



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

RAYANNY GOMES DE ANDRADE

**Expressão heteróloga da protease Rv 2467 de
*Mycobacterium tuberculosis***

**Goiânia
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

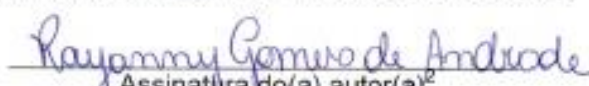
Nome completo do autor: Rayanny Gomes de Andrade

Título do trabalho: Expressão heteróloga da protease Rv 2467 de *Mycobacterium tuberculosis*

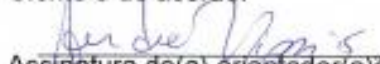
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 10 / 07 / 2018.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

Rayanny Gomes de Andrade

**Expressão heteróloga da protease Rv 2467 de
*Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública da
Universidade Federal de Goiás
para obtenção do Título de
Mestre em Medicina Tropical e
Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr André Kipnis
Co-orientador: Prof. Dra Ana
Paula Junqueira Kipnis

**Goiânia
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Gomes de Andrade, Rayanny

Expressão heteróloga da protease Rv 2467 de *Mycobacterium tuberculosis* [manuscrito] / Rayanny Gomes de Andrade. - 2018.
90 f.

Orientador: Prof. Dr. Andre Kipnis; co-orientadora Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2018.
Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, lista de figuras.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. virulência. 3. Infecção. 4. protease... I. Kipnis, Andre, orient. II. Título.

CDU 561.23



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE RAYANNY GOMES DE ANDRADE – Aos doze dias do mês de junho do ano de 2018 (12/06/2018), às 08:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. ANDRÉ KIPNIS, MARIA CLÁUDIA DANTAS PORFÍRIO BORGES ANDRÉ e ANDREI STECCA STEINDORFF, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEASE RV 2467 DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS”**, em nível de MESTRADO, área de concentração em MICROBIOLOGIA, de autoria de RAYANNY GOMES DE ANDRADE, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. ANDRÉ KIPNIS, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução n°. 1034/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Prof. Dr. André Kipnis

Profa. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André

Prof. Dr. Andrei Stecca Steindorff

Aprovada / Reprovada

Aprovada

Aprovada
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata HABILITADA (Habilitada ou não Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em MICROBIOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 h 06 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, ZHARA HELOU RIBEIRO DE CASTILHO, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Prof. Dr. André Kipnis (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André (IPTSP/UFG)

Prof. Dr. Andrei Stecca Steindorff (Embrapa/ DF)

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

André Kipnis
Maria Cláudia D. P. B. André
Andrei Stecca Steindorff
Zhara H. R. de Castilho

“Uma experiencia nunca é um fracasso, pois sempre vem a demonstrar algo”.

Thomas Alva Edison

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado força, estando sempre comigo me iluminado e dando sabedoria guiando meus passos por onde eu ando, me mostrando o caminho a seguir para me tornar uma pessoa cada vez melhor. Agradeço também a Nossa Senhora por sempre me ajudar a encarar os desafios.

Quero agradecer aqueles que me colocaram no mundo “os meus pais” que me criaram e me educaram. Não pouparam esforços para que eu tivesse uma graduação até que me formei em Biologia. Quando surgiu a oportunidade de fazer uma pós-graduação me deram todo o apoio necessário para que eu chegasse até aqui, aguentando meus estresses, choros e momentos felizes. A eles o meu MUITO OBRIGADA!!

Quero agradecer imensamente ao meu irmão Rodrigo por sempre ter me ajudado com trabalhos, com conselhos, por se preocupar com meu bem-estar. Atualmente ele está longe, lutando por algo melhor e eu não sabia que ele me faria tanta falta como faz hoje. A ele o meu MUITO OBRIGADA!!

Meus agradecimentos à minha família por todo apoio e por todo carinho. Agradeço minha avó, tias e tios e lógico meus primos, não vou citar todos aqui, pois ficaria horas escrevendo nomes porque acredite, somos uma família muito grande. A eles o meu MUITO OBRIGADA!!

Uma imensa gratidão, pois não caberia aqui somente um muito obrigado, aos meus queridos orientadores; Professor Dr. André Kipnis e Professora Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis, por me receberem em seus ambientes de trabalho, para mim, eu os considero como meus “pais científicos”, pois pais são aqueles que ensinam, educam, puxa orelha quando necessário e amam seus filhos, e foi assim que me senti, como uma filha nesse tempo de mestrado. Tenho certeza de que cheguei aqui engatinhando e hoje concluo pelo menos dando alguns passos. Obrigado professores pela paciência que tiveram comigo. A vocês o meu enorme CARINHO!

Não poderia deixar de citar aqui o meu grande amigo e colega de laboratório Lázaro Moreira Marques Neto, obrigado por ser essa pessoa maravilhosa que você é, humilde, dedicada e inteligente, sempre me ajudando. Te desejo muito sucesso na sua vida. A você o meu MUITO OBRIGADA!!

Quero agradecer também ao meu grande amigo Fábio Muniz de Oliveira, por ter colaborado com o desenvolvimento do trabalho com todo seu conhecimento, e

meu crescimento quanto mestranda, pode ter certeza que toda sua cobrança e ensinamentos não foram em vão, obrigada Fábio por acreditar que tudo no final iria dar certo, obrigado por toda ajuda nesse tempo de convivência. A você o meu MUITO OBRIGADA!!.

AH! Não poderia esquecer de agradecer a Larissa Mendonça Marques e Rogério Coutinho das Neves, me lembro como se fosse hoje quando cheguei ao laboratório igual um peixe sem saber nadar e encontrei essas duas pessoas preparando meio de cultura para fazer placas, desde então nos tornamos amigos além das paredes do laboratório. A vocês o meu MUITO OBRIGADO!!!

Aos meus amigos do 423 e 323 por todo esse tempo de convivência, vocês se tornaram para mim uma família, sempre compartilhando as alegrias e tristezas de cada um, obrigada pelas risadas, pelos ensinamentos e pelos almoços juntos. MUITO OBRIGADO!!

Agradeço a minha dupla Rafaela e Beatriz, nos conhecemos no laboratório e nossos santos bateram, desde então não nos desgradamos mais, minhas companheiras para todas as horas, me ajudando e aconselhando a nunca desistir dos meus sonhos. Agradeço a Deus todos os dias por ter colocado essas pessoas maravilhosas na minha vida. MUITO OBRIGADO!!!

A todos da UFG também

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	vi
FIGURAS E ANEXOS	viii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 HISTÓRICO	1
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE NO MUNDO E NO BRASIL ..	4
1.3 ETIOLOGIA	5
1.4 PATOGENICIDADE DO <i>M. TUBERCULOSIS</i>	6
1.5 DIAGNÓSTICO	9
1.6 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA	12
1.7 PREVENÇÃO DA TUBERCULOSE, A VACINA BCG.....	14
1.8 PROTEASES	15
1.8.1 AMINOPEPTIDASES	17
1.8.2 PROTEASES COMO NOVA FORMULAÇÃO PARA VACINAS.	21
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos	24
4- MÉTODOS.....	25
4.1 Amplificação do DNA correspondente ao gene Rv2467	25
4.2 Purificação do Produto de PCR.....	26
4.3 Clonagem do produto amplificado purificado.	26
4.4 Indução e análise da expressão da proteína recombinante	28
4.5 Solubilização da proteína com sarcosil 2%.....	29
4.6 Purificação da proteína recombinante em condição não desnaturante.....	30
4.7 Purificação da proteína recombinante em condições desnaturantes.	30
4.8 Eletrforese em gel de poliacrilamida.....	31
4.9 Produção de anticorpos policlonal	31
4.10 Western Blotting	32

5	RESULTADOS	33
5.1	Análises in silico (Predições) proteína Rv2467	33
5.2	Clonagem do gene Rv2467 de <i>M. Tuberculosis</i>	41
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE	69
	Anexo 2 – Manuscrito a ser submetido a revista do IPTSP.....	74

FIGURAS E ANEXOS

Figura 1 - Parede celular de micobacterias.....	6
Figura 2 - Mapa do vetor de clonagem.....	27
Figura 3 - Mapa do vetor de expressão pET-28a.....	28
Figura 4- Arvore de similaridade.....	33
Figura 5 - Predição da estrutura molecular Rv2467	34
Figura 6 - Motivo consenso GXEN	36
Figura 7 - Motivo HEXXH.....	36
Figura 8 - Predição de peptideo sinal.....	37
Figura 9- Predição de sítios de glicosilação.....	38
Figura 10- Predição de possíveis pontes de dissulfeto..	40
Figura 11 – Sequenciamento da construção do gene Rv2467	41
Figura 12 - Análise do produto amplificado do gene Rv2467.....	42
Figura 13 - Análise da digestão do plasmídeo recombinante pGem T_Rv246	43
Figura 14 - Clonagem do gene Rv2467 no vetor pET28a (Novagen).	44
Figura 15 – Avaliação do crescimento de clones transformante.	45
Figura 16 - Avaliação da indução da proteína recombinante (Rv2467	46
Figura 17-Avaliação da solubilidade da proteína recombinante (Rv2467).	47
Figura 18 - Análise de expressão da proteína recombinante Rv2467.....	48
Figura 19 - Solubilização da proteína recombinante Rv2467 com sarcosil 2%.	49
Figura 20 - Purificação da proteína recombinante Rv2467 em condições nativas. ...	50

Figura 21 - Solubilização da proteína recombinante Rv2467 com β -mercaptoetanol..	51
Figura 22 - Purificação da proteína recombinante Rv2467 em condições desnaturantes.....	52
Figura 23- Western blotting para verificação da presença da calda de histidina.....	53

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

- (AG) Arabinogalactamo
- (BAAR) Bacilos álcool-ácido resistentes
- (BCG) *Mycobacterium bovis* atenuado Bacilo Calmette-Guerin
- (DNA) Ácido Desoxirribonucleico
- (DAB) Diaminobenzidina
- (HPA) (Ensaio de Proteção por Hibridização
- (IFN- γ) Interferon gama
- (IPTG) Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
- (LAM) Lipoarabinomanana
- (LOS) Lipooligossacarídeo
- (LB ágar) Luria Bertani ágar
- (MCL) Micobactéria de crescimento lento
- (MTD) Teste direto de *Mycobacterium tuberculosis*
- (MDR) Multidrogas resistentes (MDR)
- (MTBC) Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- (NAG) N- acetilglicosamina
- (NAN) N-acetil-murâmico
- (NaSal) Salicilato de Sódio
- (OMS) Organização Mundial de Saúde
- (PBS) Salina tamponada, do inglês “phosphate-buffered saline
- (PCR) Reação da polimerase em cadeia
- (PPD) Derivado proteico purificado
- (RT-PCR) PCR em tempo real
- (TAANS) Testes de amplificação de ácidos nucleicos
- (TGF- β) Fator transformador de crescimento beta
- (TMA) Amplificação mediada por transcrição
- (XDR) extensivamente resistente a fármacos

RESUMO

Mycobacterium tuberculosis é o agente etiológico da tuberculose (TB), que provocou em 2015, 10,4 milhões de novos casos e 1,8 milhões de mortes registrados mundialmente. Para conseguir evadir as barreiras de defesa do hospedeiro, a bactéria evoluiu criando mecanismos que modulam ou modificam o ambiente no qual ela está inserida, sendo a secreção de moléculas bioativas uma estratégia eficiente para isso. Dentre as moléculas bioativas produzidas por *M. tuberculosis*, as proteases desempenham papel crucial para o sucesso da infecção, pois estão envolvidas em diversos processos biológicos importantes para a bactéria, tais como replicação do DNA, proliferação celular, processamento de antígeno, entre outros. Deste modo, as proteases se apresentam como alvo para novas drogas anti-TB ou como possíveis antígenos vacinais. Com isso, o foco deste trabalho foi clonar e expressar o produto do gene Rv2467, uma suposta protease com atividade aminopeptidase de *M. tuberculosis*. Para tanto foi realizado o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificar o gene Rv2467 por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) que foi clonado no vetor pGEM-T easy. O inserto correspondendo ao gene Rv2467 foi retirado do vetor de clonagem e inserido no vetor de expressão pET-28a. A proteína recombinante foi expressa a partir do plasmídeo recombinante pET-28a/Rv2467 em *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS* através de indução com IPTG. A proteína recombinante, apresentando o tamanho esperado de 94 KDa, foi expressa e submetida ao processo de purificação por cromatografia de afinidade ao níquel. A purificação parcial da proteína recombinante somente foi possível de forma desnaturada, sendo que as tentativas de obtê-la de forma nativa para testar atividade resultaram improdutivas. O baixo rendimento de purificação da proteína recombinante levou a suspeitar da possível perda da cauda de histidina e, para tanto, realizou-se um Western Blotting com anticorpo anti-histidina. Ao ver a revelação na membrana verificou-se que o anticorpo não reconheceu a proteína Rv2467 o que impossibilitou obter a proteína pura não podendo seguir para futuros testes de caracterização. Além de testes para obter a proteína em sua forma nativa foi escrito um manuscrito científico de revisão da literatura sobre proteases de *Mycobacterium tuberculosis* envolvidas no mecanismo de virulência.

Palavras chaves; *Mycobacterium tuberculosis*, virulência, infecção, protease.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is the etiological agent of tuberculosis (TB), which is responsible in 2015 for 10.4 million new cases and 1.8 million casualties registered worldwide. To be able to avoid the defense barriers of the host, the bacteria evolved mechanisms to modulate or change the environment it is in, thereby, the secretion of bioactive molecules is an efficient strategy to do so. Among the bioactive molecules produced by *M. tuberculosis*, proteases have a crucial role to a successful infection, as they are involved in several important biological processes of the bacteria, such as DNA replication, cell proliferation and antigen processing. Thus, proteases are good targets for the development of new anti-TB drugs or as possible vaccine antigens. This work aimed to clone and express the gene Rv2467, a putative protease with aminopeptidase activity from *M. tuberculosis*. To achieve this goal, oligonucleotides design were made to amplify the gene Rv2467 by Polymerase Chain Reaction (PCR), which was cloned in the pGEM-T easy vector. The clone Rv2467 gene was then transferred to the expression vector pET-28a. The recombinant protein was expressed from the recombinant plasmid pET-28a/Rv2467 in *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS* through induction with IPTG. The recombinant protein, with the expected size of 94KDa, was expressed and subjected to the purification process by nickel affinity chromatography. The recombinant protein was partially purified only in its denatured form. The low yield of purified recombinant protein raised the possibility of histidine tail loss. To verify that, Western Blotting with anti-histidine antibody was made and it was verified that the antibody did not recognize the target Rv2467 protein, which made it impossible to acquire the pure protein, not allowing further characterization tests. Additionally, a literature review was performed about *Mycobacterium tuberculosis* proteases that are involved in virulence mechanisms to make a manuscript to be submitted to a scientific journal.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*, virulence, infection, protease

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HISTÓRICO

A tuberculose é uma doença antiga, tendo os primeiros registros encontrados em hominídeos (GUTIERREZ et al., 2005). Análises atuais utilizando técnicas moleculares revelaram que o gênero *Mycobacterium* possivelmente existe há 150 milhões de anos (BARBERIS et al., 2017). Outras evidências arqueológicas foram encontradas no Egito em tecidos de múmias e indicam que a tuberculose em humanos existe há mais de 5000 anos (MORSE; BROTHWELL; UCKO, 1964). Com o início do processo de migração de pessoas entre os países, documentos mostraram também indícios de casos de tuberculose na Índia há 3300 anos e na China há 2300 anos. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, foi possível observar evidências arqueológicas em cadáveres em diversos locais do mundo, revelando que a tuberculose é uma doença que está acometendo o homem há milênios (DANIEL, 2006).

Com o passar dos tempos, relatos descritos na antiguidade caracterizam a tuberculose como “phthisis” ou tísica. Esse nome surgiu na literatura grega denominado pelo notório médico Hipócrates (460-370 a.C.), que descreveu pela primeira vez o termo e suas manifestações clínicas como: tosse seguida de “hemorragia” ou “hemoptise”. A doença parecia bastante comum, por essa razão recomendavam aos seus seguidores a não manter contato com os doentes e indicava como tratamento uma boa alimentação, leite e exercícios físicos (THOMAZ, 2010). A escola hipocrática ao observar a formação de tubérculos pela primeira vez em ovinos e suínos considerou a “phthisis” como uma doença hereditária (HERZOG, 2007).

Já Aristóteles (384-322 a.C) percebeu em seus estudos uma manifestação mais comum da tuberculose “a escrofulose”, uma forma de tuberculose cutânea que acometia linfonodos cervicais e inguinais, tais manifestações estavam presentes em suínos. Com essas observações supôs que a etiologia causadora dessas lesões era de caráter contagioso, uma vez que vários animais da mesma região em que foi feito o estudo apresentavam as mesmas manifestações (THOMAZ, 2010). Nesta mesma época uma prática bastante comum na Inglaterra e na França era o “Toque Real”, pois acreditava-se que as mãos dos reis tinham poder de curar indivíduos escrofulosos (FRITH, 2014) .

Os primeiros indícios de tuberculose nas Américas foram encontrados em múmias peruanas nos desertos áridos do Peru e Norte do Chile. Naquela época a mumificação era bastante praticada conservando assim os cadáveres (ARRIAZA et al., 1995). Essa primeira identificação foi realizada em cadáver mumificado de uma nativa peruana, na qual, foi observada alterações em seus pulmões contendo os bacilos. As amostras de DNA retirados desses esqueletos passaram por amplificação de ácidos nucleicos, onde foram encontradas evidências de tuberculose típica espondilite, o que indicou que esses casos começaram há mais de 500 anos nessas regiões. Essas análises com DNA conservado mostraram indícios da existência da tuberculose na América na era pré-colombiana (ROSEMBERG, 1999).

No Brasil acredita-se que o surgimento da tuberculose se deu na época da colonização. Os colonos e os Jesuítas que vinham ao Brasil na maioria das vezes infectados com a “peste branca” e que conviviam com os habitantes na região transmitiam a doença acometendo assim muitos nativos. Um dos primeiros relatos da tuberculose na América do Sul foi a morte do padre Emanuel da Nóbrega chegado ao Brasil em 1549 (CAMPOS; PIANTA, 2001).

Em meados do século XVII Sylvius de La Boë de Amsterdã (1617-1655) em sua obra “Ópera Médica” de 1679, e anos depois em um edital a saúde pública da república de Lucca na Itália reconhece a natureza infecciosa da doença em suas publicações. Nessa obra Sylvius de La Boë descreve a presença de tubérculos como lesões constantes encontradas nas regiões pulmonares em pacientes portadores de tísica, esses tubérculos progrediam formando cavidades e úlceras. Em suas análises Sylvius de La Boë também possibilitou a relação entre o comprometimento pulmonar (Tísica) com a doença de pele (Escrófula). Dez anos depois, o mesmo foi concluído em análises feitas por Richard Mortan (1637-1698), em Londres, que observou a doença em estágios: primeiro a inflamação provocando a tuberculose, a progressão para úlceras e por final para tísica (THOMAZ, 2010).

A tuberculose já estava sendo responsável por um elevado número de óbitos, principalmente em jovens, no século XVIII na Europa Ocidental devido às condições precárias, tanto no trabalho quanto no local de habitação e desnutrição, por consequência da revolução industrial em curso (FRITH, 2014). Com essas observações e como maneira de conter a disseminação da doença, criou-se os sanatórios, que foram medidas de tratamento e cura para tuberculose. Estes eram construídos em cidades montanhosas a

fim de propiciar ar fresco após este ter sido descrito por Hermann Brehmer como terapia de cura durante uma viagem às montanhas do Himalaia (BARBERIS et al., 2017).

Até o início do século XX, a tuberculose estava sob controle na Europa, porém durante a Primeira Guerra Mundial, a doença se alastrou rapidamente entre os combatentes (DANIEL, 2006). Isso levou a cruz vermelha americana a enviar contingentes para França formando uma sede em Paris. Até então o foco era principalmente os militares, porém o governo da França estendeu os cuidados até as comunidades que também necessitavam de ajuda, promovendo assim várias medidas como a criação do Programa “The Bureau of Tuberculosis and Public Health,” criado em 1917 para resolver os problemas contando com a aprovação do Ministério Francês (DAVIES, 1920).

Villemin (1827 – 1892), cirurgião militar francês propôs em seus estudos que a tuberculose era uma doença infecciosa e transmissível. Estudando a glanders ou mormo, uma doença conhecida por acometer principalmente equinos, e que se transmitia de cavalo para cavalo, percebeu que, em sua forma crônica suas manifestações eram parecidas com as manifestações apresentadas por pacientes infectados com tuberculose. Concluiu assim que a tuberculose também poderia ser transmissível. Com a predição de que a tuberculose podia ser também de caráter infeccioso. Villemin realizou experimento utilizando dois coelhos, um inoculado e outro como controle. Ao realizar a autópsia dos dois coelhos ele observou que no coelho inoculado havia presença de lesões típicas da tuberculose, já essa manifestação não foi vista no coelho usado como controle. Com isso foi possível apontar a tuberculose como uma doença infecciosa (DANIEL, 2015).

O grande marco do estudo da tuberculose ocorreu em 24 de março de 1882 quando o cientista Robert Koch conseguiu isolar e cultivar o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* a partir de amostras humana e animal e, logo depois, conseguiu reproduzir a doença quando inoculou o bacilo em animais de laboratório. Com seus resultados Koch conseguiu entender a etiologia infecciosa da doença levando-o a receber o Prêmio Nobel de medicina no ano de 1905 (GRADMANN, 2001).

Esse grande marco histórico permitiu vários avanços na pesquisa, como por exemplo, os testes tuberculínicos, a vacina desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin (BCG), no ano de 1921, em seus estudos cultivaram o bacilo da tuberculose em meio contendo bile. Isto possibilitou modificações nas propriedades do bacilo atenuado levando à sua baixa virulência. Calmette então nomeou a cepa como bacilo atenuado de “Bacilo Calmette Guérin ou BCG”. Em outros estudos, a vacina BCG se apresentou inofensiva para modelos cobaias de diversas espécies de mamíferos e os protegeu contra

uma inoculação artificial virulenta que foi definitivamente letal. Este estudo foi realizado nos institutos de Pasteur de Dacar e de Kindia (Guiné Francesa). (HAWGOOD, 2007).

Além desses achados, e a partir da descoberta do bacilo de Koch, novas maneiras de combater a tuberculose foram criadas como a estreptomicina, desenvolvida por Selman Waksman, os testes tuberculínicos, já citados anteriormente, e outras drogas antituberculosas. Atualmente ainda se faz necessário a organização de novas estratégias que possam auxiliar na prevenção e no tratamento dessa enfermidade, tanto através do desenvolvimento de novas drogas, quanto em diagnósticos e prevenção (BARBERIS et al., 2017).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE NO MUNDO E NO BRASIL

A tuberculose está entre as doenças infecciosas que mais afetam a população nos dias de hoje, principalmente as classes menos abastadas, mais vulneráveis aos determinantes sociais dessa doença, tais como a fome, o alcoolismo e a pobreza de modo geral. No ano de 2015 a prevalência mundial de pessoas com tuberculose era de 10,4 milhões de novos casos e destes, 5,9 milhões (56%) estavam entre homens; 3,5 milhões (34%) entre mulheres e 1,0 milhão (10%) entre as crianças enquanto indivíduos HIV positivo representava 1,2 milhões (11%). O número de óbitos causados pela tuberculose em 2015 chegou a 1,4 milhões com adicional de 0,4 milhões de indivíduos com HIV. Apesar de a taxa de mortalidade ter diminuído, entre os anos 2000 a 2015 a tuberculose foi a doença infectocontagiosa de origem bacteriana mais prevalente no mundo (WHO, 2016).

No Brasil no período de 2007 a 2016 a taxa de incidência da doença variou de 37,9/100 mil habitantes para 32,4/100 mil habitantes em 2016. Apesar dessa redução a tuberculose ainda continua sendo um problema de saúde no Brasil. Quanto ao risco de adoecimento por tuberculose no Brasil, houve uma variação de 10,5/100 mil habitantes no Distrito Federal a 67,2/100 mil habitantes no Amazonas, considerados ainda altos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A taxa de mortalidade por tuberculose apresentou uma redução nos períodos de 2006 a 2015 de 2,6/100 mil habitantes para 2,2/100 mil habitantes, mas mesmo com essa redução ainda foram registrados 4.543 óbitos por tuberculose sendo que o Estado do Rio de Janeiro, Pernambuco, Amazonas e Pará mostraram maiores riscos de óbito pela tuberculose (BRASIL, 2017).

1.3 ETIOLOGIA

Mycobacterium tuberculosis é o agente etiológico da tuberculose. É um microrganismo bacilo álcool ácido resistente (BAAR) com morfologia de bastonete medindo aproximadamente 0,2 a 0,6 µm de largura e 1-10 mm de comprimento, não possuem cápsulas, não formam esporos, aeróbios estritos. De acordo com o tempo de multiplicação é considerada uma bactéria patogênica de crescimento lento (MCL), com temperatura ótima de crescimento a 35-37°C (COELHO; MARQUES, 2006). Esse microrganismo juntamente com as espécies *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *M. bovis*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii* formam o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (FORRELLAD et al., 2013).

As espécies pertencentes a este complexo são bem próximas quando analisadas por sequenciamento gênico pelo rRNA 16S por exemplo, diferindo apenas pelas características morfológicas, pelo tropismo e pela patogenicidade no hospedeiro. Apesar de descender de um ancestral comum, *M. tuberculosis* é específica para humanos, assim como *M. africanum* e *M. canettii*, enquanto outras espécies são consideradas patógenos de roedores (*M. microti*) ou possuem um amplo espectro de hospedeiro (*M. bovis*) (DUCATI et al., 2006).

Uma das características consideradas importantes para o gênero *Mycobacterium* é a composição peculiar de envelope celular (Figura 1), o qual promove uma barreira proporcionando sua sobrevivência e capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro, afetando assim seu crescimento, morfologia e virulência. Externamente à membrana, micobactérias possuem um polímero denominado de peptideoglicano, formado pela ligação cruzada de moléculas de N-acetil-murâmico (NAN) e N-acetilglucosamina (NAG) que confere rigidez a parede celular. Nas extremidades distais estratificadas de tais açúcares (NAN e NAG), diferentemente das demais bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o gênero *Mycobacterium* possui polissacarídeos de arabinogalactano (AG) em ligação covalente. Sobre o AG se encontram cadeias longas de ácidos graxos, formando os ácidos micólicos (JOE et al., 2007). Além dos componentes citados, existe também uma variedade de lipídeos como os lipídeos livres, ou seja, lipídeos que não estão ligados ao complexo AG e que são retirados facilmente por solventes; lipooligossacarídeos (LOS) e lipoarabinomanana (LAM) (BRENNAN; NIKAIDO, 1995). A presença de grande quantidade de ácidos micólicos, lipídeos e

proteínas tornam as micobactérias resistentes a descoloração pelo álcool-ácido usado na coloração de Ziehl Neelsen e se coram em vermelho, sendo denominadas bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), da mesma forma este envoltório singular tornam estas micobactérias resistentes aos antimicrobianos e alguns agentes desinfetantes/antissépticos (BARKSDALE; KIM, 1977).

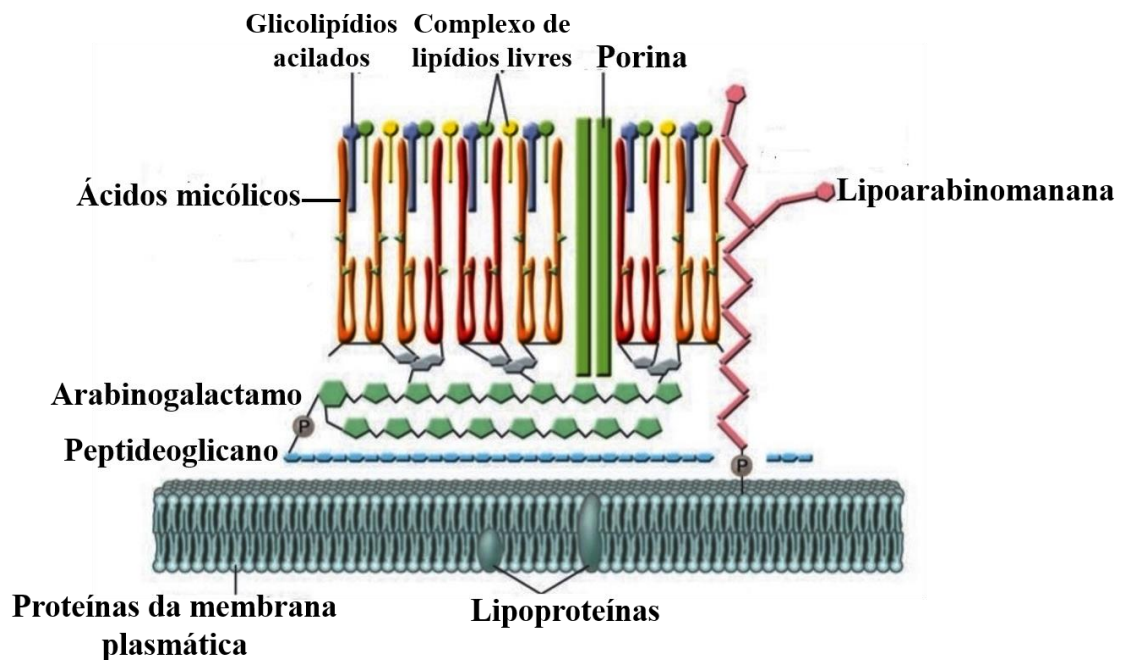


Figura 1 - Parede celular de micobactérias Adaptada de “Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis”(RILEY, 2006).

1.4 PATOGENICIDADE DO *M. TUBERCULOSIS*

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa em que o paciente com tuberculose ativa, portando o bacilo, ao tossir, conversar ou até mesmo espirrar, gera uma espécie de aerossol contendo o bacilo em seu interior. Estas pequenas gotículas permanecem no ar por algum tempo após a sua eliminação para o exterior, que com algumas contribuições como virulência, exposição a luz solar e ventilação promovida pelo ar, pode ser inalada por um indivíduo susceptível podendo assim desenvolver a doença na sua forma ativa. A partir do momento em que o indivíduo saudável entra em contato com os bacilos através de sua inalação, estes conseguem ultrapassar as barreiras físicas iniciais do sistema

respiratório atingindo os alvéolos pulmonares. Inicia-se, então, o processo de infecção (RANDALL et al., 2015).

Uma vez que os bacilos conseguem atingir os alvéolos pulmonares se deparam com células fagocíticas como macrófagos alveolares, células dendríticas locais e quando nos brônquios são fagocitados por células epiteliais (DELOGU; SALI; FADDA, 2013). Ao serem fagocitados, os bacilos são contidos em vesículas endocíticas denominadas fagossomas. Os fagossomas se unem a organelas presentes no citoplasma contendo em seu interior enzimas digestivas que degradam partículas que se originam no meio exterior chamados lisossomas. Forma-se uma estrutura chamada de fagolisossoma, que proporciona um ambiente desfavorável para o patógeno, com um pH ácido, grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são considerados tóxicos para o bacilo (SHALER et al., 2012). A estrutura formada pelo fagolisossoma é ligada ao bacilo por receptores de complemento e de manose. No entanto o bacilo contém o lipoglicano lipoarabinomana (LAM) que se encontra em sua superfície que medeia a interação entre os receptores de manose e o bacilo (YUK; JO, 2014).

Para conseguir permanecer no ambiente gerado pelas células fagocíticas profissionais do hospedeiro, como monócitos e macrófagos, *M. tuberculosis* desenvolveu uma variedade de estratégias de evasão imunológica, sendo a principal delas o bloqueio da fusão dos fagossomas com os lisossomas para formação de um fagolisossoma maduro. Isso facilita a replicação do bacilo e seu escape para o citoplasma do macrófago. Outra delas é a inibição da autofagia; um processo fisiológico de degradação de componentes do citosol e organelas danificadas para manutenção da homeostase celular em situações de privação de nutrientes e a presença de patógenos e toxinas. Além desses, outros mecanismos também são utilizados por *M. tuberculosis* como a inibição da apoptose, uma via de morte celular com forte atividade antimicrobiana; a inibição do reconhecimento por células T; a inibição da sinalização pelo receptor interferon gama (IFN- γ), um receptor de extrema importância pois regula todos esses mecanismos de defesa do hospedeiro; a eliminação de intermediários tóxicos de oxigênio e nitrogênio. O conjunto desses mecanismos ajuda na evasão e sobrevivência de *M. tuberculosis* contra as defesas do hospedeiro (O'GARRA et al., 2013).

Após o processo inicial de infecção e fagocitose, os macrófagos liberam quimiocinas para atração de novos monócitos, neutrófilos e linfócitos visando suprimir o bacilo. Porém essa resposta não é suficiente para contenção do patógeno, mas a interação entre elas proporciona um meio com citocinas que se torna prejudicial ao bacilo

potencializando a defesa do hospedeiro. Entre tais citocinas podemos citar: (TNF- α), que induz a produção de derivados do oxigênio e nitrogênio reativos que são letais para o bacilo; o IFN- γ , que torna os macrófagos mais letais para o bacilo. Mas também existe entre essas citocinas aquelas que diminuem as defesas contra o bacilo, entre elas estão o fator beta transformador de crescimento (TGF- β), que inibe a ativação do macrófago, a proliferação de linfócitos T e regula negativamente o IFN- γ , reduzindo assim as defesas contra o bacilo (DORHOI; KAUFMANN, 2016).

Os linfócitos são ativados pela apresentação de antígenos do bacilo pelo macrófago e desempenham papéis importantes contra a virulência do patógeno. Os linfócitos TCD4⁺ por exemplo secretam citocinas lesivas para o bacilo assim como o macrófago produz IFN- γ (CARUSO et al., 1999) . Com algumas diferenças entre eles, são divididos em células tipo Th1 e Th2. As células do tipo Th1 produzem IFN- γ , uma das principais citocinas presentes na resposta protetora durante o processo de infecção, responsável por ativar macrófagos. Além desta, produzem IL-12 que ativam células inflamatórias e fagocíticas capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas. As células tipo Th2 (IL-4, IL10, IL-6 e IL-13) regulam o funcionamento das células B, que produzem anticorpos, e inibem a produção de IFN- γ pelas células Th1. Já os linfócitos TCD8⁺ produzem citocinas semelhantes aos linfócitos TCD4⁺ e possuem capacidade de lisar as células nos locais de lesão (GIDEON et al., 2015).

Após o recrutamento de células, há o início da formação de uma estrutura denominada granuloma, composta por células como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos B e linfócitos T com objetivo de conter a disseminação do bacilo. No centro do granuloma observa-se células epitelióides e células de Langerhans circundadas por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Com o desenvolvimento da imunidade celular, o centro do granuloma sofre um processo de necrose de caseificação induzido pelo bacilo através de TNF- α e LAM. Esse ambiente diminui sua atividade metabólica permanecendo em um estágio de dormência podendo sobreviver por décadas estabelecendo a doença em uma forma latente (TORRADO et al., 2015).

Dada a dependência na formação de uma resposta imunológica Th1 para conter a infecção, pode-se concluir que alguns fatores de agravo desta doença são aqueles que interferem com a capacidade de formação de tal resposta. Nesse contexto, com o advento da infecção pelo vírus HIV na década de 80 do século passado, teve-se um grande aumento de casos de tuberculose devido a esta doença aparecer como principal infecção secundária em pacientes com HIV. Este vírus compromete o sistema imune debilitando o

organismo e favorecendo assim o desenvolvimento de doenças infecciosas, incluindo a infecção por tuberculose e a disseminação hematogênica do bacilo. Na infecção pelo HIV, além da diminuição de células TCD4+, também se observa uma queda na qualidade dessas células pela perda da hipersensibilidade tardia, que se manifesta mesmo com um número elevado de células CD4+. Como o mecanismo de defesa contra o *Mycobacterium tuberculosis* se baseia justamente na imunidade celular, a infecção pelo HIV é um forte indutor na progressão da tuberculose-infecção para tuberculose-doença (DIEDRICH; O'HERN; WILKINSON, 2016).

Várias células estão envolvidas na resposta imune frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, tanto em sua regulação quanto em seu funcionamento, incluindo funções ativadoras e efectoras. O equilíbrio entre essas respostas e a capacidade do patógeno de modulação destas, fará com que as células alvo de infecção direcionem se haverá um controle sobre a infecção, ou se está progredirá com o aumento do números de bactérias, lesões teciduais pulmonares e a transmissão do patógeno a posteriores hospedeiros susceptíveis (ORME; ROBINSON; COOPER, 2015).

1.5 DIAGNÓSTICO

Dentre as diversas formas para diagnosticar um indivíduo com suspeita de tuberculose, é o encontro de infiltrações nos lóbulos dos pulmões após o paciente apresentar sintomas respiratórios anormais e através da radiografia de tórax, uma das primordiais formas de diagnóstico da doença. Uma outra forma são os exames bacteriológicos, como por exemplo a baciloscopia. Este método convencional é rápido e econômico, e detecta a bactéria em uma amostra de escarro coletada de uma pessoa portadora da doença e submetida à coloração de Ziehl Neelsen. O tratamento com fucsina de Ziehl confere uma coloração avermelhada às micobactérias. Porém, este teste não é considerado específico para tuberculose, pois outras espécies de micobactérias podem apresentar o mesmo resultado. Adicionalmente, este teste apesar de ser rápido e barato, é muito pouco sensível, e portanto muitos indivíduos com Tb ativa não são diagnosticados por esta técnica, sendo os falsos negativos (THRUPP et al., 2004). Para melhorar um pouco a sensibilidade desta técnica, pode-se empregar métodos de coleta de amostra que aumentam um pouco o sucesso de detecção, como por exemplo através da inalação de solução salina concentrada e provocando assim a indução do escarro pelo paciente. Alternativamente pode-se também proceder a broncoscopia ou realizar um lavado

broncoalveolar como maneira de fornecer material com maiores chances de encontrar o bacilo de Koch (YORK; KANE, 2013).

Outro método laboratorial importante no diagnóstico da tuberculose é a cultura, considerada padrão-ouro devido à sua alta sensibilidade. Este método propicia o isolamento em meios de cultura específico que permitem o seu crescimento. Esse teste consiste em várias etapas, onde primeiramente ocorre um tratamento da amostra coletada, por exemplo escarro, urina ou líquido, que são centrifugadas formando sedimentos. Em seguida, esse sedimento é fluidificado e descontaminado com hidróxido de sódio se a amostra for de um sítio não estéril, como escarro e lavado brônquico. Em seguida faz-se a semeadura em um meio sólido, sendo o mais utilizado o meio Löwenstein-Jensen (LJ) que é a base de ovo, ou meios à base de ágar, como o Middlebrook 7H10 e Middlebrook 7H11, que permitem o desenvolvimento das colônias. Por último ocorre a etapa de incubação entre 35-37°C por mais ou menos 8 semanas, pois estas micobactérias são de crescimento lento. Após o processo de incubação realiza-se a leitura da placa avaliando sua morfologia, pigmentação e aspecto (lisa/rugosa) (BRASIL, 2008). Apesar do método de cultura ser considerado um teste padrão ouro, sua desvantagem está na demora para obter seu resultado, pois o tempo para o crescimento bacteriano pode levar até oito semanas para leitura da placa levando a um diagnóstico tardio (BRASIL, 2011a).

Dentre outros tipos de testes que podem ser utilizados para triagem e acompanhamento do tratamento está a prova tuberculínica (PPD), um teste imunológico disponível para detecção de pacientes com suspeita de tuberculose. Consiste em injetar via intradérmica uma substância chamada tuberculina, uma mistura composta por proteínas secretadas pelo *Mycobacterium*. Os indivíduos que tiveram exposição ou contato com *Mycobacterium tuberculosis* e algumas vezes a outro tipo de micobactéria podem apresentar uma reação de hipersensibilidade no local da injeção após 48-72 horas, resultando em um endurecimento que pode ser detectado através da medida desta reação. Porém a realização desse teste conta com algumas limitações, como por exemplo, os indivíduos vacinados com BCG (Bacilo Calmette Guérin) podem também apresentar uma reação, além da possibilidade de erros na interpretação na hora da leitura e sua sensibilidade ser considerada baixa (PALOMINO, 2005).

Os testes convencionais auxiliam na detecção de pacientes com tuberculose. Apesar da disponibilidade e o baixo custo, estes testes possuem bastante limitações como baixa sensibilidade e/ou longa duração. Atualmente no cenário da tuberculose testes de amplificação de ácidos nucleicos (TAANS), tanto para a identificação do complexo

Mycobacterium tuberculosis quanto para detecção de resistência a fármacos, têm sido desenvolvidos. Esses testes são executados de maneira rápida com resultados precisos em até 48 horas, se baseiam na amplificação de ácidos nucleicos pela reação da polimerase em cadeia (PCR) na identificação de sequências específicas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (TRAJMAN et al., 2008). A vantagem dos TAANS em comparação com exame cultural está na precocidade dos resultados com especificidade elevada independentemente do local de coleta da amostra seja ela respiratória ou extrapulmonar. Entretanto estes testes não podem substituir os métodos microbiológicos tradicionais, e portanto o resultado tem que ser interpretado em conjunto na tomada de decisão de iniciar ou não o tratamento antes do resultado de cultura, devido a resultados falsos positivos e negativos por possíveis contaminações e presença de inibidores enzimáticos no momento da amplificação (BENTO et al., 2011).

Hoje já existem TAANS comercializados em kits com alvo na identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas. Entre eles estão Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* da Roche Molecular Diagnostics, o qual é realizado uma PCR em tempo real para amplificar uma parte do rRNA16S comum ao gênero *Mycobacterium* e posteriormente é feita uma hibridização com uma sonda oligonucleotídica específica para a espécie *Mycobacterium tuberculosis* (BRASIL, 2011a)

O teste direto de *M. tuberculosis* (MTD) da empresa Hologic é um teste em duas fases em que amplificação e detecção ocorrem num mesmo tubo. Inicialmente, ácidos nucleicos são liberados das micobactérias por sonicação. Segue-se a desnaturação desses ácidos através de aquecimento e perda da estrutura secundária do rRNA. O método Amplificação por Transcrição Mediatizada (TMA), a 42°C, amplifica um alvo específico desse rRNA micobacteriano, pela transcrição de intermediários do DNA, resultando em múltiplas cópias do RNA de micobactéria (amplicon). As sequências específicas do complexo de *M. tuberculosis* são então detectadas usando o método HPA (Ensaio de Proteção por Hibridização). O reagente de hibridização de *M. tuberculosis* contém uma sonda de fita única de DNA com um componente quimioluminescente complementar às referidas sequências. Quando híbridos RNA:DNA estáveis são formados entre a sonda e as sequências específicas, a sonda hibridizada é selecionada e mensurada em um luminômetro Leader® (GEN-PROBE INCORPORATED, 2001).

Atualmente novas técnicas moleculares surgiram com objetivo de melhorar e agilizar o diagnóstico. Tais técnicas se baseiam na amplificação e análise de sequências

específicas em ácidos nucleicos fornecendo um resultado em até 48 horas. Dentre estas técnicas o Xpert MTB/RIF vem sendo bastante utilizado para detecção simultânea de *Mycobacterium tuberculosis* e resistência a fármacos. Este método se respalda na amplificação de ácidos nucleicos por PCR em tempo real (RT-PCR) e na investigação, por hibridização de sondas em sequências específicas do gene *rpoB* de *M. tuberculosis* cuja mutação é responsável pela maioria das resistências a rifampicina. Entretanto a execução deste método exige um alto custo financeiro, pois o equipamento precisa de um computador e também ser calibrado anualmente por um técnico que seja treinado, além do gasto elevado de energia (BRASIL, 2011b).

1.6 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA

A tuberculose, apesar do tratamento existente, continua a ser um problema mundial de saúde alarmante, sendo responsável por um elevado número de óbitos registrados anualmente. Esta, quando diagnosticada a tempo e se tratada adequadamente, pode ser curada. As drogas anti-Tb devem apresentar atividade bactericida e esterilizante. O tratamento consiste em combinações de tais drogas, rifampicina, isoniazida, etambutol, estreptomicina, etionamida e pirazinamida, conhecidas como drogas de primeira linha. Tais drogas são eficazes pois interferem em diversos estágios do metabolismo do patógeno, seja no bloqueio de síntese proteica, na formação da parede celular ou até mesmo no DNA e RNA (CAMPOS, 2007). O esquema clássico para o tratamento consiste em duas fases, denominado de esquema RIP, com duração total de 6 meses. A primeira fase, chamada de fase de ataque, é composta pela administração de rifampicina, isoniazida, pirazinamida nos dois primeiros meses e a fase de manutenção consiste na manutenção da administração da rifampicina e isoniazida por mais quatro meses (BRASIL., 2010).

No Brasil, devido ao aumento da taxa de isolados com resistência à isoniazida e rifampicina, novas medidas foram tomadas pelo Programa Nacional de Controle a Tuberculose que acrescentou o etambutol ao esquema RIP na fase de ataque e desenvolveu um comprimido único contendo todas as drogas do tratamento. Tal mudança teve como objetivo de diminuir o risco de falência, ou seja, mesmo com o tratamento a baciloscopia continua a ser positiva e recidiva, o paciente que tratou e teve cura mas depois de alguns anos ele volta a ter diagnóstico positivo (CONDE et al., 2009).

Muitos isolados têm demonstrado resistência a fármacos de primeira linha e quando a resistência se apresenta às drogas isoniazida e rifampicina, eles são chamados de multidroga-resistentes (MDR). Nesses casos, deve-se recorrer às drogas de segunda linha fluoroquinolonas, amicacina, capreomicina, estreptomicina, canamicina e/ou linezolida, cujo custo e tempo de tratamento são bem maiores e com risco de desenvolver resistência a essas drogas, resultando em cepas extensivamente resistentes denominadas de XDR (DROBNIEWSKI et al., 2013).

A tuberculose causada por uma cepa MDR (MDR-TB) traz uma taxa de mortalidade e morbidade bastante elevada o que acarreta um olhar mais cuidadoso de médicos especialistas em doenças pulmonares (WEIS et al., 1994). O tratamento nesses casos segue recomendação feita pela Organização Mundial da Saúde com duas fases de tratamento: fase intensiva e de manutenção sendo que a fase intensiva deve conter quatro drogas efetivas, uma droga injetável (estreptomicina, canamicina, amicacina ou capreomicina), uma fluoroquinolona (levofloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina), uma droga oral (etionamida, protionamida, cicloserina, terizidona ou ácido para-aminossalicílico) e uma droga de reforço (linezolida, ertapenem, imipenem/cilastatina, meropenem, claritromicina, tioacetazona, amoxicilina/clavulanato, clofazimina, isoniazida em altas doses (ação modesta), bedaquilina ou delamanida) por oito meses. Na fase de manutenção a droga injetável deve ser retirada sendo mantida as outras drogas por 12 meses posterior à negativação da prova de baciloscopia negativa (ZUMLA et al., 2015).

O esquema de tratamento para os casos de XDR deve ser cuidadosamente estabelecido com base no histórico de tratamento para tuberculose. A OMS recomenda cuidados quando constatado resistência. Entre estes cuidados inclui; o uso da pirazinamida ou algum outro medicamento de primeira linha, o uso de quinolonas, o uso de drogas injetáveis (aminoglicosídeo ou capreomicina), o uso por 12 meses ou por todo o tratamento e a utilização de dois ou mais agentes de reforço (ARBEX et al., 2015).

Desde a introdução da rifampicina em 1996 nenhum medicamento de primeira linha teve aprovação no mercado, aumentando assim o número de cepas MDR/XDR resistentes também a drogas de segunda linha. No entanto até que novas estratégias para o desenvolvimento de drogas para um tratamento eficaz nos casos de resistência, o regime de terapia vai depender do uso ideal de opções existentes de medicamentos de primeira, segunda e terceira linha já aprovados no mercado (MITCHISON, 2000).

1.7 PREVENÇÃO DA TUBERCULOSE, A VACINA BCG

A vacina BCG foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin na França, nos anos de 1908 e 1921, quando foram realizados cultivos sucessivos de *Mycobacterium bovis* em meio contendo bile até a obtenção de uma cepa atenuada (RITZ et al., 2008). No ano de 1921 foi realizada a primeira imunização, a qual demonstrou que a vacina era bastante eficaz na proteção em crianças, contra meningite tuberculosa fazendo com que a vacina fosse implantada em diversos países do mundo, se tornando obrigatória principalmente nas áreas endêmicas de Tb. A imunização com BCG também mostrou uma eficácia de 80% de proteção contra a tuberculose grave e disseminada. Hoje se apresenta como uma das mais seguras com mais de 120 milhões de doses ministradas por ano (TRUNZ; FINE; DYE, 2006).

A principal região genética responsável pela atenuação da cepa obtida por Calmette e Guérin foi a deleção da Região de Diferença 1 (RD1), sendo que esta região por sua vez aparece em *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*, e codifica para um sistema de secreção de proteínas ESX-1 no qual secreta proteínas como ESAT-6 e CFP-10 consideradas imunogênicas para o *M. tuberculosis*. Devido ao sucesso dos resultados com a BCG, a vacina original mantida no Instituto Pasteur foi distribuída para diversos países sem as devidas padronizações de métodos de cultivo, provocando assim diferenças genéticas e imunológicas entre as cepas espalhadas mundialmente e dando origem a novas cepas vacinais, como por exemplo a BCG Moreau, BCG Pasteur, BCG Rússia, BCG Japan, BCG Danish e BCG Glaxo (DELOGU; FADDA, 2008).

Apesar da BCG ser a vacina mais administrada em humanos, esta tem sido bastante contestada atualmente pois estudos tem demonstrado que sua proteção contra a tuberculose pulmonar em adultos é bastante variável, variando de 0 a 80%, não sendo considerada satisfatória (TRICCAS; GICQUEL, 2000). Estudos realizados na Índia demonstraram um certo nível de proteção, mas em contrapartida em faixas etárias mais elevadas essa proteção foi perdida (TRIAL, 1980). A perda de alguns genes que foram excluídos em *Mycobacterium bovis* atenuado pode ter levado ao desenvolvimento da cepa sem a capacidade de conferir a proteção ideal (BEHR et al., 1999). Com todas essas divergências como mutações genéticas e fatores genéticos observadas na produção da vacina, principalmente na perda da região RD1, faz-se necessário o desenvolvimento de novas vacinas que possam substituí-la ou até mesmo melhorar a BCG já existente para a prevenção e controle da tuberculose.

1.8 PROTEASES

Dentre as moléculas bioativas secretadas, as proteases tem sido foco de muitos pesquisadores por serem amplamente distribuídas no ambiente, além de estarem envolvidas em processos biológicos do ciclo celular do patógeno, como replicação do DNA, invasão celular, nutrição e modulação de resposta imunológica, por isto são de extrema importância para o metabolismo e sobrevivência do microrganismo. Estas participam da hidrólise das ligações peptídicas que formam uma proteína, algumas delas possuem preferência por clivar substratos e outras apenas clivar peptídeos de cadeias curtas (TURK, 2006).

Mycobacterium tuberculosis possui em seu genoma mais de 100 genes em potencial que codificam proteases ou peptidases. Estudos apontam que estas possuem um futuro promissor para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos contra tuberculose, bem como novas vacinas, incluindo as proteases envolvidas em processos celulares como secreção e *turnover* e também as que estão envolvidas no processo de virulência (ROBERTS et al., 2013).

De acordo com o local de atuação, ou seja, local de hidrólise, as proteases são classificadas como: endopeptidases, que clivam as ligações peptídicas internas, se diferenciando das exopeptidases que clivam as ligações terminais, estas últimas são subdivididas em aminopeptidases e carboxipeptidases dependendo da extremidade das ligações peptídicas em que atuam. Além de serem classificadas pelo local de ação, as proteases também são classificadas conforme o cofator presente no sítio ativo envolvido na reação de hidrólise que podem ser: proteases que possuem resíduos de ácido aspártico na catálise são chamadas de proteases aspárticas como por exemplo as proteases de HIV. Diferentemente, as metaloproteases necessitam de um íon metálico bivalente em seu sítio ativo, sendo o mais comum o zinco, mas podendo ser encontrado cobalto, ferro e manganês. São exemplos de metaloproteases: metaloproteases de matriz e metionina metaloprotease. Por último, as serino-proteases, precisam de um resíduo de serina para realizarem a hidrólise, são exemplificadas pelas quimiotripsina, tripsina (enzimas digestivas do intestino) e as proteases envolvidas na cascata de coagulação (HOOPER, 2002).

Diversas proteases de *M. tuberculosis* que auxiliam no processo patológico já foram descritas, como por exemplo as proteases que estão envolvidas no processo de secreção de proteínas agindo como peptidases sinal. As peptidases sinais do tipo I (Spase

tipo I) são de extrema importância, pois ao clivar o peptídeo sinal N-terminal permitem a liberação da proteína madura da membrana citoplasmática para o meio externo. Um exemplo de Spase tipo I é a protease LepB, que tem papel essencial no crescimento bacteriano (OLLINGER et al., 2012). Sua inibição leva à morte tanto de bactérias replicantes quanto não replicantes. Ela possui um domínio transmembrânico que permite a sua ancoragem na membrana citoplasmática. As peptidases sinais do tipo II (Spase tipo II) ficam ligadas à membrana com o seu sítio ativo voltado para o lado extracelular, sendo as peptidases do grupo das LpsA um exemplo de Spase tipo II e que agem através da clivagem das pré-proteínas facilitando o transporte através da membrana. Além destas proteases envolvidas na translocação e transporte de proteínas para serem secretadas, *M. tuberculosis* conta com as proteases que contribuem para a reciclagem de proteínas como as Clps (proteínas de serina) degradando proteínas mal dobradas ou agregadas que são potencialmente tóxicas para célula, contribuindo assim para homeostase da proteína celular. Além disso, também é uma maneira eficiente de reciclar recursos importantes e escassos para a célula (ROBERTS et al., 2013).

Além das proteases citadas acima, o *M. tuberculosis* codifica ainda para uma grande família de proteases como as HtrA de serina sendo elas: HtrA1 (Rv1223), HtrA2 (Rv0983) e HtrA3 (Rv0125) (MOHAMEDMOHAIDEEN et al., 2008). Esta grande família atua na manutenção do proteoma de uma célula, através da degradação das proteínas de membrana dobradas ou danificadas funcionando como chaperonas para outras. Sua estrutura geral consiste em um domínio contendo uma tríade catalítica, com sítio ativo altamente conservado (Ser-His-Asp) e um domínio de interação proteína – proteína que facilita a ligação do substrato (SINGH; KUPPILI; BOSE, 2011).

Mycobacterium tuberculosis possui também proteases que atuam em outros mecanismos, como demonstrado por Kiran e colaboradores (2009). Em seus estudos, observaram a expressão de FtsH, uma proteína de membrana essencial que degrada proteínas de membrana integral e proteínas citoplasmáticas. A expressão de FtsH em *Mycobacterium tuberculosis* é regulada positivamente após o bacilo ser exposto a agentes que produzem reativos tóxicos de oxigênio e nitrogênio (ROI) e (RNI), possibilitando continuar o crescimento em macrófagos e a sobrevivência neste ambiente hostil (KIRAN et al., 2009).

Nosso grupo demonstrou recentemente o envolvimento da enzima Zmp1 como tendo capacidade de clivar a molécula “big endotelina” em endotelina, no pulmão de camundongos e assim poder controlar o tônus do endotélio pulmonar, bem como o

abastecimento de nutrientes e oxigênio do tecido (CORREA et al., 2014). Foi demonstrado também, que, ao se inibir essa protease secretada pelo *M. tuberculosis*, houve uma considerável melhora no quadro patológico de camundongos infectados.

Existem também proteases transmembranares que são importantes para homeostase em *M. tuberculosis* como por exemplo Marps que é uma proteína de serina localizada no periplasma. Foi demonstrado que sua localização é essencial para sua função contra estresses extracelulares (SMALL et al., 2013). Além de proteínas transmembranares, o *Mycobacterium* possui proteínas que estão envolvidas no processo de síntese de peptideoglicano (Rip). Os genes *RipA* e *RipB* foram caracterizados como codificadores de endopeptidases de DL, que clivam a ligação entre os resíduos de D-glutaminil e o mesodiaminopimelyl nos péptidos do peptideoglicano. O gene *RipA* é considerado indispensável para *Mycobacterium tuberculosis* e a *Mycobacterium smegmatis* e a deleção desses genes mostraram um aumento da susceptibilidade a antibióticos e detergentes (MARTINELLI; PAVELKA, 2016).

1.8.1 AMINOPEPTIDASES

Dentro da diversidade de proteases existente com funções importantes encontram-se as Aminopeptidases, que são enzimas proteolíticas que atuam catalisando ligações peptídicas entre proteínas liberando aminoácidos na porção N-terminal (GONZALES; ROBERT-BAUDOUY, 1996). Estas proteases desempenham papéis importantes na virulência, sobrevivência e principalmente na manutenção de diversos patógenos. As aminopeptidases ainda podem ser subdivididas em três outros subgrupos catalíticos de acordo com a sensibilidade aos inibidores. Assim temos as cisteína aminopeptidases, serina-aminopeptidases e metalo-aminopeptidases. As aminopeptidases de cisteína são especificamente inibidas por iodoacetamida, iodoacetato, N-etilmaleimida e antipaína e trans-epoxi-succinil-L-leucineamido-4-guanidina-butano tendo dois principais subgrupos aminopeptidases de tipo C e piroglutamil aminopeptidases (pirodinonil carboxipeptidases) (JANKIEWICZ; BIELAWSKI, 2002). As serino aminopeptidases possuem sensibilidade para o fluoreto de fenil-metil-sulfonilo. Já as metalo-aminopeptidases, que são enzimas cuja atividade é regulada pela presença de cátions metálicos, são inibidas por EDTA e O-phenantroline; (UMEZAWA, 1982). As metalo-aminopeptidases podem ser subdivididas ainda em grupos, sendo o de maior

representação as PepN, que são aminopeptidases encontradas em *Escherichia coli* e bactérias de ácido-láticas (JONGENEEL; BOUVIER; BAIROCH, 1989).

Presentes em diversos organismos que variam de mamíferos a procariotos, suas funções são bastantes diversificadas. Em mamíferos, por exemplo, as aminopeptidases da família M1 desempenham papéis cruciais fisiológicos como inflamação, angiogênese e clivagem de peptídeos. Já entre variados microrganismos também estão envolvidas em diversas funções celulares como; reciclagem de peptídeos livres, resistência a antibióticos, infecção e estresse (BHOSALE; KADTHUR; NANDI, 2012).

A família M1 de aminopeptidases é representada em *Escherichia coli* conhecida como PepN. Com uma ampla distribuição, sua localização é bastante discutida. Estudos indicam que em mamíferos a PepN está associada à membrana, servindo como receptor de vários vírus (YEAGER et al., 1992). No entanto em procariotos a evidência fisiológica é de que a PepN está localizada na face interna da membrana servindo para o processamento de antibióticos como, por exemplo, a albomicina, que contém quatro ligações peptídicas para possíveis locais de clivagem para peptidase próxima, ou na membrana citoplasmática, permitindo assim a excreção da parte transportadora de ferro e a acumulação de compostos antibioticamente ativos no citoplasma sendo possível que a molécula livre de ferro seja um peptídeo linear que seja clivado sucessivamente a partir da extremidade amino-terminal (BRAUN et al., 1983).

Além de sua localização, algumas propriedades da PepN levaram-na a ser pesquisada, como por exemplo sua regulação e sua síntese. Estudos sugeriram que sua regulação ocorre preferencialmente em três situações. O trabalho desenvolvido por Gharbi e colaboradores demonstrou que a expressão da aminopeptidase é regulada pela limitação de fosfato, anaerobiose e pela natureza da fonte de carbono onde a síntese é aumentada sob a inanição de fosfato em células cultivadas em meio mínimo suplementado com glicose, sendo a atividade de P-Galactosidase realizada em estirpes transportando o operon pepN-lacZ, observando assim um aumento da taxa de síntese de beta-galactosidase confirmando a regulação e expressão da PepN (GHARBI et al., 1985).

Outras características da PepN também foram observadas por (BHOSALE et al., 2013). Estas apresentam um maior *turnover* catalítico de proteínas celulares pela eliminação daquelas proteínas tidas como envelhecidas ou danificadas, promovendo assim uma manutenção mais eficiente em relação a outras peptidases (BHOSALE et al., 2013). Por fim, é uma enzima não essencial, porém sua função se manifesta durante o

estresse, como observado por Chandu e Nandi (2003) que relataram que a clivagem de aminoácidos básicos ou pequenos por PepN aumenta a capacidade de *E.coli* de resistir ao estresse por Salicilato de Sódio (NaSal). Os resultados demonstraram que quando induzidas com NaSal, as cepas mutantes de pepN foram incapazes de crescer quando comparadas as cepas selvagens, demonstrando assim sua importância para bactéria resistir a situações de estresse no qual são submetidas (CHANDU, 2003).

Kumar e Nandi (2007) também observaram um papel fisiológico de pepN em *S. Typhimurium* durante o *downshift* nutricional juntamente com estresse gerado pela alta temperatura. Seus experimentos demonstraram a importância da degradação de proteínas para o fornecimento de aminoácidos para síntese de novas proteínas durante o downshift nutricional. Também foi observado que pepN foi requerida por *S. Typhimurium* para o seu crescimento durante sua nutrição e para o estresse provocado pela alta temperatura mostrando sua relevância ao desempenhar papéis distintos durante o estresse (KUMAR; NANDI, 2007).

Além de ter um papel envolvido no estresse celular, a PepN participa, juntamente com outras peptidases, da degradação de peptídeos gerados durante a degradação de proteínas intracelulares (PERKINS; ROGERS, 1959). Uma atividade de aminopeptidase foi observada em *Salmonella Typhimurium* durante a obtenção de alimento onde, Yen e colaboradores (1980), para confirmar esta hipótese, mediram a taxa de síntese proteica durante a inanição por carbono em estirpes de tipo selvagem (TN843) e de tipo peptidase. Os resultados obtidos sugeriram que ausência simultânea de peptidases N, uma vez que a produção de aminoácidos para produção de uma nova síntese proteica durante a inanição é fortemente reduzida nas cepas deficientes em peptidase, leva a uma diminuição significativa na capacidade da célula de detectar proteínas durante a inanição (YEN; GREEN; MILLER, 1980).

Diversos pontos da atividade de pepN foram mostrados, porém seu papel catalítico durante o estresse e a infecção não foram demonstrados. Quando se trata de infecção não se pode deixar de citar as citocinas que desempenham papéis importantes durante a infecção. Dentre elas, o IFN- γ é uma citocina importante que modula várias respostas do hospedeiro. Com isso Bhosale e colaboradores (2012) propuseram um modelo de infecção em camundongos C57BL / 6 e IFN- γ -/- com finalidade de ver o papel de IFN- γ endógeno na modulação da resposta em diferentes estirpes de *S. Typhimurium*; WT, Δ pepN, Δ pepN/pepN e Δ pepN/E298A. As respostas do hospedeiro às cepas de *S. Typhimurium* expressaram diferentes quantidades de pepN, mostrando

assim sua atividade catalítica e destaca a importância do IFN- γ endógeno na modulação da resposta imune e sobrevivência durante a infecção (BHOSALE; KADTHUR; NANDI, 2012).

A atividade de pepN também pode ser encontrada em *Salmonella Typhimurium*. Para fundamentar essa observação, Patil e colaboradores (2007) iniciaram um estudo com intuito de investigar o papel funcional de PepN durante a infecção sistêmica de camundongos com *S. Typhimurium*. Para avaliar o papel de pepN durante a infecção, camundongos foram infectados com cepas de *S. Typhimurium* mutante de pepN e selvagem, posteriormente foi contado o CFU. Após três dias, as cepas mutantes e selvagens apresentaram um CFU semelhante, porém, com cinco dias, a cepa mutante apresentou um maior CFU comparado com a cepa selvagem, demonstrando assim, que a PepN reduz o crescimento de *S. Typhimurium* durante infecção sistêmica em camundongos (PATIL et al., 2007).

Além de papéis considerados importantes, pesquisas sugerem que enzimas do tipo pepN também desempenham papéis importantes na associação benéfica entre animais e bactérias. A exemplo disso, as cepas de bactérias marinhas bioluminescentes *Vibrio fischeri* (ES114) formam uma associação benéfica com espécies de lulas *Euprymna scolopes* (NYHOLM et al., 2000). Com essas informações Fidopiastis e colaboradores (2012) relataram a localização e a atividade de pepN produzidas por lulas simbióticas. Para testar se pepN estaria envolvida também na colonização de *V. fischeri* a lulas, cepa de *V. fischeri* foi colocada a exposição a lula. Após 12 h de exposição a cepa deficiente de pepN perdeu sua capacidade de colonização em comparação ao tipo selvagem, diferentemente ao observado a 24 horas sugerindo que este efeito foi devido a um atraso no início da colonização. Esse resultado mostra que a interrupção de pepN resulta em atraso nos estágios iniciais da colonização de lulas por *V. fischeri* (FIDOPIASTIS et al., 2012).

A espécie *Streptomyces lividans* 66 é bastante utilizada como hospedeira para produção de proteínas recombinantes. Ao caracterizá-la, Butler e colaboradores (1994) através da sequência de nucleotídeos determinaram uma proteína de 95kDa no qual apresentou homologia para proteínas pepN de outros organismos. Relataram também genes que codificam para uma aminopeptidaseN (pepN) descrevendo PepN como uma meto-exopeptidase mais ativa contra os substratos Arg, Leu e Lys. Possuindo menos atividade, porém significativa, contra os substratos Met, Ala, Ser e Phe. Não hidrolisa os substratos Glu, Asp, Val, Gly ou Pro (BUTLER et al., 1994).

A atividade da peptidase N é citoplasmática e hidrolisa peptídeos pequenos, normalmente é produzido em níveis modestos (10,1% de proteína total) de forma aparentemente constitutiva. Com isso Mc Caman e Gabe (1986) descreveram a sequência de nucleotídeos completa que codifica a peptidase N. A sequência completa do gene pepN foi determinado. O índice deste gene pode direcionar a síntese de peptidase N para um nível de 50% da proteína celular total quando inserido a jusante de um promotor lac em plasmídeo multicópia. A proteína superproduzida é completamente solúvel e enzimaticamente ativa (MCCAMAN; GABE, 1986).

1.8.2 PROTEASES COMO NOVA FORMULAÇÃO PARA VACINAS.

Com o grande avanço tecnológico de vacinas, alguns métodos que venham melhorar a eficácia da atual vacina utilizada para prevenção da tuberculose, a BCG (ANDERSEN, 2001). Este inclui o desenvolvimento de novas vacinas de subunidade proteicas ou vacinas micobacterianas vivas. Para esses tipos de vacina podem ser feitas algumas estratégias, como por exemplo, a atenuação de *Mycobacterium tuberculosis* ou modificação genética da BCG, inserindo ou deletando genes importantes para virulência e imunogenicidade, ou genes que codificam para outras proteínas que não são expressas por micobactérias (ANDERSEN; DOHERTY, 2005).

É sabido que a BCG tem um auto efeito protetor variável em termos de prevenção da tuberculose na idade adulta. Uma grande evolução tem ocorrido para o desenvolvimento de novas alternativas para novas vacinas. Algumas abordagens inovadoras foram tentadas, incluindo o desenvolvimento de vacinas recombinantes e vacinas baseadas em DNA (ORME; MCMURRAY; BELISLE, 2001). A identificação de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* que preferencialmente ativam células T para secretarem IFN- γ por ambas as células TCD4⁺, TCD8⁺ e células Ab são fundamentais para o desenvolvimento de vacinas de subunidades contra a tuberculose (KAUFMANN; MCMICHAEL, 2005).

Recentemente Skeiky e colaboradores (1999) identificaram novos antígenos de Mtb na infecção em humanos e em camundongos C57BL / 6, caracterizados por sua capacidade de desencadear respostas de células T. Destes antígenos encontrados, uma proteína de fusão recombinante foi gerada resultando em um antígeno Mtb72F, uma proteína de fusão recombinante baseada em uma protease de serina putativa Mtb32A (Rv0125 que codifica para PepA) e Mtb39A (Rv1196 que codifica para o PPE18). Os

camundongos foram imunizados em dois sistemas adjuvantes chamados de AS01B e AS02A (Glaxo Smith Kline Biologicals proprietary adjuvants). Nos estudos de imunogenicidade revelaram que a imunização dos camundongos com Mtb72 formulados em AS01B gerou um perfil de resposta imune mais robusta induzindo melhor células TCD4⁺ e TCD8⁺, quando comparada com a formulação em AS02. Apesar dessas diferenças de imunogenicidade, todas as três formas de imunização protegeram os camundongos contra a infecção por TB (SKEIKY et al., 1999). Portanto, o uso de AS01B e AS02A em conjunto com a viabilidade de fabricação de poliproteínas Mtb72F representam grandes desenvolvimentos em direção à realização de uma vacina segura e acessível contra a TB. O Mtb72F formulado em adjuvante AS02A está atualmente em fase I de testes clínicos nos EUA, tornando-se a primeira vacina recombinante de proteína TB a ser testada em seres humanos (BRANDT et al., 2004).

Em estudos anteriores, Tsenova e colaboradores (2006) estabeleceram e caracterizaram um modelo de infecção na Tuberculose Miliar (TBM) em coelhos, que espelha o sistema nervoso central (SNC) humano. Para avaliar a eficácia de novas vacinas candidatas para proteger o hospedeiro contra a infecção e a patologia da TBM, foi utilizada a poli proteína Mtb72F formulada em AS01B (Mtb72F+ AS01B) ou em AS02A (Mtb72F+AS02A). Os resultados obtidos pelos pesquisadores demonstraram que Mtb72F, formulado em um adjuvante AS02A ou AS01B, é tão protetora como BCG tendo assim evidências que esta vacina é uma potencial candidata para testes em países no qual TB é endêmica sugerindo que futuros ensaios clínicos possam ser feitos (TSENOVA et al., 2006).

Uma nova estratégia mais eficaz no desenvolvimento de vacinas é inevitável. Na tuberculose não resta dúvida de que a imunidade pode prevenir a doença, e que a imunidade protetora pode ser induzida pela vacinação. Nos últimos 5 anos, poucos candidatos surgiram para o desenvolvimento de vacinas contra tuberculose. Conhecendo a atividade de proteases e sua capacidade de modulação da resposta imune, esta pode se tornar um potente alvo para o surgimento de novas vacinas tendo maiores alternativas para prevenção da doença (VOSS et al., 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma doença infecto contagiosa responsável por inúmeros casos novos por tuberculose e por uma alta taxa de mortalidade. Nas últimas décadas, tem se visto cada vez mais o aumento de cepas bacterianas resistentes a fármacos e suas falhas no tratamento, tornando-se cada vez mais necessário estudos para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos de grande interesse para minimizar a disseminação da tuberculose.

O *M. tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose, é um patógeno que de acordo com a co-evolução vem se adaptando através de mecanismos de virulência e estratégias de evasão do Sistema Imune do hospedeiro, estabelecendo assim o processo infeccioso. Sendo uma dessas estratégias a produção de proteases, que são enzimas envolvidas em diversos papéis fisiológicos de patógenos, permitindo assim sua sobrevivência no hospedeiro. Conhecendo e entendendo essa relação patógeno-hospedeiro é o caminho para desequilibrar essa equação em favor do paciente.

Com base em pesquisas e buscas em bancos de dados o genoma de *M. tuberculosis* possui aproximadamente 4.411.529 pares de bases e 3.924 regiões de leituras abertas (*open reading frames* ORFS)(COLE et al., 1998). Em seu genoma mais de 100 genes em potencial codificam proteases ou peptídeos, porém poucas foram estudadas (RIBEIRO-GUIMARÃES; PESSOLANI, 2007). Com base nesse levantamento genômico, selecionamos genes que codificam para proteases possivelmente secretadas e que ainda não foram estudadas e caracterizadas como Rv2672, Rv0125 e Rv2467, estas possuem um futuro promissor para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos por estarem envolvidas em processos celulares como secreção e *turnover* e nos mecanismos de virulência de patógenos como *M. tuberculosis*.

O gene de interesse do presente estudo foi o Rv2467, que codifica para uma aminopeptidase (pepN), uma protease pertencente à família de metaloproteases M1, que possuem uma alta especificidade por substratos como Lisina e Leucina dentre outros. Estudos demonstraram que pepN tem uma importância para espécies bacterianas como *Escherichia coli*, *Streptomyces* e *Lactobacilos* atuando na reciclagem de aminoácidos, crescimento, nutrição e resistência ao estresse no qual são submetidos pela resposta do hospedeiro, mostrando assim ser uma protease em potencial para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos eficazes para um melhor controle da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Clonar e produzir a proteína recombinante codificada pelo gene Rv2467 de *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2 Objetivos específicos

Amplificar o gene alvo Rv2467 presente em *Mycobacterium tuberculosis*

Clonar e expressar o produto para obter a proteína recombinante

Purificar a proteína recombinante em condições não desnaturantes.

4- MÉTODOS

4.1 Amplificação do DNA correspondente ao gene Rv2467

Para amplificação da região correspondente ao gene Rv2467, o DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Rv) havia sido previamente extraído e, a partir de pesquisas no banco de dados do GenBank, oligonucleotídeos iniciadores específicos às extremidades do gene Rv2467 foram desenhados e sintetizados com as seguintes sequências: oligonucleotídeo “forward” 5’ GGA CCA **TAT GGC** CCT TCC AAA CCT CAC G -3’ e o oligonucleotídeo “reverse” 5’ - **AAG CTT** CTA GCC GTC AGC GTC GAA GTT GCG- 3’. Os oligonucleotídeos “forward” e “reverse” contêm sítios de restrição (em negrito) das enzimas *Nde* I e *Hind* III, respectivamente.

Os oligonucleotídeos juntamente com DNA foram usados para amplificação do gene Rv2467 pela técnica de PCR. A reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 100 ng de DNA genômico, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 200 ηM de cada oligonucleotídeo, 1U de Platinum® Taq DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen®) e tampão de reação diluído em água milli-Q q.s.p 50 µL. O programa da reação teve as seguintes etapas e temperaturas: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55°C por 30s, extensão a 72°C por 1:30 min, a reação foi estendida por mais 10 min a 72°C.

Para análise do produto posteriormente à PCR, 4 µL do sistema mais 1 µL de tampão de amostra 5X concentrado foi adicionado a um tubo tipo *ependorf* de 0,6 mL. Em seguida, o volume contido no tubo (5 µL) foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Para visualização do tamanho do produto foi aplicado 10 µL do marcador molecular comercial com fragmentos múltiplos de 1kb. Na corrida do gel, a passagem de corrente elétrica foi programada na fonte de eletroforese a 80 V; 100 mA por uma hora. Após o término da corrida, o gel foi levado para o transiluminador UV para visualização de possíveis bandas e confirmação da amplificação da região do DNA desejado.

4.2 Purificação do Produto de PCR

Após confirmação da amplificação do PCR, o sistema foi passado por um processo de purificação utilizando um Kit de purificação da GE Healthcare Life Sciences. Primeiramente 500 µL do tampão “Capture Buffer type 2” no tubo contendo 50 µL da reação de PCR, em seguida foram homogeneizados, após esse procedimento todo o volume foi transferido para mini colunas com a finalidade de isolar o DNA. Posteriormente a mini coluna foi centrifugada por um minuto a 13.000 x g e adicionou-se 500 µL do “Wash Buffer type 1” e aguardou-se por 2 minutos. Passado o período de incubação, centrifugou-se a 13.000 x g por 1 minuto e este processo foi repetido. Em seguida a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e foi adicionado 50 µL de H₂O mili Q no centro da coluna e esta foi centrifugada por 1 minuto a 13.000 x g. A confirmação do produto de PCR purificado foi realizada em um gel de agarose 1,5% como descrito no item anterior.

4.3 Clonagem do produto amplificado purificado.

O produto amplificado foi clonado no vetor de clonagem pGem-T easy (Promega) através de um sistema de ligação composto por 3 µL de água MiliQ; 4 µL do produto amplificado; 1 µL do plasmídeo pGem-T easy (Promega, Figura 2); 1 µL do tampão da enzima T-4 DNA ligase mais 1µL da enzima T-4 DNA ligase. Ao término da montagem da reação ao tubo tipo eppendorf foi levado ao termociclador permanecendo durante a noite a 16°C. Dois microlitros do sistema de ligação foram utilizados para transformar linhagem de *Escherichia coli* XL-10 Gold competente por eletroporação. O sistema de transformação foi plaqueado em meio Luria Bertani ágar (LB ágar) composto por Triptona, Extrato de Levedura e Cloreto de Sódio contendo como marca de seleção ampicilina (100 µg/mL) e as placas foram incubadas durante a noite a 37°C. As colônias crescidas em placas foram transferidas e incubadas em tubos contendo LB caldo com ampicilina (100 µg/mL) para extração do DNA plasmidial. A extração do DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen) e o material extraído foi digerido com as enzimas *Nde* I e *Hind* III de acordo com as normas estabelecidas pelo fabricante para visualização da liberação do inserto. As amostras digeridas foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL) para visualização da presença do inserto. O plasmídeo recombinante

contendo o inserto foi usado para excisão do inserto do gel, eluição e purificação usando os respectivos kits (ilustra GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification kit, GE Healthcare).

Após purificação, o gene foi ligado ao vetor de expressão pET28a (Novagen, Figura 3) digerido com as enzimas de restrição *Nde* I e *Hind* III utilizando um sistema de ligação composto por 5 µL do produto purificado (Rv2467); 2µL do plasmídeo pET28a (Novagen); 2 µL do tampão da enzima T-4 DNA ligase e 1µL da enzima T-4 DNA ligase (1U/ µL) o qual foi incubado durante a noite a 16°C. O sistema de ligação foi usado para transformar células competentes de *E. coli* linhagem XL-10 Gold, as quais foram plaqueadas em LB contendo canamicina (20 µg/mL). Colônias da transformação tiveram seus plasmídeos purificados para verificar a presença do vetor pET28a recombinante através da extração de DNAs plasmidiais e verificação do inserto com digestão com as enzimas recombinantes citadas. O plasmídeo pET28a recombinante (pET28a/Rv2467) contendo o gene de interesse foi então transformado em *E. coli* BL-21(DE3) pLysS, as quais são próprias para expressão de genes sob controle do promotor T7 do sistema pET. O sistema de transformação foi plaqueado em meio LB ágar contendo cloranfenicol (100 µg/mL) para manter o plasmídeo pLysS e canamicina (20 µg/mL), e ao final estas foram incubadas a 37°C durante a noite.

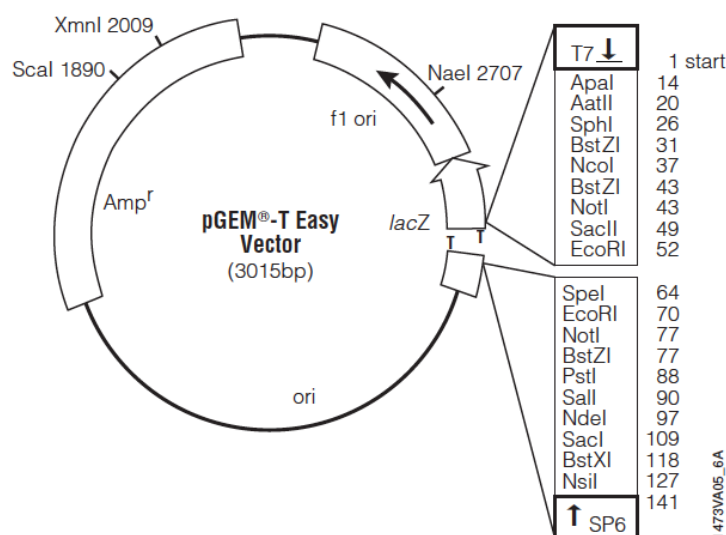


Figura 2 - Mapa do vetor de clonagem. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T-easy. Acessado em: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t easy-vector-systems-protocol.pdf>

realizada uma pequena indução onde as culturas crescidas foram transferidas a um volume de 50 μ L em 5 mL de meio LB caldo. Esta foi mantida sob agitação até chegar a uma OD de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm quando então foi induzida com IPTG (0,4 mM final) durante 4 horas. Após incubação as células ficaram mantidas no gelo e a cultura foi centrifugada a 6.000 x g, 4°C por 10 min. O sedimento obtido foi ressuspenso com 100 μ L de solução de Phosphate-buffered saline (PBS) em seguida, as células foram submetidas a 3 ciclos de sonicação, no gelo, com um processador ultrassônico Vibra-Cell VC130 (Sonics®). Os ciclos foram de duração total de 1 min, segmentados em pulsos de 5 s, com potência de 10 W. Um intervalo de 1 min foi respeitado entre cada ciclo aplicado nas amostras, depois as células foram centrifugadas numa rotação de 16.000 x g por 15 min a 4°C com finalidade de separar as frações solúvel e insolúvel que foram analisadas em gel de SDS-PAGE 12%.

Para prosseguir para etapa de purificação, um volume maior de cultura bacteriana foi induzido para ter um rendimento maior da proteína expressa. Para isso foi realizado um inóculo da bactéria em 5 mL de meio LB caldo com os antibióticos canamicina e cloranfenicol, que permaneceu sobre agitação durante a noite. Em seguida foi transferido 3 mL do inóculo em 75 mL de meio LB caldo, o frasco foi mantido sobre agitação a 37°C até chegar na OD de 0,6 no comprimento de onda de 600nm. Posteriormente a cultura foi induzida com IPTG (0,4 mM final) por 4 horas, em seguida as células foram mantidas no gelo e todo o meio foi centrifugado 6.000 x g, 4 °C por 10 min. O sedimento formado foi ressuspenso com 250 μ L de solução de PBS, após este processo foi realizada a lise celular por sonicação seguindo como descrito acima. Logo em seguida estas foram centrifugadas a 16.000 x g por 15 min a 4°C com finalidade de separar as frações solúvel e insolúvel que foram analisadas em gel de SDS-PAGE 12%.

4.5 Solubilização da proteína com sarcosil 2%

Uma alíquota de 50 μ L da cultura de *E. coli* BL21-pET28a/Rv2467 foi inoculada em 4 mL de LB caldo contendo as marcas de seleção canamicina e cloranfenicol, permanecendo sob agitação a 37°C durante a noite como descrito anteriormente. Em seguida o tubo tipo *ependorf* contendo a amostra foi adicionado o sarcosil (10%), sendo adicionado 62,5 μ L de sarcosil ao volume final contido no tubo, ficando na concentração de 2%, seguidamente o tubo tipo *ependorf* permaneceu no gelo por duas horas. Após a incubação por duas horas no gelo, a amostra foi centrifugada a 14.000 x g por 30 minutos

a 4°C, em seguida o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o sedimento foi ressuspenso com 250 µL de solução PBS para posterior análise em gel SDS-PAGE 12%.

Para prosseguir com a purificação foi realizado uma indução em um volume maior. Inicialmente foi feito um inóculo da bactéria em 5 mL de meio LB caldo com os antibióticos canamicina e cloranfenicol. Este permaneceu sob agitação durante a noite, em seguida foi transferido 3 mL do inóculo em 75 mL de meio LB caldo. O frasco foi mantido sob agitação a 37°C até chegar a OD equivalente a 0,6 no comprimento de onda 600nm. Posteriormente o clone foi induzido com IPTG (0,4 mM) por 4 horas. Em seguida as células foram mantidas no gelo, e todo o meio foi centrifugado 6.000 x g, 4 °C por 10 min. O sedimento formado foi armazenado no freezer -20°C até o momento da purificação.

4.6 Purificação da proteína recombinante em condição não desnaturante.

A purificação da proteína recombinante em condições não desnaturantes foi feita com o kit de purificação Ni-NTA Fast Start (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Uma cultura de 250 mL de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo recombinante previamente induzido com IPTG foi centrifugada e armazenada no freezer -20°C. O sedimento foi ressuspenso em 7,5 mL de tampão de lise “Native Lysis buffer pH 8,0” suplementado com lisozima 1mg/mL e benzonase 25U/µL. Em seguida permaneceu incubado por 30 min no gelo, após incubação no gelo foi adicionado sarcosil para concentração final de 2%, as células foram centrifugadas a 16.000 x g por 30 min a 4°C e a porção solúvel foi aplicada a uma coluna de níquel com afinidade pela histidina. Após aplicação, a coluna foi lavada por duas vezes com 4 mL do tampão de lavagem Wash Buffer. Posteriormente a proteína recombinante foi eluída da coluna por duas vezes utilizando 1 mL do tampão de eluição. Todas as frações de cada etapa foram analisadas em gel de SDS-PAGE 12%.

4.7 Purificação da proteína recombinante em condições desnaturantes.

A purificação da proteína de forma desnaturante foi feita também com o kit de purificação Ni-NTA Fast Start (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Para tanto, células de *E. coli* a partir de volume de 250 mL de cultura previamente induzida por

IPTG foram obtidas por centrifugação e armazenado no freezer -20°C. Em seguida, para a lise da célula, o sedimento foi ressuspenso com 10 mL de tampão desnaturante ajustando o pH da solução para 8,0 com solução de NaOH concentrado e a suspensão foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Após incubação, as células foram centrifugadas a 14.000 x g por 40 minutos a 15°C. A porção solúvel foi aplicada a uma coluna de níquel com afinidade pela histidina (His Bind Purification Kit®, Quiagen®). Após aplicação, a coluna foi lavada por duas vezes com 4 mL do tampão de lavagem preparado através do tampão desnaturante, ajustando o pH da solução para 6,3 utilizando NaOH concentrado. Em seguida, a proteína recombinante foi eluída da coluna por duas vezes com 1mL do tampão de eluição que também foi preparado a partir do tampão desnaturante, ajustando o pH para 4,5 utilizando HCL concentrado. Todas as frações de cada etapa de eluição foi analisada em gel de SDS-PAGE 12%.

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Para analisar a separação das proteínas do extrato total, monitorou o padrão de migração da proteína recombinante purificada bem como estimar sua massa molecular, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante poliacrilamida 12%. O tampão de amostra utilizado foi composto por 0,1% de SDS e 50 µM de β-mercaptoetanol; as amostras foram aplicadas no gel com fervura prévia. Após eletroforese, os géis foram corados com azul de Coomassie para a visualização das bandas e estimativa da massa molecular da proteína utilizando-se de marcadores comerciais como referência (BenchMark Protein Ladder).

4.9 Produção de anticorpos policlonal

A produção de anticorpos foi feita utilizando um camundongo isogênico da linhagem BALB/c atendendo estritamente as normas estabelecidas e aprovadas pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás. A banda correspondente a proteína recombinante foi cortada do gel de SDS-PAGE 12% e juntamente com o gel foi macerada para inoculação em camundongos. A proteína recombinante purificada foi utilizada para a imunização dos camundongos. A própria acrilamida, por possuir fortes propriedades inflamatórias foi utilizada como adjuvante. Foram feitas 3 imunizações via subcutânea com intervalo de 15 dias. O sangue do animal

foi coletado 15 dias após a última imunização, o soro foi separado e estocado a -20°C. Os anticorpos obtidos foram caracterizados por *Western blotting* e posteriormente utilizados para estudos de citolocalização e detecção das enzimas nativas.

4.10 Western Blotting

A amostra contendo a proteína recombinante (Rv2467) expressa foi preparada a partir de bactérias cultivadas em meio LB caldo. A amostra utilizada no experimento foi uma amostra purificada sob condições não desnaturantes em gel de SDS-PAGE 12%. Após transferência do gel para membrana, esta foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado, sem gorduras dissolvido em PBS adicionado na membrana colocada dentro de um saquinho permanecendo sobre agitação durante a noite a 4°C. Em seguida, a solução de bloqueio foi desprezada e a membrana então foi incubada por duas horas à 37°C com anticorpo anti-histidina liofilizado. O anticorpo anti-histidina foi ressuspenso com 15µL de água resultando em uma concentração final de 0,2 mg/mL, sendo posteriormente diluído 1:1000 para atingir a concentração de uso. As membranas foram lavadas com PBS e então incubadas por uma hora a temperatura de 37°C sob agitação com anticorpo secundário Biotin-XX (Molecular Probe), diluído em 15 mL de tampão PBS 2% de leite desnatado. A membrana foi novamente lavada com PBS e então foi incubada por uma hora a temperatura ambiente sob agitação com 3µL de Avidina-Peroxidase (Sigma-Aldrich) em 15 mL de tampão PBS 2% com leite desnatado. A membrana foi lavada e em seguida foi revelada ao abrigo da luz com tampão de revelação contendo diaminobenzidina (DAB); PBS e H₂O₂. A reação foi monitorada por 10 minutos para detecção das bandas. O complexo antígeno-anticorpo foi detectado via anti-histidina.

Para caracterização do anticorpo policlonal produzido pelo soro dos camundongos imunizados foi realizado um outro Western blotting do mesmo modo descrito acima porém ao invés de usar anticorpo anti-histidina, foi usado o anticorpo policlonal produzido conforme descrito acima. Foi realizado uma adsorção utilizando 30 µL do soro em 300 µL de PBS, adicionando 2 µL de uma alíquota de *E.coli* BL21 retirada do freezer -80°C permanecendo no banho Maria à 37°C por uma hora. Em seguida a amostra foi centrifugada e todo sobrenadante foi diluído em 10 ml de tampão PBS 2% com leite desnatado.

5 RESULTADOS

5.1 Análises in silico (Predições) proteína Rv2467

- **Árvore de Similaridade**

A árvore de similaridade foi construída através da sequência de aminoácidos da proteína Rv2467 dado pelo banco de dados “Tuberculist”. Através da sequência observamos a similaridade da proteína em estudo com outras proteínas, no qual, realizamos o alinhamento no programa Clustal IX 2 com alguns microrganismos como por exemplo espécies do próprio gênero *Mycobacterium*, espécies de *Streptomyces*, *Lactobacilos*, *Escherichia coli*, Eucarioto e *Homosapiens*. Após o alinhamento o programa gera um arquivo no formato DND que através deste arquivo é possível construir a árvore de similaridade no programa FigTree v.1.4.3.exe.

Como podemos observar na figura 4, há uma grande similaridade da proteína Rv2467 com as proteínas das espécies *Mycobacterium Bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*, enquanto proteínas de outras espécies bacterianas pertencentes ao mesmo gênero são mais distintas, como por exemplo *M. abcessus*.

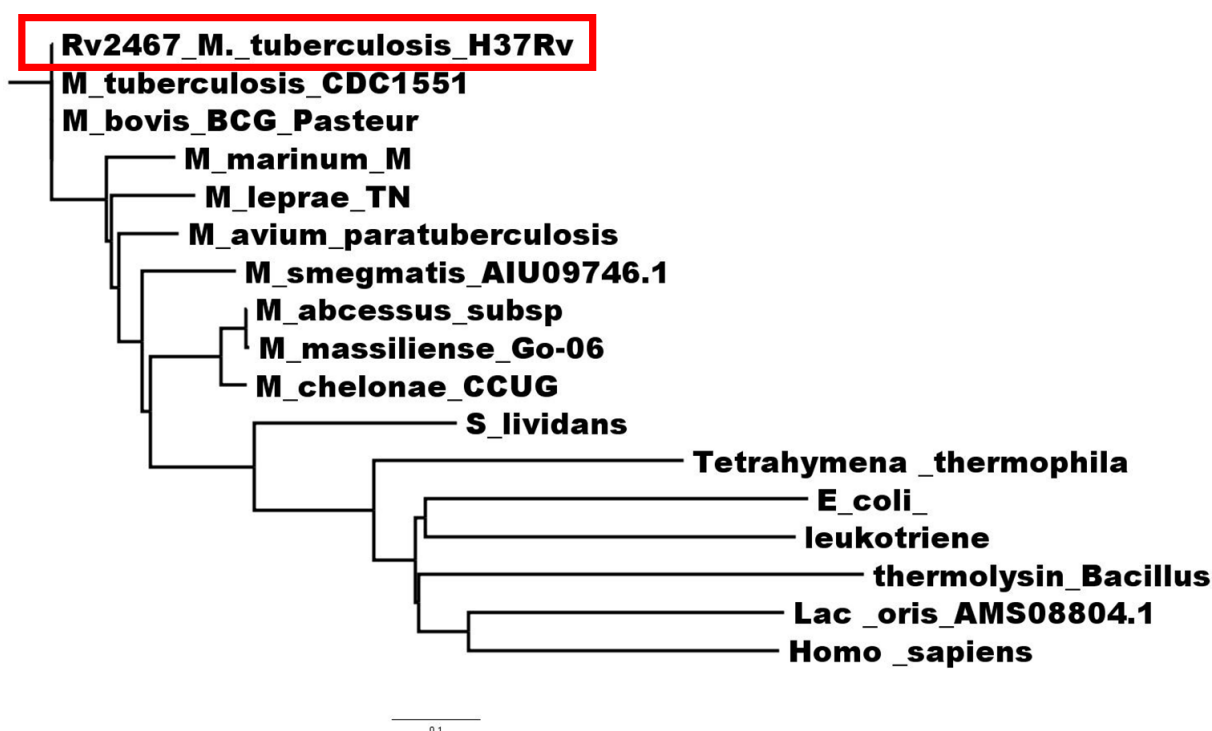


Figura 4- Arvore de similaridade. A partir da sequência de aminoácidos da proteína Rv2467 foi realizado uma busca de sequencias similares realizando o alinhamento no programa Clustal IX 2 e posteriormente foi construída a arvore de similaridade no programa FigTree v.1.4.3.exe.

- **Estrutura molecular**

A proteína Rv2467 é uma aminopeptidase (PepN) com ampla especificidade de substrato para vários peptídeos (pode preferencialmente clivar leucina, arginina e lisina em substratos contendo ligações peptídicas) presentes em *Mycobacterium tuberculosis*. No entanto, sua estrutura molecular ainda não está bem definida em bancos de dados, o que nos levou a procurar por estruturas similares a ela. Ao colocar a sequência de aminoácidos no programa Phyre2 server, este nos deu uma predição da estrutura molecular da proteína Rv2467 (Figura 5A) bem como estruturas homólogas (Figura 5B).

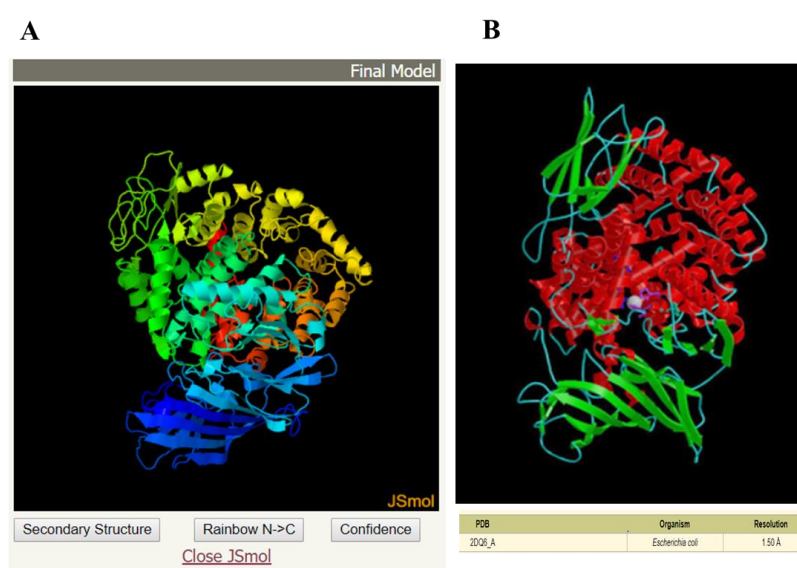


Figura 5 - Predição da estrutura molecular Rv2467 **A** - Predição da estrutura molecular da proteína recombinante RV2467 analisada pelo programa Phyre2 server. **B** - Estrutura homóloga de Leukotrieno hydrolase/aminopeptidase (LTA4H)

Ao analisar estruturas homólogas da proteína Rv2467 observamos que a estrutura de Leukotrieno (LT) A4 hydrolase/aminopeptidase (LTA4H) pertencente à família M1 no qual a proteína Rv2467 também pertence mesma família, seria a mais similar estruturalmente a ela (Figura 5B). Esta estrutura é composta por três domínios; domínio N-terminal, domínio catalítico e o domínio C-terminal.

O domínio N-terminal é composto por folhas- β compostas por sete filamentos e duas folhas β menores que se dobras em lados opostos da mesma face da folha de sete filamentos, de modo que um tipo de envelope é formado, com uma grande concavidade, superfície exposta ao solvente. Já o domínio C-terminal é composto por duas camadas de

hélices α paralelas, cinco na camada interna e quatro na externa, dispostas de maneira antiparalela, com rotações perpendiculares contendo segmentos helicoidais curtos no topo. As hélices se assemelham a repetições de regiões de motivo HEAT que são pares de α hélices antiparalelas que geralmente são maiores e criam estruturas helicoidais adequadas para interações proteína-proteína.

O domínio catalítico é similar em estrutura à protease bacteriana termolisina produzida por “*Bacillus thermoproteolyticus*”. Sua identidade de sequência compartilhada está confinada ao motivo de ligação de zinco (HEXXH-X18-E). Assim como a termolisina, este domínio consiste em dois lobos, um α -helicoidal e um misto α / β . Como este domínio contém apenas 245 aminoácidos, alguns truncamentos são evidentes em relação à termolisina (que contém 314 resíduos). O local de ligação metálica Zn^{2+} está compreendido entre os dois lóbulos, e o metal está coordenado pelos aminoácidos His 295, His 299 e um oxigênio carboxílico de Glu 318. Os resíduos Glu 296 e Tyr 383 estão implicados na atividade de clivagem do peptídeo e estão localizados perto do Zn^{2+} (THUNNISSEN; NORDLUND; HAEGGSTRÖM, 2001).

- **Motivos consensos**

A proteína Rv 2467 possui alguns motivos semelhantes com de outras bactérias. Entre eles se encontram o tipo catalítico descrito que a classifica como uma metaloproteases. Segundo as descrições de Rawlings e Barrett (1993), as aminopeptidases foram classificadas como pertencentes à família M1, uma enzima monomérica possuindo habilidades catalíticas de amino e endopeptidases. Os membros pertencentes a essa família possuem motivos que são bastantes conservados e estão presentes em alguns microrganismos. Dentre os importantes motivos conservados se encontra GXXEN (Figura 6), um motivo conservado de exopeptidase e o motivo HEXXH (Figura 7) um motivo de ligação metálica, sendo composto por quatro domínios, N-terminal, catalítico folha β e C-terminal.

Para observar estes motivos consensos, as sequencias de proteínas das espécies consideradas similares a proteína codificada por Rv2467, foram agrupadas em um bloco de notas que ao terminar este arquivo foi convertido para um formato fasta e em seguida analisado no programa <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>.

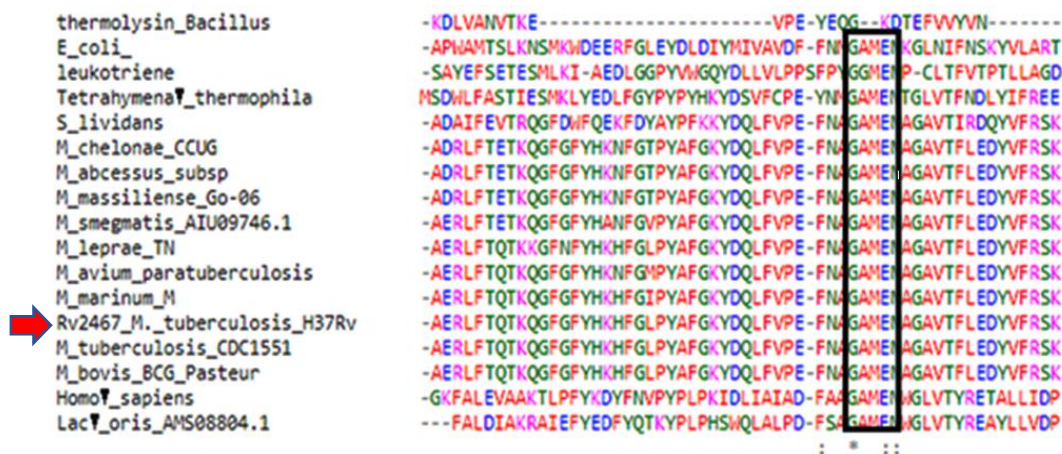


Figura 6 - Motivo consenso GXEN - Alinhamento da proteína Rv2467 com as proteases de outras espécies bacterianas pelo clustal. A chave em preto representa um motivo GXEM, um motivo conservado de exopeptidase. A seta em vermelho aponta a proteína Rv2467

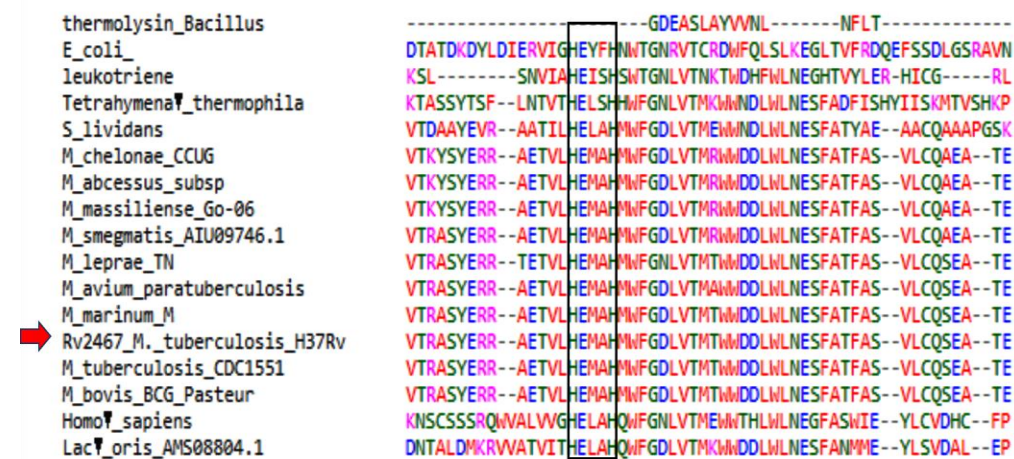


Figura 7 - Motivo HEXXH. Motivo de ligação metálica, sendo composto por quatro domínios, N-terminal, catalítico, folha β e C-terminal. A chave em preto representa a região onde o motivo se encontra. A seta em vermelho aponta a proteína Rv2467

• Peptídeo Sinal.

A secreção de proteínas se dá por uma sequência de 15-40 aminoácidos chamadas de peptídeo sinal que vão atuar marcando as proteínas que serão exportadas para determinados locais, como por exemplo, o ambiente extracelular. Estas proteínas vão ser reconhecidas por meio da sequência sinal, o qual, após a exportação, é removido da proteína por meio da ação de proteases. Devido á sua importância para secreção de proteínas, novos métodos computacionais foram desenvolvidos para prever péptidos de sinal e determinar os locais de clivagem do sinal (ZHANG; HENZEL, 2009).

Com finalidade de predizer se a sequência de aminoácidos da proteína Rv2467, contém uma sequência de peptídeo sinal foi utilizado o programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>). Na figura 8 pode-se ver que na sequência submetida ao programa SignalP não há nenhuma sequência com potencial de peptídeo sinal de secreção.

Os seguintes resultados são mostrados: O escore S médio do possível péptido sinal (da posição 1 à posição imediatamente anterior à pontuação Y máxima).. Pontuação Y. Esta é a pontuação que é usada para discriminar péptidos de sinal de péptidos não-sinal. Para as proteínas não secretoras, todas as pontuações representadas na saída SignalP devem, idealmente, ser muito baixas (perto do valor alvo negativo de 0,1). O resultado obtido pelo programa através da sequência de aminoácidos da proteína desejada pode ser observado que esta não possui peptídeo sinal (Figura 8).

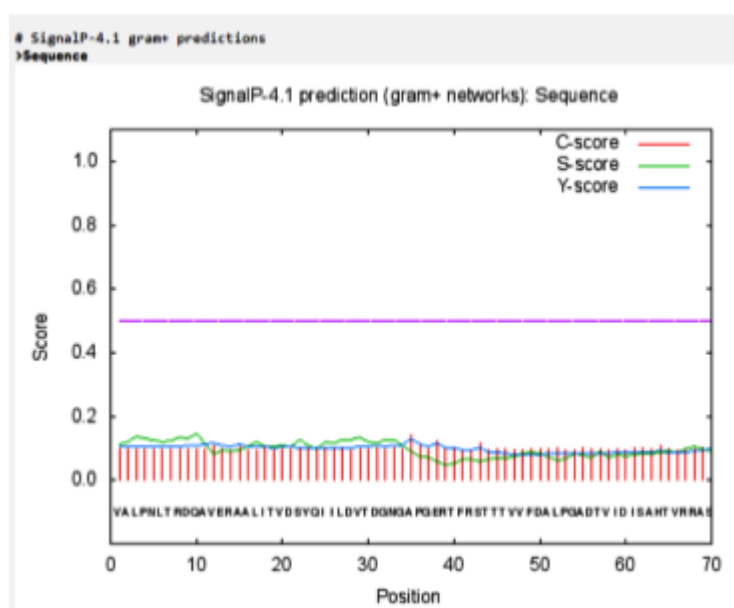


Figura 8 - Predição de peptídeo sinal. Após a submissão da proteína recombinante gerou-se o gráfico onde: **C-score** (score do sítio de clivagem bruta), **S-score** (score do peptídeo de sinal), **Y-score** (score combinado da clivagem).

- **Análise de possíveis sítios de glicosilação da proteína Rv2467**

O processo de glicosilação é importante por influenciar as propriedades biológicas como atividade, solubilidade, dobragem, conformação, estabilidade de diferentes proteínas celulares, modulando a estrutura e função de proteínas (CHAUHAN et al., 2012). É sabido que a glicosilação pode ocorrer em duas formas. A primeira delas é o

processo de glicosilação N-ligada, que ocorre quando uma molécula de açúcar é adicionado a porção amino-terminal da cadeia lateral de uma asparagina. Uma outra forma seria a O-ligada, que ocorre quando um açúcar é adicionado ao grupo carboxílico de aminoácidos como serina e treonina.

Com o intuito de predizer se a proteína Rv2467 possui possíveis sítios N-ligados e O- ligados utilizamos a plataforma criada por Chauhan e colaboradores (2012) foi construída através da extração glicoproteínas anteriormente caracterizadas experimentalmente, constituindo de espécies como; *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Proteobacteria*, *Actinobacterias* e *Firmicutes*. Tendo como resultado um valor máximo de 0,48 a 0,51 com valor de precisão de 82,03% e 86,39% para predição de N-glicosilado (Figura 9A). Para os possíveis sítios O-glicosilados também pode ser previsto com uma precisão razoavelmente alta de 70,24% e 89,69% com valores máximos de MCC correspondentes de 0,19 a 0,50 (Figura 9B).

A				B			
Position	Residue	Score	Prediction	Position	Residue	Score	Prediction
5	NLT	0.18803477	Potential Glycosylated	7	I	-0.16951934	Non-glycosylated
33	NGA	0.16079807	Potential Glycosylated	19	I	0.13976141	Potential Glycosylated
72	NDQ	-0.10520544	Non-glycosylated	22	S	0.20857623	Potential Glycosylated
96	NVV	-0.42192602	Non-glycosylated	30	I	-0.895646	Non-glycosylated
108	NTG	0.025204008	Potential Glycosylated	40	I	-0.1566785	Non-glycosylated
166	NGA	-0.20750085	Non-glycosylated	43	S	-0.39560896	Non-glycosylated
174	NGV	-0.045536213	Non-glycosylated	44	I	0.45701216	Potential Glycosylated
263	NAG	-0.47888597	Non-glycosylated	45	I	0.40799572	Potential Glycosylated
269	NAG	0.070616807	Potential Glycosylated	46	I	0.18760714	Potential Glycosylated
321	NES	0.22728928	Potential Glycosylated	57	I	-0.22350251	Non-glycosylated
379	NFD	0.27422735	Potential Glycosylated	62	S	-0.10808061	Non-glycosylated
419	NAS	0.15553107	Potential Glycosylated	65	I	-0.96619659	Non-glycosylated
439	NWG	-0.18922514	Non-glycosylated	70	S	-0.13519878	Non-glycosylated
451	NTL	0.037780929	Potential Glycosylated	79	S	-0.74492281	Non-glycosylated
519	NVP	-0.51208173	Non-glycosylated	107	S	-0.32590875	Non-glycosylated
535	NDD	-0.13682781	Non-glycosylated	109	I	-0.53178093	Non-glycosylated
656	NSL	0.28929816	Potential Glycosylated	124	I	-0.70678042	Non-glycosylated
761	NAT	0.30642405	Potential Glycosylated	128	S	-1.2739423	Non-glycosylated
856	NFD	-0.64630389	Non-glycosylated	132	I	0.29422695	Potential Glycosylated
*****				150	I	-1.0085217	Non-glycosylated
				156	I	-0.50694141	Non-glycosylated

Figura 9- Predição de sítios de glicosilação. A- Possíveis sítios de glicosilação para glicosilação N-ligada.B- Possíveis sítios de glicosilação O-ligada..

- **Pontes de dissulfeto**

As pontes de dissulfeto desempenham um papel importante na estabilização do processo de dobragem das proteínas. Além disso, o conhecimento sobre o estado de ligação de dissulfeto de cisteínas pode ajudar o processo de determinação da estrutura experimental e podem ser úteis em outras tarefas genicas de anotação (CERONI et al., 2006). Sabendo-se da influência das pontes de dissulfeto na conformação da proteína buscou-se a predição de pontes de cisteína na proteína desejada utilizando o DISULFIND - Cysteines Disulfide Bonding State and Connectivity.

A análise *in silico* de possíveis pontes de dissulfeto na sequência da proteína Rv2467 demonstraram que a proteína desejada não possui possíveis pontes de dissulfeto, pois resultados iguais a 1 representa uma ponte de dissulfeto e 0 significa pontes ausentes (Figura 10).

Results for L8wJVA

```

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....
AA  VALPNLTRDQAVRAALITVDSYQIILDVTDGNGAPGERTFRSTTVVFDALPGADTVIDISANTVRRASLNDQDLDS
DB_state
DB_conf

80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....
AA  GYDEAAGIPLRGLAQRNVVVVDADCHYSNTGEGLRHFRVDPVDGETYLYSQFETADAKRMFACFDQDPLKATFDVVRTAP
DB_state      0      0
DB_conf      8      9

160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....
AA  AHNKVISNGAPLAAANGVHTFATTPRMSTYLVALIAGPYAANTDTYIDHGEIPLGIYCRASLAEYMDAERLFTQTKQG
DB_state      0
DB_conf      9

240.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....
AA  FGFYHKHGLPYAFGKYDQLFVPEFNAGAMENAGAVTFLEDYVFRSKVTRASYERRAETVLHEMAHMMFGDLVTHTWD
DB_state
DB_conf

320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....
AA  DLWLNESFATFASVLCQSEATEFTEAWTTFATVEKSWAYRQQLPSTHPIAADIPDLAAVEVNFQDITYAKGASVLKQL
DB_state      0
DB_conf      9

400.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....
AA  VAYVGLERFLAGLRDYFRTHAFGNASFDLLAALEKASGRDLSNWGEQNLKTTGLNLRPDFEVDAGRFRFAVTQSG
DB_state
DB_conf

480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....
AA  AAPGAGETRVHRLAVGIYDDGSKSSGKLVRVHREELDVSGPITNVPALVGVSRGKLLILVNDDLTYSCLRSLDERSLQT
DB_state      0
DB_conf      9

560.....570.....580.....590.....600.....610.....620.....630.....
AA  ALDRIADIAEPLRPTLVWSAANEMTREAE LRARDFVSLVSGGVHAETEVGVAQRLLQATLGCYAEFGNARERGNPQ
DB_state      0
DB_conf      9

640.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....
AA  FADRLLELAREAEPSDHLAYINSLCSSVLSPRHVQTLGALLEGEPAACGLAGLAVDTDLRWIRIVTALATAGADADG
DB_state      0      0
DB_conf      8      8

720.....730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....
AA  PETPRIDAEVQRDPTAAGKRHAQAARAARPQFVVKDEAFTTVVEDDTLANATGRAMIAGIAAPGQGE LKPFARRYFQA
DB_state
DB_conf

800.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....
AA  IPGVNARRSSEVAQSVMIGLYPHWDISEQGITAEEFLSDPEVPPALRRLVLEGQAQVQRSLRARNFDADG
DB_state
DB_conf

```

- Please cite:
 - A. Ceroni, A. Passerini, A. Vullo and P. Frasconi. *DISULFIND: a Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server*, Nucleic Acids Research, 34(Web Server issue):W177-W181, 2006.
- Contact information:
 - Questions and comments are very appreciated. Please, send email to: cystein@dsi.unifi.it
- Abbreviations used:
 - AA amino acid sequence
 - DB_state predicted disulfide bonding state (1=disulfide bonded, 0=not disulfide bonded)

Figura 10- Predição de possíveis pontes de dissulfeto. A primeira linha abaixo da sequência de aminoácido apresenta os resíduos de cisteína, com (1) ou sem (0) potencial de haver pontes de dissulfeto. Abaixo destes valores ainda aparece a confiança (0 baixo até 9, alta) desta informação estar certa.

• Sequenciamento

Após análise do sequenciamento do primer 5'-3' verificamos que a construção feita para clonagem e expressão da proteína desejada Rv2467 foi realizada de forma correta. Em particular pode-se ver no eletroferograma (Figura 11) a junção entre a região

aminoterminal do gene Rv2467 e o plasmídeo pET28 em que pode-se notar a sequência correspondente ao local de ação da enzima de restrição Nde I e logo em seguida podemos observar a região do oligonucleotídeo iniciador forward 5'-3' seguido da parte inicial do gene Rv2467 de *Mycobacterium tuberculosis*.

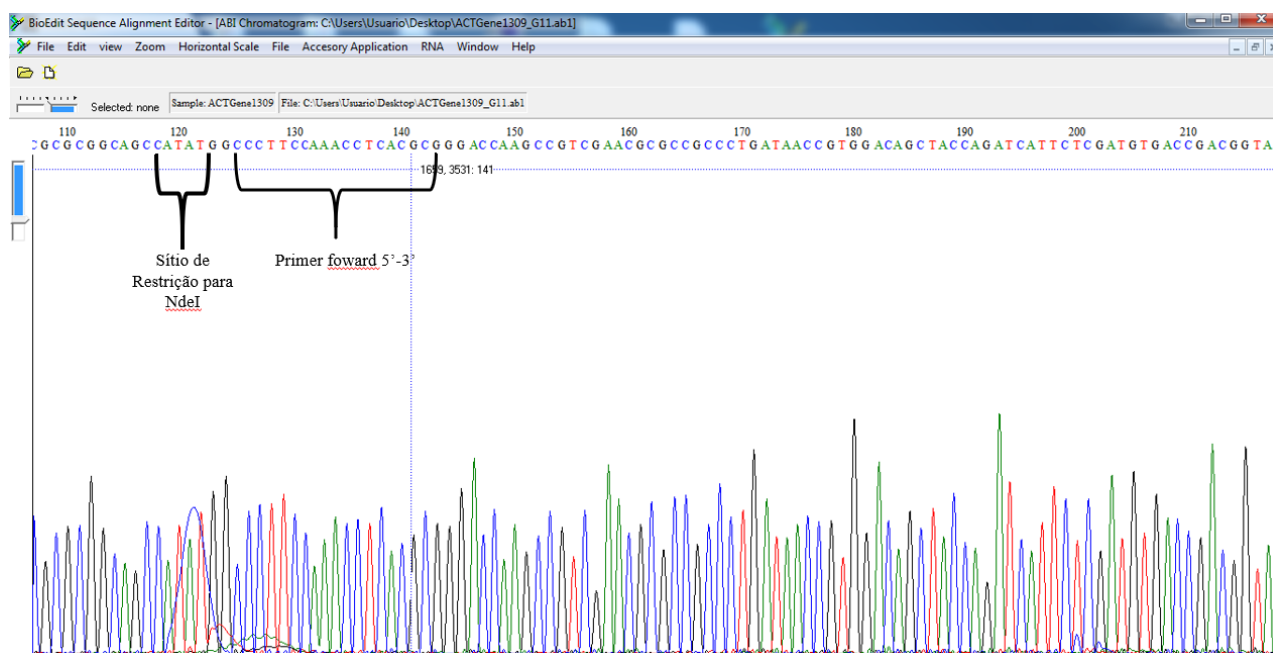


Figura 11 – Sequenciamento da construção do gene Rv2467- O eletroferograma apresentou picos isolados confirmando que a construção foi realizada de forma correta, no qual pode-se observar o sítio de restrição para NdeI e em seguida o primer forward primer 5'-3'.

5.2 Clonagem do gene Rv2467 de *M. Tuberculosis*

O DNA genômico da cepa padrão ATCC H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* foi extraído e posteriormente serviu de molde para amplificar o gene Rv2467 por meio de oligonucleotídeos iniciadores desenhados para amplificar um fragmento de 2586 pb.

O produto da amplificação obteve um amplicon na região entre 2000 e 3000 pb quando comparado ao marcador de tamanho molecular conhecido 1kb plus (Figura 12) correspondendo ao tamanho de banda esperado de acordo com o tamanho do gene e a inserção dos sítios para enzimas de restrição.

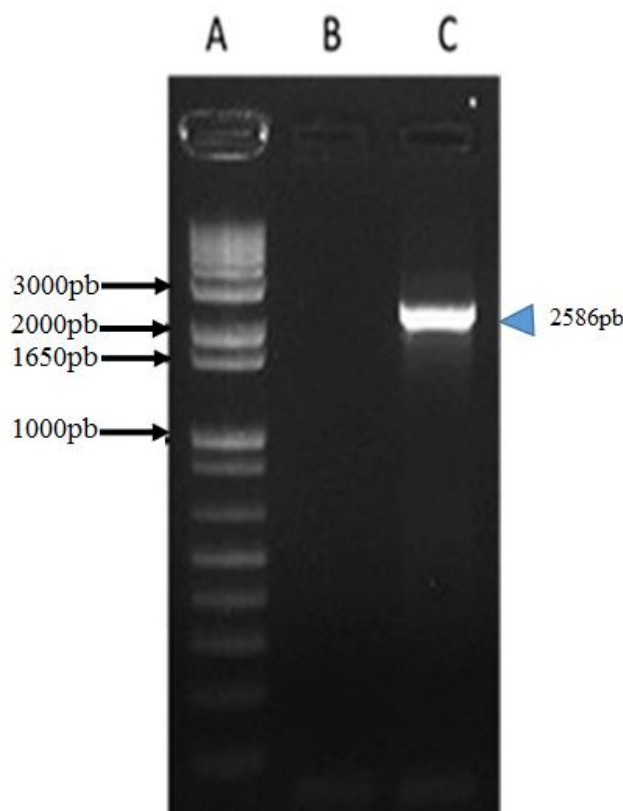


Figura 12 - Análise do produto amplificado do gene Rv2467. Gel de agarose a 1,5 % contendo o produto da reação da polimerase em cadeia (PCR) do gene Rv2467. O produto foi amplificado (Rv2467) a partir do DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv). A - Marcador de massa molecular 1kb plus (Invitrogen). B - Amostra controle negativo C - Amostra do produto amplificado. A cabeça de seta indica o produto amplificado do tamanho esperado de 2.586 pares de bases.

A partir do resultado obtido pela técnica de PCR foi realizado um sistema de ligação do produto amplificado ao vetor de clonagem pGem-T easy e este sistema posteriormente foi utilizado para transformar em *E. coli* XL10 Gold. Dos transformantes obtidos, cinco clones resultantes da transformação foram selecionados e crescidos em meio LB caldo com ampicilina. De cada clone selecionado foi realizado a extração plasmidial por lise alcalina. A partir do DNA extraído os clones selecionados foram submetidos ao processo de digestão com as enzimas *Nde* I e *Hind* III. Após análise em gel de agarose observou-se um clone positivo, ou seja, que teve a liberação do inserto apresentando bandas correspondente ao plasmídeo pGem T_Rv2467 (Figura 13).

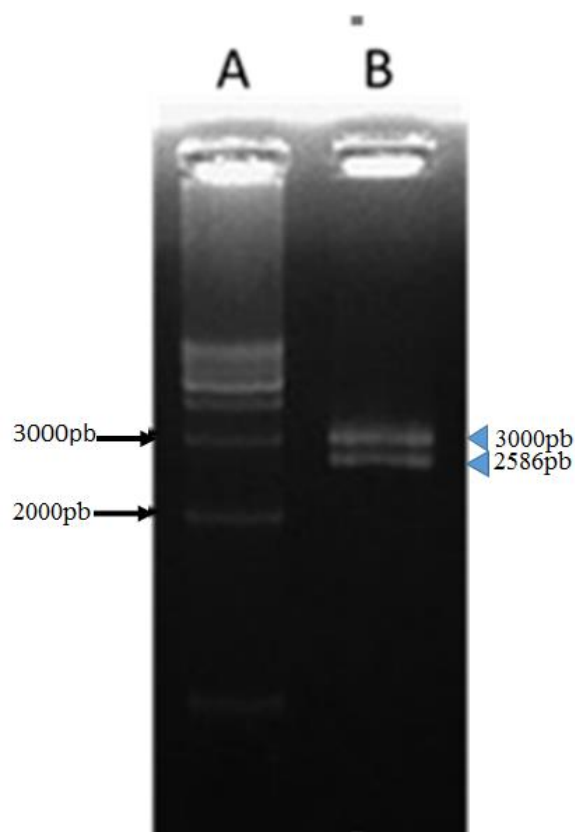


Figura 13 - Análise da digestão do plasmídeo recombinante pGem T_Rv2467 com as enzimas de *Nde I* e *Hind III*. A- Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). B- Dos clones resultantes da transformação foi feita a extração plasmidial de cada clone, e posteriormente digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII*. As cabeça das setas indica as bandas presentes no gel corresponderam ao tamanho das bandas esperadas, sendo a banda de 3.000pb corresponde ao plasmídeo pGem T easy (3015pb) e outra de 2586pb correspondendo ao gene codificante Rv2467

Procedeu-se então a digestão em maior escala do plasmídeo recombinante pGem T_Rv2467 com as enzimas de digestão *Nde I* e *Hind III* e procedeu-se a eluição em gel de agarose do fragmento de 2586 pb liberados correspondente ao gene Rv2467. O produto de eluição foi usado para montar um novo sistema de ligação com plasmídeo de expressão pET28a (Novagen®) previamente digerido também com as enzimas *Nde I* e *Hind III*. Este novo sistema de ligação foi utilizado para transformação em *E. coli* XL10Gold. Das colônias geradas pela transformação, dez clones foram selecionados e crescidos em LB caldo contendo canamicina e cloranfenicol como marca de seleção. Em seguida foi realizada a extração do DNA plasmidial de cada clone selecionado e os DNAs extraídos foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde I* e *Hind III*.

O resultado obtido após digestão com as enzimas de restrição foi analisado em gel de agarose. No gel, observou-se um clone positivo, que apresentou uma banda na altura correspondente ao gene codificante Rv2467, contendo 2586 pb e outra na altura correspondente ao plasmídeo pET28a, que possui 5369pb quando comparado ao

marcador molecular 1Kb-plus (Invitrogen), equivalente ao esperado para o plasmídeo recombinante pET28a -Rv2467 (Figura 14).

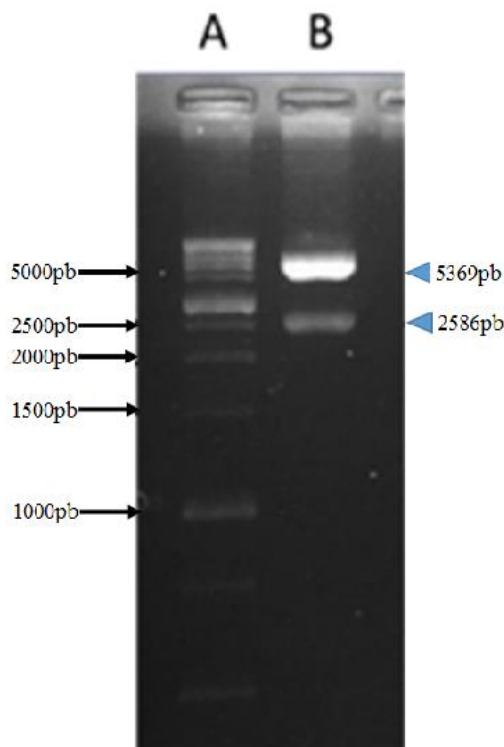


Figura 14 - Clonagem do gene Rv2467 no vetor pET28a (Novagen). A - Marcador molecular de massa 1Kb plus (Invitrogen). B- Plasmídeo pET28a/Rv2467 recombinante digerido com enzimas de restrição *Nde* I e *Hind* III analisado em gel de agarose. As cabeças das setas indicam as bandas apresentadas correspondem ao tamanho esperado de (5.369 pb) correspondente ao plasmídeo (pET28a) e a outra correspondente ao gene codificante Rv2467 (2.586 pb).

O plasmídeo recombinante pET28a -Rv2467 obtido foi utilizado para transformar *E. coli* BL21(DE3) pLysS, que é uma linhagem de *E. coli* própria para expressão de proteínas a partir do promotor do bacteriófago T7 (contido no vetor pET28a). Das colônias resultantes da transformação e que cresceram na placa contendo LB ágar com cloranfenicol (100µg/ml) e canamicina (20 µg/ml) foram selecionados 10 clones, os quais foram inoculadas em réplicas em duas placas de LB ágar ambas com antibiótico; uma contendo IPTG (0,4 mM), e outra sem IPTG e incubadas durante a noite (Figura 15) com a finalidade de avaliar o crescimento da cultura transformante sob condições de indução da expressão da proteína recombinante. Trata-se de uma avaliação subjetiva e baseado na ideia de que ao induzir a expressão da proteína recombinante em altos níveis com IPTG, a bactéria sofre consequências metabólicas que interferem no seu crescimento.

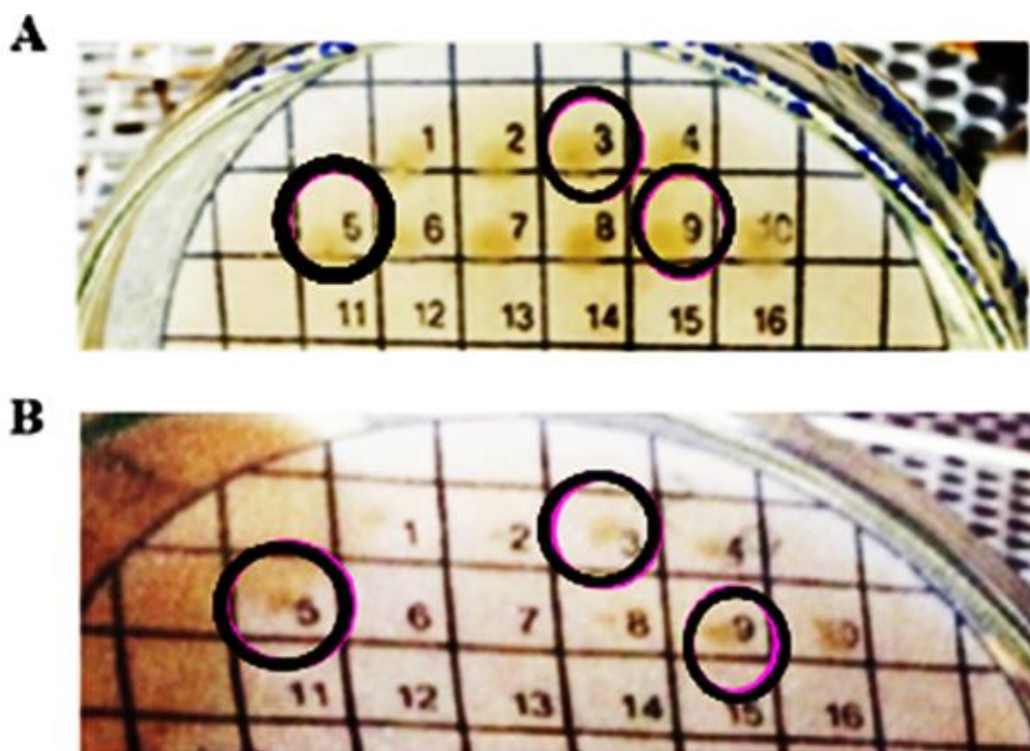


Figura 15 – Avaliação d crescimento de clones transformante na presença de IPTG. Ambas placas tinham LB ágar mais antibióticos e Cloranfenicol 100 µg/mL e canamicina 20 µg/ml porém uma das placas não teve adição do indutor IPTG (**A**) e a outra placa teve adição de 0,4 mM do indutor IPTG (**B**). Ambas placas foram mantidas a 37°C durante a noite. Os clones circulados em preto (3, 5 e 9) representam os clones que foram selecionados para posterior indução.

Em observação do gel, notou-se que as culturas induzidas com IPTG havia a presença de uma banda mais forte com peso molecular esperado de 94 kDa, quando comparado ao marcador molecular de tamanho conhecido (10-225 kDa) e esta banda mais evidente estava ausente nas culturas sem indução, indicando ser do tamanho esperado para a proteína recombinante Rv2467 (Figura 16). Aparentemente o clone 9 teve uma indução mais robusta que os outros dois clones, seguido do clone 3 e o clone 5 teve a menor expressão da proteína recombinante.

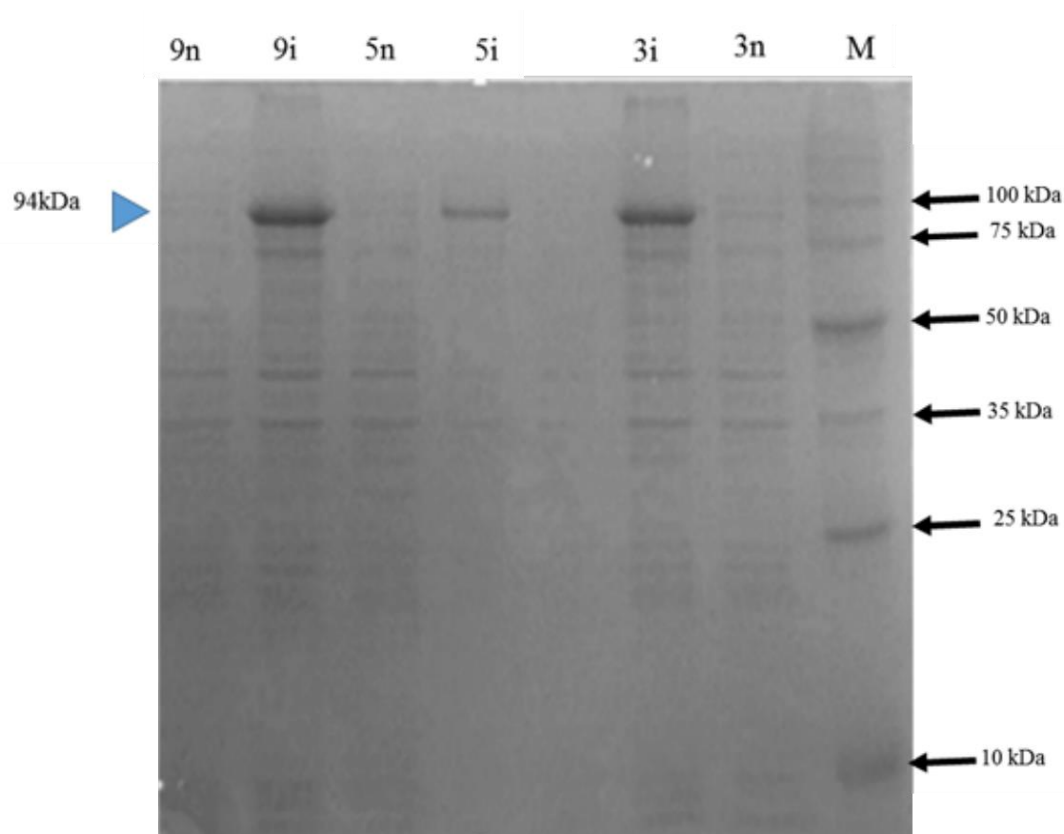


Figura 16 - Avaliação da indução da proteína recombinante (Rv2467) em gel de SDS-PAGE 12%. M- Marcador de massa molecular (Promega- 10-225 Kda). As amostras de três clones (3, 5 e 9) foram analisadas em relação a cultura não induzida (9n, 5n e 3n) e a cultura induzida com IPTG (9i, 5i e 3i). A cabeça da seta corresponde ao tamanho da banda de 94 Kda, esperado para a proteína Rv2467 recombinante.

Após confirmação da expressão da proteína recombinante, os clones 3i e 9i que deram a melhor expressão foram selecionados para serem novamente inoculados em 5 mL meio LB caldo, contendo os antibióticos cloranfenicol (100µg/ml) e canamicina (20 µg/ml) e induzidos por 4 horas com IPTG (0,4 mM) para verificar a solubilidade da proteína recombinante expressa. As culturas foram centrifugadas e os sedimentos celulares foram lisados por sonicação e logo após foram centrifugados para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento). Como apresentado na Figura 17, pode-se observar que a proteína recombinante Rv2467 ficou predominantemente na fração insolúvel, provavelmente formando corpúsculo de inclusão nos dois clones testados.

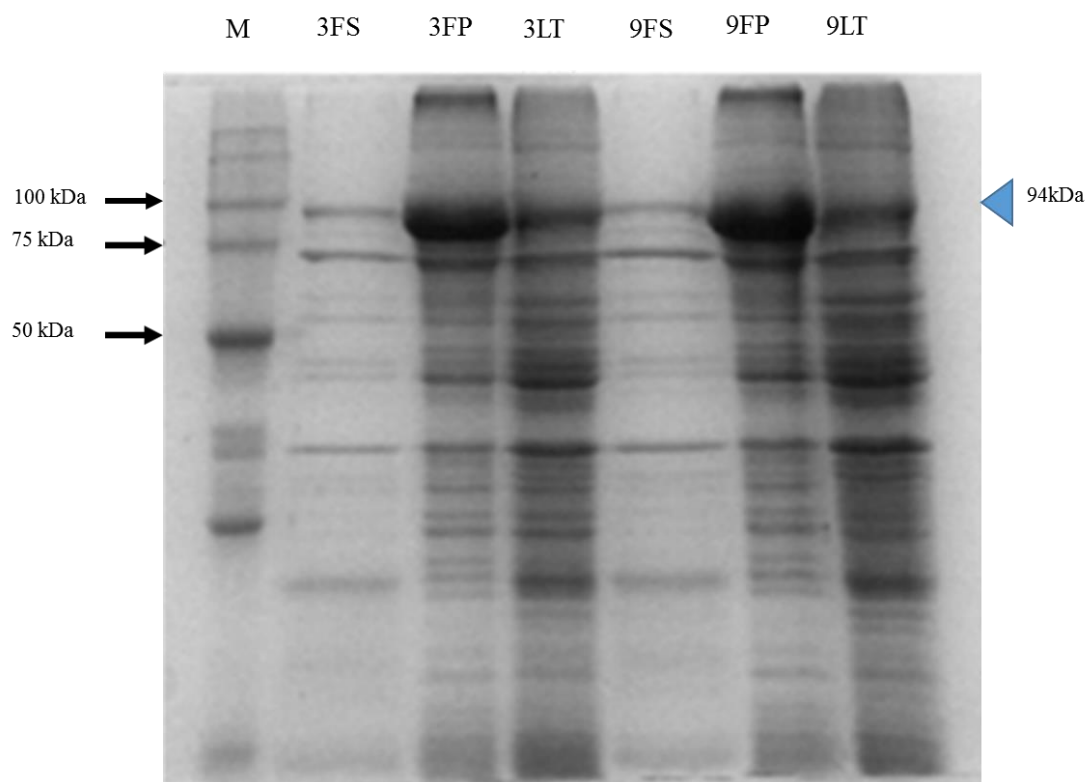


Figura 17-Avaliação da solubilidade da proteína recombinante (Rv2467) em gel de SDS-PAGE Após indução dos clones 3 e 9, as culturas foram lisadas por sonicação e uma parte do extrato total foi aplicada em gel de SDSPAGE (fração LT). O restante foi centrifugado dando origem as frações insolúveis do sedimento (FP) e a fração do sobrenadante (FS). M- Marcador de massa molecular (Promega - 10 – 225 Kda); 3FS - fração solúvel/sobrenadante do clone 3; 3FP – fração insolúvel/sedimento do **clone 3**; **3LT** - lisado total do clone 3; 9FS - fração solúvel/sobrenadante do clone 9; 9FP – fração insolúvel/sedimento do clone 9; 9LT - lisado total do clone 9. A cabeça da seta indica o tamanho da banda esperado de 94kDa.

Diante da não solubilização da proteína recombinante expressa, o clone 9 foi selecionado para uma nova indução de uma forma mais lenta que as anteriores e uma menor concentração de IPTG, almejando diminuir a formação de corpúsculos de inclusão e obter maior rendimento da proteína em sua conformação solúvel. Para tanto uma alíquota do clone 9 foi inoculada em meio LB caldo contendo os antibióticos cloranfenicol (100 µg/ml) e canamicina (20 µg/ml). Posteriormente a cultura foi induzida com 0,2 mM de IPTG por seis horas. Em seguida, a célula foi lisada por sonicação e centrifugada para separação das porções solúveis e insolúveis para análise em gel de SDS-PAGE 12% (Figura 18).

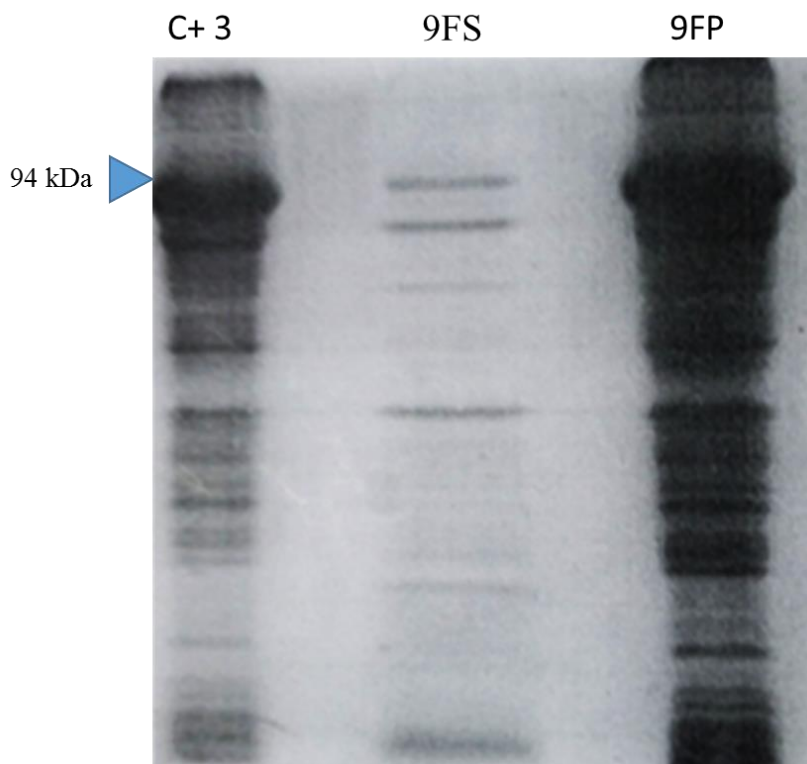


Figura 18 - Análise de expressão da proteína recombinante Rv2467 nas frações solúvel e insolúvel. Como marcador para identificar a proteína recombinante Rv2467, foi utilizado uma amostra induzida anteriormente do clone 3 (**C+3**). Após indução do clone 9 com 0,2 mM de IPTG por seis horas a cultura foi processada para lise por sonicação e separação das frações solúvel e insolúvel. Feito isso, as frações foram analisadas em gel de SDS-PAGE 12%. **9FS** - fração solúvel/sobrenadante do clone 9; **9FP** - fração insolúvel/sedimento do clone 9. A cabeça da seta indica o tamanho esperado da proteína recombinante Rv2467 de 94kDa.

O aumento do tempo de indução causou o aumento da expressão da proteína recombinante, mesmo utilizando-se metade da concentração do indutor IPTG, contudo a proteína recombinante permaneceu na forma insolúvel. Em uma tentativa de solubilizar a proteína foi visto em literatura por Hu Tao e colaboradores que o sarcosil é um detergente que pode ajudar na solubilização da proteína. Então foi proposta uma tentativa de solubilização da proteína utilizando sarcosil 2%. O clone 9 foi crescido em meio LB caldo contendo os dois antibióticos citados e posteriormente a cultura foi induzida com 1mM de IPTG. Em seguida a célula foi lisada e centrifugada para separação das frações solúvel e insolúvel. Após lise da célula, foi adicionado sarcosil na concentração final de 2%, permanecendo no gelo por duas horas. Em seguida a célula foi centrifugada novamente e o sobrenadante e sedimentos foram analisados em gel de SDS-PAGE 12% (Figura 19). Como observado na Figura 19, a adição de sarcosil na amostra ajudou na solubilização das proteínas em geral, nota-se agora que a maioria das proteínas passaram

a predominar na fração solúvel, inclusive a proteína recombinante Rv2467 que pode ser vista na altura do tamanho esperado da proteína de 94 kDa. (TAO et al., 2010).

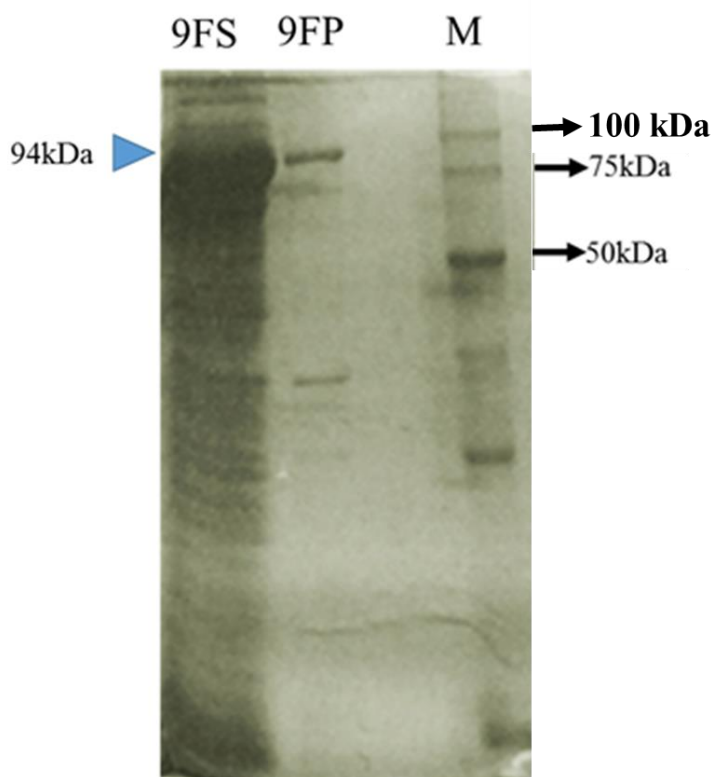


Figura 19 - Solubilização da proteína recombinante Rv2467 com sarcosil 2%. O clone 9 sem induzir foi crescido em meio LB caldo e posteriormente induzido por quatro horas com IPTG 1 mM. Após a lise das células foi adicionado sarcosil na concentração de 2% permanecendo no gelo por duas horas. As frações foram separadas e analisadas em gel de SDS-PAGE 12%. Como controle foi utilizado o marcador de massa molecular conhecido (Promega- 10-225kDa) **M**. **9FS** - fração solúvel (Sobrenadante); **9FP**- fração insolúvel (Sedimento). A cabeça da seta indica o tamanho da proteína desejada de 94 kDa.

Como a tentativa de isolar a proteína recombinante para posteriores testes de caracterização da proteína, foi realizado teste para purificação da mesma em condições nativas. Para tanto o sobrenadante da lise celular com sarcosil a 2% do clone 9 induzido foi coletado por meio de centrifugação e transferido para coluna de purificação de níquel. Todas as etapas da purificação da proteína foram coletadas para análise em gel de SDS-PAGE 12% (Figura 20). Como observado na Figura 24, boa parte da proteína recombinante não se aderiu a coluna durante a aplicação, pois pode ser vista na fração da primeira lavagem da coluna (Figura 20, FL e E1). Uma fração muito pequena da proteína recombinante Rv2467 pode ser observada nas frações de eluição 1 e 2, no entanto proteínas adicionais de massa molecular menor que a proteína Rv2467 também foram recuperadas, podendo ser degradação da proteína recombinante ou impurezas.

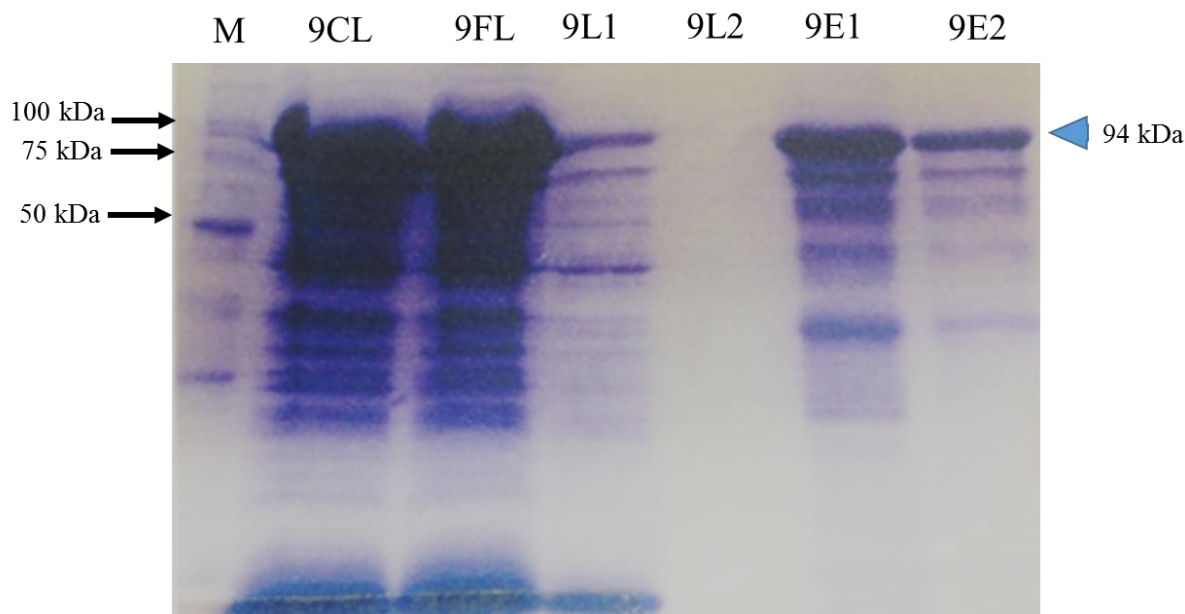


Figura 20 - Purificação da proteína recombinante Rv2467 em condições nativas. A cultura do clone 9 foi induzida com 1 mM de IPTG por quatro horas. Ao final da indução, a cultura foi centrifugada e as células coletadas foram submetidas a lise com tampão de lise e suplementado com sarcosil na concentração final de 2% por 2 horas. Em seguida, o sistema foi centrifugado e o sobrenadante foi passado na coluna de Ni^{+2} , durante este processo de purificação frações de todas as etapas foram coletadas, para posterior análise em gel SDS-PAGE 12%. Primeiramente foi retirada uma alíquota antes da passagem do sobrenadante na coluna (**9CL**); A solução que passou inicialmente pela coluna foi coletada (**9FL**); Em seguida a coluna foi lavada por duas vezes com tampão de lavagem e em cada lavagem foi coletada uma alíquota (**9L1** e **9L2**); Posteriormente o que permaneceu ligado à coluna foi eluído com 1 mL de tampão de eluição. Esse processo foi repetido por duas vezes e em cada etapa foi coletada uma alíquota (**9E1** e **9E2**) para análise em gel de SDS-PAGE. M: marcador promega 10-225 kDa.

Devido ao baixo rendimento da purificação da proteína em condições nativas e com sarcosil, procedemos a tentativa de purificar a proteína insolúvel para ver se o rendimento seria melhor. Para tanto o lisado bacteriana do clone 9 induzido foi realizada pela adição do tampão desnaturante contendo ureia. Em busca na literatura foi verificado por Bornhorst e colaboradores onnotaram que a adição de 10 mM de β -mercaptoetanol nos tampões de lise ajudam na quebra de ligações fortes como pontes de dissulfeto, pois talvez somente a ureia não seria suficiente para quebrar estas ligações Inicialmente foi feito uma indução em pequena escala adicionando β -mercaptoetanol no tampão de lise para ressuspensão das células (Figura 21) (BORNHORST; FALKE, 2000).

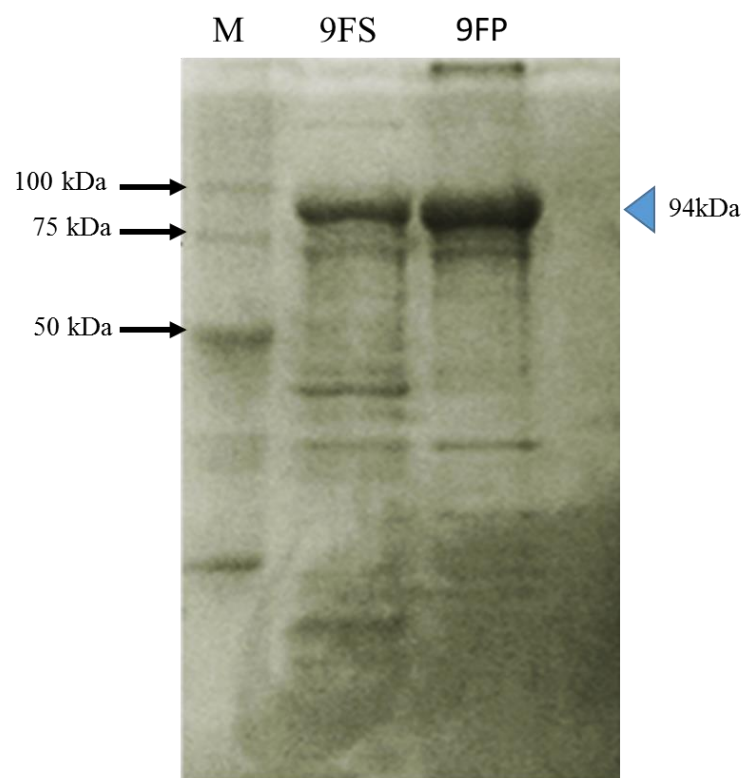


Figura 21 - Solubilização da proteína recombinante Rv2467 com β -mercaptoetanol. Após indução do clone 9, a célula foi lisada em tampão desnaturante contendo uréia e em seguida foi adicionado β -mercaptoetanol e depois do tempo de incubação a amostra foi centrifugada para separação das amostras em suas frações solúveis e insolúveis e foram analisadas em gel de SDS-PAGE. **M**- marcador molecular de tamanho conhecido (10-225Kda); **9FS** - Fração solúvel (sobrenadante) e **9FP** -Fração insolúvel (sedimento). A cabeça da seta indica o tamanho da proteína recombinante de 94Kda.

Como observado no gel da Figura 21, a adição de β -mercaptoetanol na solução de lise ajudou na recuperação da proteína na forma solúvel, porém a eficiência ainda foi baixa pois boa parte da proteína recombinante ficou na fração insolúvel. Apesar da baixa eficiência de solubilidade, foi feita outra tentativa de purificação da proteína recombinante Rv2467 em condições desnaturantes. Após indução do clone 9 e lise do mesmo com ureia conforme descrito acima, foi retirada uma alíquota antes do processo de centrifugação do lisado total (LT) com a finalidade de observar o perfil do extrato total lisado da indução. Em seguida a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi adicionado a coluna de níquel e todas as etapas foram coletadas para análise em gel de SDS-PAGE 12% Figura 22.

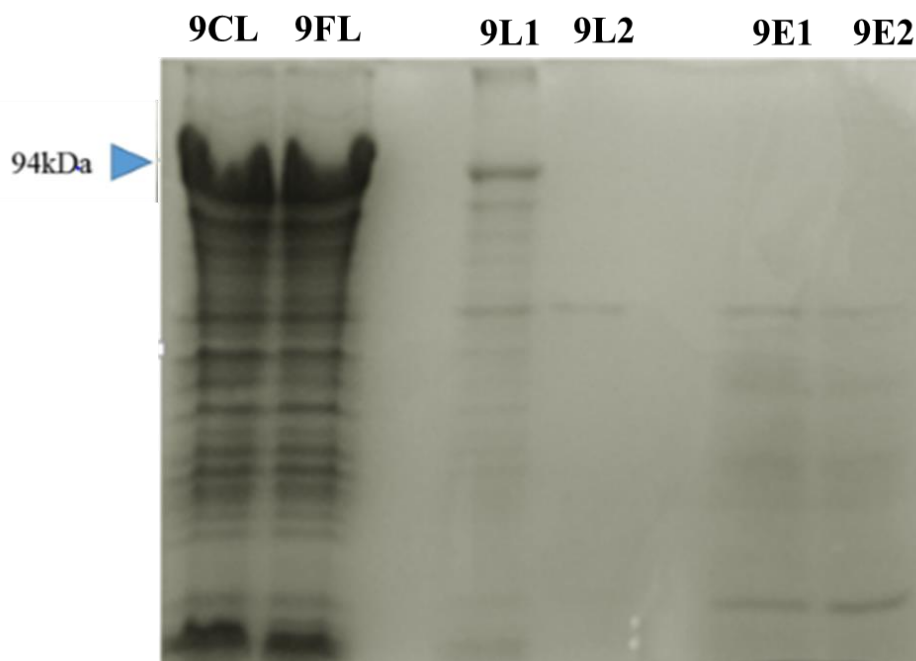


Figura 22 - Purificação da proteína recombinante Rv2467 em condições desnaturantes. A cultura de *E. coli* B121 (DE3) pLysS_pET28a_Rv2467 (clone 9) foi induzida com 1mM de IPTG e posteriormente lisada com tampão de lise desnaturante (com uréia) pH 8,0 suplementado com β -mercaptoetanol. Após a lise da célula, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi passado na coluna. Inicialmente foi retirada uma alíquota antes da centrifugação tendo o Lisado total (**9CL**); Em seguida o sobrenadante foi aplicado à coluna de níquel e uma alíquota foi coletada sendo denominada: Sobrenadante não aderido (**9FL**). Posteriormente a coluna foi lavada duas vezes com tampão de lise pH 6,3 e o material eluído foi analisado (**9L1 e 9L2**). Depois de lavada o que se ligou na coluna foi eluído com tampão de lise pH 4,5 em duas vezes de 1 mL e o eluato juntamente com as outras frações foi analisado no gel de SDS-PAGE (**9E1 e 9E2**).

Na purificação de forma desnaturada da proteína recombinante Rv2467 pode-se observar que a proteína recombinante presente no lisado inicial, não aderiu a coluna de níquel pois a grande maioria da mesma foi coletada no material eluído da coluna durante a aplicação (Figura 22), (9CL). O pouco da proteína que se aderiu a coluna, foi eliminado já na primeira lavagem da mesma (Figura 22, L1), consequentemente nenhuma proteína recombinante foi obtida ao final da purificação nos eluatos E1 e E2.

A dificuldade em se obter a proteína purificada na coluna de níquel nos fez pensar que a proteína recombinante pudesse estar desprovida de sua cauda aminoterminal de poli-histidina provida pelo vetor pET28a. Para verificar se este era o caso, foi realizado um western blotting utilizando um anticorpo anti-histidina, tendo como um controle uma proteína recombinante produzida pelo laboratório anteriormente, a CMX que possui a cauda de histidina. Como pode-se ver na figura 23, observou-se que a proteína Rv2467 recombinante não foi reconhecida pelo anticorpo anti-histidina, sugerindo que a proteína recombinante Rv2467 esteja desprovida da porção aminoterminal de poli-histidina.

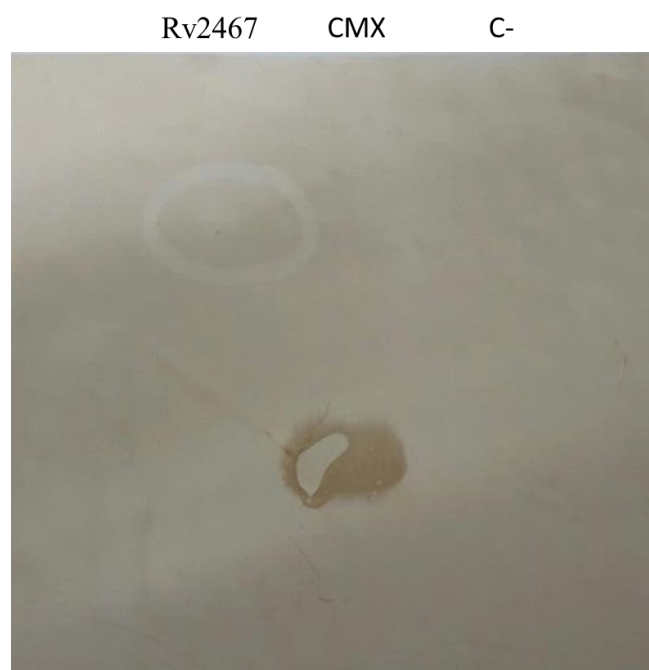


Figura 23 - Western blotting para verificação da presença da calda de histidina em Rv2467 recombinante. Como controle foi utilizado uma proteína já produzida pelo laboratório CMX que contém cauda de histidina. Como controle negativo foi utilizado uma lisado de *Escherichia coli* XL-10 GOLD C-. RV2467 proteína recombinante.

Devido a possível confirmação da falta da cauda de histidina, optamos pela produção de anticorpo com a proteína recombinante Rv2467, o camundongo foi imunizado com a proteína recombinante (Rv2467) eluída do gel de poliacrilamida 12% por três vezes com intervalo de 15 dias, ao final da última imunização coletou-se o sangue do camundongo. Para realização do teste foi utilizado como controles positivos um extrato de lisado de *M. tuberculosis* e CFP (proteína de filtrado de cultura) de *M. tuberculosis*. Foi realizado uma pré-adsorção do soro produzido utilizando uma alíquota de *E. coli* BL21-vazia. Em seguida foi feito o teste western blotting com a finalidade de ver se o camundongo foi capaz de produzir anticorpo contra a proteína recombinante porém o western não revelou nenhum reconhecimento por parte do soro de camundongos contra a proteína recombinante.

6 DISCUSSÃO

O sistema para expressão de proteínas em *Escherichia coli* como hospedeiro é o mais indicado para atingir o sucesso de uma boa expressão da proteína desejada, pois esta linhagem é de baixo custo, fácil manipulação e apresenta um crescimento rápido quando cultivada em meio de cultura. Apesar de haver diversas vantagens, algumas desvantagens devem ser levadas em conta, entre eles a decisão se a proteína heteróloga deve ser secretada ou não, e se a proteína será fundida a um fragmento amino-terminal; o estado redox de cisteínas durante o crescimento da cultura e subsequente purificação.

O gene Rv2467 presente em *Mycobacterium tuberculosis* é tido como uma protease com possível atividade de aminopeptidase. Este gene foi clonado e expressado gerando uma proteína de 94 kDa o que correspondeu ao esperado segundo o banco de dados NCBI. Após o processo de clonagem realizou-se um sequenciamento pela empresa ACTGene Análises Moleculares que nos confirmou que a nossa construção foi feita de forma correta dando mais confiança em seguir com outros procedimentos como expressão e purificação.

Foi demonstrado que a atividade da aminopeptidase está presente em diferentes compartimentos celulares. No entanto, a maioria dessas enzimas (97%) são encontradas em frações solúveis, no citoplasma (65%), no periplasma de bactérias Gram-negativas ou na parede celular Gram-positiva (16%), ou secretadas para o ambiente externo (16%). Vários tipos enzimáticos, associados à interação com a membrana citoplasmática, especialmente em seu lado interno, sem serem considerados proteínas de membrana. Estas enzimas normalmente exibem parte de sua atividade como uma fração solúvel e parte associada a membranas (GUENET; LEPAGE; HARRIS, 1992).

A razão pela qual essas enzimas requerem contato com a membrana citoplasmática é desconhecida. No entanto, uma vez que alguns deles estão envolvidos na nutrição bacteriana, é possível que essas peptidases estão localizadas em estreita proximidade com os sistemas de membrana celular envolvidos no transporte de peptídeos exógenos, a fim de serem capazes de reagir com seus substratos assim que entram no sistema da célula (GONZALES; ROBERT-BAUDOUY, 1996). No entanto, não está excluído que alguma fração da atividade da aminopeptidase possa estar associada ao envelope celular. Além disso, alguns autores sugerem um mecanismo desconhecido de translocação ou um "vazamento específico" de algumas aminopeptidases citoplasmáticas (EXTERKATE et al., 1992).

Ao avaliar a solubilidade da proteína alvo em gel de SDS-PAGE, observamos que esta permaneceu, em sua maior parte, insolúvel. Segundo Vincentelli e colaboradores apontaram que quanto maior o número de domínios, maiores as chances de um dobramento malsucedido. Em *E. coli* não apenas proteínas heterólogas apresentam problemas de dobramento e solubilidade, mas também proteínas bacterianas, no qual, o resultado é a insolubilidade da proteína em questão. Com a predição da estrutura homóloga à proteína Rv2467, observamos que há presença de três domínios (Figura 5) que são eles; domínio N-terminal, domínio catalítico e o domínio C-terminal e motivos consensos entre algumas espécies que são eles os motivos HEXXH e o motivo GXEM figuras 6 e 7, podem ter contribuído para o insucesso da obtenção da proteína em sua forma solúvel (VINCENTELLI et al., 2003).

Uma outra hipótese que deve ser levada em consideração sobre a insolubilidade da proteína seria a ausência do peptídeo sinal, uma vez que estes são importantes ao atuar marcando as proteínas que serão exportadas para determinados locais, como por exemplo, o ambiente extracelular. Estas proteínas vão ser reconhecidas por meio da sequência sinal, o qual, após a exportação, é removido da proteína por meio da ação de proteases (ZHANG; HENZEL 2004). Em análise da predição com a finalidade de determinar a presença ou ausência de peptídeo sinal da figura 8, observamos que esta não o apresenta, levando a não secreção da proteína para o ambiente extracelular.

Ao inserir um gene estranho em uma bactéria sua expressão se dará em um ambiente diferente daquele que lhe é natural (pode haver um pH diferenciado, osmolaridade, potencial de redução, cofatores e mecanismos de dobradura. Quando o nível de expressão da proteína é alto, as partes hidrofóbicas permanecem em altas concentrações interagindo assim com regiões similares de outras cadeias peptídicas, levando a instabilidade da proteína e a agregação de outras proteínas, cuja consequência é a geração de corpúsculos de inclusão (CARRIÓ; VILLAVERDE, 2001).

O processo de glicosilação é importante por influenciar as propriedades biológicas como atividade, solubilidade, dobramento, conformação, estabilidade de diferentes proteínas celulares, modulando a estrutura e função dessas proteínas para uma variedade de processos como o envolvimento nas interações hospedeiro-patógeno, imunogenicidade e em muitas outras funções celulares importantes (Figura 9). Ao observar os sítios de glicosilação da proteína vimos que ela possui potenciais sítios de glicosilação para glicosilação do tipo O-ligada porém não significando que estes são glicosilados. Através

do resultado obtido, pode-se inferir que os sítios de não glicosilados podem ter levado a má conformação da proteína levando-a a ficar insolúvel.

Várias glicoproteínas potenciais foram relatadas em filtrados de cultura de Micobactéria (*M. bovis*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, BCG) com base em sua reatividade com lectinas tais como concanavalina A, e por análise de carboidratos. As glicoproteínas foram reconhecidas por soros obtidos de pacientes com tuberculose pulmonar e anticorpos específicos foram induzidos em coelhos. Em *M. tuberculosis*, três antígenos proeminentes (45/47, 38 e 19 kDa) foram descritos como glicoproteínas.

As pontes de dissulfeto determinam um papel importante na estabilização do processo de dobramento da proteína. Além disso, o conhecimento sobre o estado de ligação de dissulfeto de cisteínas pode ajudar o processo de determinação da estrutura experimental e podem ser úteis em outras tarefas gênicas por outro lado, o ambiente citoplasmático de *E. coli* é muito reduzido e desfavorável a formação de pontes dissulfeto (CERONI et al., 2006). Todavia, não há previsão de a proteína RV2467 ter pontes dissulfetos e, portanto, não deve ter influenciado no insucesso da solubilidade da proteína recombinante obtida (Figura 10).

As proteínas secretadas por Mtb têm muitas funções diferentes, incluindo aquelas associadas a virulência, patogenicidade e manutenção de parede celular. Dentro do proteoma de Mtb, foi previsto que mais de 180 proteínas são secretadas, das quais 60% podem conter ligações dissulfeto com base em seu conteúdo de cisteína que desempenham um papel importante no correto dobramento de proteínas secretadas levando a investigar se a interrupção das vias de dobramento de proteínas assistidas pelo Mtb pode prevenir a infecciosidade e a viabilidade micobacteriana.

O processo de purificação foi realizado pelo sistema His-tag que utilizam marcadores de afinidade de poli histidina são normalmente colocados na porção N terminal ou C das proteínas recombinantes. Como vimos na figura 20 a maior parte da proteína não se aderiu a coluna, dificultando assim obter a mesma pura (BORNHORST e FALKE,2000).

Proteínas que permanecem solúveis no citoplasma, ou que são secretadas, geralmente podem ser purificadas usando essas condições nativas. No entanto, a purificação sob condições nativas pode ser impedida se a proteína alvo for insolúvel, agregadas em corpos de inclusão, ou possuir uma estrutura terciária que oclua o marcador de afinidade de poli histidina. Ao passarmos para o processo de purificação da proteína alvo, tivemos dificuldades em obter a proteína purificada. Pensamos talvez na

possibilidade da possível perda da cauda de histidina, impedindo assim prosseguirmos com testes de caracterização (BORNHORST e FALKE ,2000).

As proteases têm demonstrado desempenhar papéis biológicos e fisiológicos que permite o microrganismo obter sucesso na infecção. Compreendendo os papéis e funções destas enzimas através de estudos previsto na literatura e estudos experimentais irá proporcionar uma melhor compreensão do processo de infecção e o conhecimento para novas alternativas terapêuticas, como o surgimento de novas drogas ou candidatos a novas vacinas, para assim alcançar o controle da tuberculose.

7 CONCLUSÕES

A proteína Rv2467 de *M. tuberculosis* foi inserida em plasmídeo de expressão em *E. coli* e foi expressa em níveis razoavelmente elevados, apresentando seus característicos 94KDa. Apesar de não ter sido altamente expressa, apresentou dificuldade de ser obtida na forma solúvel tanto em condições não desnaturantes como em condições desnaturantes, supostamente levando à formação de corpúsculos de inclusão, dificultando o processo de purificação.

As dificuldades em se obter a proteína pura levou a pesquisa a procurar falhas no processo de construção e expressão da proteína. O caminho escolhido, western blotting, utilizou anticorpo anti-histidina, o que demonstrou a provável falta da cauda de histidina, que seria peça chave para a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel, já que a histidina é notória pela sua afinidade a este metal.

A não purificação da referida proteína impediu a continuidade dos experimentos de caracterização e função desta. Essa dificuldade deverá ser alvo de futuras indagações experimentais.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, P. TB vaccines: progress and problems. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 3, p. 160–168, mar. 2001.

ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M. The success and failure of BCG — implications for a novel tuberculosis vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 656–662, 11 ago. 2005.

ARBEX, M. A. et al. The challenge of managing extensively drug-resistant tuberculosis at a referral hospital in the state of São Paulo, Brazil: a report of three cases. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 6, p. 554–559, dez. 2015.

ARRIAZA, B. T. et al. Pre-Columbian tuberculosis in Northern Chile: Molecular and skeletal evidence. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 98, n. 1, p. 37–45, 1995.

BARBERIS, I. et al. The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. E9–E12, 2017.

BARKSDALE, L.; KIM, K.-S. Mycobacterium. **American Society for Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 217–372, 1977.

BEHR, M. et al. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. **Science**, v. 284, n. 5419, p. 1520–1523, 28 maio 1999.

BENTO, J. et al. Métodos de diagnóstico em Tuberculose. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 1, p. 145–154, 2011.

BHOSALE, M. et al. Catalytic activity of Peptidase N is required for adaptation of *Escherichia coli* to nutritional downshift and high temperature stress. **Microbiological Research**, v. 168, n. 1, p. 56–64, jan. 2013.

BHOSALE, M.; KADTHUR, J. C.; NANDI, D. Roles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium encoded Peptidase N during systemic infection of *Ifn γ ^{-/-}* mice.

Immunobiology, v. 217, n. 3, p. 354–362, mar. 2012.

BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. **Methods Enzymol**, v. 326, p. 245–254., abr. 2000.

BRANDT, L. et al. The Protective Effect of the Mycobacterium bovis BCG Vaccine Is Increased by Coadministration with the Mycobacterium tuberculosis 72-Kilodalton Fusion Polyprotein Mtb72F in M. tuberculosis-Infected Guinea Pigs. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6622–6632, 1 nov. 2004.

BRASIL. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. p. 436, 2008.

BRASIL. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. **Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde**, v. 3, p. 284, 2011a.

BRASIL. Xpert® MTB/RIF no diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**, n. 16, p. 35, 2011b.

BRASIL. Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde- Ministério da Saúde. v. 8, 2017.

BRASIL. Mudanças no tratamento da tuberculose. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 197–199, fev. 2010.

BRAUN, V. et al. Intracellular activation of albomycin in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. **Journal of bacteriology**, v. 156, n. 1, p. 308–15, out. 1983.

BRENNAN, P.; NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry**, p. 29–63, 1995.

BUTLER, M. J. et al. The aminopeptidase N-encoding pepN gene of Streptomyces lividans 66. **Gene**, v. 141, n. 1, p. 115–119, abr. 1994.

CAMPOS, H. S. Tratamento da Tuberculose. **Revista PULMÃO RJ - Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. 16, n. 1, p. 21–31, 2007.

CAMPOS, R.; PIANTA, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul–Brasil. **Bol Saúde**, v.

15, n. 1, p. 61–71, 2001.

CARRIÓ, M. M.; VILLAVERDE, A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. **FEBS Letters**, v. 489, n. 1, p. 29–33, 26 jan. 2001.

CARUSO, A. M. et al. Mice Deficient in CD4 T Cells Have Only Transiently Diminished Levels of IFN- γ , Yet Succumb to Tuberculosis. **The Journal of Immunology**, p. 5407–5416, 1 out. 1999.

CERONI, A. et al. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Web Server, p. W177–W181, 1 jul. 2006.

CHANDU, D. PepN is the major aminopeptidase in Escherichia coli: insights on substrate specificity and role during sodium-salicylate-induced stress. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3437–3447, 1 dez. 2003.

CHAUHAN, J. S. et al. GlycoPP: A Webserver for Prediction of N- and O-Glycosites in Prokaryotic Protein Sequences. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40155, 9 jul. 2012.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. DE A. Etiologia. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, p. 24–26, 2006.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 11 jun. 1998.

CONDE, M. B. et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 10, p. 1018–1048, 2009.

CORREA, A. F. et al. The Endothelin System Has a Significant Role in the Pathogenesis and Progression of Mycobacterium tuberculosis Infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 12, p. 5154–5165, dez. 2014.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862–1870, nov. 2006.

DANIEL, T. M. Jean-Antoine Villemin and the infectious nature of tuberculosis.

International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v. 19, n. 3, p. 267–268, 2015.

DAVIES, G. THE ROLE OF THE AMERICAN RED CROSS IN THE TUBERCULOSIS CAMPAIGN IN FRANCE DURING THE GREAT WAR . **THE BRITISH JOURNAL OF TUBERCULOSIS**, p. 6, 1920.

DELOGU, G.; FADDA, G. Review Article The quest for a new vaccine against tuberculosis. **J Infect Developing Countries**, p. 5–15, 2008.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. THE BIOLOGY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS INFECTION. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 2013070, 15 nov. 2013.

DIEDRICH, C. R.; O'HERN, J.; WILKINSON, R. J. HIV-1 and the Mycobacterium tuberculosis granuloma: A systematic review and meta-analysis. **Tuberculosis**, v. 98, n. March, p. 62–76, maio 2016.

DORHOI, A.; KAUFMANN, S. H. E. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 153–166, 5 mar. 2016.

DROBNIIEWSKI, F. et al. Rapid diagnostics of tuberculosis and drug resistance in the industrialized world: clinical and public health benefits and barriers to implementation. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 190, 29 dez. 2013.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697–714, nov. 2006.

EXTERKATE, F. A. et al. Location and characterization of aminopeptidase N in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 46–54, abr. 1992.

FIDOPIASTIS, P. M. et al. Characterization of a *Vibrio fischeri* Aminopeptidase and Evidence for Its Influence on an Early Stage of Squid Colonization. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 15, p. 3995–4002, 1 ago. 2012.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis*

complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 27 jan. 2013.

FRITH, J. History of tuberculosis. Part 1 - Phthisis, consumption and the white plague. **Journal of Military and Veterans' Health**, v. 22, n. 2, p. 29–35, 2014.

GEN-PROBE INCORPORATED. **Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test**, 2001.

GHARBI, S. et al. Multiple controls exerted on in vivo expression of the pepN gene in Escherichia coli: Studies with pepN-lacZ operon and protein fusion strains. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 3, p. 1191–1195, 1985.

GIDEON, H. P. et al. Variability in Tuberculosis Granuloma T Cell Responses Exists, but a Balance of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines Is Associated with Sterilization. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004603, 22 jan. 2015.

GONZALES, T.; ROBERT-BAUDOUY, J. Bacterial aminopeptidases: Properties and functions. **ELSEVIER**, v. 18, p. 319–344, 1996.

GRADMANN, C. Robert Koch and the Pressures of Scientific Research: Tuberculosis and Tuberculin. **Medical History**, v. 45, n. 1, p. 1–32, 7 jan. 2001.

GUENET, C.; LEPAGE, P.; HARRIS, B. A. Isolation of the Leucine Aminopeptidase Gene from Aeromonas proteolytica. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 267, p. 8390–8395, 1992.

GUTIERREZ, M. C. et al. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 1, p. e5, 2005.

HAWGOOD, B. J. Albert Calmette (1863-1933) and Camille Guérin (1872-1961): the C and G of BCG vaccine. **Journal of medical biography**, v. 15, n. 3, p. 139–46, 2007.

HERZOG, B. History of Tuberculosis. **In: Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care.**, p. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. (eds). p25-49, 2007.

HOOPER, N. M. Proteases : a primer. **Essays in Biochemistry**, v. 38, p. 1–8, 2002.

JANKIEWICZ, U.; BIELAWSKI, W. Purification and properties of phenylalanyl aminopeptidase synthesised by Pseudomonas sp. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42,

n. 4, p. 260, ago. 2002.

JOE, M. et al. Synthesis of the docosanasaccharide arabinan domain of mycobacterial arabinogalactan and a proposed octadecasaccharide biosynthetic precursor. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 32, p. 9885–9901, 2007.

JONGENEEL, C. V.; BOUVIER, J.; BAIROCH, A. A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. **FEBS Letters**, v. 242, n. 2, p. 211–214, 2 jan. 1989.

KAUFMANN, S. H. E.; MCMICHAEL, A. J. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4s, p. S33–S44, abr. 2005.

KIRAN, M. et al. Mycobacterium tuberculosis ftsH expression in response to stress and viability. v. 86, n. 12, p. 3279–3288, 2009.

KUMAR, A.; NANDI, D. Characterization and role of Peptidase N from Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 3, p. 706–712, 2007.

MARTINELLI, D. J.; PAVELKA, M. S. The RipA and RipB Peptidoglycan Endopeptidases Are Individually Nonessential to Mycobacterium smegmatis. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 9, p. 1464–1475, 1 maio 2016.

MCCAMAN, M. T.; GABE, J. D. Sequence of the promoter and 5' coding region of pepN, and the amino- terminus of peptidase N from Escherichia coli K-12. **Mol Gen Genet**, v. 204, n. 1, p. 148–152, 1986.

MITCHISON, D. A. Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 9, p. 796–806, 2000.

MOHAMEDMOHAIDEEN, N. N. et al. Structure and function of the virulence-associated high-temperature requirement A of Mycobacterium tuberculosis. **Biochemistry**, v. 47, n. 23, p. 6092–6102, 2008.

MORSE, D.; BROTHWELL, D. R.; UCKO, P. J. Tuberculosis in Ancient Egypt 1. **American Review of Respiratory Disease**, v. 90, n. 4, p. 524–541, 1964.

NYHOLM, S. V et al. Establishment of an animal-bacterial association: recruiting symbiotic vibrios from the environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10231–5, 2000.

O’GARRA, A. et al. The Immune Response in Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 475–527, 21 mar. 2013.

OLLINGER, J. et al. Inhibition of the Sole Type I Signal Peptidase of *Mycobacterium tuberculosis* Is Bactericidal under Replicating and Nonreplicating Conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 10, p. 2614–2619, 15 maio 2012.

ORME, I. M.; MCMURRAY, D. N.; BELISLE, J. T. Tuberculosis vaccine development: recent progress. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 115–118, mar. 2001.

ORME, I. M.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 57–63, jan. 2015.

PALOMINO, J. C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: Feasibility and applicability in the field. **European Respiratory Journal**, v. 26, n. 2, p. 339–350, 2005.

PATIL, V. et al. Peptidase N encoded by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium modulates systemic infection in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 431–442, 2007.

PERKINS, H. R.; ROGERS, H. J. The Incorporation of Amino Acids into the Cell-Wall Mucopeptide of *Staphylococci* and the Effect of Antibiotics on the Process. **BIOSYNTHESIS OF THE CELL WALL**, v. 72, p. 654–662, 1959.

RANDALL, P. J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection of the “non-classical immune cell”. **Immunology and Cell Biology**, v. 93, n. 9, p. 789–795, out. 2015.

RIBEIRO-GUIMARÃES, M. L.; PESSOLANI, M. C. V. Comparative genomics of mycobacterial proteases. **Microbial Pathogenesis**, v. 43, n. 5–6, p. 173–178, 2007.

RILEY, L. W. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 4–7, 2006.

RITZ, N. et al. **Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis** *FEMS Microbiology Reviews*, ago. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00118.x>>

ROBERTS, D. M. et al. Proteases in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis: potential as drug targets. **Future microbiology**, v. 8, n. 5, p. 621–31, maio 2013.

ROSEMBERG, J. Tuberculose-Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 7, n. 2, p. 5–29, 1999.

SHALER, C. R. et al. Understanding Delayed T-Cell Priming, Lung Recruitment, and Airway Luminal T-Cell Responses in Host Defense against Pulmonary Tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–13, 2012.

SINGH, N.; KUPPILI, R. R.; BOSE, K. The structural basis of mode of activation and functional diversity: A case study with HtrA family of serine proteases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 516, n. 2, p. 85–96, 2011.

SKEIKY, Y. A. W. et al. Cloning, Expression, and Immunological Evaluation of Two Putative Secreted Serine Protease Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p. 3998–4007, 1999.

SMALL, J. L. et al. Substrate Specificity of MarP, a Periplasmic Protease Required for Resistance to Acid and Oxidative Stress in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 18, p. 12489–12499, 3 maio 2013.

TAO, H. et al. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. **BioTechniques**, v. 48, n. 1, p. 61–64, 2010.

THOMAZ, J. B. Trombose de origem infecciosa: tuberculosa. **FLEBOLOGÍA Y LINFOLOGÍA - LECTURAS VASCULARES**, n. 14, p. 866–873, 2010.

THRUPP, L. et al. Tuberculosis Prevention and Control in Long-Term-Care Facilities for Older Adults. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 12, p. 1097–1108, 2 dez. 2004.

THUNNISSEN, M. M. G. M.; NORDLUND, P.; HAEGGSTRÖM, J. Z. Crystal structure

of human leukotriene A₄ hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 2, p. 131–135, 1 fev. 2001.

TORRADO, E. et al. Interleukin 27R regulates CD4 + T cell phenotype and impacts protective immunity during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 9, p. 1449–1463, 24 ago. 2015.

TRAJMAN, A. et al. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: What works and what does not? **European Respiratory Journal**, v. 31, n. 5, p. 1098–1106, 2008.

TRIAL, T. P. Trial of BCG vaccines in South India for tuberculosis prevention tuberculosis prevention trial, Madras. **Journal of Infection**, v. 2, n. 2, p. 190, jun. 1980.

TRICCAS, J. A.; GICQUEL, B. Life on the inside: Probing *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during infection. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 4, p. 311–317, ago. 2000.

TRUNZ, B. B.; FINE, P.; DYE, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. **The Lancet**, v. 367, n. 9517, p. 1173–1180, abr. 2006.

TSENOVA, L. et al. tein Vaccine in a Rabbit Model of Tuberculous Meningitis Evaluation of the Mtb72F Polypro. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2392–2401, 1 abr. 2006.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 785–799, 2006.

UMEZAWA, H. Low-Molecular-Weight Enzyme Inhibitors of Microbial Origin. **Annual Review of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 75–99, out. 1982.

VINCENTELLI, R. et al. Medium-Scale Structural Genomics: Strategies for Protein Expression and Crystallization. **Accounts of Chemical Research**, v. 36, n. 3, p. 165–172, mar. 2003.

VOSS, G. et al. Progress and challenges in TB vaccine development. **F1000Research**, v. 7, n. Mvi, p. 199, 16 fev. 2018.

WEIS, S. E. et al. The Effect of Directly Observed Therapy on the Rates of Drug Resistance and Relapse in Tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 17, p. 1179–1884, 1994.

WHO. Global Tuberculosis Report 2016. **Cdc 2016**, n. Global TB Report 2016, p. 214, 2016.

YEAGER, C. L. et al. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. **Nature**, v. 357, n. 6377, p. 420–422, 4 jun. 1992.

YEN, C.; GREEN, L.; MILLER, C. G. Degradation of intracellular protein in *Salmonella typhimurium* peptidase mutants. **Journal of Molecular Biology**, v. 143, n. 1, p. 21–33, out. 1980.

YORK, N. L.; KANE, C. Caring for the Critically Ill Patient With Tuberculosis. **Dimensions of Critical Care Nursing**, v. 32, n. 1, p. 6–11, 2013.

YUK, J.-M.; JO, E.-K. Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, n. 2, p. 155, 2014.

ZHANG, Z.; HENZEL, W. J. Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. **Protein Science**, v. 13, n. 10, p. 2819–2824, 1 jan. 2009.

ZUMLA, A. et al. Tuberculosis treatment and management-an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 3, n. 3, p. 220–234, 2015.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 21 de março de 2017.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 040/17

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa – IC, Mestrado, Doutorado e outros

II - Identificação:

- ☐ Data de apresentação a CEUA: 17/03/2017
- ☐ Título do projeto: Clonagem e caracterização de proteases secretadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* e seu emprego como alvo de novas drogas e vacinas contra tuberculose
- ☐ Pesquisador Coordenador no SAP/ Unidade: Prof. Dr. André Kipnis- IPTSP/UFV
- ☐ Pesquisador Responsável/ Unidade: Lázaro Moreira Marques Neto- IPTSP/UFV
- ☐ Pesquisadores Participantes: Prof. Dr. André Kipnis, Lázaro Moreira Marques Neto, Ana Paula Junqueira Kipnis
- ☐ Médico Veterinário/CRMV: Daniel Silva Goulart/4632-GO
- ☐ Unidade onde será realizado: IPTSP/UFV

III - Objetivos e justificativa do projeto:

O objetivo é analisar a importância de genes de proteases para virulência e imunogenicidade em micobactéria como alvos de novas drogas e desenvolvimento de vacinas. Justifica-se: Explorando os benefícios a nova tecnologia de vacinas, um número de novos métodos para melhorar ou substituir a vacina BCG existente tem surgido. Nas últimas décadas, tem sido desenvolvido uma grande quantidade de pesquisas relacionadas a prevenção da TB, principalmente com o desenvolvimento de novas vacinas de subunidade proteica ou vacinas micobacterianas vivas. O desenvolvimento de vacinas micobacterianas vivas pode ser realizado por diversas estratégias como, por exemplo, pela atenuação do Mtb ou modificação genética da BCG inserindo/deletando genes importantes para virulência e imunogenicidade ou genes que codificam para outras proteínas que não são expressas por Micobactérias. Vacinas bacterianas vivas teriam a vantagem de que muitos antígenos poderiam agir simultaneamente para induzir uma resposta imune mais eficaz. Além disso, é esperado que essas vacinas permaneçam em tecidos por períodos prolongados, possibilitando ao sistema imune maiores chances de apresentação de antígenos, podendo gerar uma memória imunológica eficiente. No entanto, estas diferentes abordagens são sempre complicadas pelo risco em potencial de aumentar a virulência da cepa vacinal, possível indução de doença mediante situações de imunossupressão e nenhum dos mutantes testados até agora promoveram níveis de proteção maiores do que a BCG em animais. Assim, é necessária uma nova abordagem na recombinação de cepas de BCG, visando genes diferentes envolvidos com a virulência e metabolismo destas bactérias, tornando a vacinação mais segura para pacientes imunocomprometidos, até mesmo aumentando a imunogenicidade e proteção gerada pela BCG. Para o estudo funcional destes genes vêm sendo desenvolvidas técnicas de biologia molecular em várias espécies de bactérias como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Dentre essas técnicas o uso de AES (allelic exchange substrates) para substituição e deleção de regiões do DNA bacteriano é bastante utilizada para o estudo da função de diversos genes. Os AESs contêm regiões homólogas que flanqueiam o gene alvo com uma marca de seleção. A recombinação homóloga facilita

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



a substituição do gene alvo pela marca de seleção, resultando em uma cepa mutante. Uma variedade de estratégias vem sendo usada para esse tipo de manipulação genética em muitas espécies de bactérias, entretanto, esta não é uma tarefa fácil na maioria das micobactérias. Em algumas espécies de micobactérias de crescimento rápido com o *M. smegmatis*, o uso das técnicas tradicionais de mutagenese tem resultados satisfatórios. Porém no Mtb, vários estudos mostram que pode haver muita dificuldade no uso de técnicas simples como substituição gênica. Assim, o desenvolvimento de novas ferramentas para o estudo funcional de genes no Mtb é de grande importância.

IV - Sumário do projeto:

- ❑ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** Os camundongos a serem utilizados neste projeto permitirão a produção de soro contra a proteína recombinante que estaremos estudando e somente com este soro é que a caracterização da proteína será possível. Outras espécies animais poderiam ser usadas, mas sem dúvida os camundongos isogênicos são as mais homogêneas e versáteis e que permitem o melhor rendimento com um número reduzido de animais, sem contar que são animais pequenos e ocupam pouco espaço e sua manutenção é mais simples se compararmos com ratos e coelhos e permitem avaliar a resposta imunológica. Não existe método alternativo, que não o animal e que seja economicamente viável para produção de soro. Adicionalmente, usaremos os camundongos para avaliar a resposta imunológica de uma infecção por bactéria, que até o momento não pode ser reproduzida/avaliada por modelos que não animal. Igualmente camundongos. Experimentos usando camundongos isogênicos tem a vantagem de representarem um modelo animal muito mais homogêneo e consequentemente diminuem as variações dos resultados experimentais. Diversos estudos já foram feitos com relação ao erro alfa de experimentos que envolvem infecções de camundongos isogênicos com micobactéria e o número de animais mínimo que deve ser composto os grupos de pesquisa para conseguir ter a significância estatística é 5 animais por grupo. Nós temos alguns grupos com 6 animais em nossos experimentos porque o desenho necessita que usemos um animal no dia 1 de infecção.
- ❑ **Prevê Projeto Piloto:** Não.
- ❑ **Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57Bl/6, sendo 3 grupos: produção de soro – 18 animais; virulência das cepas knock out: 60 animais, proteção vacinal: 60 animais. **Total: 138 animais.**
- ❑ **Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57Bl/6, fêmeas, 25 gramas, de 3 a 4 semanas.
- ❑ **Fonte de obtenção do animal:** Biotério do IPTSP/UFG. Se necessário compraremos do Biotério CEMIB-UNICAMP.
- ❑ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Os animais serão mantidos em sala com dimensão de 10 metros quadrados, contendo 2 estantes ventiladas, 1 fluxo laminar classe IIB2, com controle de iluminação 12/12 horas. Controle de ventilação e temperatura com ar condicionado. Sem controle de umidade. Estarão em gaiolas de 25 cm (largura) x 40 cm (comprimento) x 25 cm (altura) e acondicionados em estantes ventiladas com trocas constantes de ar, filtrado através de filtros HEPA (Obs., as estantes ventiladas possuem filtros HEPA de entrada e saída) em número máximo de 6 animais por caixa. A cama é de maravalha de pinho que é autoclavada previamente e trocada 2 vezes por semana. Os camundongos receberão ração peletizada formulada para resistir a

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



esterilização feita previamente ao fornecimento ad libitum para os animais. A água filtrada, acidificada com ácido clorídrico e autoclavada também é fornecida ad libitum para os animais

- ❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Os pesquisadores utilizarão cepas de *Mycobacterium tuberculosis* por via intravenosa uma única vez na dose de 5×10^4 CFU/animal. Informa que tem potencial zoonótico, mas possui vacina BCG e tratamento eficaz. Os riscos aos pesquisadores serão minimizados, pois para entrar na sala Vacinômica é necessário trocar de roupa na antessala limpa (jaleco cirúrgico, sapatos internos, calçar propés, touca e máscara N95- específica para trabalhar com agentes infecciosos transmissíveis pelo ar), luvas cirúrgicas aderidas ao jaleco por fita crepe e não portar nenhum adereço (brinco, celular e etc). Após a entrada na sala Vacinômica, um par de luvas será calçado por cima da luva anterior. As roupas de uso interno são retiradas antes da entrada na ante-sala limpa, acondicionadas em sacos de autoclave juntamente com as luvas externas, máscaras, propés e toucas, que após fechados serão acondicionados novamente em saco de autoclavagem limpo, e nesta etapa as luvas internas serão retiradas e embaladas em lixo próprio para também serem autoclavadas. Por fim, todo o material a ser descartado estará acondicionado nos devidos sacos para autoclavagem os quais serão lacrados com fita e descontaminados externamente com formol a 5%. Após essa descontaminação, o material será acondicionado em mais um saco já na ante-sala limpa, antes de ser encaminhado para autoclavagem. Esta prática refere-se ao acondicionamento duplo de qualquer material possivelmente contaminado com *M. tuberculosis*. Toda a manipulação dos animais bem como do agente infeccioso *M. tuberculosis* (H37Rv), será realizada dentro de fluxo laminar de nível III de biossegurança (Airstream® Class III Biosafety Cabinet Esco- Airstream Class III biohazard safety cabinets offer the highest level of product, operator and environmental protection from infectious/biohazardous aerosols and are suitable for microbiological work with agents assigned to biological safety levels 1, 2, 3, or 4), presente no biotério de experimentação Vacinômica. Explicando melhor, esta cabine de fluxo laminar contém filtros HEPA que filtram todo o ar que circula dentro da cabine, e como os isoladores serão apenas abertos dentro do fluxo laminar, a contaminação ambiental é mínima. Portanto, o risco para os trabalhadores de contaminação com o animal infectado será minimizado. Os pesquisadores autorizados envolvidos na manipulação dos animais são treinados e somente os mesmos têm acesso permitido ao laboratório de Vacinômica. Estes pesquisadores são vacinados com BCG e uma vez por ano são submetidos ao teste de PPD ou Prova tuberculínica para avaliar se houve ou não contaminação pelo agente infeccioso. Indivíduos cujo PPD for positivo, antes do trabalho no referido laboratório serão encaminhados uma vez por ano ao Hospital das Clínicas, Departamento de Clínica Médica para realização de exame radiológico pulmonar e acompanhamento pelo setor de Tisiologia. Para manipulação, transporte e infecção dos animais com *M. tuberculosis* (H37Rv), somente a Dr. Ana Paula Junqueira Kipnis realizará estas etapas. A mesma foi altamente treinada na Colorado State University, onde passou quatro anos em treinamento para trabalhar com micobactérias. Além do mais, a Dra Ana Paula Junqueira Kipnis foi recentemente treinada pelo CVMBS do Albert Einstein College of Medicine, New York para manipular geneticamente micobactérias, assim como animais infectados pelo agente. O transporte do agente infeccioso do freezer -80°C até o biotério de experimentação será realizado em recipientes específicos. Um recipiente que protege o tubo contendo a bactéria e um segundo recipiente de transporte que protege estes dois tubos, bem como o manipulador. Caso ocorra a queda deste sistema, o agente não é disseminado pelo ambiente, haja vista que ele está protegido por recipientes duplos. Quando da necessidade do transporte deste material infeccioso, calendário apropriado será esquematizado para se evitar o alto fluxo de pessoas nos corredores entre o Laboratório de Bacteriologia Molecular e o biotério e a sala Vacinômica, reduzindo-se os riscos para os transeuntes. Antes de serem infectados com Mtb, os animais serão trocados e, após o procedimento de infecção, as gaiolas contendo os camundongos infectados permanecerão dentro do fluxo laminar sob luz ultravioleta por 15 minutos (ORDWAY & ORME. Animal Models of Mycobacteria Infection. Current Protocols in Immunology, 2011. DOI: 10.1002/0471142735.im1905s94. Item 25), de acordo com protocolo já estabelecido na literatura para infecção de camundongos com micobactérias. Decorrido este prazo, os animais serão fechados nos isoladores, e estes serão descontaminados externamente com solução de hipoclorito a 10% e transferidos para as estantes ventiladas. Os animais permanecerão nas estantes sem manipulação até a próxima troca (serão apenas observados externamente) que ocorrerá em intervalos de uma semana. A água, os alimentos oferecidos aos animais infectados, a maravalha e todo e qualquer material utilizado na manipulação dos animais passarão por processo de autoclavagem antes de

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



serem descartados. O trabalho com os camundongos sempre oferece risco aos pesquisadores/alunos e, em caso de mordedura por esses animais, é de conhecimento de todos que se deve lavar e desinfetar o local e relatar o ocorrido aos responsáveis pelo biotério, bem como anotar o caso no livro de ocorrências. Existe a possibilidade de risco psicológico traumático aos pesquisadores que realizarão a eutanásia. Contudo, o pessoal autorizado

- ❑ **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa: Produção de anticorpo:** As enzimas recombinantes purificadas serão utilizadas para a imunização subcutânea de camundongos. Serão utilizados 50 µg de cada proteína por animal, em uma primeira imunização com 50% (v/v) de adjuvante de Freund completo, seguida por dois reforços a cada 14 dias com 50 µg de proteína e 50% (v/v) de adjuvante de Freund incompleto. Para cada soro a ser produzido, serão utilizados 6 camundongos C57Bl/6, num total de 18 animais. O sangue dos animais será coletado 10 dias após a última imunização, quando os mesmos serão eutanasiados por deslocamento cervical, seu sangue coletado do plexo axilar e o soro separado e estocado. **Avaliação da influência das cepas nocautes na virulência em modelo animal:** As três cepas de *M. tuberculosis* nocauteadas a serem desenvolvidas neste projeto e a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv serão cultivadas em meio 7H9 suplementado com OADC, contendo tween 80 a 0.05% até a fase log de crescimento, e em seguida serão aliquotadas e mantidas no freezer -80°C. O estoque será plaqueado e quantificado um mês após o congelamento. Diluições centesimais do estoque serão plaqueadas em meio 7H11 suplementado com OADC e as unidades formadoras de colônias serão contadas. No dia da infecção, o inóculo será diluído em PBS tween 80 a 0.05% na concentração de 10⁵ CFU/mL, então será administrado 100 µL deste pela via intravenosa pelo plexo orbital, sendo inoculado, portanto 10⁴ CFU/animal. Cada grupo será composto por 6 camundongos C57Bl/6. Um dia após a infecção, será eutanasiado um camundongo por grupo para análise da carga bacteriana pulmonar. Com 30 dias de infecção, os camundongos serão eutanasiados para análise da carga bacilar e histopatológico. **Determinação da carga bacilar no pulmão:** Para avaliar a eficácia protetora das vacinas, após 60 dias de infecção, camundongos desafiados com Mtb serão eutanasiados, para coleta dos lobos pulmonares, os quais serão homogeneizados e plaqueados em meio Middlebrook 7H11 suplementado com OADC para determinação da carga bacilar a partir da contagem de CFU, após 21 dias de incubação a 37°C. **3 Estudo de vacinação com as proteínas recombinantes:** Camundongos receberão três imunizações subcutânea com as proteínas recombinantes purificadas em intervalo de 21 dias entre elas ou uma imunização em dose única com as cepas nocautes. Cada animal será imunizado com 20 µg de adjuvante mais 20 µg da proteína recombinante purificada. Serão compostos 3 grupos de 6 animais cada, um grupo para cada proteína. O sangue dos camundongos imunizados que receberam as imunizações, será coletado 15 dias após a última imunização para obtenção do soro. Serão realizados dois a três experimentos independentes para confirmação dos resultados obtidos. **Obtenção das células do baço:** Para obtenção das células, o baço de três camundongos de cada grupo será coletado após 45 dias da última imunização, passado em filtro de 70 µm para células.
- ❑ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** Os animais serão mantidos e manejados de acordo com os critérios do CONCEA. Os animais permanecerão em microisoladores que propiciam um ambiente livre de patógenos, com água e ração ad libitum. Adicionalmente, estes microisoladores são acoplados a cabines reguladas para gerar um ambiente/habitat com condições que mimetizam o natural destes animais. Todos os procedimentos invasivos bem como a eutanásia dos animais serão realizados ao final do experimento para coleta de órgãos e posterior análise dos mesmos. Durante todo o ensaio os animais serão observados cuidadosamente e, caso algum

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



deles apresente alguma reação adversa e/ou desconforto provocados por algum dos procedimentos previstos neste projeto, os animais receberão tratamentos quando for necessário, porém procederemos com a eutanásia deste(s) animal(is), que será realizada por deslocamento cervical respeitando a resolução 100 do CFMV de 11 de maio de 2012. A decisão de se realizar a eutanásia de animais que apresentarem algum desconforto/reações adversas ao invés de trata-los, se dá ao fato de que em tais situações, por mais que se possa reverter o quadro de desconforto/sofrimento, ele com certeza invalida a interpretação de dados a serem obtidos e, portanto, não justifica realizar tal tratamento. Ao final dos experimentos os animais serão sacrificados de forma ética por deslocamento cervical (respeitando a mesma resolução citada anteriormente), descontaminados em autoclave e incinerados posteriormente.

- ☐ Grau de invasividade: 1
- ☐ Material utilizado em outros projetos: não.
- ☐ Método de eutanásia: Deslocamento cervical.
- ☐ Destino do animal: Armazenamento em freezer no biotério IPTSP para posterior incineração da Escola de Veterinária da UFG.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ☐ Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG: Os documentos estão de acordo com o solicitado pela CEUA/UFG.
- ☐ Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores: Estão de acordo com as exigências do CONCEA.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até 31 de maio de 2020.

VII - Data da reunião: 03/04/17.

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP: 74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com

Anexo 2 – Manuscrito a ser submetido a revista do IPTSP.

Title: Proteases associated with *Mycobacterium tuberculosis* infection

Authors: Andrade R.G¹, Junqueira-Kipnis¹ A.P, Kipnis A¹.

1-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil

Abstract

The tuberculosis is a contagious infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, an obligate intracellular bacterium that relies on infection and spreading host to host to survive. According to evolution, the pathogen developed virulence mechanisms to evade the host's immune system and endure many factors, such as cellular stress for example. One of the strategies used by pathogens to achieve success in their infection is the production of proteases, which are enzymes that cleave peptide bonds between the amino acids in a protein. They are widely distributed in the environment and have different roles that are considered important to the bacteria biological cycle. This review presents the literature searched between 2014 and 2017 that addressed the roles of the proteases involved in the *Mycobacterium tuberculosis* infection.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, virulence, infection, protease

• Introduction

The peptide bond is the most important covalent bond that unites the amino acids to peptides and proteins formation. These peptide bonds can be hydrolyzed by enzymes called proteases or proteinases comprising a large group named hydrolases (Rani et al., 2007). The proteases possess the capability to selectively modify proteins by cleavage, and consequently activate molecules such as zymogenic enzyme forms, blood coagulation proteins or release secreted proteins during protein transport through membranes. The study of these proteolytic enzymes is valued because of its uses in various forms of medical therapies and by its importance as lab reagents, clinic and industry processes in addition to the understanding of the pathogenesis during infection (Badgujar & Mahajan., 2009).