500 L). A maioria dos critérios para escalonamentos propostos na literatura baseia-se em manter constante parâmetro operacional ou uma relação entre eles na escala maior e na similaridade geométrica dos fermentadores em diferentes escalas. Este desenvolvimento visa determinar um processo de produção de qualidade, e economicamente viável em escala industrial.

As concentrações das proteínas ESAT6 e CFP10 produzidas foram avaliadas por dosagem da proteína purificada e análise em gel SDS-Page 15%. A concentração da proteína CFP10 produzida foi de 232,59 mg/L (miligrama de proteína por litro fermentado) e a concentração da proteína ESAT6 de 120,79 mg/L.

As concentrações de proteínas recombinante expressas em *E.coli* relatadas em literaturas são bastante diversas. Bai *et al.* (2008), relataram a concentração de 18 mg/L de cultura da proteína ESAT6-MPT64 expressa em *E. coli*, oriunda da fusão dos genes ESAT6 e MPT64. O estudo de Piubelli *et al.* (2013), descreve a otimização das condições de fermentação e expressão da proteína TB10.4, Ag85B e uma proteína quimérica TB10.4Ag85B de *M. tuberculosis* em *E. coli* e citam concentrações de 2,5 mg/L até 25 mg de proteína /L de fermentado.

Aghababa *et al.* (2014), relatam uma estratégia de otimização sobre sistemas e métodos de purificação, clonagem e produção da proteína recombinante Micoliltransferase (Ag85B) de *M. tuberculosis* visando o aumento do rendimento destas. Esta otimização resultou em um rendimento de 8 mg/L de Ag85B. Outro trabalho revela a hipótese de baixa expressão de alguns genes de *micobactérias* inseridos em *E. coli* ser devido à presença de códons de baixo uso. A substituição de alguns códons e a utilização do promotor T7 demonstraram resultados bem promissores em relação ao aumento de proteínas recombinantes. Os autores obtiveram aumento de 0,5 mg/L para 27 mg/L e 10 mg/L para 80 mg/L com a substituição de códons e a expressão aumentou para 250 mg /L com a troca do promotor (Lakey *et al.*, 2000).

A utilização do vetor pDest17 (promotor T7) usado neste trabalho beneficiou a estabilidade e o rendimento da proteína recombinante de interesse. Comparando os resultados obtidos com os da literatura é possível constatar o alto nível de produção das proteínas de interesse purificadas. O baixo custo e a simplicidade do cultivo tornam este sistema de expressão uma boa alternativa para a produção em escala industrial.

Para futuros testes em biorreator alguns estudos de otimização devem ser implementados como: otimização de um meio de cultivo, otimização das condições operacionais (aeração, agitação, oxigênio dissolvido, etc.) que não foram passíveis de controle nos planejamentos em frascos Erlenmeyer. Ademais seria recomendável estudar diferentes formas de conduzir a fermentação por batelada e batelada alimentada, visando à prolongação do tempo de crescimento e maior produtividade do processo. Bateladas alimentadas possibilitam a obtenção de uma alta densidade de *E.coli* recombinante sendo relevante para a expressão de proteínas heteróloga tanto no meio extracelular quanto no meio intracelular. Alguns trabalhos evidenciam a batelada alimentada sendo mais favorável à expressão de proteínas recombinantes (Lee & Chang, 1990; Babaeipour *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

Na TABELA 19 é demonstrada uma estimativa inicial do custo de produção das proteínas recombinantes estudadas neste trabalho. Para compilação do cálculo de custo somaram-se os valores gastos em insumos e matérias de purificação. É importante ressaltar que este estudo de custo considerou apenas os valores de reagentes, não incluindo mão de obra, estrutura, energia elétrica e outros gastos pertinentes a uma produção comercial.

A análise econômica mostra que o custo de produção estimado inicialmente por litro de meio de cultivo foi de R\$ 108,26, o que representa que cada miligrama das proteínas CFP10 e ESAT6 produzidas custa R\$ 0,46 e R\$ 1,11 respectivamente. Como se pode observar na FIGURA 19 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** o maior peso no custo do processo encontra-se na etapa de purificação que representa aproximadamente 75% do custo total.

TABELA 19 – ESTIMATIVA DE CUSTOS PARA PROCESSAMENTO DE 1L DE FERMENTADO PARA A PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10 E ESAT6 EM BIORREATOR DE 10L

Etapa	Custo (R\$)
Fermentação	20,64
Rompimento celular	5,34
Solubilização	1,45
Purificação	80,83
Total	108,26

O processo de produção recombinante de proteínas para *M. tuberculosis* tem claras vantagens de biossegurança sobre a produção convencional de fermentação do microrganismo patogênico para o PPD, além da sua especificidade e sensibilidade. O emprego de biorreatores do tipo tanque agitado para cultivo de cepas de expressão permite facilidade para ampliação de escala de produção, de modo a ser viável o atendimento da demanda global por este método diagnóstico.

A última compra do PPDRT23 (frasco 1,5 mL contendo 15 doses) efetuada pelo Ministério da Saúde no ano de 2014 foi estimada em US\$15,07 dólares. Neste valor não estão inclusos as taxas de importação e transporte, o que aumentaria ainda mais o preço do produto. Estima-se que o insumo PPD recombinante, desenvolvido neste trabalho, terá um preço mais baixo e competitivo com o atual PPD utilizado no país.

5.4.2 Caracterização das proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6 por espectrometria de Massa

É importante ressaltar a necessidade do alto grau de pureza de bioprodutos com fins de diagnóstico humano, visando esta necessidade e a certificação da integridade conformacional das proteínas, foi realizada a espectrometria de massa das amostras resultantes do cultivo em biorreator.

As proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6 após serem purificadas foram submetidas à corrida eletroforética em gel SDS-Page 15%. A FIGURA 19 representa o perfil eletroforético das proteínas CFP10 e ESAT6. Para a primeira, foi possível observar a presença de duas bandas, uma banda com massa de aproximadamente 10 kDa e outra com aproximadamente 5 kDa. Para a segunda, observa-se a presença de apenas uma banda de 11,6 kDa.

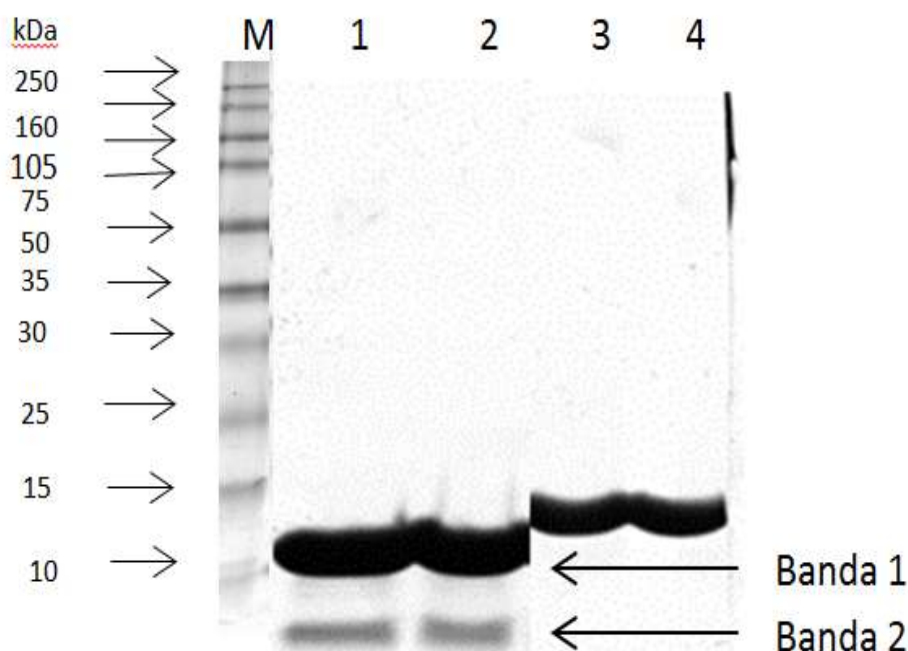
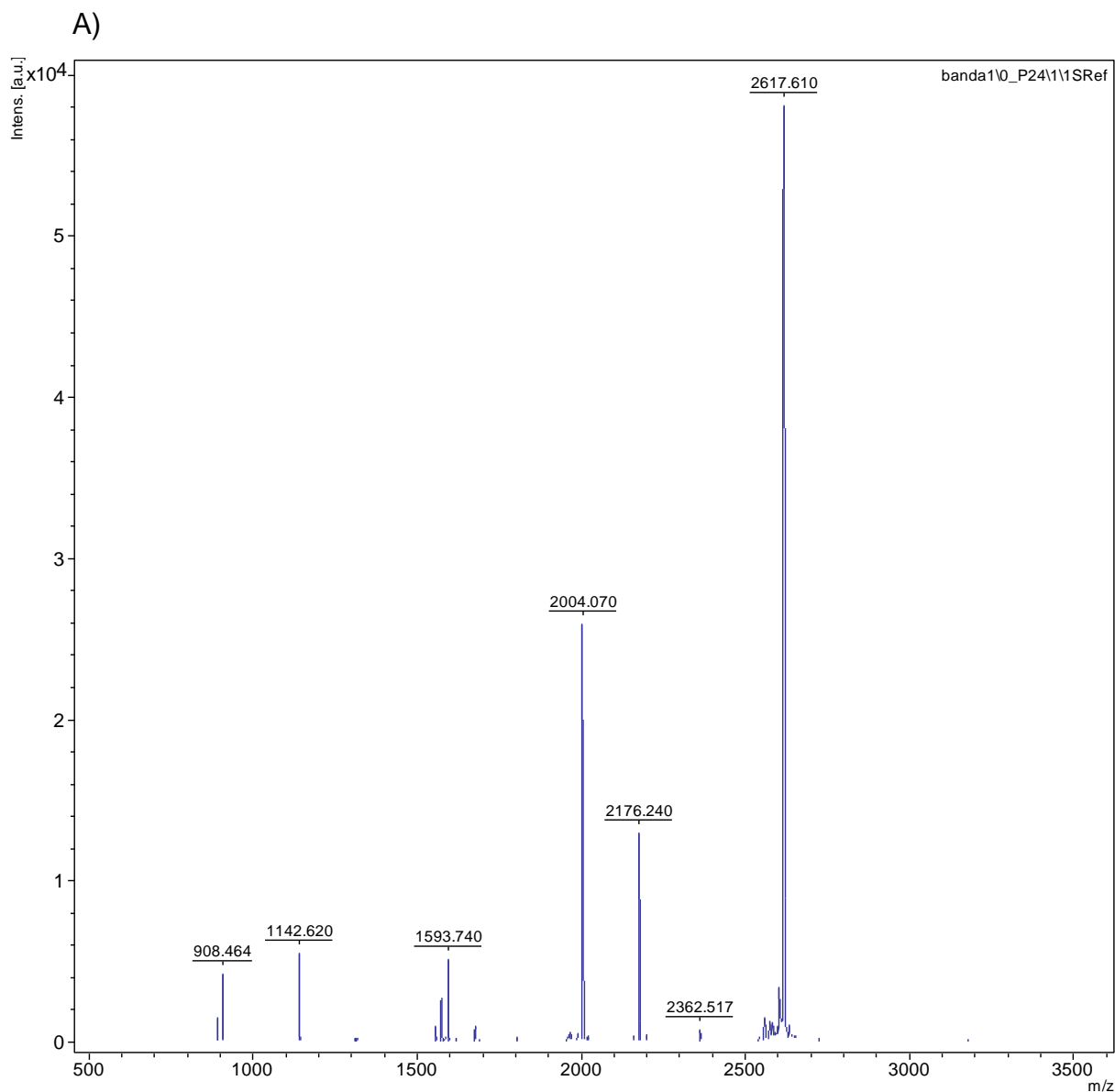


FIGURA 19 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 PRODUZIDAS EM BIORREATOR.
 LEGENDA: M – marcador Amersham Full-Range Rainbow (GE Healthcare) 250 kDa – 10 kDa; 1 e 2 – CFP10 – banda 1 e banda 2; 3 e 4 – ESAT6.

As proteínas obtidas em gel SDS-PAGE foram purificadas e avaliadas por meio de espectrometria de massa (MS), que determina a massa molecular pela relação massa/carga dos peptídeos ionizados. O equipamento MALDI, acoplado a um analisador de massas do tipo tempo de voo (Tof), foi utilizado para a obtenção do perfil peptídico das proteínas selecionadas. Os espectros foram obtidos com auxílio do programa *Flex Control* e analisados no programa *Flex Analysis*.

A lista de massas dos peptídeos trípticos, gerada experimentalmente para cada amostra, foi comparada com listas de peptídeos teóricos, gerados “*in silico*”, de proteínas dos bancos de dados NCBI, por meio do software MASCOT (disponível em: <<http://www.matrixscience.com/cgi>>). Os espectros e a identificação das proteínas encontram-se na FIGURA 20 e 21 e TABELA 20.



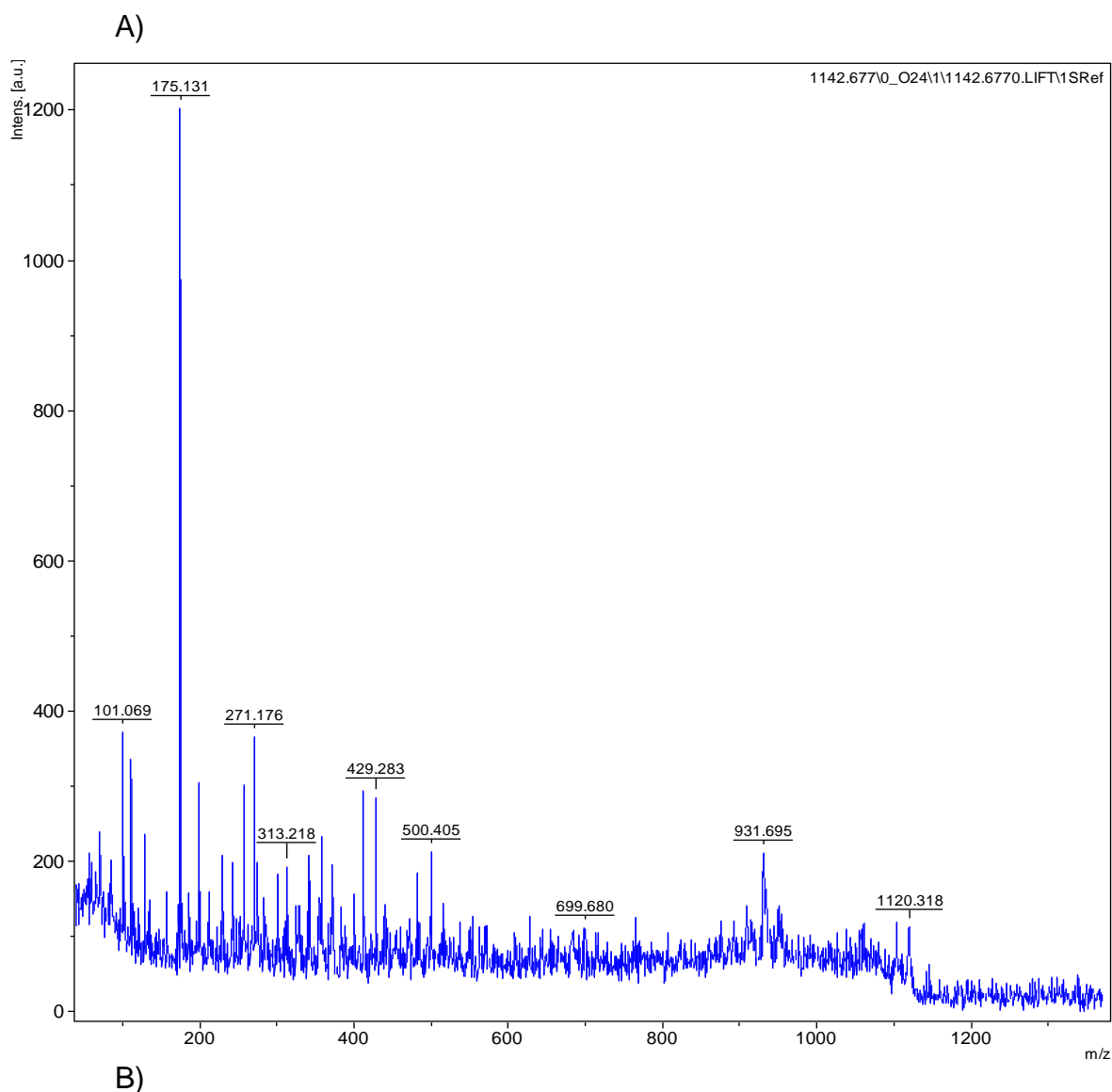
B)

1	<u>MK</u> <u>TDAATLAQ</u> <u>EAGNFER</u> ISG DLKT <u>QIDQVE</u> <u>STAGSLQGQW</u> <u>RGAAGTAAQA</u>
51	<u>AVVR</u> FQEAAAN <u>KQKQELDEIS</u> <u>TNIRQAGVQY</u> <u>SRADEEQQA</u> <u>LSSQMGF</u>

FIGURA 20 – ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO *SPOT* CORRESPONTE À PROTEÍNA CFP10. (A) Espectro dos peptídeos gerados pela tripsinização do *spot* correspondente à banda 1 da proteína recombinante CFP10. (B) Os peptídeos seqüenciados formam o *fingerprinting* da CFP10 recombinante e estão sublinhados na sequência de aminoácidos da proteína.

A Banda 2 da proteína CFP10 foi identificada pelo método PMF, porém para confirmação foi submetida ao método de MS/MS. O Peptídeo 1142,677 que apresentou um pico com boa intensidade e resolução foi fragmentado em sítios não

específicos. A combinação das massas dos fragmentos gerados forneceu as informações sobre a sequência de aminoácidos. Os espectros foram comparados com os mesmos bancos de dados utilizados para os dados de PMF e sob os mesmos parâmetros de busca.



1	MAEMKTDAA	LAQEAGNFER	ISGDLKTQID	QVESTAGSLQ	GQWRGAAGTA
51	AQAAVVR	FQE AANKQKQELD	EISTNIRQAG	VQYSRADEEQ	QQALSSQMGF

FIGURA 21 – ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO PICO 1142,677 CORRESPONDENTE À PROTEÍNA CFP10. (A) Espectro dos peptídeos gerados pela tripsinização do pico correspondente à banda 2 da proteína recombinante CFP10. (B) Os peptídeos sequenciados formam o *fingerprinting* da CFP10 recombinante e estão sublinhados na sequência de aminoácidos da proteína.

A proteína ESAT6 foi identificada, e os peptídeos sequenciados encontram-se na FIGURA 22.

1	TEQQWNFAGI	EAAASAIQGN	VTSIHSLLE	GKQSLTKLAA	<u>AWGGSGSEAY</u>
51	<u>QGVQQKWDAT</u>	<u>ATELNNALQN</u>	<u>LARTISEAGQ</u>	<u>AMASTEKNVT</u>	<u>GMFA</u>

FIGURA 22 – ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO SPOT CORRESPONDENTE À PROTEÍNA ESAT6. Os peptídeos sequenciados formam o *fingerprinting* da ESAT6 recombinante e estão sublinhados na sequência de aminoácidos da proteína.

TABELA 20 – DADOS DA IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Nome	CFP10 Banda 1 MS	CFP10 Banda 2 MS	CFP10 Banda 2 MS/MS	ESAT6 Banda 1 MS
N. de identificação	gi 497622982	gi 497622982	gi 15611010	gi 269914409
% de cobertura	84%	62%	13%	60%
Score	118	71	58	70
Expect	0,00000008	0.0041	0.0048	0,0053
Massa	10456	10456	10787	9767
Ponto isolétrico	4,68	4,68	4,59	4,48
Taxonomia	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Banco de Dados	NCBIInr	NCBIInr	NCBIInr	NCBIInr Chain B, Structure Of The Cfp10- Esat6 Complex From <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
Identificação	10 kDa culture filtrate antigen EsxB	10 kDa culture filtrate antigen EsxB	10 kDa culture filtrate antigen EsxB	

De acordo com os resultados obtidos pela espectrometria de massa, as proteínas CFP10 e ESAT6 apresentaram fidelidade de conformação e pureza.

5.4.3 Remoção de endotoxinas

Dentre as técnicas atualmente utilizadas para remoção de endotoxinas foram estudadas duas, avaliou-se efetividade, produtividade e custo.

A primeira técnica avaliada foi a da coluna Pierce® High-capacity endotoxin, a segunda, tem por base a extração em sistema micelar de duas fases aquosa. As amostras obtidas foram previamente dialisadas para diminuir a concentração do agente surfactante, fator responsável por possíveis interferências no ensaio. Os resultados obtidos na quantificação de endotoxinas pelo método cromogênico indicaram-se satisfatórios para ambas as técnicas (>5,0 EU/mL). Comparando o SMDFA ao Pierce®, nota-se um melhor desempenho na recuperação da proteína no segundo modelo. Neste a perda foi de 1,3% enquanto o SMDFA resultou numa perda de 4,7% a cada ciclo, o que resulta numa perda total de 14,2% nos três ciclos. Resultado similar foi descrito por Aida & Pabst (1990), que citam redução de endotoxinas por triton-X114 em preparações contaminadas de citocromo C, catalase e albumina em até 1000 vezes. Segundo os autores a remoção completa pôde ser alcançada por ciclos adicionais de separação de fases. Ainda relataram a perda de 2% de proteína por ciclos de separação, a quantidade de resíduo de detergente encontrada na amostra foi de 0,018% e pôde ser removida em filtração em gel ou adsorção. Liu *et al.* (1997) e Lin *et al.* (2005), descrevem a redução de 99% das endotoxinas com três ciclos de triton-x114 e também justificam a média de perda a cada processo na ordem de 10-20%.

Em relação ao custo a metodologia Pierce® é aproximadamente 100 vezes mais onerosa que a SMDFA. Segundo Laurent Simon (2005), sistemas aquosos em duas fases têm sido utilizados, extensivamente, na recuperação e purificação de biomoléculas farmacêuticas. As principais vantagens deste tipo de processo de extração são a sua biocompatibilidade, facilidade de *scale-up*, baixo custo de operação e aprovação por órgãos reguladores.

5.5 FORMULAÇÃO, LIOFILIZAÇÃO E TESTE DE ESTABILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

As formulações eleitas para o PPD recombinante deste trabalho foram fundamentadas a partir de conhecimentos das características físico-químicas e biológicas da proteína recombinante, incluindo estabilidade, especificidade e uniformidade do ativo empregado. Almeida & Souto (2007) ressaltam a importância da escolha do método de preparação da formulação, de modo que este pode ser influenciado por fatores ambientais presentes nos processos de produção como, pH, temperatura, alta pressão, solventes não aquosos, íons metálicos e agitação que podem levar a perda da atividade da proteína.

Os excipientes utilizados na formulação foram avaliados de acordo com a compatibilidade, dose administrada e via de administração descrita em compêndios oficiais (Farmacopeia). Verificou-se que as duas formulações propostas para o PPD recombinante (1 e 2) item 4.5 não apresentaram variação entre si em nenhum parâmetro de estabilidade analisado descritos no item 4.5.2.1. Além da formulação, a forma de apresentação do PPD recombinante também foi estudada. Verificou-se que a forma liofilizada apresentou-se sem alteração em todos os fatores testados (TABELA 21).

O resultado da análise do PPD recombinante na apresentação solúvel, não apresentou alterações no aspecto, cor e esterilidade, porém apresentou instabilidade da concentração de proteína, atividade biológica e pH frente a algumas condições de temperatura. Os ciclos de congelamento e descongelamento não apresentaram diferença na concentração da proteína em nenhuma das apresentações (liofilizada e solúvel) mantendo-se estável.

Os valores de pH oscilaram entre 6,9 e 7,4 nas diversas condições de temperatura (FIGURA 23). Como pode ser verificado, os valores de pH não sofreram alterações maiores que 10%, permanecendo compatíveis com o pH cutâneo. Produtos destinados à administração cutânea devem ser isotônicos e ter pH próximo de neutro em veículo aquoso (Leonardi *et al.*, 2002). A importância da medida do pH em fórmulas farmacêuticas se relaciona a eficácia e segurança, em atributos como estabilidade, biodisponibilidade e biocompatibilidade. Valores baixos de pH podem causar o aparecimento de irritação dérmica cumulativa e degradar as proteínas recombinantes solubilizadas no veículo (GIL, 2007).

A estabilidade da proteína, na forma solúvel, foi avaliada mediante a concentração da mesma em diferentes condições de temperatura (FIGURA 24). Verificou-se estabilidade de 100% da concentração da proteína recombinante mediante congelamento (-20°C e -80°C), durante os 90 dias avaliados. A concentração da proteína em temperatura de refrigeração (5°C) diminuiu em 26% e em temperatura ambiente 77% no período avaliado. Em condição elevada de temperatura (40°C) nos primeiros quinze dias observou-se queda de 56% na concentração de proteína recombinante, seguido de ausência total de proteínas após trinta dias resultando na perda da atividade humoral após 30 dias. Quando proteínas são submetidas à elevada temperatura ocorre o processo de desnaturação térmica resultando na perda da concentração de proteína e atividade biológica (Lehninger, 2011).

É importante ressaltar que a amostra do PPD recombinante liofilizado apresentou-se mais estável quando comparada com a apresentação solúvel. Esta apresentação permaneceu com todas as características iniciais inalteradas nas diversas temperaturas. Uma das principais formas farmacêuticas utilizada é a solúvel, devido à simplicidade de preparação, custo e manipulação. Entretanto, as proteínas instáveis podem ser facilmente desnaturadas ou degradadas por reações químicas mediadas pelo meio aquoso em que as proteínas se encontram. Segundo Roy & Gupta (2004) a liofilização é uma técnica de suma importância para a indústria farmacêutica devido a maior estabilidade das proteínas quando apresentadas em pó, garantindo maior prazo de validade e facilidades de armazenamento e transporte.

A preparação de formulações a -20 °C também se mostrou estável, porém não se torna uma alternativa economicamente viável em muitos mercados, dado que dificulta o armazenamento, transporte e monitorização em locais de difícil acesso.

O PPD recombinante liofilizado apresentou-se estável até o presente momento totalizando nove meses de teste, armazenado em temperatura ambiente.

TABELA 21 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PPD RECOMBINANTE FRENTE A DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA

PPD Recombinante CFP10 - Formulação 1 E 2															
Temp. Armazenamento	Temp. refrigeração (5 °C)					Temp. Ambiente (20 °C)					Temp. elevada (40 °C)				
	t(0)	t(15)	t(30)	t(60)	t(90)	t(0)	t(15)	t(30)	t(60)	t(90)	t(0)	t(15)	t(30)	t(60)	t(90)
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
pH	7,4	7,4	7,3	7,2	7,4	7,4	7,3	7,1	7,1	7,1	7,4	6,9	6,9	6,9	7
Esterilidade	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
(%) perda [conc]	100	92	91	83	74	100	85	78	67	23	100	44	0	0	0
Atividade Humoral	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	NA	NA	NA
Temp. Armazenamento	Temp. congelamento (-20 °C)					Temp. congelamento (-80 °C)					*Liofilização (5 /20 /40 /-20 /-80°C)				
	t(0)	t(15)	t(30)	t(60)	t(90)	t(0)	t(15)	t(30)	t(60)	t(90)	t(0)	t(15)	t(30)	t(60)	t(90)
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
pH	7,4	7,4	7,3	7,3	7,3	7,4	7,2	7,3	7,3	7,2			7,4		
Esterilidade	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
(%) perda [conc]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Atividade Humoral	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

LEGENDA: t(0) - Logo após o preparo da formulação

Aspecto: N - Normal / LM - Levemente alterado / IM - Intensamente modificado

Cor: N - Normal sem alteração / LA - levemente alterado / A - Amarelo / IA - Intensamente Amarelo

Esterilidade: A - Apresentou / NA - Não Apresentou

Atividade Humoral *in vitro*: A -Apresentou / NA - Não Apresentou

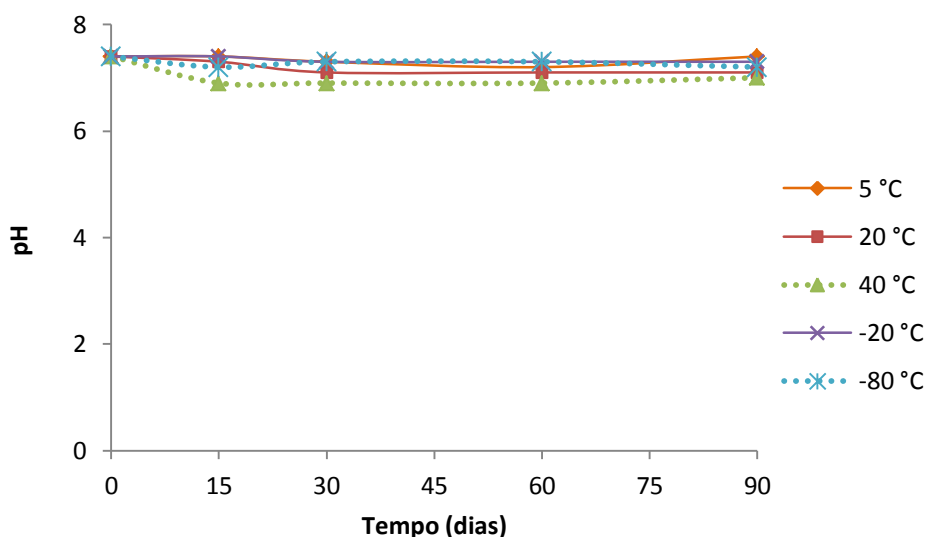


FIGURA 23 – VERIFICAÇÃO DOS VALORES DE PH NO PPD RECOMBINANTE SOLÚVEL EM DIFERENTES TEMPERATURAS ANALISADAS

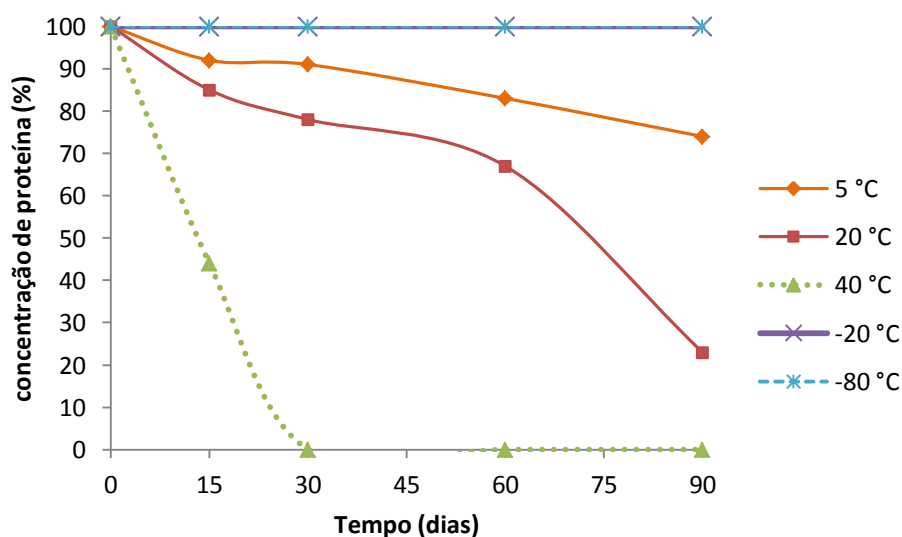


FIGURA 24 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NO PPD RECOMBINANTE SOLÚVEL EM DIFERENTES TEMPERATURAS ANALISADAS

Os processos de produção devem garantir a qualidade e estabilidade do produto de acordo com autoridades regulatórias. Métodos que indicam a estabilidade de biofármacos são estabelecidos para fornecer evidência sobre a qualidade deste, quando exposto a condições externas, como pH, temperatura meios oxidativos e à luz. As investigações sobre a estabilidade de fármacos estão ganhando maior relevância na indústria farmacêutica como um fator importante para se determinar tanto a eficácia quanto a toxicidade, uma vez que as alterações na estrutura podem induzir alterações nas suas propriedades biológicas. Sendo ainda

importante para adequar as condições de armazenamento, períodos de re-avaliação e estabelecer a vida de prateleira (Baranda *et al.*, 2006).

Obeve-se sucesso nos resultados de estabilidade da formulação liofilizada do PPD recombinante, uma vez que esta atendeu as principais exigências de estabilidade para bioprodutos exigida por órgãos regulamentadores. A liofilização evita problemas relacionados a instabilidade termodinâmica que ocorre em proteínas, além de representar uma forma mais acessível para triagem de pacientes TB positivos, em regiões de alta incidência, com território extensos e de difícil acesso como é o caso do Brasil.

Como perspectiva futura visa-se a análise estrutural das proteínas por análise em espectro de discoísmo circular.

5.6 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 FRENTE AO SORO POLICLONAL DE COELHO

Anti soros de *M. tuberculosis* foram produzidos em animais com a finalidade de avaliar a especificidade das proteínas CFP10 e ESAT6 em ensaios sorológicos por meio das técnicas ELISA e Western Blot. Para definição das melhores concentrações dos reagentes (ELISA) avaliou-se a titulação em bloco de antígeno, soro e conjugado. Considerando os dois tipos de antígenos (proteína CFP10 e ESAT6), os melhores parâmetros foram definidos por critério baseado na maior diferença entre a média da absorbância dos soros policlonais positivos e dos soros negativos em número de vezes. Ao analisar os resultados encontrou-se a concentração ótima para proteína CFP10 de 1000 ng/poço e ESAT6 de 500 ng/poço. As diluições de soro foram 1:50 e conjugado 1:5000 (TABELAS 22 e 23). A diferença entre o positivo e negativo em número de vezes foi de 51,05 e 41,47 vezes para proteína CFP10 e ESAT6 respectivamente (FIGURAS 25 e 26).

TABELA 22 – ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CFP10 EM SORO DE COELHO POLICLONAL anti-*Mycobacterium tuberculosis*

Proteína CFP10		250 ng		500 ng		1000 ng		
Soro		+	-	+	-	+	-	
conjugado	2500	1,540	0,067	1,570	0,059	1,755	0,061	Soro 1:25
	5000	1,367	0,042	1,380	0,048	1,505	0,048	
	10000	0,652	0,023	0,684	0,023	0,711	0,027	
	20000	0,241	0,010	0,257	0,010	0,265	0,010	
conjugado	2500	1,058	0,049	1,071	0,048	1,203	0,043	Soro 1:50
	5000	0,737	0,017	0,752	0,020	0,970*	0,019*	
	10000	0,276	0,016	0,265	0,013	0,288	0,011	
	20000	0,168	0,012	0,167	0,011	0,185	0,010	
conjugado	2500	0,795	0,037	0,974	0,034	0,989	0,036	Soro 1:100
	5000	0,504	0,016	0,506	0,014	0,627	0,017	
	10000	0,206	0,012	0,231	0,010	0,245	0,011	
	20000	0,107	0,009	0,124	0,008	0,139	0,007	

* Maior diferença entre a média de absorvância soro positivo e negativo de cada bloco testado.

TABELA 23 – ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ESAT6 EM SORO DE COELHO POLICLONAL anti-*Mycobacterium tuberculosis*

Proteína ESAT6		250 ng		500 ng		1000 ng		
Soro		+	-	+	-	+	-	
conjugado	2500	1,232	0,062	1,199	0,049	1,155	0,049	Soro 1:25
	5000	1,115	0,044	1,104	0,044	1,107	0,045	
	10000	0,523	0,021	0,511	0,019	0,521	0,026	
	20000	0,189	0,009	0,137	0,013	0,215	0,010	
conjugado	2500	0,952	0,041	0,989	0,049	0,913	0,040	Soro 1:50
	5000	0,627	0,017	0,622*	0,015*	0,671	0,018	
	10000	0,232	0,015	0,212	0,010	0,196	0,012	
	20000	0,149	0,011	0,138	0,010	0,139	0,010	
conjugado	2500	0,683	0,037	0,674	0,035	0,709	0,034	Soro 1:100
	5000	0,449	0,012	0,401	0,012	0,441	0,012	
	10000	0,232	0,011	0,230	0,010	0,225	0,011	
	20000	0,107	0,009	0,124	0,008	0,139	0,007	

* Maior correlação entre a média de absorvância soro positivo e negativo de cada bloco testado.

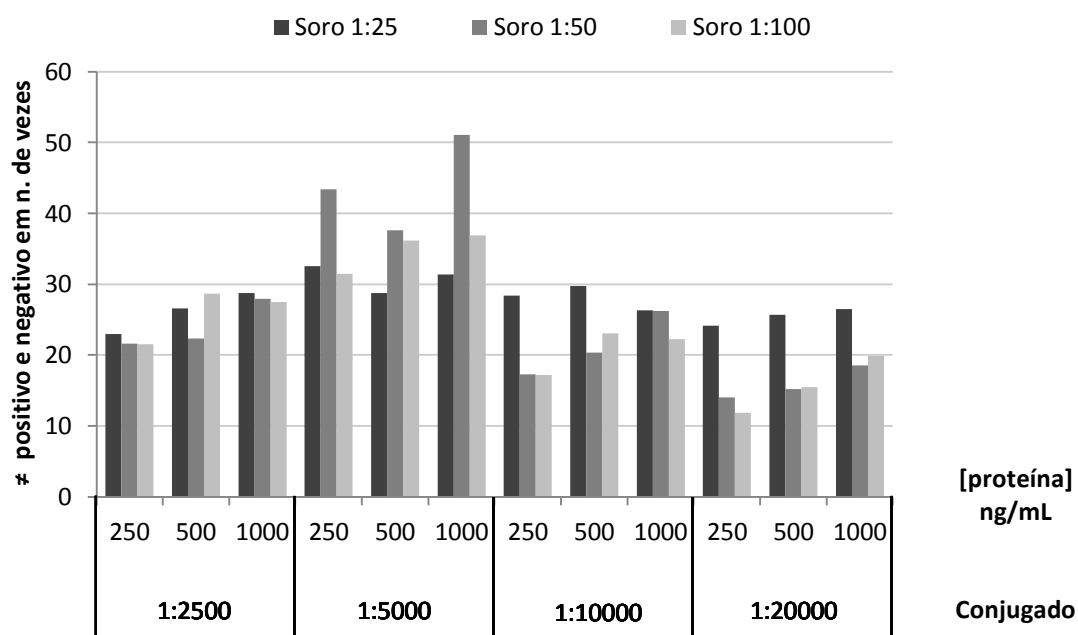


FIGURA 25 – AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA DE ABSORBÂNCIA DO SORO POLICLONAL E DO SORO NEGATIVO EM NÚMERO DE VEZES FRENTE ÀS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CFP10

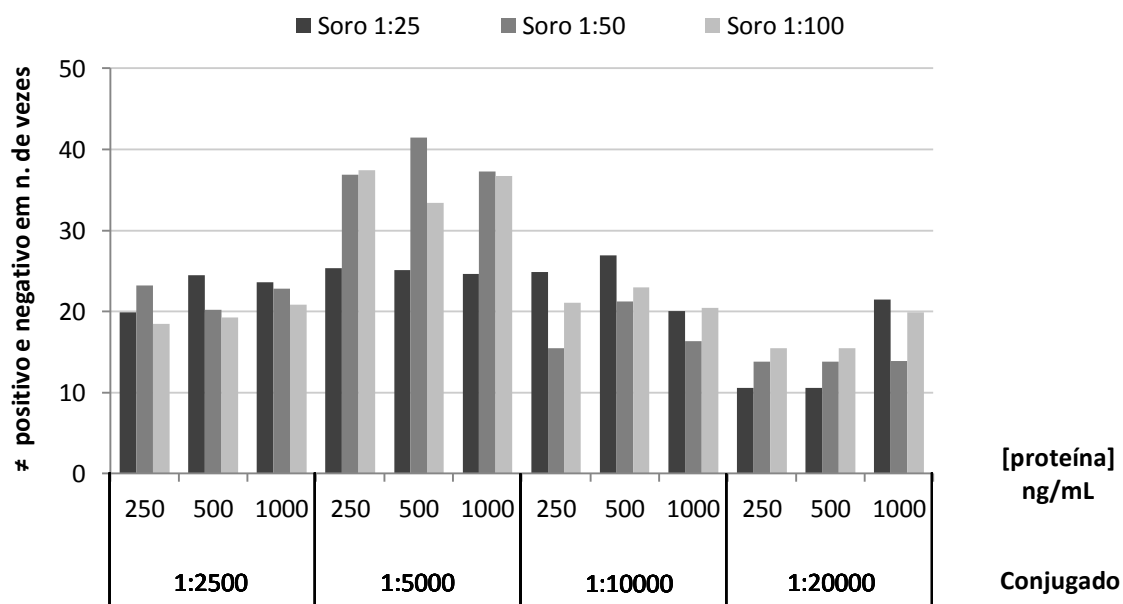


FIGURA 26 – AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA DE ABSORBÂNCIA DO SORO POLICLONAL E DO SORO NEGATIVO EM NÚMERO DE VEZES FRENTE ÀS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ESAT6

A cinética de produção de anticorpos presentes no soro dos animais imunizados com *M. tuberculosis* foi realizada frente às proteínas CFP10 e ESAT6 (FIGURA 27). Observou-se que a partir da primeira semana de imunização houve

aumento no título de anticorpos específicos para ambas às proteínas recombinantes, tendo seu pico máximo no 45º dia, sofrendo em seguida uma leve redução. Observa-se que mesmo após o reforço, no 45º dia, não houve aumento na resposta imunológica. Este tipo de comportamento é típico de tolerância imunológica em que a produção de anticorpos decresce, embora o antígeno continue estimulando a defesa imunológica por outros mecanismos (Pollock *et al.*, 2003). O estudo do título dos anticorpos produzidos em coelho imunizado mostrou alta sensibilidade para os soros coletados aos 15, 30, 45 e 60 dias, visto que reagiram para a proteína CFP10 e ESAT6.

A detecção e avaliação da atividade das proteínas recombinantes também foi realizada por meio de Western Blot. Os resultados obtidos identificaram alta reatividade das proteínas CFP10 e ESAT6 frente ao soro policlonal positivo. Esta reatividade pode ser observada pela intensidade da banda na FIGURA 28. O controle negativo não apresentou nenhuma banda. Wards *et al.* (2000) relatam resultados similares com o sucesso na atividade humoral das proteínas CFP10 e ESAT6 frente ao soro policlonal obtido em coelhos por meio da técnica de avaliação de ELISA e Western Blot.

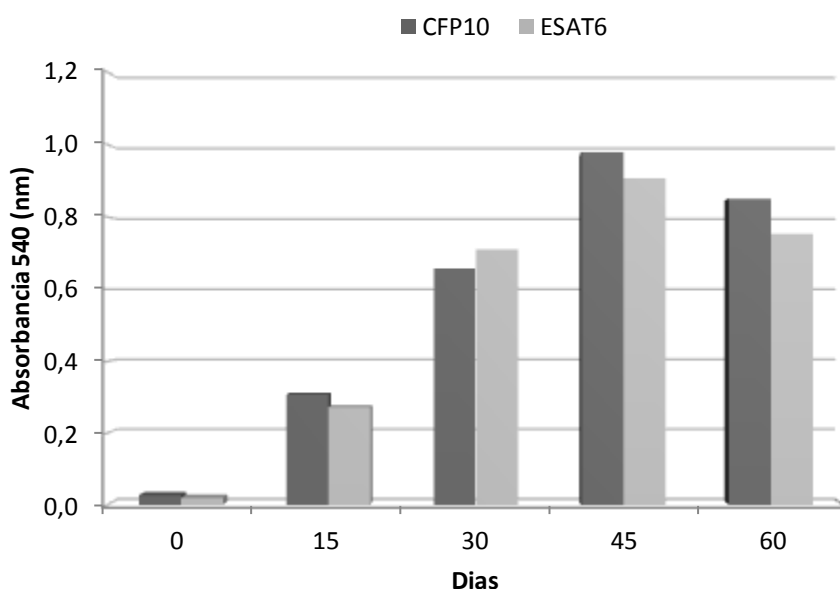


FIGURA 27 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*, APÓS IMUNIZAÇÃO COM 1 mg E REFORÇO COM A MESMA QUANTIDADE AO 15º, 30º, 45º E 60º DIAS FRENTE ÀS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CFP10 E ESAT6

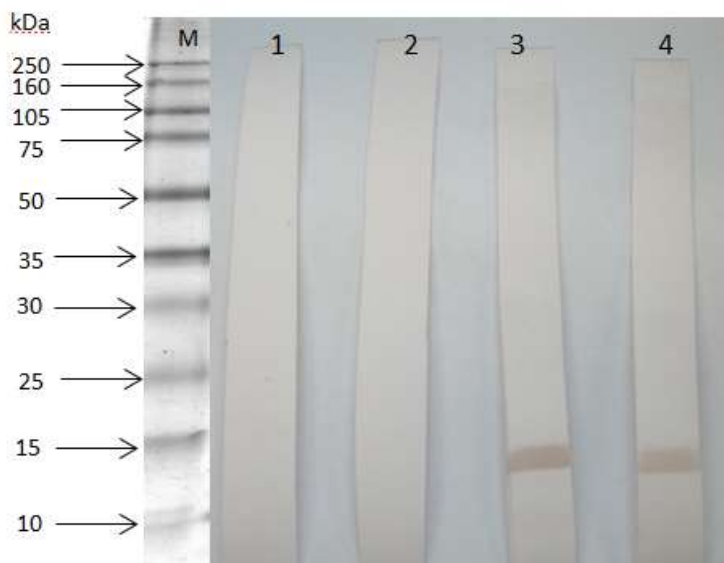


FIGURA 28 – A ESPECIFICIDADE DAS PROTEÍNAS AVALIADA POR WESTERN BLOT USANDO SORO NEGATIVO E O ANTICORPO POLICLONAL DE COELHO

LEGENDA: M – marcador Amersham Full-Range Rainbow (GE Healthcare) 250 kDa – 10 kDa; 1- soro negativo/CFP10; 2- soro negativo/ESAT6; 3- Soro Policlonal/CFP10 e 4- Soro policlonal/ESAT6

5.7 QUANTIFICAÇÃO DE INTERFERON GAMA (IFN- γ)

Para a quantificação de IFN- γ nas amostras de sobrenadante do cultivo de células mononucleares de sangue periférico de pacientes estudados, foi utilizado o kit comercial (DuoSet ELISA – R&D Systems). O teste de dosagem de IFN- γ foi realizado para analisar a capacidade das proteínas recombinantes produzidas induzirem a produção de IFN- γ em pacientes infectados por *M. tuberculosis*.

Na TABELA 24 são apresentados os parâmetros de sensibilidade e especificidade obtidos para as proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6 e do antígeno padrão ouro (PPDRT23) em indivíduos com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis. Dos 27 indivíduos com tuberculose pulmonar, o teste detectou produção de IFN- γ para proteína: 1) CFP10 em 24 indivíduos; 2) ESAT6 em 25 indivíduos 3) CFP10 + ESAT6 em 25 indivíduos e 4) PPDRT23 em 26 indivíduos. A sensibilidade foi de 88,88%; 92,59%; 92,59% e 96,29, respectivamente. Para os indivíduos saudáveis as proteínas recombinantes apresentaram especificidade de 100% enquanto o PPDRT23 a especificidade ficou em 61,53%.

TABELA 24 – RESULTADO DO TESTE DE DOSAGEM DE IFN- γ NOS INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE PULMONAR (DOENÇA PRESENTE) E NOS INDIVÍDUOS SADIÓS (DOENÇA AUSENTE)

IFN- γ	Doença								Total
	CFP10		ESAT6		CFP10 + ESAT6		PPDRT23		
	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
Positivos	24	0	25	0	25	0	26	5	27
Negativos	3	13	2	13	2	13	1	8	13
Total	27	13	27	13	27	13	27	13	40

Na FIGURA 29 observa-se a resposta individual de IFN- γ produzido após o estímulo com os antígenos CFP10, ESAT6, CFP10 + ESAT6 e PPDRT23 nos grupos estudados.

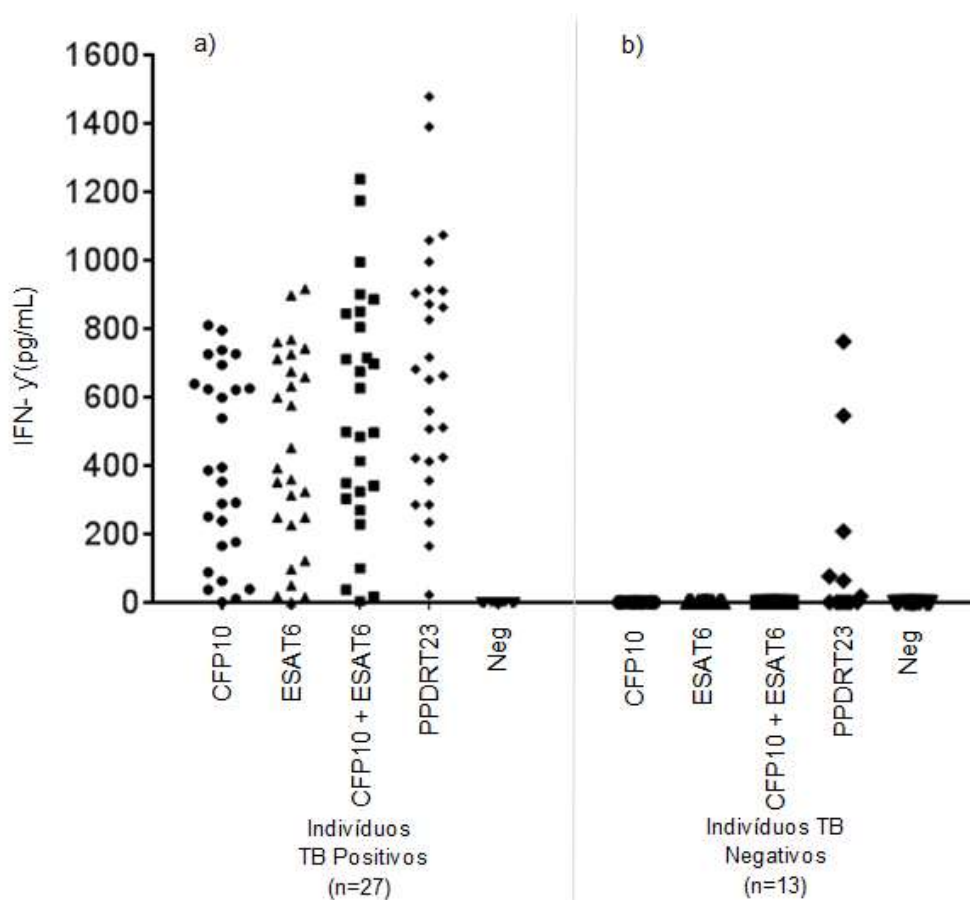


FIGURA 29 – RESPOSTA INDIVIDUAL DE IFN- γ PRODUZIDO APÓS ESTÍMULO COM OS ANTÍGENOS CFP10; ESAT6; CFP10 + ESAT6; PPDRT23 E NEG (SEM ESTÍMULO) EM 29 INDIVÍDUOS TUBERCULOSE PULMONAR (a) E EM 13 INDIVÍDUOS SADIÓS (b).

Verificou-se que entre as proteínas recombinantes a produção de IFN- γ em pg/mL foi maior quando estas foram associadas. O controle negativo, realizado com o cultivo de amostras sem estímulo não apresentou produção de IFN- γ em nenhum dos indivíduos testados nos dois grupos. E a resposta da produção de IFN- γ em indivíduos não infectados por TB foi de zero para todas as proteínas recombinantes. Porém o controle positivo (PPDRT23) apresentou produção de IFN- γ em 5 pacientes.

Estes resultados demonstram que as proteínas recombinantes produzidas foram capazes de estimular a produção de IFN- γ por células T em indivíduos infectados por tuberculose. Além de diferenciarem pacientes vacinados e infecção por outras micobactérias. O que indica que as proteínas codificadas na região RD1, CFP10 e ESAT6 são mais específicas que o PPDRT23 no diagnóstico da tuberculose em uma população com cobertura da vacina BCG.

Resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado por Zhang *et al.* (2010), que demonstra ensaios de (IFN- γ) utilizando as proteínas CFP10, ESAT6 e PPDRT23. Os resultados apresentaram maior sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes comparadas ao teste PPD. Este trabalho realizou estudo em 89 pacientes com TB pulmonar ativa e 57 pacientes saudáveis. As taxas de produção de interferon positivas nos grupos com tuberculose ativa e indivíduos saudáveis foram 87,6% (78/ 89) e 21.1% (12 /57), respectivamente. Este trabalho ainda revelou que a produção de IFN- γ em pacientes com tuberculose ativa pode estar relacionada a gravidade da doença e ao período de tratamento.

Futuros estudos são necessários para avaliar a especificidade e sensibilidade em um grupo maior de indivíduos.

5.8 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR DAS PROTEÍNAS CFP10 E ESAT6 EM MODELO ANIMAL *Cavia. porcellus*

A resposta imune celular das proteínas recombinantes foi avaliada por meio da leitura do halo de endureção formado nos cobaios *C. porcellus* previamente sensibilizados com: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* e *M. bovis* (BCG). Foram

considerados positivos valores acima de 9 mm de leitura. As reações positivas foram identificadas visualmente a partir de reações de sensibilidade avermelhadas fortes (eritema) e endureção (FIGURA 30).



FIGURA 30 – REAÇÃO DE ENDURAÇÃO, PRODUZIDA NO LOCAL DE APLICAÇÃO DA FORMULAÇÃO COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ANIMAIS SENSIBILIZADOS COM O ANTÍGENO DE *Mycobacterium.tuberculosis*

Verificou-se ausência de reação de endureção para as proteínas recombinantes e tampões testados nos animais sensibilizados com *M. avium*, *M. bovis* (BCG) e os animais não sensibilizados (negativos). Porém o controle positivo PPDRT23 formou um halo de endureção de 10 mm de diâmetro em ambos os animais sensibilizados. Na resposta celular obtida em animais imunizados com BCG pode-se constatar a especificidade e a capacidade das proteínas recombinantes produzidas em diferenciar a infecção por TB de uma vacinação bem sucedida. Os cobaias que não foram sensibilizados (negativos) não apresentaram reação.

Observou-se nos animais sensibilizados com *M. tuberculosis* e *M. bovis* que todas as formulações, contendo proteína recombinante, e o controle positivo

PPDRT23 induziram resposta de hipersensibilidade tipo tardia, após 24 horas de inoculação. Todos os animais estudados não apresentaram reações aos veículos utilizados na formulação, demonstrando somente reação de imunogenicidade para as proteínas.

A FIGURA 31 relaciona os resultados obtidos no teste de intradermorreação em animais sensibilizados com *M. bovis* e *M. tuberculosis* frente a diferentes formulações de antígenos e seus veículos. Observa-se que todas as concentrações e formulações avaliadas apresentaram reação de endureção e eritema com diâmetro de leitura superior a 9 mm (cut off), com intervalo de 9 a 14 mm. As proteínas testadas em associação (CFP10 e EAST6), apresentaram diâmetro de endureção que variou de 11 a 16 mm. O desvio padrão variou de 0,7 a 1,4.

Estudos relatam resultados semelhantes. A utilização de antígenos provenientes da região RD1 do *M. tuberculosis*, foi avaliada quanto à atividade diagnóstica com base na reação de hipersensibilidade tardia. Estes estudos demonstraram que as proteínas recombinantes sozinhas e suas múltiplas combinações induziram forte resposta celular em cobaias imunizadas com *M. tuberculosis* e a resposta apresentou-se insignificante em cobaias imunizadas com *M. bovis* (BCG). Estes estudos também demonstraram que as proteínas recombinantes citadas são capazes de induzir reações de intradermorreação em cobaias imunizadas com Mtb e em bovinos vacinados com *M. bovis*, mas não induz qualquer reação nas cobaias vacinadas com a vacina BCG ou *M. avium* (Wards et al., 2000; Pollock et al., 2003; Kalra et al., 2010).

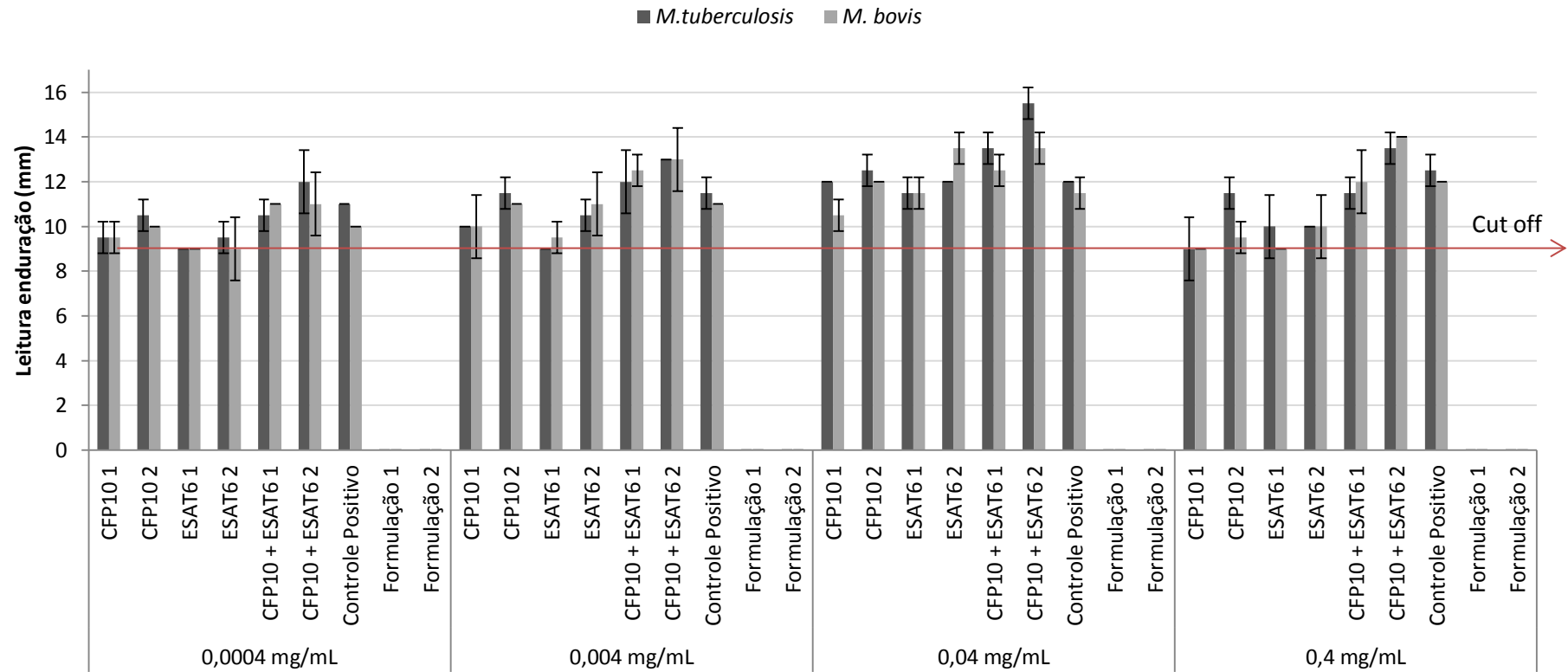


FIGURA 31 – DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DE DIÂMETRO DE ENDURAÇÃO PRODUZIDOS PELAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES INOCULADAS EM COBÁIAS *Cavia porcellus* PREVIAMENTE SENSIBILIZADOS COM *Mycobacterium tuberculosis* EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES (0,0004 mg/mL; 0,004 mg/mL; 0,04 mg/mL; 0,4 mg/mL)

Os resultados expostos neste estudo indicam que combinações de múltiplos antígenos produzem melhores resultados que os mesmos antígenos usados isoladamente, mesmo em concentrações similares. Os resultados obtidos por coquetéis elaborados por proteínas recombinantes da região RD1 corroboram com nossos resultados (Whelan *et al.*, 2010; Malaghini *et al.*, 2011; Stavri *et al.*, 2012). Estudos em animais demonstraram que a combinação da proteína ESAT6 e CFP10 associadas promovem aumento da sensibilidade do produto sem prejudicar a especificidade (van Pinxteren *et al.*, 2000).

As respostas positivas medidas na leitura após 24 h apresentaram-se mais fortes do que em 48 h para todos os grupos. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa. Após 72 h, todas as reações, incluindo o controle PPDRT23, diminuiu para menos de 3 mm de diâmetro e, portanto, foram consideradas negativas. Estudos realizados por Wu *et al.* (2008), verificaram resultados semelhantes. A resposta imune celular máxima encontrada no modelo de cobaia foi entre 24 e 48 h após a intradermorreação da amostra de proteína recombinante testada. Para o teste de intradermorreação realizado em seres humanos, o tempo ideal de leitura é de 48-72 h após a inoculação intradérmica do antígeno.

Verificou-se que as melhores respostas para a reação de endureção foram obtidas na concentração de 0,04 mg/mL com o coquetel de proteína CFP10 e ESAT6 na formulação com o tampão PPD. Observa-se esta mesma concentração de proteínas recombinantes para teste de intradermorreação na identificação da tuberculose em outros trabalhos (van Pinxteren *et al.*, 2000; Malaghini *et al.*, 2011).

A concentração escolhida de 0,04 mg/mL com a injeção de 200 µL, torna viável a produção destas proteínas quando comparado aos rendimentos obtidos de 232,59 mg/L e 120,79 mg/L de fermentado.

Em Resumo os resultados obtidos neste trabalho permitem a produção de proteínas específicas purificadas de *M. tuberculosis* livres de endotoxinas com aplicação em diferentes métodos de diagnóstico da Tuberculose e com potencial para produção e maiores escalas. A estabilidade da forma liofilizada das proteínas recombinantes também facilita o transporte e o armazenamento das mesmas, possibilitando a triagem em regiões de difícil acesso. A fim de melhoria do diagnóstico da tuberculose e autossuficiência da produção de insumos nacionais a introdução de novos testes específicos e sensíveis se faz necessária.

CONCLUSÃO

Uma vez desenvolvidos os experimentos e analisados os resultados obtidos na pesquisa pode se chegar às seguintes conclusões:

1. A amplificação e purificação dos plasmídeos *Rv3874* e *Rv3875* permitiu a montagem de um banco de plasmídeos purificados para os trabalhos realizados e futuros experimentos.
2. A padronização do pré-inóculo mostrou-se eficaz garantindo uma parametrização no processo fermentativo, além de identificar o melhor tempo de inoculação para o pré-inóculo.
3. A otimização do processo de lise de corpúsculos de inclusão e das condições de cultivo para expressão das proteínas recombinantes CFP10 e ESAT6 mostraram-se eficientes e obtiveram-se rendimentos superiores.
4. Obteve-se sucesso na transposição do cultivo celular realizada em escala laboratorial (frascos Erlenmeyer) para biorreator, mantendo a atividade biológica e imunológica das proteínas. O cultivo celular em biorreator propiciou a produção em maior escala, com baixo custo o que possibilita a competitividade com o mercado.
5. Obteve-se o produto na sua forma liofilizada, com atividade biológica celular e humoral.
6. Foi possível verificar a resposta de células mononucleares com a produção de IFN- γ quando estimuladas com as proteínas recombinantes e o PPD.
7. Os testes biológicos de avaliação de resposta imune celular demonstraram que as duas proteínas recombinantes testadas produziram reação positiva de endureção em teste intradérmico em cobaias *C. porcellus* previamente sensibilizados com *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Em animais sensibilizados com *M. avium*, *M. bovis* BCG e animais não sensibilizados não houve reação.
8. Quando aplicadas em conjunto (coquetel CFP10 e ESAT6), na concentração de 0,04 mg/mL, os resultados de intradermorreação em *C.*

porcellus apresentaram excelentes resultados de enduração. Representando uma alternativa viável e factível para produção de antígenos recombinantes de *M. tuberculosis* em substituição ao PPD convencional.

9. O presente trabalho atingiu, portanto, seu objetivo geral de desenvolver um produto biotecnológico injetável de proteínas recombinantes específicas de *M. tuberculosis*. Com capacidade de produção industrial para uso em intradermorreação e de grande importância para o desenvolvimento de novas pesquisas biomédicas, prevenção, tratamento e diagnóstico tuberculose.

PERSPECTIVAS

Para a continuidade deste estudo seria interessante:

1. Avaliar a estrutura das proteínas recombinantes obtidas (CFP10 e ESAT6) por meio de técnica de discoísmo circular;
2. Aumentar o tempo de duração da resposta celular 48 horas para 72 horas e a endureção no local da aplicação, por meio de adjuvantes, conjugação com peguilados ou lipossomas;
3. Conceber um processo industrial considerando as variáveis de operação otimização do pH, oxigênio dissolvido, meio de cultura e agitação em biorreator;
4. Padronização do uso destas proteínas em testes rápidos, utilizando dispositivos de uso único, não dependentes de infraestrutura, e que possam ser concluídos em tempo igual ou inferior a 30 minutos. Utilizando plataforma de adsorção da proteína em membrana por Western Blot;
5. Desenvolvimento de um kit para dosagem de IFN- γ nacional, avaliar especificidade e sensibilidade;
6. Estudo clínico em grupos bem caracterizados para avaliação de sensibilidade e especificidade do teste de intradermoreação;
7. Registro do teste de intradermoreação PPD recombinante em órgão regulamentado (ANVISA);

REFERÊNCIAS

- ABRAMO, C.; MEIJGAARDEN, K. E.; GARCIA, D.; FRANKEN, K. L.; KLEIN, M. R.; KOLK, A. J.; OLIVEIRA, S. C.; OTTENHOFF, T. H.; TEIXEIRA, H. C. Monokine induced by interferon gamma and IFN-gamma response to a fusion protein of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 in Brazilian tuberculosis patients. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, 8, 45-51, 2006.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual review of immunology**, 17, 593-623, 1999.
- AGHABABA, H.; MOHABATI MOBAREZ, A.; KHORAMABADI, N.; BEHMANESH, M.; MAHDAVI, M.; TEBIANIAN, M.; NEJATI, M. A Comparative Approach to Strategies for Cloning, Expression, and Purification of Mycobacterium tuberculosis Mycolyl Transferase 85B and Evaluation of Immune Responses in BALB/c Mice. **Molecular biotechnology**, 2014.
- AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. **Clinical & developmental immunology**, 2011, 814943, 2011.
- AIDA, Y.; PABST, M. J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **J Immunol Methods**, 132, 191-195, 1990.
- ALEXANDER, K. A.; LAVER, P. N.; MICHEL, A. L.; WILLIAMS, M.; VAN HELDEN, P. D.; WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. mungi. **Emerging infectious diseases**, 16, 1296-1299, 2010.
- ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. **Advanced drug delivery reviews**, 59, 478-490, 2007.
- ANDERSSON, L.; YANG, S.; NEUBAUER, P.; ENFORS, S. O. Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of Escherichia coli. **Journal of biotechnology**, 46, 255-263, 1996.
- ARAUJO, L. S.; MELLO, F. C.; DA SILVA NDE, B.; LEUNG, J. A.; MACHADO, S. M.; SARDELLA, I. G.; MACIEL RDE, M.; SAAD, M. H. Evaluation of Gamma Interferon Immune Response Elicited by the Newly Constructed PstS-1(285-374):CFP10 Fusion Protein To Detect Mycobacterium tuberculosis Infection. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, 21, 552-560, 2014.
- BABAEIPOUR, V.; SHOJAOSADATI, S. A.; MAGHSOUDI, N. Maximizing Production of Human Interferon-gamma in HCDC of Recombinant E. coli. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, 12, 563-572, 2013.
- BABAYIGIT, C.; OZER, B.; OZER, C.; INANDI, T.; DURAN, N.; GOCMEN, O. Performance of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test and Tuberculin Skin Test for diagnosis of latent tuberculosis infection in BCG vaccinated health care workers. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, 20, 521-529, 2014.

- BAI, Y.; XUE, Y.; GAO, H.; WANG, L.; DING, T.; BAI, W.; FAN, A.; ZHANG, J.; AN, Q.; XU, Z. Expression and purification of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and MPT64 fusion protein and its immunoprophylactic potential in mouse model. **Protein expression and purification**, 59, 189-196, 2008.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Current opinion in biotechnology**, 10, 411-421, 1999.
- BARANDA, A. B.; ALONSO, R. M.; JIMENEZ, R. M.; WEINMANN, W. Instability of calcium channel antagonists during sample preparation for LC-MS-MS analysis of serum samples. **Forensic science international**, 156, 23-34, 2006.
- BLOCK, H.; MAERTENS, B.; SPRIESTERSBACH, A.; BRINKER, N.; KUBICEK, J.; FABIS, R.; LABAHN, J.; SCHAFFER, F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. **Methods in enzymology**, 463, 439-473, 2009.
- BOMBARDA, S.; FIGUEIREDO, C. M.; FUNARI, M. B. D. G.; SOARES JÚNIOR, J.; SEISCENTO, M.; TERRA FILHO, M. Imagem em tuberculose pulmonar. **Jornal de Pneumologia**, 27, 329-340, 2001.
- BORKOWSKA, D.; RADZIKOWSKA, E.; ZALESKA, J.; ZIOLKOWSKI, J.; KLATT, M.; ZWOLSKA, Z.; AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E.; ROSZKOWSKI-SLIZ, K. [Interferon-Gamma Release Assays in the diagnosis of latent tuberculosis infection in clinical situations]. **Pneumonologia i alergologia polska**, 82, 39-45, 2014.
- BOTTAI, D.; BROSCHE, R. Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families. **Molecular microbiology**, 73, 325-328, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72, 248-254, 1976.
- BRASIL, 2002. Ministério da Saúde - Manual Técnico para o Controle da Tuberculose. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_controle_tuberculose.pdf Acessado em jan. 2014.
- BRASIL, 2011. Ministério da Saúde - Manual de recomendações para controle da tuberculose no Brasil. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.pdf Acesso em jan. 2014.
- BRATS, 2011. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologia em Saúde. Disponível em http://200.214.130.94/rebrats/publicacoes/Brats_16.pdf Acesso em jan 2013.
- BRODIN, P.; MAJLESSI, L.; BROSCHE, R.; SMITH, D.; BANCROFT, G.; CLARK, S.; WILLIAMS, A.; LECLERC, C.; COLE, S. T. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant Mycobacterium microti vaccine that induces T cell immunity against region of difference 1 antigens. **The Journal of infectious diseases**, 190, 115-122, 2004.

- CARLSON, R.; SRIENC, F. Fundamental Escherichia coli biochemical pathways for biomass and energy production: identification of reactions. **Biotechnology and bioengineering**, 85, 1-19, 2004.
- CHEN, H.; WANG, W.; SONG, C.; YU, S.; DING, C. Marek's disease virus VP22 enhances potentially the immune response of ESAT-6/CFP-10 against Mycobacterium bovis infection. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, 42, 337-344, 2010.
- CHEN, R.; GAO, X. B.; LIU, Z. H.; SHEN, X. B.; GUO, A. Z.; DUAN, Y. Y.; LIU, Z. L.; WU, X. W.; ZHU, D. Z. Combination of multiplex PCR with denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection of Mycobacterium genus and simultaneous identification of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 77, 53-57, 2013.
- CHEN, S.; PARLANE, N. A.; LEE, J.; WEDLOCK, D. N.; BUDDLE, B. M.; REHM, B. H. New skin test for detection of bovine tuberculosis based on antigen-displaying polyester inclusions produced by recombinant Escherichia coli. **Applied and environmental microbiology**, 2014.
- COLLINS, H. L.; KAUFMANN, S. H. The many faces of host responses to tuberculosis. **Immunology**, 103, 1-9, 2001.
- CONDE, M. B. III Diretrizes para tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **J. bras. pneumol**, 35, 1018-1048, 2009.
- CONDE, M. B.; SOARES, S. L.; MELLO, F. C.; REZENDE, V. M.; ALMEIDA, L. L.; REINGOLD, A. L.; DALEY, C. L.; KRITSKI, A. L. Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis: experience at an acquired immune deficiency syndrome reference center in Rio de Janeiro, Brazil. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 162, 2238-2240, 2000.
- COSTA, S.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DOMINGUES, L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in : the novel Fh8 system. **Frontiers in microbiology**, 5, 63, 2014.
- DALL'STELLA, R.; KRIEGER, M. A.; BURGER, M.; AGOTTANI, J. B.; CHAHAD-EHLERS, S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Development of bioprocess for the production of purified protein derivative with Brazilian strains of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis use. **Journal of biotechnology**, 127, 278-287, 2007.
- DANESHIAN, M.; GUENTHER, A.; WENDEL, A.; HARTUNG, T.; VON AULOCK, S. In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs. **Journal of immunological methods**, 313, 169-175, 2006.
- DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, 7, 771-782, 2008.

- DE JONGE, M. I.; PEHAU-ARNAUDET, G.; FRETZ, M. M.; ROMAIN, F.; BOTTAI, D.; BRODIN, P.; HONORE, N.; MARCHAL, G.; JISKOOT, W.; ENGLAND, P.; COLE, S. T.; BROSCH, R. ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. **Journal of bacteriology**, 189, 6028-6034, 2007.
- DE LEON, J.; JIANG, G.; MA, Y.; RUBIN, E.; FORTUNE, S.; SUN, J. *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 exhibits a unique membrane-interacting activity that is not found in its ortholog from non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis*. **The Journal of biological chemistry**, 287, 44184-44191, 2012.
- DIETZE, R., HADAD, D. J., PEREIRA, F. E. L. E RODRIGUES, R. R. 2009. FUNDAMENTOS EM INFECTOLOGIA. , In: ROCHA, M.O.C.P., E.R.P (Ed.) TUBERCULOSE. RUBIO, RIO DE JANEIRO, 703-738.
- DOHERTY, T. M.; ARDITI, M. TB, or not TB: that is the question -- does TLR signaling hold the answer? **The Journal of clinical investigation**, 114, 1699-1703, 2004.
- DONOVAN, R. S.; ROBINSON, C. W.; GLICK, B. R. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. **Journal of industrial microbiology**, 16, 145-154, 1996.
- DOURADO, I.; RIOS, M. H.; PEREIRA, S. M.; CUNHA, S. S.; ICHIHARA, M. Y.; GOES, J. C.; RODRIGUES, L. C.; BIERRENBACH, A. L.; BARRETO, M. L. Rates of adverse reactions to first and second doses of BCG vaccination: results of a large community trial in Brazilian schoolchildren. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, 7, 399-402, 2003.
- DU, W. X.; CHEN, B. W.; LU, J. B.; GAO, M. Q.; SHEN, X. B.; YANG, L.; SU, C.; WANG, G. Z.; SUN, Q. F.; XU, M. Preclinical study and phase I clinical safety evaluation of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 protein. **Medical science monitor basic research**, 19, 146-152, 2013.
- EDWARDS, L. B.; ACQUAVIVA, F. A.; LIVESAY, V. T.; CROSS, F. W.; PALMER, C. E. An atlas of sensitivity to tuberculin, PPD-B, and histoplasmin in the United States. **The American review of respiratory disease**, 99, Suppl:1-132, 1969.
- FABRE, M.; HAUCK, Y.; SOLER, C.; KOECK, J. L.; VAN INGEN, J.; VAN SOOLINGEN, D.; VERGNAUD, G.; POURCEL, C. Molecular characteristics of "*Mycobacterium canettii*" the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, 10, 1165-1173, 2010.
- FARDELONE, B. Â. B. L. C. 2006. Biopharmaceutical sector and opportunities for Brazil. In Rev. FAE, 29-38.
- FARDELONE, L. C.; BRANCHI, B. Â. Biopharmaceutical sector and opportunities for Brazil. **Rev. FAE**, 9, 29-38, 2006.
- FERRER-MIRALLES, N.; DOMINGO-ESPIN, J.; CORCHERO, J. L.; VAZQUEZ, E.; VILLAVARDE, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial cell factories**, 8, 17, 2009.

- FISKE, C. T.; YAN, F. X.; HIRSCH-MOVERMAN, Y.; STERLING, T. R.; REICHLER, M. R. Risk factors for treatment default in close contacts with latent tuberculous infection. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, 18, 421-427, 2014.
- FLYNN, J. L.; CHAN, J. What's good for the host is good for the bug. **Trends in microbiology**, 13, 98-102, 2005.
- FRIEDEN, T. R.; STERLING, T. R.; MUNSIFF, S. S.; WATT, C. J.; DYE, C. Tuberculosis. **Lancet**, 362, 887-899, 2003.
- FRIEHS, K. Plasmid copy number and plasmid stability. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, 86, 47-82, 2004.
- GADELHA, C. A.; COSTA, L. S. [Health and development in Brazil: progress and challenges]. **Revista de saude publica**, 46 Suppl 1, 13-20, 2012.
- GARAY, S. M. 2004. Pulmonary tuberculosis, In: ROM, W.N.G., S (Ed.) Tuberculosis. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 345-394.
- GEHRE, F.; ANTONIO, M.; FAIHUN, F.; ODOUN, M.; UWIZEYE, C.; DE RIJK, P.; DE JONG, B. C.; AFFOLABI, D. The first phylogeographic population structure and analysis of transmission dynamics of *M. africanum* West African 1--combining molecular data from Benin, Nigeria and Sierra Leone. **PloS one**, 8, e77000, 2013.
- GIL, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**, 2^{ao} ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. Vol 1, 485
- GOLDEN, M. P.; VIKRAM, H. R. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. **American family physician**, 72, 1761-1768, 2005.
- GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, 52, 456-467, 1973.
- GUPTA, R.; SHARMA, P.; VYAS, V. V. Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, 41, 29-37, 1995.
- GUTACKER, M. M.; SMOOT, J. C.; MIGLIACCIO, C. A.; RICKLEFS, S. M.; HUA, S.; COUSINS, D. V.; GRAVISS, E. A.; SHASHKINA, E.; KREISWIRTH, B. N.; MUSSER, J. M. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. **Genetics**, 162, 1533-1543, 2002.
- GUTIERREZ, M. C.; BRISSE, S.; BROSCHE, R.; FABRE, M.; OMAIS, B.; MARMIESSE, M.; SUPPLY, P.; VINCENT, V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS pathogens**, 1, e5, 2005.
- HAGG, P.; DE POHL, J. W.; ABDULKARIM, F.; ISAKSSON, L. A. A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, 111, 17-30, 2004.

- HAN, K.; LIM, H. C.; HONG, J. Acetic acid formation in Escherichia coli fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, 39, 663-671, 1992.
- HANGAI, S.; YOSHIMI, A.; HOSOI, A.; MATSUSAKA, K.; ICHIKAWA, M.; FUKAYAMA, M.; KUROKAWA, M. An indeterminate result of QuantiFERON-TB Gold In-Tube for military tuberculosis due to a high level of IFN-gamma production. **International journal of hematology**, 2014.
- HORTA, A. C. L., 2008. Técnicas Computacionais Inteligentes para a Inferência de Estado e a Otimização de Cultivos de Streptococcus pneumoniae. Universidade Federal de São Carlos.,
- HUEBNER, R. E.; SCHEIN, M. F.; BASS, J. B., JR. The tuberculin skin test. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 17, 968-975, 1993.
- JAGIELSKI, T.; VAN INGEN, J.; RASTOGI, N.; DZIADEK, J.; MAZUR, P. K.; BIELECKI, J. Current Methods in the Molecular Typing of and Other Mycobacteria. **BioMed research international**, 2014, 645802, 2014.
- KALRA, M.; KHULLER, G. K.; SHEIKH, J. A.; VERMA, I. Evaluation of Mycobacterium tuberculosis specific RD antigens for delayed type hypersensitivity responses in guinea pig. **Indian journal of experimental biology**, 48, 117-123, 2010.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, 11, 373-384, 2010.
- KLEINBERG, M.; MOSDELL, K. W. Current and future considerations for the new classes of biologicals. **American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists**, 61, 695-708; quiz 709-610, 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685, 1970.
- LAKEY, D. L.; VOLADRI, R. K.; EDWARDS, K. M.; HAGER, C.; SAMTEN, B.; WALLIS, R. S.; BARNES, P. F.; KERNODLE, D. S. Enhanced production of recombinant Mycobacterium tuberculosis antigens in Escherichia coli by replacement of low-usage codons. **Infection and immunity**, 68, 233-238, 2000.
- LALVANI, A.; PAREEK, M. Interferon gamma release assays: principles and practice. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, 28, 245-252, 2010.
- LAURENT SIMON, O. H. Aqueous Two-Phase Extraction: a Case Study in Process Analysis and Control. **AIChE ANNUAL MEETING Conference Proceedings**, 237-246, 2005.
- LEE, E. Y.; BANG, J. Y.; PARK, G. W.; CHOI, D. S.; KANG, J. S.; KIM, H. J.; PARK, K. S.; LEE, J. O.; KIM, Y. K.; KWON, K. H.; KIM, K. P.; GHO, Y. S. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from Escherichia coli. **Proteomics**, 7, 3143-3153, 2007.
- LEE, S. Y. High cell-density culture of Escherichia coli. **Trends in biotechnology**, 14, 98-105, 1996.

- LEE, S. Y.; YIM, K. S.; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, 32, 203-211, 1994.
- LEE, Y. L.; CHANG, H. N. High cell density culture of a recombinant *Escherichia coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle fermentor. **Biotechnology and bioengineering**, 36, 330-337, 1990.
- LEHNINGER, A. **Princípios de Bioquímica** Sarvier, 2011. Vol.
- LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 77, 563-569, 2002.
- LEWINSOHN, D. A.; ZALWANGO, S.; STEIN, C. M.; MAYANJA-KIZZA, H.; OKWERA, A.; BOOM, W. H.; MUGERWA, R. D.; WHALEN, C. C. Whole blood interferon-gamma responses to mycobacterium tuberculosis antigens in young household contacts of persons with tuberculosis in Uganda. **PloS one**, 3, e3407, 2008.
- LI, J.; JAITZIG, J.; HILLIG, F.; SUSSMUTH, R.; NEUBAUER, P. Enhanced production of the nonribosomal peptide antibiotic valinomycin in *Escherichia coli* through small-scale high cell density fed-batch cultivation. **Applied microbiology and biotechnology**, 98, 591-601, 2014.
- LIN, M. F.; WILLIAMS, C.; MURRAY, M. V.; ROPP, P. A. Removal of lipopolysaccharides from protein-lipopolysaccharide complexes by nonflammable solvents. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, 816, 167-174, 2005.
- LIU, S.; TOBIAS, R.; MCCLURE, S.; STYBA, G.; SHI, Q.; JACKOWSKI, G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. **Clinical biochemistry**, 30, 455-463, 1997.
- LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A.; THOEN, C. O. Tuberculosis in humans and animals: an overview. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, 14, 1075-1078, 2010.
- LOPEZ, P. J.; MARCHAND, I.; JOYCE, S. A.; DREYFUS, M. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. **Molecular microbiology**, 33, 188-199, 1999.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, 193, 265-275, 1951.
- LYASHCHENKO, K.; MANCA, C.; COLANGELI, R.; HEIJBEL, A.; WILLIAMS, A.; GENNARO, M. L. Use of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis. **Infection and immunity**, 66, 3606-3610, 1998.

- MACHADO, D.; RAMOS, J.; COUTO, I.; CADIR, N.; NARCISO, I.; COELHO, E.; VIEGAS, S.; VIVEIROS, M. Assessment of the BD MGIT TBc Identification Test for the Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in a Network of Mycobacteriology Laboratories. **BioMed research international**, 2014, 398108, 2014.
- MAGALHAES, P. O.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T. C.; PESSOA, A., JR. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques**, 10, 388-404, 2007.
- MALAGHINI, M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A.; PRETI, H.; KRITSKI, A.; SOCCOL, C. R. Recombinant antigen production for assays of intradermoreaction for diagnosis and surveillance of tuberculosis. **Journal of biotechnology**, 156, 56-58, 2011.
- MONTESSORI, V.; PHILLIPS, P.; MONTANER, J.; HALEY, L.; CRAIB, K.; BESSUILLE, E.; BLACK, W. Species distribution in human immunodeficiency virus-related mycobacterial infections: implications for selection of initial treatment. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 22, 989-992, 1996.
- MOSTOWY, S.; INWALD, J.; GORDON, S.; MARTIN, C.; WARREN, R.; KREMER, K.; COUSINS, D.; BEHR, M. A. Revisiting the evolution of Mycobacterium bovis. **Journal of bacteriology**, 187, 6386-6395, 2005.
- MS, 2010. Ministério da Saúde - Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS (SIA/SUS).
- MULENGA, H.; MOYO, S.; WORKMAN, L.; HAWKRIDGE, T.; VERVER, S.; TAMERIS, M.; GELDENHUYS, H.; HANEKOM, W.; MAHOMED, H.; HUSSEY, G.; HATHERILL, M. Phenotypic variability in childhood TB: implications for diagnostic endpoints in tuberculosis vaccine trials. **Vaccine**, 29, 4316-4321, 2011.
- NAYAK, D. P.; VYAS, V. V. Improved stability and expression of a recombinant shuttle plasmid in Escherichia coli during fedbatch cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 15, 65-71, 1999.
- NIEMANN, S.; RUSCH-GERDES, S.; JOLOBA, M. L.; WHALEN, C. C.; GUWATUDDE, D.; ELLNER, J. J.; EISENACH, K.; FUMOKONG, N.; JOHNSON, J. L.; AISU, T.; MUGERWA, R. D.; OKWERA, A.; SCHWANDER, S. K. Mycobacterium africanum subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. **Journal of clinical microbiology**, 40, 3398-3405, 2002.
- NIIRANEN, L.; ESPELID, S.; KARLSEN, C. R.; MUSTONEN, M.; PAULSEN, S. M.; HEIKINHEIMO, P.; WILLASSEN, N. P. Comparative expression study to increase the solubility of cold adapted Vibrio proteins in Escherichia coli. **Protein expression and purification**, 52, 210-218, 2007.
- ONGKUDON, C. M.; PICKERING, R.; WEBSTER, D.; DANQUAH, M. K. Cultivation of E. coli carrying a plasmid-based Measles vaccine construct (4.2 kbp pcDNA3F) employing medium optimisation and pH-temperature induction techniques. **Microbial cell factories**, 10, 16, 2011.

- OPAS/OMS, 2010. O apoio à implementação da Estratégia de Tratamento Diretamente Supervisionado (DOTS) para o combate à Tuberculose. .
- OSMAN, M.; SIMPSON, J. A.; CALDWELL, J.; BOSMAN, M.; NICOL, M. P. GeneXpert MTB/RIF version G4 for identification of rifampin-resistant tuberculosis in a programmatic setting. **Journal of clinical microbiology**, 52, 635-637, 2014.
- PAI, M.; DENKINGER, C. M.; KIK, S. V.; RANGAKA, M. X.; ZWERLING, A.; OXLADE, O.; METCALFE, J. Z.; CATTAMANCHI, A.; DOWDY, D. W.; DHEDA, K.; BANAEI, N. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. **Clinical microbiology reviews**, 27, 3-20, 2014.
- PAI, M.; RILEY, L. W.; COLFORD, J. M., JR. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **The Lancet infectious diseases**, 4, 761-776, 2004.
- PEREIRA, S. M.; DANTAS, O. M. S.; XIMENES, R.; BARRETO, M. L. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. **Revista de saúde pública**, 41, 59-66, 2007.
- PETERNEL, S. Bacterial cell disruption: a crucial step in protein production. **New biotechnology**, 30, 250-254, 2013.
- PIO, T. F.; FRAGA, L. P.; MACEDO, G. A. Inoculum padronization for the production of cutinase by *Fusarium oxysporum*. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 39, 74-77, 2008.
- PIUBELLI, L.; CAMPA, M.; TEMPORINI, C.; BINDA, E.; MANGIONE, F.; AMICOSANTE, M.; TERRENI, M.; MARINELLI, F.; POLLEGIONI, L. Optimizing *Escherichia coli* as a protein expression platform to produce Mycobacterium tuberculosis immunogenic proteins. **Microbial cell factories**, 12, 115, 2013.
- POLLOCK, J. M.; MCNAIR, J.; BASSETT, H.; CASSIDY, J. P.; COSTELLO, E.; AGGERBECK, H.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. **Journal of clinical microbiology**, 41, 1856-1860, 2003.
- POPOV, M.; PETROV, S.; NACHEVA, G.; IVANOV, I.; REICHL, U. Effects of a recombinant gene expression on ColE1-like plasmid segregation in *Escherichia coli*. **BMC biotechnology**, 11, 18, 2011.
- PYM, A. S.; BRODIN, P.; BROSCHE, R.; HUERRE, M.; COLE, S. T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. **Molecular microbiology**, 46, 709-717, 2002.
- RAVINDRAN, R.; KRISHNAN, V. V.; DHAWAN, R.; WUNDERLICH, M. L.; LERCHE, N. W.; FLYNN, J. L.; LUCIW, P. A.; KHAN, I. H. Plasma antibody profiles in non-human primate tuberculosis. **Journal of medical primatology**, 2014.
- RODRIGUEZ-CARMONA, E.; CANO-GARRIDO, O.; SERAS-FRANZOSO, J.; VILLAVERDE, A.; GARCIA-FRUITOS, E. Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. **Microbial cell factories**, 9, 71, 2010.

- ROY, I.; GUPTA, M. N. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. **Biotechnology and applied biochemistry**, 39, 165-177, 2004.
- SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1989. Vol.
- SAWERS, G.; JARSCH, M. Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, 46, 1-9, 1996.
- SCHOLVINCK, E.; WILKINSON, K. A.; WHELAN, A. O.; MARTINEAU, A. R.; LEVIN, M.; WILKINSON, R. J. Gamma interferon-based immunodiagnosis of tuberculosis: comparison between whole-blood and enzyme-linked immunospot methods. **Journal of clinical microbiology**, 42, 829-831, 2004.
- SHINNICK, T. M.; KING, C. H.; QUINN, F. D. Molecular biology, virulence, and pathogenicity of mycobacteria. **The American journal of the medical sciences**, 309, 92-98, 1995.
- SMITH, D. W.; WIEGESHAUS, E. H. What animal models can teach us about the pathogenesis of tuberculosis in humans. **Reviews of infectious diseases**, 11 Suppl 2, S385-393, 1989.
- SOCIETY, A. T. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 161, 1376-1395, 2000.
- SORENSEN, A. L.; NAGAI, S.; HOUEN, G.; ANDERSEN, P.; ANDERSEN, A. B. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and immunity**, 63, 1710-1717, 1995.
- SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial cell factories**, 4, 1, 2005.
- STAVRI, H.; BUCURENCI, N.; ULEA, I.; COSTACHE, A.; POPA, L.; POPA, M. I. Use of recombinant purified protein derivative (PPD) antigens as specific skin test for tuberculosis. **The Indian journal of medical research**, 136, 799-807, 2012.
- STEFAN, H.; KAUFMANN, E.; HELDEN, P. V. **Handbook of Tuberculosis: Clinics, Diagnostics, Therapy and Epidemiology**: Wiley-Blackwell, 2008. Vol.
- SURYADARMA, P.; OJIMA, Y.; FUKUDA, Y.; AKAMATSU, N.; TAYA, M. The *rpoS* deficiency suppresses acetate accumulation in glucose-enriched culture of *Escherichia coli* under an aerobic condition. **Front. Chem. Sci. Eng.**, 6, 152-157, 2012.
- TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 33, 323-334, 2007.

- TOKSOY, E.; ONSAN, Z. I.; KIRDAR, B. High-level production of TaqI restriction endonuclease by three different expression systems in Escherichia coli cells using the T7 phage promoter. **Applied microbiology and biotechnology**, 59, 239-245, 2002.
- VAN PINXTEREN, L. A.; RAVN, P.; AGGER, E. M.; POLLOCK, J.; ANDERSEN, P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, 7, 155-160, 2000.
- VARAHRAM, M.; FARNIA, P.; NASIRI, M. J.; KARAHARUDI, M. A.; DIZAGIE, M. K.; VELAYATI, A. A. Association of Mycobacterium Tuberculosis Lineages with IFN-gamma and TNF-alpha Gene Polymorphisms among Pulmonary Tuberculosis Patient. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, 6, e2014015, 2014.
- VICENTE, M.; CHATER, K. F.; DE LORENZO, V. Bacterial transcription factors involved in global regulation. **Molecular microbiology**, 33, 8-17, 1999.
- VILLAVERDE, A.; CARRIO, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology letters**, 25, 1385-1395, 2003.
- WARDS, B. J.; DE LISLE, G. W.; COLLINS, D. M. An esat6 knockout mutant of Mycobacterium bovis produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. **Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, 80, 185-189, 2000.
- WHELAN, A. O.; CLIFFORD, D.; UPADHYAY, B.; BREADON, E. L.; MCNAIR, J.; HEWINSON, G. R.; VORDERMEIER, M. H. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. **Journal of clinical microbiology**, 48, 3176-3181, 2010.
- WHO. Global Tuberculosis Control. 2010.
- WHO, 2013. Global tuberculosis report - Disponível em <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/> Acessado em jan 2013.
- WU, X.; ZHANG, L.; ZHANG, J.; ZHANG, C.; ZHU, L.; SHI, Y. Recombinant early secreted antigen target 6 protein as a skin test antigen for the specific detection of Mycobacterium tuberculosis infection. **Clinical and experimental immunology**, 152, 81-87, 2008.
- XU, J.; LI, W.; WU, J.; ZHANG, Y.; ZHU, Z.; LIU, J.; HU, Z. Stability of plasmid and expression of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine in Escherichia coli. **Applied microbiology and biotechnology**, 73, 780-788, 2006.
- YEE, L.; BLANCH, H. W. Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in Escherichia coli. **Biotechnology and bioengineering**, 41, 781-790, 1993.
- YURT, N.; BEYENAL, H.; SEARS, J.; LEWANDOWSKI, Z. Quantifying selected growth parameters of Leptothrix discophora SP-6 in biofilms from oxygen concentration profiles. **Chemical Engineering Science** 58, 4557-4566, 2003.

- ZHANG, J.; MENG, W.; WANG, C.; WU, Z.; WU, G.; XU, Y. Expression, purification and characterization of recombinant plasminogen activator from *Gloydius brevicaudus* venom in *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, 91, 85-90, 2013.
- ZHANG, S.; SHAO, L.; MO, L.; CHEN, J.; WANG, F.; MENG, C.; ZHONG, M.; QIU, L.; WU, M.; WENG, X.; ZHANG, W. Evaluation of gamma interferon release assays using *Mycobacterium tuberculosis* antigens for diagnosis of latent and active tuberculosis in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated populations. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, 17, 1985-1990, 2010.
- ZHAO, Y.; HE, W.; LIU, W. F.; LIU, C. C.; FENG, L. K.; SUN, L.; YAN, Y. B.; HANG, H. Y. Two distinct states of *Escherichia coli* cells that overexpress recombinant heterogeneous beta-galactosidase. **The Journal of biological chemistry**, 287, 9259-9268, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Soluções e Gel para Eletroforese

A) Tampão Corrida

Tampão de Corrida 10x Concentrado

- 30,3 g TRIS
- 144 g Glicina
- 0,5 g SDS
- 1000 mL Água Purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 8,6

Tampão Corrida

- 100 mL Tampão Corrida 10x
- 900 mL Água Purificada

B) Gel Acrilamida – Separação 12,5%

Solução Acrilamida:Bis 30:0,8 (%)

- 90 g Acrilamida
- 2,4 g Bis-Acrilamida
- 300 mL Água Purificada q.s.p

Gel Acrilamida – Separação 12,5%

- 7 mL de Água Purificada
- 6,25 mL Bis-Acrilamida
- 2,18 mL 3M TRIS-HCl (pH 8,8)
- 156 µL SDS 10%
- 38,1 µL APS 20%
- 7,8 µL TEMED

C) Gel Acrilamida – Empilhamento 5%

- 2,85 mL de Água Purificada
- 625 µL Bis-Acrilamida
- 250 µL 1M TRIS-HCl (pH 6,8)
- 37,5 µL SDS 10%
- 13,75 µL APS 20%
- 1,9 µL TEMED

D) Tampão Amostra

- 0,45 g TRIS
- 0,5 g SDS
- 2,0 mL glicerol
- 0,1 mL EDTA 0,1 M
- 0,2 mg azul de bromofenol
- 20 mL Água Purificada q.s.p.
- 240 µL 2-mercaptoetanol (no momento do uso)

E) Solução Coomassie Azul Brilhante

- 0,25 g Coomassie Brilhante R250 101
- 50 mL Metanol
- Ácido Acético

APÊNDICE 2 – WESTERN BLOT

1. Material

- tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20 % de metanol)

2. Procedimento

1º dia

- 2.1 Após eletroforese, anotar as dimensões do gel, marcar seu início e equilibrar o gel em tampão de transferência (10-30 min);
- 2.2 Preparar a membrana: umedecer em metanol 100% (15 s); enxaguar com água ultra pura e embeber por 15-20 s; equilibrar em tampão de transferência por ao menos 5 min;
- 2.3 Embeber papel de filtro e esponjas em tampão de transferência por ao menos 30 s;
- 2.4 Para montar o sanduíche, seguir a ordem: (-) suporte, espuma, papel filtro, gel, membrana, filtro, espuma, suporte (+). Remover bolhas entre cada camada do sanduíche;
- 2.5 Colocar o sanduíche na cuba, adicionar tampão e conectar os fios de corrente. Voltagem em 24 V a 4°C, *overnight*.

2ª dia

- 2.1 Aumentar a voltagem para 48 V e manter por 1 h;
- 2.2 Retirar a membrana e enxaguá-la com água destilada;
- 2.3 Corar a membrana com Ponceau S:
 - Incubar a membrana em solução Ponceau S com agitação por 10 min;
 - Descorar em água destilada até as bandas se tomarem visíveis;
 - Marcar a membrana usando lápis e cortar como desejado;
 - Descorar completamente em água destilada;
- 2.4 Bloquear a membrana em PBST 0,3% com agitação por 1h;
- 2.5 Lavar a membrana por 3x5 min em PBST 0,05% com agitação;
- 2.6 Incubar a membrana com anticorpo primário em PBST 0,05% com agitação por 1h;
- 2.7 Lavar a membrana por 4x5 min em PBST 0,05% com agitação;
- 2.8 Incubar a membrana com anticorpo secundário em PBST 0,05% com agitação por 1h;
- 2.9 Lavar a membrana por 3x5 min com PBST 0,05% seguido por 2x5 min com PBS com agitação;
- 2.10 Revelação: **Tetrahydrocloro de 3,3'- Diaminobenzidina (DAB)**
 - Antes do uso: 10 mg em 15 mL de 50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,6;
 - Adicionar 12 µL de peróxido de hidrogênio 30%; Incubar por 1-5 min;
 - Interromper a reação com PBS.

ANEXOS

ANEXO 1 – SÍTIOS DE APLICAÇÕES REAÇÃO INTRADERMOREAÇÃO

concentração 0,0004 mg/mL

A – CFP10 1
 B – CFP10 2
 C – ESAT6 1
 D – ESAT6 2
 E – CFP10+ESAT6 1
 F – CFP10+ESAT6 2
 G – Tampão Fosfato 1
 H – Salina Fenolada 2
 Controle Positivo– PPD RT23

concentração 0,004 mg/mL

A – CFP10 1
 B – CFP10 2
 C – ESAT6 1
 D – ESAT6 2
 E – CFP10+ESAT6 1
 F – CFP10+ESAT6 2
 G – Tampão Fosfato 1
 H – Salina Fenolada 2
 Controle Positivo– PPD RT23

concentração 0,04 mg/mL

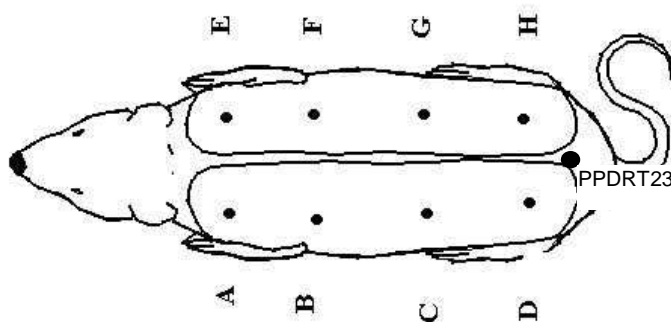
A – CFP10 1
 B – CFP10 2
 C – ESAT6 1
 D – ESAT6 2
 E – CFP10+ESAT6 1
 F – CFP10+ESAT6 2
 G – Tampão Fosfato 1
 H – Salina Fenolada 2
 Controle Positivo– PPD RT23

concentração 0,4 mg/mL

A – CFP10 1
 B – CFP10 2
 C – ESAT6 1
 D – ESAT6 2
 E – CFP10+ESAT6 1
 F – CFP10+ESAT6 2
 G – Tampão Fosfato 1
 H – Salina Fenolada 2
 Controle Positivo– PPD RT23

Animais

- 1) *Mycobacterium avium*
- 2) *Mycobacterium bovis*
- 3) *Mycobacterium tuberculosis*
- 4) *Mycobacterium bovis* (BCG)
- 5) Negativo



ANEXO 2- COMITÉ DE ÉTICA ANIMAL



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 469

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.027600/2010-27

APROVADO: 17/08/2010 – R.O. 07/2010

TÍTULO: Validação das proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* através da avaliação da imunidade celular por ensaios biológicos

AUTORES: Vanete Thomaz Soccol, Ludmilla Troiano, Gilberto Delinski, Marcelo Malaghini

DEPARTAMENTO: Patologia Básica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA

ANEXO 3- COMITÊ DE ÉTICA HUMANO

Curitiba, 29 de Junho de 2010.

**Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
SESA/HT**

Protocolo: CEP-SESA/HT n. 196/2010

CAAE:

Projeto de Pesquisa: Produção de Tuberculina Recombinante de Mycobacterium Tuberculosis em Escala Bancada e Piloto para Elaboração de Kits de Diagnóstico da Tuberculose

Pesquisador: Sandrely Costa Machado Rocha

Patrocinador: não consta

Instituição: Regionais de saúde/Hosp: Regional Lapa e Hemepar

Area Temática Especial: Grupo 1

Data de apresentação ao CEP: 10/06/2010 **Data de Entrega do Parecer:** 29/06/2010

O Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná/Hospital do Trabalhador analisou na sessão de dia **24 de Junho de 2010** o processo N.º 196/2010, referente ao projeto de pesquisa: "Produção de Tuberculina Recombinante de Mycobacterium Tuberculosis em Escala Bancada e Piloto para Elaboração de Kits de Diagnóstico da Tuberculose", tendo como pesquisador (a) **Sandrely Costa Machado Rocha**.

Mediante a importância social e científica que o projeto apresenta e a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável a realização do projeto classificando-o como **APROVADO**. O mesmo atende aos requisitos fundamentais da Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde/MS. Solicita-se ao pesquisador o envio a este CEP de relatórios sobre o andamento da pesquisa bem com o envio de relatório final.

Atenciosamente,



Dr. Mauro Batista Albano

Vice-coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos - SESA/HT

ANEXO 4 – TERMO LIVRE DE CONENTIMENTO ESCLARECIDO



Universidade Federal do Paraná Setor de Tecnologia
Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
Programa PG em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a),

para participar da pesquisa ***“Produção de tuberculina recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* em escala bancada e piloto para elaboração de kits de diagnóstico da tuberculose”***, sob a responsabilidade da pesquisadora, **Ludmilla Troiano Araujo** e sob orientação e coordenação da Professora Doutora **Vanete Thomaz-Soccol.**

1.1 Propósito do Estudo:

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa e é causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta doença é transmitida principalmente por via aérea de uma pessoa doente para um indivíduo sadio.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorre no mundo cerca de 9 milhões de novos casos por ano e estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo da tuberculose, sendo que o Brasil ocupa 18º lugar com cerca de 129.000 casos por ano.

A tuberculose é um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo, mas com potencial de cura. Entretanto, a demora do diagnóstico, a desinformação, a dificuldade de aderência da população ao tratamento e a resistência microbiana ao medicamento são fatores agravantes no controle da Tuberculose.

Visando a necessidade de um diagnóstico nacional mais específico e sensível, este trabalho teve como objetivo desenvolver um teste de diagnóstico para confirmação da tuberculose por ensaios de imunidade celular, através de intradermo-reação e ensaio humoral, com a identificação de anticorpos presentes no soro de pacientes afetados pela doença. As proteínas recombinante utilizadas neste trabalho foram desenvolvidas pelo grupo de pesquisa orientado pela professora doutora Vanete Thomaz-Soccol.

1.1.1 Seleção

Para ser incluído (a) na pesquisa você precisa ter diagnóstico positivo para tuberculose, identificado através de alguns exames: raio X do tórax, PPD, cultura, ou ser um paciente sintomático. A coleta de sangue será realizada pela pesquisadora Ludmilla Troiano e demais profissionais competentes. Na ocasião da coleta serão feitas algumas perguntas sobre o tempo que você tem a doença, os medicamentos que está utilizando, onde você contraiu a doença, seu nome e endereço e outras perguntas importantes relacionadas a esta enfermidade.

1.1.2 Procedimento para coleta da amostra de sangue

Serão coletados cerca de 10 a 15 mL de sangue de seu braço, este material será encaminhado ao laboratório de Biologia Molecular da (UFPR), onde será processado para os devidos ensaios.

Na ocasião da coleta o paciente poderá sentir a dor da picada da agulha, que é passageira e alguns pacientes poderão apresentar hematoma (mancha roxa) na região puncionada. Isto é perfeitamente normal e poderá ser solucionado com compressas de gelo no local.

1.1.3 Local da coleta de amostra para a pesquisa:

Unidade da Secretaria Estadual da Saúde do Paraná direcionado ao controle, tratamento e investigação da doença TUBERCULOSE no Paraná: Hospital Regional São Sebastião da Lapa – Lapa-PR, regionais de saúde, Paranaguá-PR e Hemepar.

1.1.4 Local da realização dos experimentos relacionados à pesquisa:

Laboratório de processos biotecnológicos e de biologia molecular da UFPR – End: Francisco H dos Santos, 200 – Usina Piloto B - Jardim das Américas telefone para contato: 3361-3272.

1.2 Propósito da informação ao paciente e documento de consentimento.

Você esta sendo convidado (a) a participar de um estudo científico de tuberculose que está sendo desenvolvido pelo programa de pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), por um profissional da área da saúde, agora denominado PESQUISADOR.

Para participar é necessário que você leia este documento com muita atenção. Caso você não entenda alguma palavra ou frase, por favor, peça aos responsáveis pelo

estudo que expliquem detalhadamente as palavras ou procedimentos que você não tenha entendido claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará sua permissão para usar uma amostra de seu sangue para estudo. O documento descreve o objetivo do estudo, os procedimentos, benefícios e eventuais riscos e desconfortos que podem ocorrer caso queira participar. Você só deve participar do estudo se quiser. Você pode se recusar a participar deste estudo a qualquer momento.

1.3 Participação

Sua participação é voluntária e se dará por meio de doação de sangue. Se você aceitar participar, estará contribuindo para pesquisa de um diagnóstico mais rápido e eficiente para tuberculose.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço e telefone citado acima.

1.4 Consentimento Pós-Informação

Eu, _____,
 declaro que li e fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

_____	_____	Data: ___/___/___
Nome do paciente	Assinatura	
_____	_____	Data: ___/___/___
Nome do pesquisador	Assinatura	

**ANEXO 5 - RELAÇÃO DOS GENES SUBMETIDOS À AMPLIFICAÇÃO
POR PCR E DAS RESPECTIVAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS**

Rv3875

ATGACAGAGCAGCAGTGG AATTCGCGGGTATCGAGGCCGCGGCAAGCGCA
ATCCAGGGAAATGTCACGTCCATTCCCTCCTTGACGAGGGGAAGCAGTC
CCTGACCAAGCTCGCAGCGGCCTGGGGCGGTAGCGGTTCCGGAGGCGTACCA
GGGTGTCCAGCAAAAATGGGACGCCACGGCTACCGAGCTGAACAACGCGCTG
CAGAACCTGGCGCGGACGATCAGCGAAGCCGGTCAGGCAATGGCTTCGACC
GAAGGCAAC**GTC ACTGGGATGTT CGCATAG**

Rv3874

ATGGCAGAGATGAAGACCGATGCCGCTACCCTCGCGCAGGAGGCAGGTAAT
TTCGAGCGGATCTCCGGCGACCTGAAAACCCAGATCGACCAGGTGGAGTCGA
CGGCAGGTTTCGTTGCAGGGCCAGTGGCGCGGCGCGGCGGGGACGGCCGCC
CAGGCCGCGGTGGTGCCTTCCAAGAAGCAGCCAATAAGCAGAAGCAGGAAC
TCGACGAGATCTCGACGAATATTCGTCAGGCCGGCGTCCAATACTCGAGGGC
CGACGAGGAGCAGCAGCAGGCGCTGTCCT**CGCAAATGGGCTTCTGA**

**ANEXO "6 – TABELAS ANOVA DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL
ROTACIONAL**

ANOVA PARA 2³ CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, CICLO DE ROMPIMENTO E SOLUBILIZAÇÃO

Fator	Regression Coefficient	Std.Erro Pure Erro	t(2)	P	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	13,09091	0,046057	284,2351	0,000012	12,89274	13,28907
(1)Conc. Biomassa	-0,26250	0,054006	-4,8606	0,039817	-0,49487	-0,03013
(2)Ciclos Romp.	0,48750	0,054006	9,0267	0,012051	0,25513	0,71987
(3)Ciclos Solubilização	0,78750	0,054006	14,5817	0,004670	0,55513	1,01987
1 by 2	-0,28750	0,054006	-5,3235	0,033522	-0,51987	-0,05513
1 by 3	-0,13750	0,054006	-2,5460	0,125809	-0,36987	0,09487
2 by 3	-0,43750	0,054006	-8,1009	0,014898	-0,66987	-0,20513
Lack of fit	-	-	-	0,000495	-	-

Regr. Coefficients; Var.:Conc. Proteínas; R-sqr=,09372; Adj:0, (Spreadsheet1) 2**(3-0) design; MS Pure Error=,0233333 DV: Conc. Proteínas

ANOVA PARA DCCR CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, CICLO DE ROMPIMENTO E SOLUBILIZAÇÃO

Fator	Regression Coefficient	Std.Erro Pure Erro	t(2)	P	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	17,95546	0,088191	203,3667	0,000024	17,55574	18,31466
(1)Conc. Biomassa(L)	-0,01847	0,040846	-0,3449	0,763094	-0,18983	0,16166
Conc. Biomassa(Q)	-3,04433	0,043816	-66,9491	0,000223	-3,12194	-2,74489
(2)Ciclos Romp.(L)	0,64288	0,040846	15,6094	0,004079	0,46183	0,81332
Ciclos Romp.(Q)	-2,22942	0,043816	-49,4100	0,000409	-2,35345	-1,97641
(3)Ciclos Solubilização(L)	0,57253	0,040846	13,7539	0,005245	0,38604	0,73753
Ciclos Solubilização(Q)	-1,23736	0,043816	-28,0581	0,001268	-1,41791	-1,04086
1L by 2L	-0,28750	0,054006	-5,3235	0,033522	-0,51987	-0,05513
1L by 3L	-0,13750	0,054006	-2,5460	0,125809	-0,36987	0,09487
2L by 3L	-0,43750	0,054006	-8,1009	0,014898	-0,66987	-0,20513

Regr. Coefficients; Var.:Conc. Proteínas; R-sqr=,96198; Adj:,9131 (Spreadsheet1) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=,02333

ANOVA PARA 2³ CONCENTRAÇÃO DE IPTG, TEMPERATURA DE CRESCIMENTO E INDUÇÃO

Fator	Regression Coefficient	Std.Erro Pure Erro	t(2)	P	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	0,118182	0,001425	82,9412	0,000145	0,112051	0,124313
(1)Conc. IPTG	-0,043875	0,001671	-20,7233	0,002320	-0,041814	-0,027436
(2)Temp. Cresc.	0,002375	0,001671	1,4215	0,291091	-0,004814	0,009564
(3)Temp. Induç.	-0,034625	0,001671	-26,2594	0,001447	-0,051064	-0,036686
1 by 2	-0,000375	0,001671	0,2244	0,843259	-0,006814	0,007564
1 by 3	0,006125	0,001671	3,6658	0,067019	-0,001064	0,013314
2 by 3	0,000375	0,001671	-0,2244	0,843259	-0,007564	0,006814
Lack of fit	-	-	-	0,005058	-	-

Regr. Coefficients; Var.:Conc. Proteínas; R-sqr=,74156; Adj:,35389 (Spreadsheet1) 2**(3-0) design; MS Pure Error=,0000223 DV: Conc. Proteínas

ANOVA PARA DCCR CONCENTRAÇÃO DE IPTG, TEMPERATURA DE CRESCIMENTO E INDUÇÃO

Fator	Regression Coefficient	Std.Erro Pure Erro	t(2)	P	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	0,288873	0,004807	60,0900	0,000277	0,268189	0,309558
(1)Conc. IPTG(L)	0,064469	0,002948	21,8665	0,002085	0,051784	0,077155
Conc. IPTG(Q)	-0,080437	0,003518	-22,8637	0,001908	-0,095574	-0,065299
(2)Temp. Ind.(L)	0,027997	0,002948	9,4960	0,010909	0,015311	0,040683
Temp. Ind.(Q)	-0,099299	0,003518	-28,2251	0,001253	-0,114436	-0,084162
1L by 2L	0,016750	0,004163	4,0232	0,056588	-0,001163	0,034663
(1)Conc. IPTG(L)	0,288873	0,004807	60,0900	0,000277	0,268189	0,309558

Regr. Coefficients; Var.:Conc. Proteínas; R-sqr=,92341; Adj:,84681 (Spreadsheet1) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0000693