

MARIÂNGELA BORGES RIBEIRO DA SILVA



**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
HANSENÍASE**

CURITIBA

2013

MARIÂNGELA BORGES RIBEIRO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
HANSENÍASE**

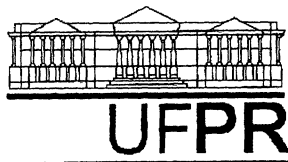
Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos Biotecnológicos, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná. Área de concentração: Saúde Humana e Animal.

Profa. Orientadora: Dra. Juliana Ferreira de Moura.

Profa. Coorientadora: Dra. Larissa Magalhães Alvarenga.

CURITIBA

2013



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e seis dias do mês de abril de 2013, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, segundo andar do prédio da Administração, no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Septuagésima Sétima Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Prof Dr Rilton Alves de Freitas (UFPR), Profª Drª Francine Valenga (PUCPR), e Profª Drª Juliana Ferreira de Moura (UFPR- orientadora da dissertação).

Às 9h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Mariângela Borges Ribeiro da Silva** a fazer a apresentação da dissertação intitulada: “**Desenvolvimento de biossensor para diagnóstico da hanseníase**”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Prof Dr Rilton Alves de Freitas, Profª Drª Francine Valenga, e Profª Drª Juliana Ferreira de Moura declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 26 de Abril de 2013.

Prof Dr Rilton Alves de Freitas

Profª Drª Francine Valenga

Profª Drª Juliana Ferreira de Moura

Ao meu esposo, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho e à minha filha linda quem tem sido o motivo da minha evolução neste planeta.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pelas oportunidades, por ter-me permitido chegar até aqui e pela certeza de Sua presença ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Aristides Fausto Borges e Iara Terezinha Borges, pelo apoio e torcida pela vitória.

À professora Dra. Juliana Ferreira de Moura, pela orientação e introdução ao caminho da ciência, por me conduzir durante o período deste trabalho, sempre me incentivando e aguçando a minha vontade de aprender. Agradeço pelos ensinamentos, atenção, infinita paciência, dedicação e incentivo a nunca desistir.

A professora Dra. Larissa Magalhães Alvarenga, pela atenção dedicada desde sempre. Agradeço pela receptividade, dicas e contribuições certamente importantes.

A colaboração imensa do Prof. Rilton Alves de Freitas pela ajuda científica e apoio a pesquisa.

Ao Dr. João Carlos Minozzo agradeço pelos conhecimentos transmitidos, pela generosidade, amizade e por sempre estar disposto a ajudar.

Ao Dr. Sérgio Túlio Stingen pela atenção a proposta e aceitação de que as imunizações fossem realizadas nas dependências do CPPI.

Aos colegas de laboratório, Juliani Ramada, Rafaela Fogaça, Rodrigo Madlener de Almeida, Luiz Felipe Minozzo, Alessandra Becker, Camila Zanata, Carine Celeira e Lima, Fernanda Schadler, Stephani de Moraes, Isabel Yamanaka, e Sabrina Silva pela satisfação em conhecê-los, pela amizade e pela convivência ao longo destes anos. Espero, sinceramente, poder estar juntos por mais tempo. Certamente vocês tornaram os meus dias mais prazerosos.

Aos colegas do laboratório Biopol, Caroline Novak, Renata da Silva, Guilherme Picheth, Gabriel Kaminski, Marco Aurélio Woehl, Francine Valenga, Clayton Fernandes de Souza, Cleverton Luiz Pirich.

A Professora Doutora Maria Rita Sierakowski, pela abertura e empréstimo de equipamentos do laboratório de Biopolímeros do Departamento da Química.

À Marilde Lermen por ter ajudado no processo de obtenção de amostras, obrigada pelo carinho e dedicação.

À Veroni Pansera representante da Secretaria Municipal de saúde de Guarantã do Norte – MT, pela participação e apoio na obtenção das amostras e por acreditar no projeto.

À Professora Daniele Chaves Moreira pela ajuda de envio do peptídeo, a sua ajuda foi de fundamental importância para realização deste trabalho.

Aos pacientes do ambulatório de Hanseníase da Secretaria Municipal de Saúde de Guarantã do Norte – MT, do Hospital Regional da Lapa e aos doadores de sangue, obrigada imensamente pela participação na pesquisa, e por acreditarem no projeto.

Ao Hemepar pelo fornecimento de amostras e apoio ao projeto. Agradeço também aos colegas de trabalho que me apoiaram durante este período de estudo.

Aos professores do programa de pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos, bem como à coordenadora Professora Dra. Luciana P. de Souza Vandenberghe, pelos conhecimentos transmitidos.

“Quando se tem uma meta, o que era obstáculo começa a ser uma das etapas
do plano.”

Gerhard Erich Boehme

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa negligenciada causada pelo *Mycobacterium leprae* que acomete a pele e os nervos periféricos. Dados da Coordenação Estadual do Programa de Vigilância e Controle da Hanseníase apontam que, no Brasil, são em média 46.270 novos casos por ano, colocando o Brasil no segundo país com maior índice de prevalência. O que mais preocupa é a crescente incidência em menores de 15 anos (8,4%) o que indica a existência de adultos portadores do *M. leprae* disseminando a doença. Atualmente o diagnóstico da hanseníase é baseado em sinais e sintomas clínicos acompanhados, ocasionalmente, por exame baciloscópico. O teste sorológico disponível é baseado na detecção de anticorpos anti-PGL-I obtido a partir do próprio bacilo, o qual não é cultivável *in vitro* sendo obtido a partir da infecção de tatus. Em estudos realizados anteriormente, peptídeos selecionados por *Phage Display* foram capazes de identificar pacientes hansenianos por ELISA. Dando continuidade a esse trabalho, um desses peptídeos foi modificado em sua porção C-terminal com um *linker* espaçador SGSG e um resíduo de cisteína. Após síntese química, o peptídeo otimizado foi utilizado na padronização de um teste de ELISA qual se obteve sensibilidade de 95% de sensibilidade e 96% de especificidade. Constatada a sua reatividade após as modificações realizadas, um protocolo para implementação de um biossensor para diagnóstico da hanseníase foi desenvolvido utilizando-se microbalança de cristal de quartzo (QCM). As etapas de limpeza do sensor, imobilização do ligante ao sensor, preparação da amostra, procedimento de medição e avaliação do sensorgrama, fazem parte do fluxo de análise da QCM. Após medições de QCM obteve-se diferença de frequência para amostras positivas para hanseníase de 854 Hz, enquanto que para as amostras negativas, apenas 4 Hz. A sensibilização do sensor foi corroborada pelas imagens de MFA, que mostraram diferença de topografia do sensor após adsorção do peptídeo. O uso da QCM tem a vantagem da simplicidade do procedimento, resultado imediato, ausência de moléculas marcadoras além da possibilidade de miniaturização do teste. O desenvolvimento de imunoenaios que permitam o diagnóstico precoce da hanseníase é extremamente desejado, pois pacientes diagnosticados e tratados tardiamente podem apresentar incapacidades físicas e deformidades que podem levar a diminuição da capacidade de trabalho, limitação da vida social e problemas psicológicos e, mais importante, o diagnóstico precoce interrompe a transmissão, fazendo com que seja possível a eliminação da doença. Portanto, o biossensor aqui desenvolvido é um passo promissor para atingir esses objetivos.

Palavras-chave: hanseníase, biossensor, QCM, peptídeo sintético, imunodiagnóstico.

ABSTRACT

Leprosy is a neglected infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that affects the skin and peripheral nerves. Data Coordination Program State Surveillance and Control of Leprosy show that, in Brazil, are on average 46.270 new cases per year, putting Brazil in the second country with the highest prevalence. Of more concern is the increasing incidence in children under 15 years (8.4%), which indicates the presence of adults with *M. leprae* spreading the disease. Currently the diagnosis of leprosy is based on clinical signs and symptoms accompanied occasionally by smear. Serologic testing available is based on detection of anti-PGL-I obtained from the bacillus itself, which is not cultivable in vitro being obtained from the infection of armadillos. In previous studies, peptides selected by *phage display* were able to identify leprosy patients by ELISA. Continuing this work, one of these peptides was modified in their C-terminal portion with a linker SGS₂G spacer and a cysteine residue. After chemical synthesis, the peptide was optimized used in a standardized ELISA test which had a sensitivity of 95% sensitivity and 96% specificity. Found their reactivity after the changes made, a protocol for implementation of a biosensor for the diagnosis of leprosy was developed using quartz crystal microbalance (QCM). The steps of cleaning the sensor, the sensor ligand immobilization, sample preparation, measurement and evaluation procedure of sensorgram, part of the flow of QCM analysis. After measurements obtained QCM frequency difference samples positive for leprosy 854 Hz, while for negative samples, only 4 Hz sensitization of the sensor was confirmed by the images of AFM, which showed differences in topography of the sensor after adsorption peptide. The use of QCM has the advantage of simplicity of the procedure, immediate result, absence of marker molecules beyond the possibility of miniaturization of the test. The development of immunoassays that allow early diagnosis of leprosy is extremely desirable because patients diagnosed and treated late may have physical disabilities and deformities that may lead to decreased work capacity, restricted social life and psychological problems and, more importantly, Early diagnosis stops transmission, making it possible to eliminate the disease. Therefore, the biosensor developed here is a promising step toward achieving these goals.

Keywords: leprosy, biosensor, QCM, synthetic peptide, immunodiagnostic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: BACILO ÁLCOOL ÁCIDO RESISTENTE COM CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>M. LEPRAE</i>	20
FIGURA 2: COEFICIENTE DE PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE POR REGIÃO.....	23
FIGURA 3: ESQUEMA APRESENTADO PARA O ELISA INDIRETO.....	28
FIGURA 4: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO FUNCIONAMENTO DA MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO.....	29
FIGURA 5: ILUSTRAÇÃO DE UMA ANÁLISE POR QCM EM TEMPO REAL.....	31
FIGURA 6: ILUSTRAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO PARA UMA GOTA MOLHANTE SOBRE UMA SUPERFÍCIE SÓLIDA.....	33
FIGURA 7: DIAGRAMA REPRESENTATIVO DO FUNCIONAMENTO DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.....	34
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MODOS DE OPERAÇÃO EM MFA.....	34
FIGURA 9: ESQUEMATIZAÇÃO DE BIOSSENSOR.....	37
FIGURA 10: REATIVIDADE DO SORO POLICLONAL DE COELHO FRENTE AO PEPTÍDEO POR ELISA.....	44
FIGURA 11: REAÇÃO DE DOT BLOT DO PEPTÍDEO + KLH E SOMENTE KLH FRENTE A DIFERENTES SOROS.....	45
FIGURA 12: REATIVIDADE DE AMOSTRAS DE SOROS NEGATIVOS E POSITIVOS PARA HANSENÍASE FRENTE AO PEPTÍDEO CARREADO A PROTEÍNA KLH E APENAS A PROTEÍNA CARREADORA KLH.....	46
FIGURA 13: REATIVIDADE POR ELISA DE SOROS COM DIFERENTES TÍTULOS FRENTE AO PEPTÍDEO NÃO OTIMIZADO.....	46
FIGURA 14: REATIVIDADE POR ELISA DE SOROS COM DIFERENTES TÍTULOS FRENTE AO PEPTÍDEO OTIMIZADO.....	47
FIGURA 15: RESULTADO DO ELISA DE TODOS OS SOROS DOS PACIENTES COLETADOS FRENTE AO PEPTÍDEO OTIMIZADO.....	48

FIGURA 16: GRÁFICO DA CORRELAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA X CLASSIFICAÇÃO ADOTADA DE ACORDO COM O VALOR OBTIDO DE ABSORVÂNCIA.	48
FIGURA 17: TESTE DE REAÇÃO CRUZADA PARA A TÉCNICA DE ELISA COM REALIZAÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA TUBERCULOSE.....	49
FIGURA 18: IMAGEM TOPOGRÁFICA DE FASE OBTIDA PELO MFA.....	51
FIGURA 19: COMPORTAMENTO DO SENSOR FRENTE À ADSORÇÃO DO PEPTÍDEO AO SENSOR DE CRISTAL.....	52
FIGURA 20: COMPORTAMENTO DO SENSOR FRENTE À AMOSTRA POSITIVA PARA HANSENÍASE.....	53
FIGURA 21: COMPORTAMENTO DO SENSOR FRENTE À AMOSTRA NEGATIVA. .	54
FIGURA 22: COMPORTAMENTO DO SENSOR FRENTE À AMOSTRA DE TUBERCULOSE	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- COEFICIENTE DE PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE EM MENORES, POR REGIÃO, 2011.....	22
TABELA 2 – INCIDÊNCIA DA HANSENÍASE NO MUNDO	23
TABELA 3 - AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE PARA O TESTE DE ELISA INDIRETO COM EMPREGO DO PEPTÍDEO OTIMIZADO.....	49
TABELA 4 – CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS FORMADOS POR SEPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO TESTE DE ELISA.....	50
TABELA 5 – DIFERENÇAS ANALÍTICAS ENTRE O PEPTÍDEO OTIMIZADO E O PEPTÍDEO NÃO OTIMIZADO.....	51
TABELA 6 – MÉDIA \pm ERRO PADRÃO PARA MEDIDAS DE RUGOSIDADE REALIZADAS A PARTIR TOPOGRAFIA DO MFA.....	56
TABELA 7 - MÉDIA \pm ERRO PADRÃO PARA MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO REALIZADAS A PARTIR DA TÉCNICA DE TENSIOMETRIA.....	56
TABELA 8 – CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA E CLASSIFICAÇÃO SOROLÓGICA ADOTADA PELA ABSORVÂNCIA ADOTADA NO TESTE DE ELISA..	79

LISTA DE SIGLAS

QCM – Microbalança de Cristal de Quartzo

ELISA – Ensaio imunoenzimático.

CPPI – Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

BIOPOL – Laboratório de Biopolímeros

LIMQ – Laboratório de Imunoquímicos

MFA – Microscopia de Força Atômica

MB – Multibacilar

PB – Paucibacilar

INPI – Instituto Nacional de Produção Industrial

SMCC – do inglês Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate

DMF – Dimetilformina

BSA – Albumina bovina sérica

KLH – Hemoscianina

PBS – Tampão fosfato

OPD – do inglês orto phenylenediamine

PGL-I – Glicolípídeo fenólico I

RMS – Rugosidade

IgG – Imunoglobulina G

DAB – tetracloridrato de 3,3 diaminobenzidina.

U.V. – luz ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 HISTÓRIA DA HANSENÍASE.....	19
1.2 HANSENÍASE.....	20
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE.....	21
2 JUSTIFICATIVA	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 DIAGNÓSTICO PARA HANSENÍASE.....	24
3.2 TÉCNICA <i>PHAGE DISPLAY</i>	25
3.3 OTIMIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	27
3.4 ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS – ELISA.....	28
3.5 MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (QCM).....	29
3.6 ÂNGULO DE CONTATO.....	32
3.7 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA).....	33
3.8 RUGOSIDADE (RMS).....	35
3.9 DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES PARA O DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA HANSENÍASE.....	36
4 OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5 MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	38
5.1.1 Amostras de pacientes com Hanseníase.....	38
5.1.2 Amostras de doadores de sangue – Controle negativo.....	38
5.1.3 Amostras de pacientes com Tuberculose – Teste de reação cruzada.....	39
5.2 CONJUGAÇÃO DO PEPTÍDEO A PROTEÍNA CARREADORA	39
5.2.1 KLH via SMCC para imunensaio.....	39
5.2.2 BSA via Glutaraldeído para imunização.....	39
5.3 IMUNIZAÇÃO DE ANIMAL PARA OBTENÇÃO DE	

ANTICORPOS POLICLONAIS.....	40
5.4 TÉCNICA DE ELISA INDIRETO.....	40
5.4.1 Soro humano.....	40
5.4.2 Soro animal (coelho).....	41
5.5 TÉCNICA DE <i>DOT BLOT</i>	41
5.6 OTIMIZAÇÃO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO.....	42
5.7 PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO DO QCM PARA AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	42
5.7.1 Procedimento de limpeza do sensor.....	42
5.7.2 Procedimento de adsorção do peptídeo ao sensor.....	43
5.7.3 Bloqueio do sensor.....	43
5.7.4 Montagem do esquema de utilização do QCM.....	43
5.8 TÉCNICA DE UTILIZAÇÃO DO MFA PARA AVALIAÇÃO DE RUGOSIDADE DA SUPERFÍCIE DO SENSOR.....	43
5.9 TÉCNICA DE TENSÍOMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO.....	44
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
7. RESULTADOS.....	44
7.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS.....	44
7.2 DOT BLOT PARA AMOSTRAS EM ANÁLISE.....	45
7.3 TÉCNICA DE ELISA INDIRETO PAR AMOSTRAS EM ANÁLISE.....	45
7.3.1 Teste de ELISA para análise de reação cruzada com a proteína carreadora KLH.....	45
7.3.2 Análise de amostras por ELISA com peptídeo não otimizado.....	46
7.3.3 Análise de amostras por ELISA com o peptídeo otimizado.....	47
7.3.4 Análise de amostras de pacientes com diagnóstico de tuberculose para avaliação de reação cruzada com o peptídeo otimizado por ELISA.....	49
7.4 DETERMINAÇÕES DE SENSIBILIDADE E ESPEDIFICIDADE.....	49
7.5 CLASSIFICAÇÕES DOS GRUPOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE DE ACORDO COM A ABSORVÂNCIA NO TESTE DE ELISA.....	50
7.6 DIFERENÇAS ANALÍTICS ENTRE O PEPTÍDEO NÃO OTIMIZADO E O PEPTÍDEO OTIMIZADO.....	50

7.7 ANÁLISES DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) PARA O SUBSTRATO DO BIOSSENSOR.....	51
7.8 ANÁLISES DE QCM.....	52
7.8.1 Adsorção do peptídeo otimizado a superfície do cristal.....	52
7.8.2 Análise da amostra positiva para hanseníase.....	53
7.8.3 Análise da amostra negativa para hanseníase.....	54
7.8.4 Análise de amostra positiva para tuberculose.....	55
7.9 CÁLCULOS DE RUGOSIDADE DA SUPERFÍCIE DO SENSOR FRENTE A DIFERENTES ETAPAS.....	56
7.10 CÁLCULOS DO ÂNGULO DE CONTATO DA SUPERFÍCIE DO SENSOR FRENTE A DIFERENTES ETAPAS.....	56
8. DISCUSSÃO.....	56
9. CONCLUSÃO.....	62
10. PERSPECTIVAS.....	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS.....	79

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma das doenças mais antigas já descritas na literatura, tem achados de até 5000 anos da sua descoberta.

Trata-se de uma doença crônica granulomatosa que afeta principalmente pele e nervos periféricos. Em 1873, foi descrito por Gerhard Hansen o agente etiológico da hanseníase, um bacilo álcool ácido resistente denominado de *Mycobacterium leprae* com características de crescimento lento e necessidade de temperaturas baixas. Esse bacilo tem alta capacidade de infectividade, porém baixa patogenicidade, propriedades estas que dependem da sua relação com o hospedeiro e do grau de endemicidade do meio.

A transmissão da hanseníase se dá pelo contato íntimo e prolongado de indivíduo suscetível com paciente bacilífero sem tratamento, através da inalação de bacilos. A melhor forma de cessar a transmissão é o diagnóstico e tratamento precoce.

No Brasil, cerca de 33.000 novos casos são detectados a cada ano sendo que 7% deles são em menores de 15 anos.

O Brasil ocupa o segundo lugar em número absoluto de casos, atrás apenas da Índia, sendo o único país que não atingiu a meta de eliminação da doença como problema de saúde pública, definida pela prevalência menor que um caso a cada 10.000 habitantes.

É necessário intensificar as ações de vigilância da hanseníase, voltadas especialmente à maior efetividade no diagnóstico e tratamento da doença, especialmente nas regiões que apresentam maior concentração de casos no país.

1.1 HISTÓRIA DA HANSENÍASE

A hanseníase, amplamente conhecida pela designação de lepra ou doença de Hansen, é uma das mais antigas doenças que já acometeram o homem. Conhecida há mais de quatro mil anos na Índia, China e Japão, já existia no Egito quatro mil e trezentos anos antes de Cristo, segundo um papiro da época de Ramsés II (SERVIÇO NACIONAL DE LEPROSA, 1960).

Há evidências objetivas da doença em esqueletos descobertos no Egito, datando do segundo século antes de Cristo (BRASIL, 1989).

Citações sobre a doença também são feitas na Bíblia Sagrada. Encontra-se, nos capítulos 13 e 14 do livro Levítico, o termo hebreu *tsaraath* ou *saraath* para designar afecções impuras. Estes termos foram traduzidos como lepra em vários idiomas (BÍBLIA SAGRADA, 1992).

Nas Américas, a hanseníase deve ter chegado entre os séculos XVI e XVII com os colonizadores, pois não há evidências da existência da moléstia entre as tribos indígenas do Novo Mundo (OPROMOLLA, 1981; 2000). A grande expansão da hanseníase nas Américas se deu devido ao tráfico de escravos (SERVIÇO NACIONAL DE LEPRA, 1960).

Na atualidade, todos os países sul-americanos têm notificações de hanseníase, sendo o Brasil o que apresenta as mais altas incidência e prevalência desta doença neste continente (OPS/OMS, 2001).

1.2 HANSENÍASE

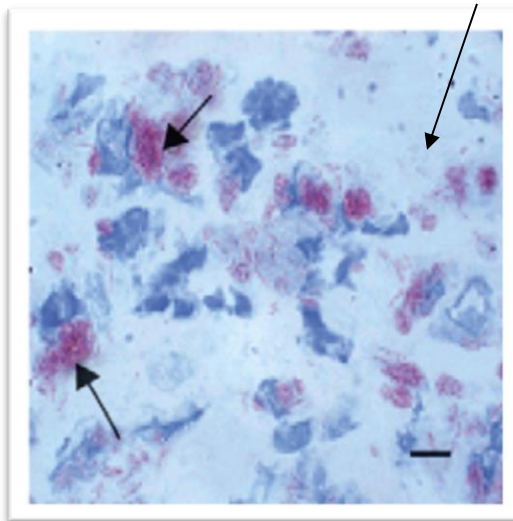


FIGURA 1: BÁCULO ÁLCOOL ÁCIDO RESISTENTE COM CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Mycobacterium leprae*. Microscopia óptica de exsudado de lesão de paciente infectado em aumento de 100x em que o bacilo está identificado pela seta.

Fonte: Adaptado LIMA *et al.*, 2005

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica granulomatosa causada pelo bacilo (Figura 1) *Mycobacterium leprae* que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos, podendo também causar danos em membranas e mucosas especialmente a mucosa nasal e em casos avançados, outros tecidos, incluindo: músculos do testículo, endotélio capilar, fígado, baço, e a medula óssea (DESIKAN; JOB, 1968).

Embora a hanseníase não seja fatal, 20-30% dos pacientes com infecções não tratadas ou negligenciados, desenvolvem incapacidades ou deformidades de mãos e pés. A sequela dessas deformidades e o estigma social tem sido historicamente associada ao suicídio, comum causa de morte entre os indivíduos infectados, particularmente durante os períodos de exacerbação das lesões (OMS, 1988).

Uma característica da doença que tem intrigado os médicos imunologistas é a variedade clínica e manifestações que podem ser encontradas. Estes variam de uma única lesão sem bacilos detectáveis ou até múltiplas lesões com grande número de bacilos detectáveis. A variedade de sintomas da doença não está relacionado com a genética da bactéria e sim com a capacidade de resposta imune do hospedeiro (BLOOM; MEHRA, 1984; KAPLAN; COHN, 1986).

A Organização Mundial da Saúde em 1998 introduziu uma classificação clínica que divide os pacientes de acordo com o número de lesões e desta forma orienta o tratamento. Caracteriza-se como Paucibacilar (PB) o paciente que apresenta menos de cinco lesões e possui exame baciloscópico negativo, e como Multibacilar (MB) o paciente que apresenta acima de cinco lesões e exame baciloscópico positivo (MOSCHELLA, 2004).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE

A melhoria das condições de vida e o avanço do conhecimento científico modificaram significativamente o quadro da hanseníase, que atualmente tem tratamento e cura.

No entanto, no Brasil, cerca de 33.000 casos novos são detectados a cada ano, sendo 7% deles em menores de 15 anos. Em 2011 foram registrados 2.420 casos novos de hanseníase em menores de 15 anos, e um coeficiente de detecção desse

grupo etário de 5,2 por 100 mil habitantes (SESSP, 2012), em decorrência de circuitos ativos de transmissão localizados nas áreas mais endêmicas, ou seja, demonstra a força de transmissão recente e a tendência à endemia (Tabela 1).

Tabela 1: COEFICIENTE DE PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE EM MENORES, POR REGIÃO, 2011

Coeficientes de prevalência, detecção geral e em menores de 15 anos de Hanseníase por Região, Brasil 2011							
Região	Prevalência ¹	Parâmetro	Detecção ²	Parâmetro	Casos Novos < 15 anos	Coeficiente < 15 anos ¹	Parâmetro
Região Norte	3,49	Médio	42,65	Hiperendêmico	670	13,34	Hiperendêmico
Região Nordeste	2,35	Médio	26,08	Muito Alto	1.166	8,19	Muito Alto
Região Sudeste	0,61	Baixo	7,42	Médio	278	1,58	Médio
Região Sul	0,44	Baixo	4,99	Médio	20	0,33	Baixo
Região Centro-Oeste	3,75	Médio	40,40	Hiperendêmico	286	8,20	Muito Alto
Brasil	1,54	Médio	17,65	Alto	2.420	5,22	Muito Alto

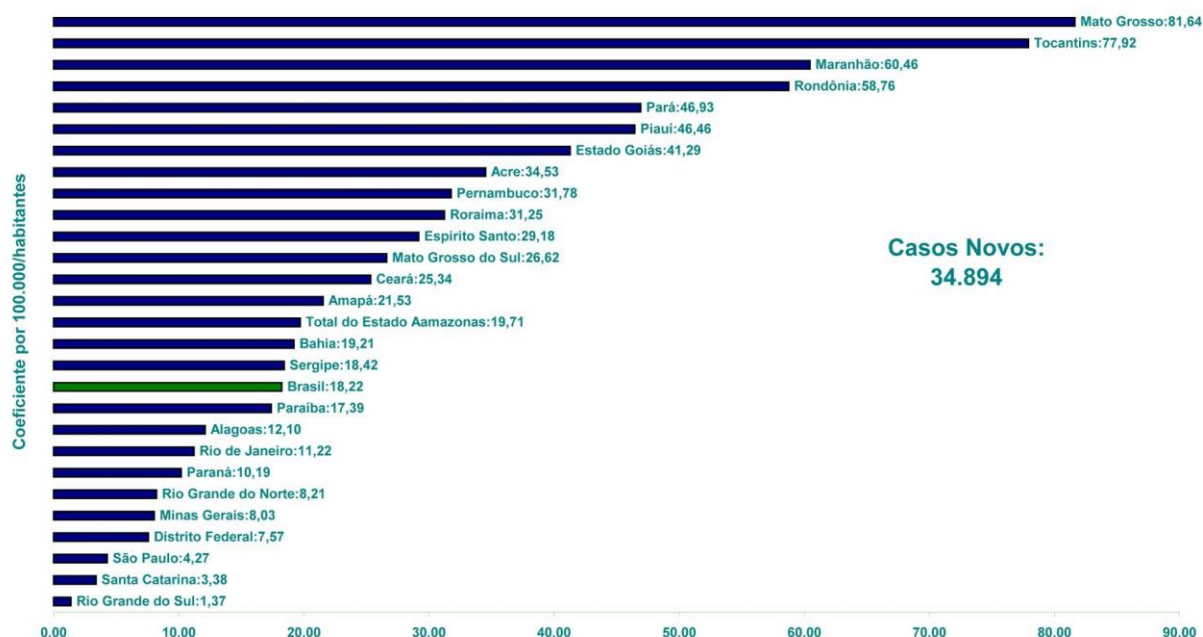
Fonte: Sinan/SVS-MS Legenda: ¹Taxa por 10.000/habitantes ²Taxa por 100.000/habitantes Dados disponíveis em 24/04/2012

Fonte: SESSP, 2012

Em 2011, o Brasil apresentou 1,54 casos para cada 10.000 habitantes, correspondendo a 29.690 casos em tratamento. Neste mesmo ano, foram detectados no Brasil 33.955 casos novos de hanseníase, correspondendo a um coeficiente de detecção geral, de 17,6/100 mil habitantes. No Brasil algumas regiões, demandam intensificação das ações para eliminação da doença, justificadas por um padrão de alta endemicidade. A Organização Mundial da Saúde preconiza um índice de novos casos de 1/10.000 no Brasil. Nos estados do Mato Grosso e Roraima temos índices de 13,73 e 13,47 como mostrados na Figura 2 (BRASIL, 2011).

Em 2011, foram registrados 30.298 novos casos da doença, redução de 15% em comparação a 2010 (34.894 casos). Apesar da queda do número de casos, o país ainda é o segundo país com maior prevalência da doença, ficando atrás somente da Índia, que registra cerca de 130 mil novos casos por ano como indicado na Tabela 2. A meta das Nações Unidas, de menos de um caso para grupo de 10 mil habitantes, só deve ser alcançada no Brasil em 2015, de acordo com o Ministério da Saúde.

**Coeficiente de detecção geral de casos novos de hanseníase
Brasil e estados, 2010**



Fonte: Sinan/SVS-MS

Dados disponíveis em 05/05/2011

FIGURA 2: COEFICIENTE DE PREVALÊNCIA DE HANSENÍASE POR ESTADO, 2010
Fonte: SESSP, 2012

TABELA 2: INCIDÊNCIA DE HANSENÍASE NO MUNDO.

Country – Pays	No. of new cases detected – Nombre de nouveaux cas dépistés						
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Angola	2 109	1 877	1 078	1 269	1 184	937	1 076
Bangladesh	8 242	7 882	6 280	5 357	5 249	5 239	3 848
Brazil – Brésil	49 384	38 410	44 436	39 125	38 914	37 610	34 894
China – Chine	1 499	1 658	1 506	1 526	1 614	1 597	1 324
Democratic Republic of the Congo – République démocratique du Congo	11 781	10 369	8 257	8 820	6 114	5 062	5 049
India – Inde	260 063	169 709	139 252	137 685	134 184	133 717	126 800
Ethiopia – Éthiopie	4 787	4 698	4 092	4 187	4 170	4 417	4 430
Indonesia – Indonésie	16 549	19 695	17 682	17 723	17 441	17 260	17 012
Madagascar	3 710	2 709	1 536	1 644	1 763	1 572	1 520
Mozambique	4 266	5 371	3 637	2 510	1 313	1 191	1 207
Myanmar	3 748	3 571	3 721	3 637	3 365	3 147	2 936
Nepal – Népal	6 958	6 150	4 235	4 436 ^a	4 708 ^a	4 394 ^a	3 118 ^a
Nigeria – Nigéria	5 276	5 024	3 544	4 665	4 899	4 219	3 913
Philippines	2 254	3 130	2 517	2 514	2 373	1 795	2 041
Sri Lanka	1 995	1 924	1 993	2 024	1 979	1 875	2 027
Sudan – Soudan	722	720	884	1 706 ^b	1 901 ^b	2 100 ^b	2 394 ^b
United Republic of Tanzania – République-Unie de Tanzanie	5 190	4 237	3 450	3 105	3 276	2 654	2 349
Total (%)	388 533 (95)	287 134 (96)	248 100 (93)	241 933 (94)	234 447 (94)	228 786 (93)	215 938 (95)
Global Total – Total général	407 791	299 036	265 661	258 133	249 007	244 796	228 474

Fonte: SESSP, 2012

2. JUSTIFICATIVA

A detecção precoce é o primeiro item a ser explorado no plano integrado de ações estratégicas do Ministério da Saúde para eliminação da hanseníase no país com meta de até 2015 diminuir consideravelmente os novos casos.

É necessário intensificar as ações de vigilância da hanseníase, voltadas especialmente à maior efetividade no diagnóstico e tratamento da doença, especialmente nas regiões que apresentam maior concentração de casos no país.

O diagnóstico é basicamente clínico e pode contar com o auxílio da baciloscopia, que se trata de raspados de lesões ou coleta de linfa das regiões nodulares para posterior visualização do bacilo álcool ácido resistente. Até o momento não temos um diagnóstico laboratorial menos invasivo ou que não necessite do cultivo do *Mycobacterium leprae*.

A hanseníase tem tratamento e cura. Porém, se no momento do diagnóstico o paciente já apresentar alguma deformidade física instalada, este pode ficar como seqüela permanente no momento da alta. Esse dado reforça a importância do diagnóstico precoce e do início imediato do tratamento adequado para a prevenção das incapacidades físicas que a evolução da doença pode causar.

O presente trabalho visa o desenvolvimento de técnicas laboratoriais para o diagnóstico precoce da hanseníase utilizando-se um antígeno sintético, ou seja, suprimindo a necessidade do cultivo de *Mycobacterium leprae*, sendo menos invasivo que o método convencional, e utilizando um sistema de biossensor que emprega a técnica de microbalança de cristal de quartzo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DIAGNÓSTICO PARA HANSENÍASE

Atualmente o diagnóstico da hanseníase é baseado em sinais cardinais, como: a presença de anestesia em lesões cutâneas, sugestivas da doença, o espessamento de nervos periféricos, e a demonstração do *M. leprae* no esfregaço de linfa ou cortes histológicos de tecidos (BRASIL, 2002).

Para diagnóstico imunológico os testes disponíveis no momento são baseados na detecção de anticorpos anti-PGL-I (glicolípido fenólico I) (OSKAM *et al.*, 2003) obtido a partir do próprio bacilo. Descoberto em 1982 como estruturas específica e antigênica do *M. leprae* desde então é utilizado como antígeno para testes laboratoriais, porém, a grande dificuldade está na produção desse insumo, pois o *M. leprae* não é cultivável em meio artificial sendo necessário o cultivo a partir da infecção de tatus. Ainda assim, a sensibilidade para pacientes classificados como Paucibacilar (PB) é de 30 – 60% (MOURA *et al.*, 2008).

Portanto, as buscas por antígenos obtidos por biotecnologia podem ser uma alternativa para contornar esse problema. Sequências peptídicas obtidas pela técnica de *Phage Display* podem ser uma delas, desde que sejam caracterizadas como sequências miméticas dos antígenos de *M. leprae* cuja antigenicidade frente aos soros possa ser uma ferramenta na identificação precoce de pacientes hansênicos (ALBAN, *et al.*, 2013) ainda mais se forem empregados como alvos em imunoenaios sensíveis que sejam aliados a uma alta especificidade como acontece quando o antígeno é adsorvido a um biossensor acoplado a uma microbalança de cristal de quartzo (SHANG *et al.*, 2011) conforme os objetivos desse trabalho.

3.2 TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY

A busca por antígenos miméticos de *M. leprae* foi realizada por Alban e colaboradores (2013) através da técnica de seleção de peptídeos *in vitro*, *Phage Display*, desenvolvida por Smith (1985). Esta técnica permite a seleção de peptídeos e ou proteínas, incluindo anticorpos e peptídeos, com alta afinidade e especificidade para vários alvos (SMITH, 1985). É uma técnica de seleção *in vitro* na qual uma proteína ou peptídeo é geneticamente fusionado a proteínas de superfície de um bacteriófago filamentosos da classe M13, resultando na expressão de uma proteína heteróloga na

superfície do capsídeo viral. Esta biblioteca possui uma população de ligantes em potencial. Fagos que apresentam em sua superfície peptídeos com especificidade de ligação desejada podem ser selecionados da biblioteca através da ligação com uma molécula imobilizada, como por exemplo, um anticorpo específico (ALBAN *et al.*, 2013) e a sequência do peptídeo selecionado pode ser deduzida da sequência do DNA (SCOTT; SMITH, 1990).

Esta técnica possibilita a expressão de um grande número (maior que 10^{11}) de peptídeos ou proteínas na superfície de fagos (SIDHU *et al.*, 2000). Quanto maior for o número de formas representadas na biblioteca, mais facilmente será encontrado um ligante afim (POSNER *et al.*, 1994).

Quando comparadas a outras bibliotecas de expressão, os sistemas utilizando fagos filamentosos apresentam vantagens. Uma delas é que fagos filamentosos não lisam as células infectadas, o que possibilita a separação de partículas virais do conteúdo intracelular, eliminando-se muito da reatividade cruzada com proteínas celulares. Outra vantagem desta estratégia é a seleção de epítopos descontínuos, significando ser possível selecionar um mimotopo (GEYSEN *et al.*, 1986).

Um mimotopo é uma macromolécula, geralmente um peptídeo, que imita a estrutura do epítipo antigênico. Devido a esta semelhança, causa uma resposta aos anticorpos similar à gerada pelo epítipo. Um anticorpo específico para um determinado epítipo antigênico reconhece também o mimotopo que imita esse epítipo. O termo mimotopo foi primeiramente descrito por (GEYSEN *et al.*, 1986) que utilizou para descrever peptídeos que imitavam um epítipo. Para se qualificar como um mimotopo o peptídeo deve ser capaz de induzir anticorpos que reconhecem o epítipo imitado. (REGENMORTEL; MULLER, 1999).

A utilização de amostras de soros na seleção de peptídeos, através da técnica de *Phage Display*, é uma estratégia atrativa que pode ser aplicada para várias doenças na tentativa de se identificar sequências específicas que se liguem a anticorpos presentes em tais amostras. Como exemplos de utilização da técnica de *Phage Display* para diagnóstico imunológico temos o trabalho desenvolvido por Rodrigues (2004) que utilizou a técnica de *Phage Display* para imunodiagnóstico de neurocisticercose, Noll (2011) utilizou a técnica de *Phage Display* para obtenção de anticorpos e peptídeos

para imunodiagnóstico e Freschi (2006) desenvolveu através da utilização do *Phage Display* o diagnóstico para câncer de próstata.

Isto leva a um possível desenvolvimento de novos reagentes para testes de imunodiagnóstico mais simples e sensíveis, além do entendimento da participação de novos antígenos na resposta imune (MANOUTCHARIAN *et al.*, 1999).

3.3 OTIMIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

A afinidade de ligação dos anticorpos e especificidade dos seus epítomos pode ser atribuída às propriedades conformacionais dos peptídeos antígenos (BANERJEE *et al.*, 1999).

A mudança na conformação do peptídeo modifica a imunoreatividade não necessariamente dependente do próprio antígeno, mas pode também resultar de uma resposta individual diferencial que o sistema imune organiza (GOETZ *et al.*, 1997).

Com o objetivo de utilizar o peptídeo no sensor de ouro da microbalança de cristal de quartzo, um novo peptídeo sintético, baseado na sequência descrita por Alban e colaboradores (2013), foi desenhado com um *linker* espaçador + um resíduo de cisteína a fim de facilitar a ligação com o ouro.

As moléculas que contêm enxofre como a cisteína, formam uma monocamada de superfície no ouro devido à forte interação específica do enxofre com o ouro (NUZZO, 1983; 1987). Monocamada de peptídeos em ouro já foi relatada antes com sucesso por outros pesquisadores (TIDWELL *et al.*, 1997; HOLMLIN *et al.*, 2001; OSTUNI *et al.*, 2001).

A monocamada que se forma do peptídeo sobre a superfície de ouro se dá devido às ligações do grupo tiol dos resíduos de cisteína e o ouro, esta ligação é estável e chamada de ligação semi-covalente (SHANG *et al.*, 2011; UTTENTHALER *et al.*, 1998). O trabalho citado também demonstrou uma maior eficiência do peptídeo quando sintetizado com o *linker* espaçador de resíduos de glicina e serina, desta forma o peptídeo ficaria mais exposto, aumentando a superfície de contato para interação com o anticorpo confirmado por Evers e colaboradores (2006).

3.4 ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS (ELISA)

Técnicas de ELISA (Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima) foram concebidos para a detecção e quantificação de substâncias tais como peptídeos, proteínas, anticorpos e hormônios. Outros nomes, como imunoenensaio enzimático ou enzima imunoenensaio (EIA), também são utilizados para descrever o mesmo processo.

Esta técnica pode ser utilizada para detecção de anticorpos presentes no soro. Os antígenos purificados são ligados à superfície interna de cada microcavidade das microplacas. Durante a incubação inicial, os anticorpos presentes no soro do paciente ligam-se especificamente ao antígeno imobilizado e assim permanecem após a primeira lavagem. Um segundo anticorpo, conjugado à enzima peroxidase, que reconhece as cadeias leves e pesadas da imunoglobulina humana, liga-se aos anticorpos do paciente, presentes após a primeira incubação. Nas cavidades em que o conjugado permanece ligado, a enzima catalisa uma reação colorimétrica no substrato. Após o bloqueio da reação enzimática, a coloração amarela é lida fotometricamente. Esta metodologia apresenta alta sensibilidade e especificidade (ENGVAL; PERLMANN, 1971).

Existem várias formas de construir um ELISA porém, a metodologia de escolha para o presente trabalho foi o método indireto por ser o mais apropriado para captura de anticorpos presentes no soro. O método indireto, é uma técnica de duas etapas, em que se utiliza anticorpo secundário marcado e um anticorpo de detecção do antígeno. Isto foi descrito pela primeira vez por Weller e Coons (1954) e ainda é um método tradicional. O elemento mais importante da detecção é uma estratégia altamente específica interação antígeno-anticorpo (Figura 3).

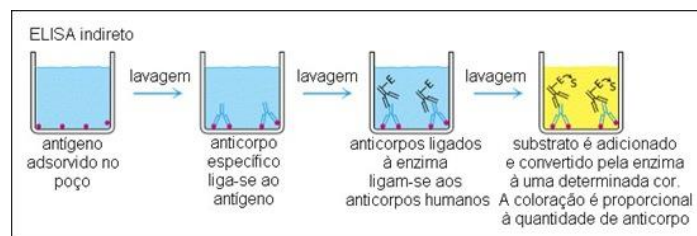


FIGURA 3: ESQUEMA APRESENTADO PARA ELISA INDIRETO. Etapa 1: adsorção do antígeno à fase sólida; etapa 2: adição do soro contendo anticorpo alvo; etapa 3: adição de anticorpo conjugado à enzima anti anticorpo humano; etapa 4: adição do substrato e após o desenvolvimento de cor análise da absorvância.

Fonte: Adaptado de Goldsby *et al.*, 2000.

3.5 MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (QCM)

A piezoelectricidade (do grego *piezin* significa pressão) é uma propriedade que certos materiais possuem e que consiste no desenvolvimento de uma diferença de potencial entre duas faces devido à aplicação de uma pressão numa determinada direção cristalográfica. Esta propriedade foi descoberta em 1880 pelos irmãos Curie (CURIE; CURIE, 1880).

Somente em 1959, Sauerbrey demonstrou que a variação de frequência de um cristal de quartzo é diretamente proporcional à massa adicionada/retirada. Foi dado, então, o primeiro passo para o desenvolvimento de uma nova ferramenta quantitativa de medida de massas extremamente pequenas, na ordem dos 10^{-9} g, não sendo impossível chegar aos 10^{-10} g (SAUERBREY, 1959).

A microbalança de cristais piezoelétricos de quartzo (QCM) demonstrado na Figura 4, baseia-se no fato de uma variação de massa, Δm , à superfície do cristal provocar uma variação na frequência de vibração, ΔF , que, segundo Sauerbrey, são proporcionais (MECEA, 2005).

$$K \Delta F \propto \Delta m$$

Equação 1

Onde K é uma constante que depende das características do quartzo como espessura, área, densidade e elasticidade.

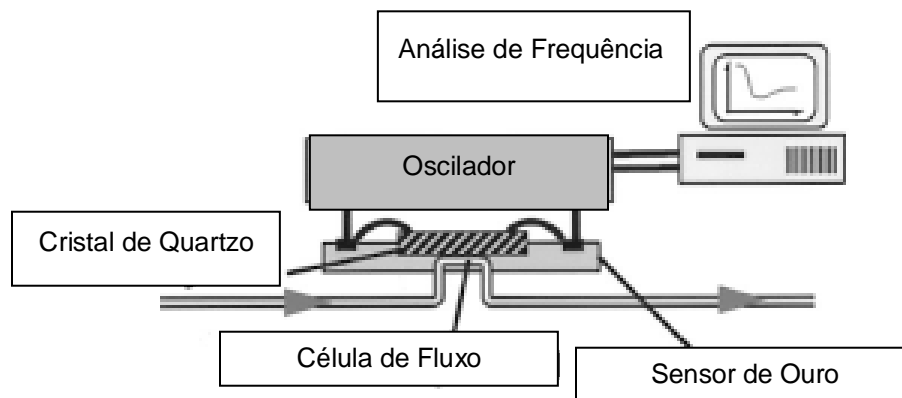


FIGURA 4: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO FUNCIONAMENTO DA MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO.

A equação de Sauerbrey assume que a massa depositada não influencia o modo de vibração do cristal, o que é válido apenas para camadas rígidas, pois estas não apresentam frequência vibracional e vibram sincronicamente com o quartzo. É de notar que a frequência de vibração do cristal de quartzo é extremamente afetada pela viscosidade do filme depositado (SPETZ, 2006).

A amostra pode ser removida do cristal e ele voltará a vibrar à frequência de ressonância inicial. Para muitos casos de QCM aplicados em contato com líquidos, a equação Sauerbrey não se sustenta. Uma série de fatores tais como propriedades líquidas interfaciais (isto é, densidade, viscosidade, condutividade, e constante dielétrica), a viscoelasticidade de filme fino, a morfologia do eletrodo, comportamento de oscilação (CARUSO *et al.*, 1995).

A operação de QCM em líquidos permanece pouco compreendida, em muitos resultados experimentais as mudanças de frequência QCM em líquidos são divergentes das previsões teóricas (CARUSO *et al.*, 1995). Na prática da investigação, o cristal de quartzo é normalmente concebido para entrar em contato com líquidos em apenas um lado ("célula de um lado") (CARUSO *et al.*, 1997; ZHOU *et al.*, 2001; TOWERY *et al.*, 2004; MANNELLI *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 2007). A razão para isto é a de eliminar as influências de condutividade e constante dielétrica, bem como para reduzir o amortecimento dos líquidos.

Um invólucro especial para a placa de quartzo é necessário para evitar o contato com o líquido do outro lado do quartzo, que é normalmente realizada por um vedante de borracha ou de teflon (AUGE *et al.*, 1995). Por um lado, o contato com o líquido, o cristal pode normalmente chegar a uma condição de oscilação estável. Para o disco de quartzo totalmente imerso, é geralmente difícil de obter uma frequência estável.

A detecção sensível e a seletividade de compostos bioquimicamente ativos pode ser alcançada empregando antígeno e anticorpo (HENGERER *et al.*, 1999). As utilizações desses materiais como potenciais analíticos tem sido revisto, particularmente com respeito ao desenvolvimento de sensores.

A análise microgravimétrica é uma nova forma de detectar a interação antígeno-anticorpo, neste sistema qualquer alteração de massa ocorrida na superfície do cristal

de quartzo é refletida por um aumento ou diminuição da frequência do cristal (GUILBAULT *et al.*, 1992; BEN-DOV *et al.*, 1997).

O sensor pode ser utilizado para a medição de marcador livre através de interações específicas entre moléculas imobilizadas e analitos em solução. A ligação de um analito solúvel para um ligante imobilizado provoca mudança na frequência de ressonância, e este sinal pode ser gravado utilizando um contador de frequência com alta resolução (KOSSLINGER *et al.*, 1992). Apesar deste método existir há mais de quatro décadas, somente na década de 90 foi desenvolvido medições imunológicas em fluxo contínuo.

A frequência em função do tempo resulta em uma curva chamada sensorgrama (Figura 5), as análises destas medições podem deduzir constantes de ligações de equilíbrio, taxa de afinidade e também a cinética de ligação de várias proteínas (SKLADAL *et al.*, 1994).

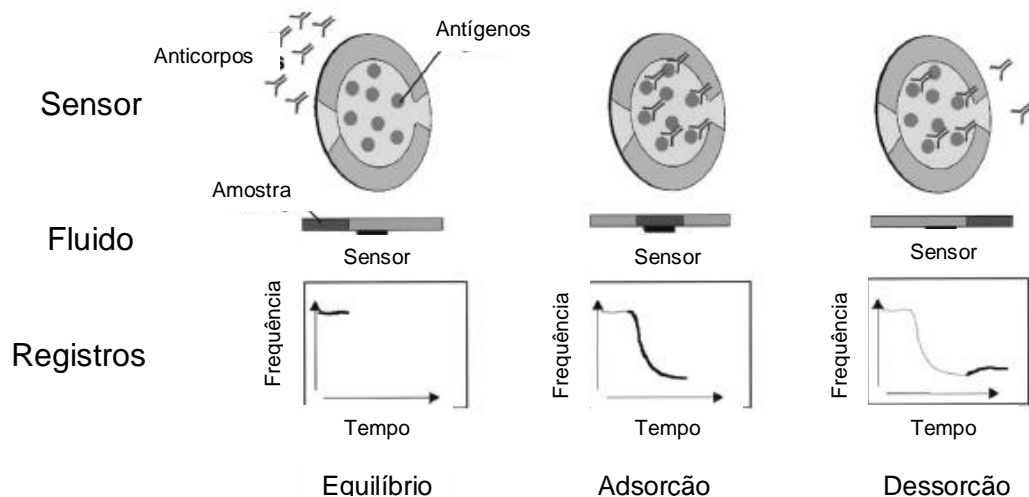


FIGURA 5: ILUSTRAÇÃO DE UMA ANÁLISE POR QCM EM TEMPO REAL. Demonstrando a ação na superfície do cristal e o surgimento do sensorgrama (Frequência x Tempo) para uma reação de antígeno-anticorpo.

Estudos de QCM fornecem informações detalhadas sobre as superfícies funcionalizadas desenvolvidas para uma série de biochips e aplicações de biossensores (GUILBAULT, 1984; MINUNNI *et al.*, 1995; TOMBELLI; MASCINI, 2000; ROGERS, 2000). Para análises imunológicas temos vários exemplos como a

imobilização de scFv para diagnóstico clínico por Kumada e colaboradores (2011); diagnóstico da malária por Potipitak e colaboradores (2011) entre outros.

3.6 ÂNGULO DE CONTATO (θ)

A técnica de determinação do ângulo de contato ou ângulo de molhabilidade representa o valor em graus que uma determinada substância líquida forma com a superfície (Figura 6).

O termo molhabilidade é definido como a manifestação macroscópica da interação molecular entre sólidos e líquidos em contato direto na interface entre eles, ou seja, é o reconhecimento existente entre as forças coesivas do líquido e as forças adesivas entre o sólido e o líquido (KARMANOV, 2000).

As forças coesivas do líquido tendem a formar uma gota esférica, já as forças adesivas entre o sólido e o líquido tendem a espalhar o líquido sobre o sólido, assim o ângulo de contato é determinado pela competição entre estas duas forças. Para ângulos inferiores a 90° o líquido é considerado molhante e para ângulos acima de 90° , não molhante. Neste caso, tem-se o conceito de hidrofobicidade e hidrofiliidade. A água possui caráter polar e quando ela apresenta com outra superfície um ângulo de contato menor que 90° esta superfície é considerada hidrofílica, porém, se este ângulo de contato for maior que 90° , o material é considerado hidrofóbico (MOITA NETO, 2006).

A molhabilidade da superfície depende dos seus constituintes, onde a atração pela água precisa ser maior que a tensão superficial desse líquido para uma boa molhabilidade (KISMANN, 1997; LO; HOPKINSON, 1995).

Segundo Leng e Cummings (2006) a aderência do peptídeo na superfície de ouro modifica a molhabilidade da superfície de hidrofóbica para hidrofílica, o mesmo acontece com camadas adicionais de proteínas.

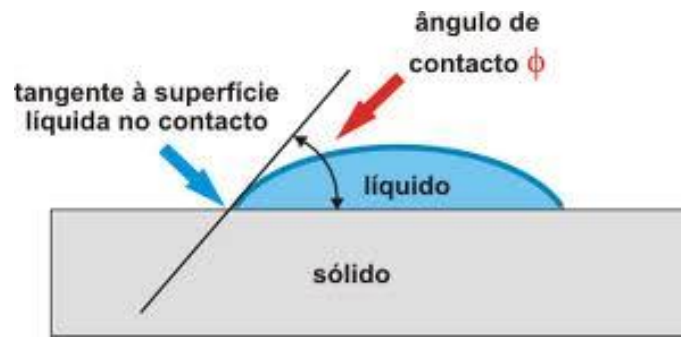


FIGURA 6: ILUSTRAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO PARA UMA GOTA MOLHANTE SOBRE UMA SUPERFÍCIE SÓLIDA.

Fonte: Adaptado de YUAN; LEE, 2013.

3.7 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

A microscopia de força atômica (MFA) (Figura 7) é uma técnica desenvolvida por Binnig, Quate e Gerber (1986), como resultado de uma colaboração entre a IBM e a Universidade de Stanford, e que permite obter imagens reais, em três dimensões, da topografia das superfícies, com uma resolução espacial que se aproxima das dimensões atômicas (MILES, 1997; BONNELL; HUEY, 2001; WIESENDANGER, 1994).

A MFA permite a caracterização das propriedades interfaciais dos eletrodos, possibilitando a observação direta da arquitetura da superfície. Consequentemente, esta técnica pode trazer informações importantes sobre a morfologia da superfície dos eletrodos modificados com moléculas biológicas.

Na MFA é efetuado o varrimento da superfície da amostra utilizando uma sonda sensível à força (sensor de força), que consiste numa ponta de dimensões atômicas integrada num braço em movimento (HAN *et al.*, 1996).

À medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de "acidentes geográficos" encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais. A força mais comumente associada com MFA na deflexão do cantilever é a força de van der Waals (WORCESTER *et al.*, 1988).

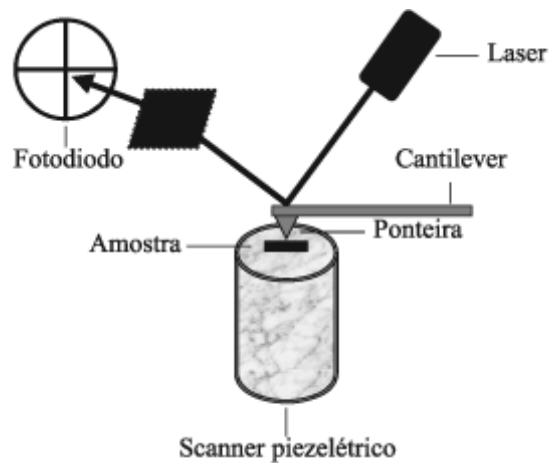


FIGURA 7: DIAGRAMA REPRESENTATIVO DO FUNCIONAMENTO DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.

FONTE: FERREIRA; YAMANAKA, 2006.

A técnica de MFA, conforme apresentado na Figura 8, pode ser operada em três modos diferentes: contato, não contato e contato intermitente.

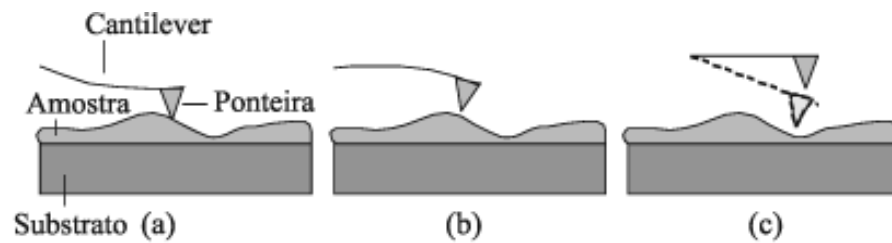


FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MODOS DE OPERAÇÃO EM MFA: a – modo contato, b – modo não contato e c – modo intermitente.

Fonte: FERREIRA; YAMANAKA, 2006.

No modo contato, o cantilever é mantido a poucos ângstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve "contato físico" com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície, podem causar danos à amostra, o que é especialmente prejudicial às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre fortemente aderidas ao substrato.

No modo de não contato, o cantilever é mantido de dezenas a centenas de ângstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa. Neste caso a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos

nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de 10^{-12} N. Esta oscilação aumenta consideravelmente a sensibilidade do microscópio, o que faz com que forças de van der Waals e forças eletrostáticas possam ser detectadas. O modo de não contato não sofre os efeitos do atrito sobre a amostra, causada pela ponta, conforme é observado no modo contato após diversas varreduras.

O modo contato intermitente é similar ao não contato, exceto pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente. A comparação das imagens nos modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente (CHICHESTER, 1998).

A simplicidade na preparação dos substratos, a interação dos antígenos com formação dos complexos na superfície de ouro modificada quimicamente e a facilidade de visualização individual dos antígenos, anticorpos e complexos Ag-Ac foram fatores importantes na realização de trabalhos empregando MFA. Na literatura temos diversos exemplos que utilizam a MFA para verificação da camada automontada na superfície de sensores de ouro. Geraldo (2008) verificou a análise topográfica de um filme nanoestruturado contendo lipossomas, Valenga (2011) verificou a formação de nanofilmes desenvolvidos a partir de galactomananas e alginato, Paiva (2010) utilizou-se do MFA para análise topográfica do filme de biofilme aderido ao sensor de ouro e Kaminiski (2013) analisou a formação de biopolímeros aderido ao sensor de ouro.

Para ser possível efetuar a investigação por técnicas de microscopia, as moléculas biológicas devem ser imobilizadas na superfície de um substrato sólido plano.

3.8 RUGOSIDADE (RMS)

A rugosidade é o conjunto de irregularidades, isto é, pequenas saliências e reentrâncias em uma superfície, e desempenha um papel importante no comportamento dos microssistemas, afetando tanto o desempenho como a eficiência desses dispositivos (AGOSTINHO, 2004).

A caracterização da rugosidade de superfície pode ser realizada em dois planos principais, pode ser medido na perpendicular à superfície utilizando a amplitude da onda e paralelos à superfície utilizando o comprimento de onda da superfície (THOMAS, 1999).

Segundo Poon e Bhushan (1995) a microscopia de força atômica é uma das metodologias mais adequadas para medir a rugosidade de uma superfície por se tratar de um método com uma melhor resolução espacial e, portanto, mais adequado para captar detalhes finos.

Autores como Valenga (2011) e Kaminski (2013) utilizam a medida de rugosidade para análise de adsorção de material orgânico a superfície do sensor de ouro. Desta forma, como alguns autores, também utilizamos a medida de rugosidade como verificação da mudança da superfície diante de diferentes substratos.

3.9 DESENVOLVIMENTOS DE BIOSENSORES PARA DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA HANSENÍASE.

Os biossensores (Figura 9) são ferramentas analíticas que combinam biomoléculas imobilizadas com transdutores químicos ou físicos para criar uma superfície que permita a medição direta de um analito específico. Dispositivos de bioafinidade, que dependem da ligação seletiva do analito-alvo ao ligante preso à superfície, como por exemplo, anticorpo ou sonda oligonucleotídica, podem ser utilizados como substratos de um biossensor. (WANG, 2000). Assim, um biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo, para o analito de interesse, com a sensibilidade de um transdutor que converte o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito (SALGADO, 2001).

Os biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes, devido as suas características únicas, tais como seletividade, baixo custo relativo de construção e potencial para miniaturização (CABRAL *et al.*, 2003; ROMANI *et al.*, 2000).

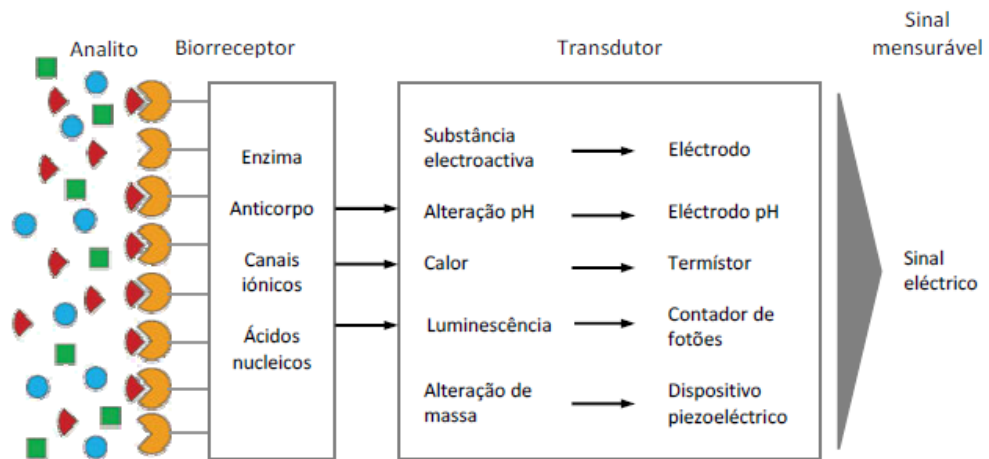


FIGURA 9: ESQUEMATIZAÇÃO DE BIOSSENSOR.
 Fonte: Adaptado de ULUDAG, 2009.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um ensaio imunológico para hanseníase utilizando peptídeo sintético acoplado a um linker como alvo em biossensores utilizando como instrumento uma balança de cristal de quartzo (QCM).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar a sequência peptídica proposta por Alban e colaboradores (2013) de forma a otimizar sua utilização em ensaio sorológico;
- Aumentar a imunogenicidade, bem como a antigenicidade do peptídeo modificado conjugando-o com uma proteína carreadora;
- Obter anticorpos policlonais anti peptídeo para uso como controle positivo em dot blot;
- Padronizar o teste de ELISA com o peptídeo modificado utilizado como antígeno;

- Determinar a especificidade e sensibilidade desse ELISA frente a soros de pacientes hansênicos provenientes de área endêmica e de voluntários sadios;
- Analisar a reação cruzada do peptídeo modificado frente a soros de pacientes com tuberculose por ELISA;
- Padronizar o protocolo de adsorção do peptídeo alvo ao biossensor de ouro.
- Determinar a tensiometria do sensor do QCM em diferentes etapas do processo;
- Comprovar a adsorção do peptídeo ao ouro, utilizando-se a técnica de microscopia de força atômica.
- Calcular a rugosidade do sensor após a adsorção do peptídeo.
- Verificar a reatividade do peptídeo modificado frente a anticorpos presentes em diferentes soros de pacientes hansênicos, tuberculosos e de voluntários sadios utilizando QCM.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

5.1.1 Amostras de pacientes – Hanseníase

Após aprovação pelo Comitê de Ética sob o número: 1080.005.11.02 e assinatura do termo de consentimento, foram coletadas 140 amostras de pacientes da região de Guarantã do Norte – Mato Grosso com diagnóstico confirmado de hanseníase.

As amostras de sangue total foram coletadas em tubos com gel de separação. Estas amostras foram centrifugadas em 2500 rpm durante 10 minutos e o soro foi separado e congelados a - 20°C.

5.1.2 Amostras de doadores de sangue – Controle negativo

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletadas 100 amostras de soros de doadores de sangue, após análise de sorologia, do

Laboratório de Sorologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná – Hemepar e congelados a - 20°C.

5.1.3 Amostras de pacientes com Tuberculose – Teste de reação cruzada

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletadas 10 amostras de soros de pacientes com diagnóstico de Tuberculose do Hospital Regional da Lapa – São Sebastião e congelados a - 20°C.

5.2 CONJUGAÇÃO DO PEPTÍDEO À PROTEÍNA CARREADORA

5.2.1 KLH (Hemocianina) via SMCC para utilização em imunoenensaio

Primeiramente o KLH (Sigma) diluído em PBS (tampão fosfato salino – 20 mM) pH 7,2, contendo cloreto de sódio (0,9 mM) foi ativado pela reação com Succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Pierce Chemical – 22320), obedecendo a proporção de 5:1 de KLH para SMCC diluído em solvente orgânico dimetilformamida (DMF). A solução foi mantida a 20°C por 2 horas sob agitação, ao abrigo da luz. Para separação das proteínas não ativadas pelo SMCC foi utilizada uma coluna de filtração molecular (PD-10), equilibrada com PBS-EDTA (tampão fosfato - ácido etilenodiaminotetracético) (100mM) pH 7,2. Foram coletadas 20 frações de 600 µL e avaliada na absorvância de 280 nm. As alíquotas do primeiro pico de leitura foram agrupadas e nelas acrescidas os peptídeos e incubadas por 2 horas a 20°C sob leve agitação, ao abrigo da luz. Posteriormente foi realizado o bloqueio das cisteínas livres com adição de solução de cisteínas (1mM), incubadas por 20 minutos sob agitação em tubos protegidos da luz. Os peptídeos acoplados foram alíquotados e estocados a - 20°C.(CAPELLI-PEIXOTO, *et al.*, 2010).

5.2.2 BSA (albumina bovina sérica) via Glutaraldeído para imunização

Adicionou-se peptídeo a uma solução de proteína carreadora (BSA) a 1 mg/mL na razão molar de 1:40. Utilizou-se 1 mg de peptídeo em 50 µL da solução de BSA que foi preparada com PBS pH 8,0. Preparou-se solução de glutaraldeído 2% (v/v) em água com volume final de 50 µL. Foi adicionada em frações de 10 µL a solução de

glutaraldeído 2% em volume equivalente ao da solução de peptídeo, sob agitação constante. Deixou-se agitando por 1 hora. A reação foi parada com borohidreto de sódio para uma concentração final de 10 mg/mL. Permaneceu-se mais 1 hora sob agitação constante a 4°C. Foi realizada diálise com três trocas no período de 24 horas em temperatura de 4°C. A solução final foi alíquotada em presença de azida 0,02% (p/v) e as alíquotas foram condicionadas a -20°C. (BARON; BALTIMORE, 1982)

5.3 IMUNIZAÇÃO DE ANIMAL PARA OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Após aprovação do comitê de ética de pesquisa em animais, anticorpos policlonais foram produzidos em coelho. Após a coleta de soro pré- imune, o coelho recebeu uma injeção inicial de peptídeos carregados a BSA (150 µg em 500 µL de PBS, pH 7,4) emulsificados em 500 µL de adjuvante incompleto de Freund e a emulsão foi injetada subcutaneamente em 2 pontos no dorso do coelho. Mais três doses de reforço foram administradas com intervalo de quinze dias. Uma semana após a última injeção o coelho foi sangrado e o soro utilizado para os ensaios.

O animal da raça New Zealand pesando 2,5 kg foram mantidos no biotério do CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Paraná) e receberam água e alimentação em condições controladas.

5.4 TÉCNICA DE ELISA INDIRETO

5.4.1 Soro humano

Placas de microtitulação com 96 poços (Nunc - Becton Dickinson) foram sensibilizadas com 10 µg/ml do peptídeo conjugado a hemocianina (KLH) diluídos em tampão bicarbonato de sódio (0,05 M) pH 9,6 e incubadas 16 h a 4°C. Depois de lavadas com solução de lavagem (salina Tween-20 0,05%), bloqueadas com tampão de bloqueio (tampão de bloqueio livre de proteínas - Thermo Fisher Scientific) por 1 hora a 37°C, as placas foram incubadas com os soros diluídos (1:50) em tampão de incubação (caseína 0,25% e Tween-20 0,05% em PBS) nas mesmas condições. O conjugado anti humano IgG Fc-específico ligado a biotina (Sigma-Aldrich) diluído 1:2500 em tampão de

incubação foi adicionado e a placa incubada por mais 1 hora a 37°C. Após as lavagens, foi adicionada streptavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich) diluída 1: 10.000 em tampão de incubação e a placa incubada por mais 1 hora a 37°C. Após as lavagens, o substrato (peróxido de hidrogênio e cromógeno ortofenilenodiamina – OPD Sigma-Aldrich) foi adicionado. Após 15 minutos reação foi interrompida pela adição de 20 µL de H₂SO₄ (5%) e os títulos dos anticorpos foram determinados em função da intensidade da coloração, cuja absorvância foi lida em comprimento de onda de 490 nm por um leitor de ELISA Bio Rad 550. Todas as medições foram feitas em duplicata e os resultados expressos como a média de dos ensaios.

5.4.2 Soro animal (coelho)

Placas de microtitulação com 96 poços (Nunc - Becton Dickinson) foram sensibilizadas com 10 µg/mL do peptídeo conjugado a hemocianina de molusco (KLH) diluídos em tampão bicarbonato de sódio (0,05 M) pH 9,6 e incubadas 16 h a 4°C. Depois de lavadas com a solução de lavagem (salina Tween-20 0,05%), bloqueadas com tampão de bloqueio (caseína 2% diluída em PBS) por 1 hora a 37°C, as placas foram incubadas com os soros diluídos (1:50 e 1:100) em tampão de incubação (caseína 0,25% e Tween-20 0,05% em PBS) nas mesmas condições. O conjugado anti coelho IgG Fc-específico (Sigma-Aldrich) diluído 1:5000 em tampão de incubação foi adicionado e a placa incubada por mais 1 hora a 37°C. Após as lavagens, foi adicionado o substrato (tampão citrato pH 5,0, peróxido de hidrogênio e cromógeno orto fenildiamina - OPD). Após 15 minutos a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de H₂SO₄ (5%) e os títulos dos anticorpos foram determinados em função da intensidade da coloração, cuja absorvância foi lida em comprimento de onda de 490 nm por um leitor de ELISA Bio Rad 550. Todas as medições foram feitas em duplicata e os resultados expressos como a média dos ensaios.

5.5 TÉCNICA DE *DOT BLOT*

A membrana de nitro celulose foi cortada 1,0 X 3,0 cm e colocada no dispositivo de dot blot, onde se adicionaram 25 µg de peptídeo carregado no poço e como controle

de reação 25 µg da proteína carreadora em outro poço. Foi utilizado vácuo, e deixou-se secar por 16 h em estufa a 37°C. A membrana foi lavada com PBS durante três lavagens de 3 minutos então, bloqueada com PBS Tween 0,3% por 1 hora a 37°C. Posteriormente lavada com PBS Tween 0,05%, durante três lavagens de 5 minutos. Incubou-se com soro diluído em PBS Tween 0,05% por 1 hora a 37°C. E então lavada com PBS Tween 0,05%, durante 3 lavagens de 5 minutos. Adicionou-se o conjugado diluído em PBS Tween 0,05% por 1 hora a 37°C (1:2500). Lavou-se com PBS Tween 0,05%, durante 2 lavagens de 5 minutos e posteriormente com PBS, durante 3 lavagens de 5 minutos, e revelada pela coloração de DAB (tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina)/ Cloronaftol.

5.6 OTIMIZAÇÃO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO.

O peptídeo de escolha (ALBAN *et al.*, 2013) com melhor reatividade foi estudado quanto a melhorar sua adsorção ao biossensor e exposição de conformação e sintetizado pela PEPTIDE 2.0 com 93,2% de pureza. Foi adicionado à porção C-terminal do peptídeo selecionado, o *linker* espaçador glicina-serina + resíduo de cisteína para aumentar a exposição deste aos anticorpos e a cisteína para permitir a adsorção ao ouro.

A sequência peptídica não foi descrita, pois o processo se encontra em fase de submissão ao registro de patentes, e para isso mantemos sigilo da sequência.

5.7 PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO DO QCM PARA AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As medições foram realizadas no laboratório Biopol do departamento de Química da UFPR. Triplicatas foram realizadas em equipamento SRS QCM200 com célula de fluxo. Cristais de ouro com vibração de 5 MHz (SRS) foram lavados por imersão em solução piranha (H₂O₂ 1:3 H₂SO₄) por 5 minutos e enxaguados com água ultra pura.

5.7. 1 Procedimento de limpeza do sensor executado imediatamente antes o uso do sensor

Preparou-se a solução piranha (3 partes de H_2SO_4 : 1 parte de H_2O_2). O sensor foi mergulhado na solução piranha de deixado por 15 min. Realizaram-se 2 lavagens em álcool P.A., durante 5 min cada lavagem. Realizaram-se 3 lavagens em água ultra pura, durante 5 min cada lavagem. Realizou-se secagem em N_2 com 2 Psi de pressão. O sensor foi deixado em contato com luz UV durante 15 min.

5.7. 2 Procedimento de adsorção do peptídeo ao sensor.

Preparou-se a solução de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peptídeo em água ultra pura. Adicionaram-se 200 μL da solução de peptídeo sobre o sensor de forma que ocupasse toda a superfície do ouro. Foi deixado por 16 horas a 4 °C em câmara úmida.

5.7. 3 Bloqueio do sensor.

Lavaram-se por 3 vezes durante 5 min em água ultra pura. Foi adicionada uma solução de 1% de BSA em água ultra pura, por 1 hora a 37 °C. Lavaram-se por 3 vezes durante 5 min em água ultra pura. O sensor foi secado sob N_2 a 2 Psi de pressão.

5.7.4 Montagem do esquema de utilização do QCM

O sensor foi colocado na câmara de fluxo. Ajustou-se o fluxo da seringa para 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Adicionou-se a amostra de interesse (soro diluído em água ultrapura) aproximadamente 250 μL . O comportamento do sensor foi avaliado, após estabilização, adicionou-se água para lavar o sistema.

5.8 TÉCNICA DE UTILIZAÇÃO DO MFA PARA AVALIAÇÃO DE RUGOSIDADE DA SUPERFÍCIE DO SENSOR

A morfologia superficial dos filmes de nanocompósitos foi investigada por MFA (microscopia de força atômica) em equipamento Agilent 5500 em modo dinâmico - não contato (BioPol – UFPR), utilizando pontas de silício Mikromasch *ultrasharp* NSC14 com constante de mola nominal de 5,7 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$.

5.9 TÉCNICA DE TENSIOMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO (θ)

Medidas de ângulo de contato da água sobre os filmes foram feitas a 25 °C em tensiômetro OCA 15+ (Dataphysics). Ângulos de contato de avanço foram obtidos pelo método da gota séssil. Foram realizadas 3 medidas para cada composição (BioPol – UFPR).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo software Origin Lab 7,0 e foram realizados testes de One-Way Anova seguido de Teste Tukey e consideradas amostras significativas com nível de significância inferior a 0,05. Para a correlação foi utilizado o teste de Pearson.

7. RESULTADOS

7.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

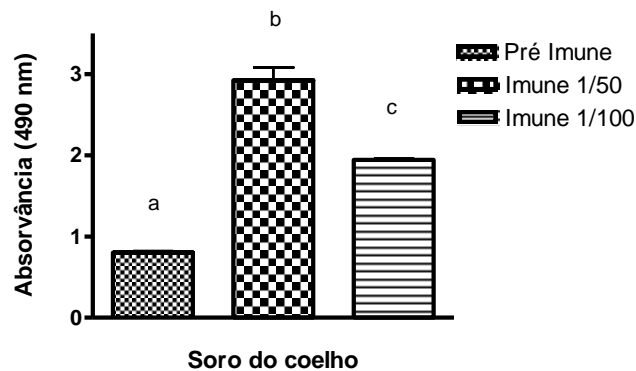


FIGURA 10: REATIVIDADE DO SORO POLICLONAL DE COELHO FRENTE AO PEPTÍDEO POR ELISA. Média + erro padrão da média para absorvância de do soro pré-imune em diferentes diluições do soro imune do animal. a difere de b e c ; b difere de c. $F_{2,3}(157,27)$

Na Figura 10 observa-se a diferença significativa de absorvância de amostras de soros pré-ímmunes e amostras pós-ímmunização em diferentes diluições (1:50 e 1:100), demonstrando a eficiência da ímmunização com obtenção de títulos de anticorpos policlonais para fins de controle positivo.

7.2 DOT BLOT PARA AMOSTRAS EM ANÁLISE

Pode-se visualizar na Figura 11, reatividade do soro de pacientes hansênicos dependente do título de anticorpos frente ao peptídeo carregado, porém, uma alta reatividade cruzada da proteína carregadora KLH com as amostras de soro. Para a amostra negativa observa-se a reação com a proteína KLH. Para soros com menor quantidade de anticorpos como no caso de paciente com médio título de anticorpos, o dot blot não foi capaz de evidenciar a reatividade. O resultado foi mais eficiente para pacientes com alto título de anticorpos, embora ainda tenha havido reação cruzada evidente com a proteína KLH.

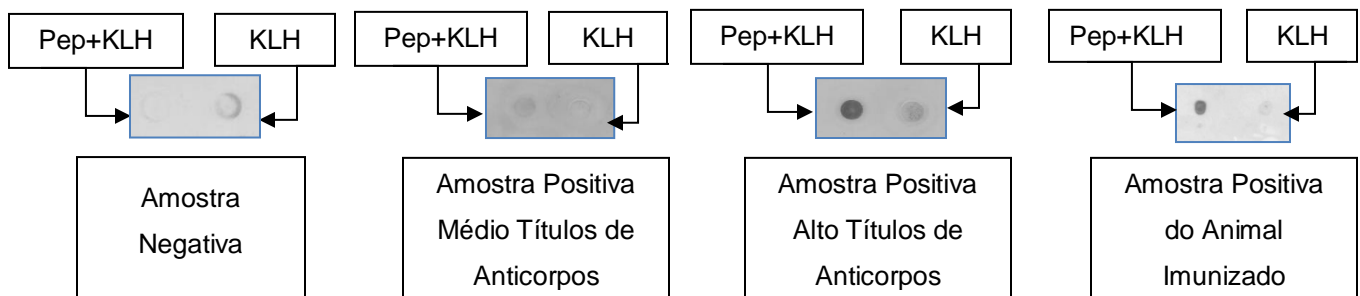


FIGURA 11: REAÇÃO DE DOT BLOT DO PEPTÍDEO + KLH E SOMENTE KLH FRENTE A DIFERENTES SOROS.

7.3 TÉCNICAS DE ELISA INDIRETA PARA AMOSTRAS EM ANÁLISE

A partir da análise da interação KLH com anticorpos demonstrados pelo teste de Dot Blot, procurou-se realizar demais experimentos por outro teste selecionado neste caso o teste de ELISA, e desta forma descrevem-se os resultados abaixo.

7.3.1 Teste de ELISA para análise de reação cruzada com a proteína carregadora KLH.

A Figura 12 mostra a baixa reatividade dos soros com a proteína KLH pela técnica de ELISA.

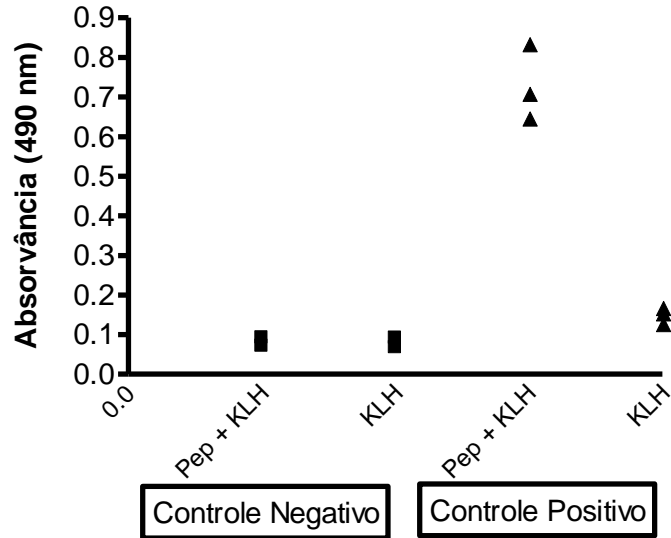


FIGURA 12: REATIVIDADE DE AMOSTRAS DE SOROS NEGATIVOS E POSITIVOS PARA HANSENÍASE FRENTE AO PEPTÍDEO CARREADO A PROTEÍNA KLH E APENAS A PROTEÍNA CARREADORA KLH. Pep + KLH representa que a placa foi adsorvida com o peptídeo carreado a KLH; KLH representa que a placa foi adsorvida com apenas a proteína carreadora KLH.

7.3.2 Análise de amostras por ELISA com peptídeo não otimizado.

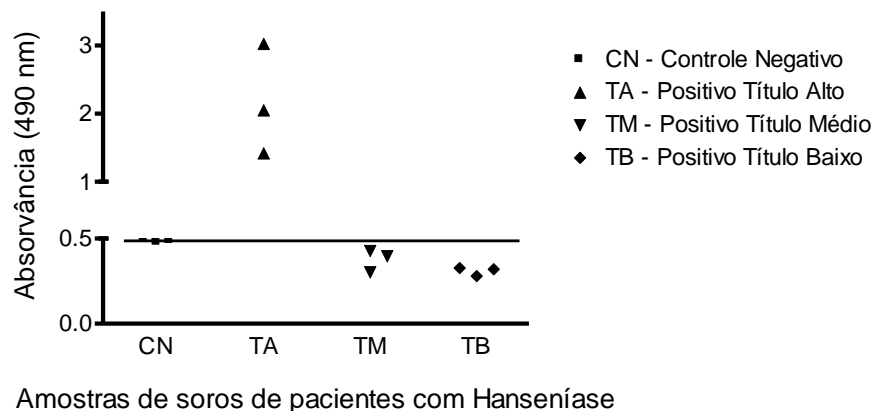


FIGURA 13: REATIVIDADE POR ELISA DE SOROS COM DIFERENTES TÍTULOS FRENTE AO PEPTÍDEO NÃO OTIMIZADO. *CUT OFF* = 0,498. Para o cálculo do *cut off* utilizou-se a média dos controles negativos acrescidos de dois desvios padrões da média. CN – amostras negativas para controle; TA – amostras de pacientes hansênicos que obtiveram absorvância 3 vezes acima do valor do *cut off*; TM – amostras de pacientes hansênicos que obtiveram absorvância entre 2 e 3 vezes o valor de *cut off* e TB – amostras de pacientes hansênicos que obtiveram absorvância entre o valor do *cut off* e 2 vezes o valor do *cut off*.

Os resultados da Figura 13 indicam que não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes com título mais baixo (TM e TB). Há apenas diferença entre os grupos com reatividade alta considerando os valores positivos acima do *cut off*.

7.3.3 Análise de amostras por ELISA com o peptídeo otimizado

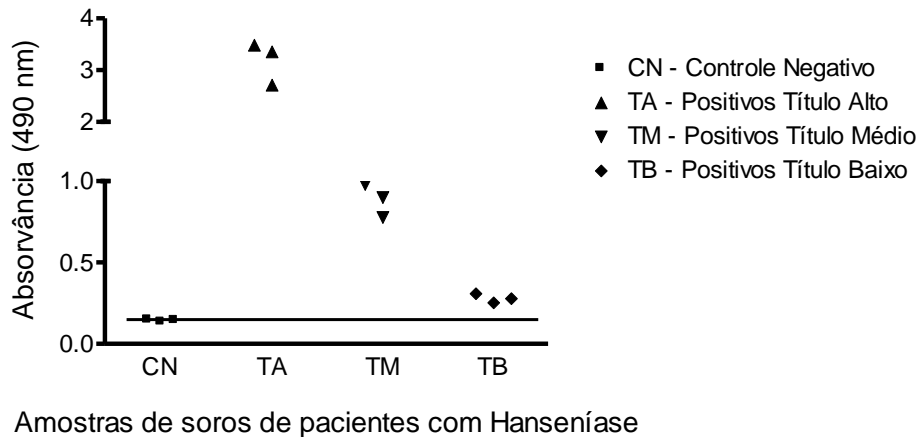


FIGURA 14: REATIVIDADE POR ELISA DE SOROS COM DIFERENTES TÍTULOS FRENTE AO PEPTÍDEO OTIMIZADO. *CUT OFF* = 0,149. $F_{3,8}$ (133,2) PM difere de PB. Para o cálculo do *cut off* utilizou-se a média dos controles negativos acrescidos de dois desvios padrões da média. CN – amostras negativas para controle; TA – amostras de pacientes hansênicos que obtiveram absorvância acima de 3 vezes o valor do *cut off*; TM – amostras de pacientes hansênicos que obtiveram absorvância entre 2 e 3 vezes o valor de *cut off* e TB – amostras de pacientes hansênicos que obtiveram absorvância entre o valor do *cut off* e 2 vezes o valor do *cut off*.

Os resultados da Figura 14 mostram que, após a modificação do peptídeo, conseguiu-se obter diferença significativa entre os grupos com título mais baixo (TM e TB). Considerando amostras positivas aquelas cujo valor de absorvância foi superior ao valor de *cut off*.

Podem-se observar na figura 15 as diferentes reatividades dos grupos de pacientes frente ao antígeno modificado. Os grupos assim foram classificados após análise estatística e constatação de que houve diferença significativa entre os grupos. Então, denominaram-se três diferentes grupos de acordo com o título de anticorpos representados pela absorvância encontrada. Estes grupos foram denominados de pacientes com título baixo (TB), pacientes com título médio (TM) e pacientes com título alto (TA).

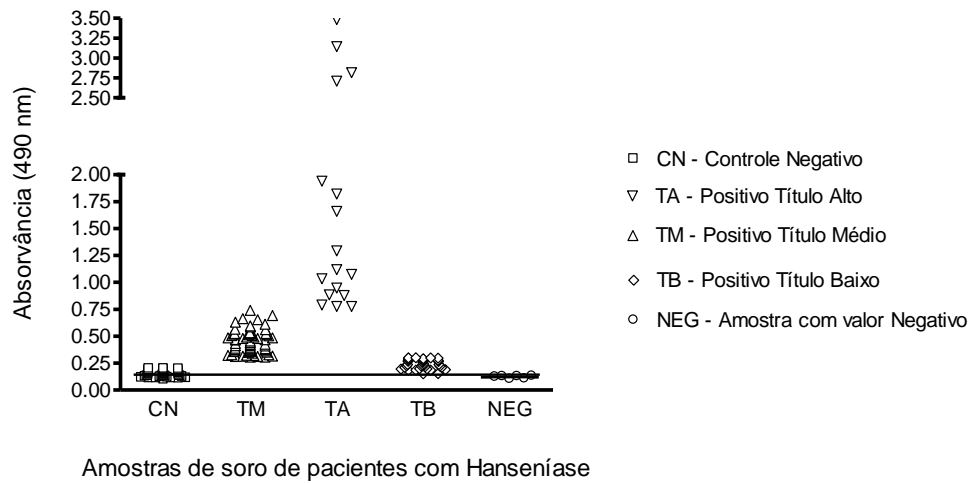


FIGURA 15: RESULTADO DO ELISA DE TODOS OS SOROS COLETADOS DE PACIENTES HANSÊNICOS FRENTE AO PEPTÍDEO OTIMIZADO. $CUT\ OFF = 0,149$. $F_{4,170} (86,47)$. Os grupos de paciente com título médio (TM), título alto (TA) e com título baixo (TB) diferem entre si. As amostras denominadas como NEG são aquelas com resultados similares ao controle negativo, mas provenientes de pacientes com sintomatologia comprovada de hanseníase.

Após teste estatístico conclui-se que não houve correlação dos grupos de pacientes classificados segundo a sua absorvância com a classificação da doença (MB - Multibacilar ou PB - Paucibacilar) representada pela Figura 16, ou seja, o peptídeo modificado consegue detectar a doença mesmo em condições de baixa produção de anticorpos como é o caso de pacientes PB - Paucibacilares.

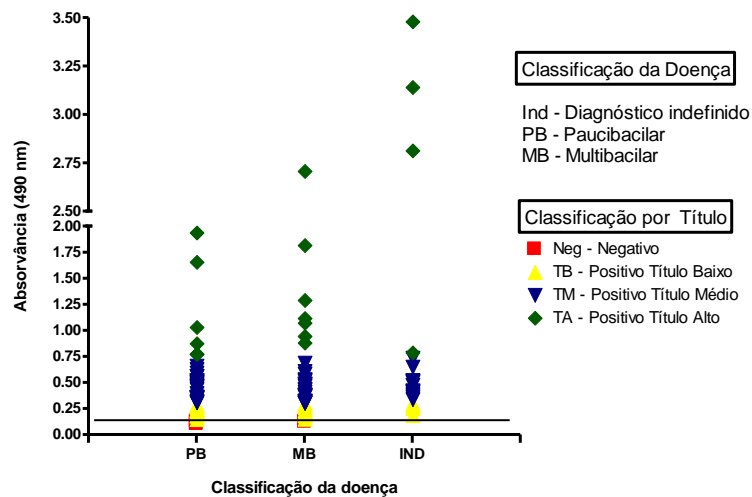


FIGURA 16: GRÁFICO DA CORRELAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA (PB – Paucibacilar e MB – Multibacilar e IND - Indefinida) x CLASSIFICAÇÃO ADOTADA PELO PRESENTE TRABALHO DE ACORDO COM O VALOR OBTIDO DE ABSORVÂNCIA. (TB – Título Baixo, TM – Título Médio, TA – Título Alto e NEG - Negativo – Controle de Amostras Negativas).

7.3.4 Análise de amostras de pacientes com diagnóstico de tuberculose para avaliação de reação cruzada com o peptídeo otimizado por ELISA

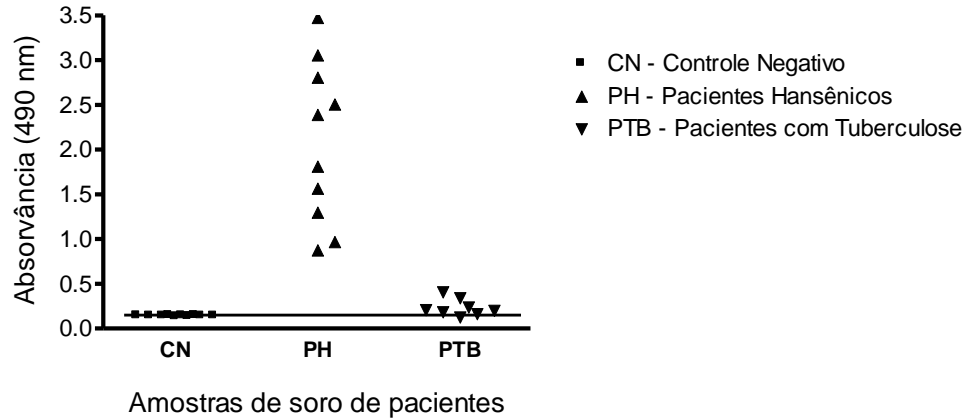


FIGURA 17: TESTE DE REAÇÃO CRUZADA PARA A TÉCNICA DE ELISA COM REALIZAÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA TUBERCULOSE. *Cut off* = 0.156 Para cálculo de *cut off* média do CN + 2 desvios padrões. O grupo PH difere significativamente do grupo PTB. $F_{2,27}$ (39,07).

A Figura 17 mostra a baixa reatividade dos soros de pacientes diagnosticados com tuberculose, ou seja, demonstrando baixa, embora existente, reatividade cruzada.

7.4 DETERMINAÇÕES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Com o objetivo de avaliação do teste proposto, calcularam-se os valores de sensibilidade e especificidade do teste ELISA indireto empregando como antígeno o peptídeo otimizado. A sensibilidade mede a capacidade do teste em identificar corretamente a doença entre aqueles que a possuem, ou seja, o quão sensível é o teste. A especificidade mede a capacidade do teste em excluir corretamente aqueles que não possuem a doença, ou seja, o quão específico é o teste.

TABELA 3: AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE PARA O TESTE DE ELISA INDIRETO COM EMPREGO DO PEPTÍDEO OTIMIZADO

Resultado	Doença	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiro Positivo (133)	Falso Positivo (2)
Negativo	Falso Negativo (7)	Verdadeiro Negativo (52)

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} = 0,95 \quad \text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} = 0,96$$

Temos valores de 95% de sensibilidade e 96% de especificidade para o teste de ELISA indireto com o emprego do peptídeo otimizado.

7.5 CLASSIFICAÇÕES DOS GRUPOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE DE ACORDO COM A ABSORVÂNCIA NO TESTE DE ELISA.

Na Tabela 4 estão descritas as classificações dos pacientes com sintomatologia de hanseníase de acordo com os resultados de absorvância obtidos no teste de ELISA e que possuem diferença estatística significativa entre os grupos.

TABELA 4: CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS FORMADOS POR SEPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO TESTE DE ELISA.

Classificação	Crítérios
CN	Controle negativo (verdadeiro negativo)
NEG	Absorvância abaixo do valor de <i>cut off</i> (falso negativo)
TB	Absorvância entre o valor de <i>cut off</i> e 2 vezes o valor de <i>cut off</i> – Título baixo
TM	Absorvância entre 2 e 3 vezes o valor de <i>cut off</i> – Título médio
TA	Absorvância acima de 3 vezes o valor de <i>cut off</i> - Título alto

7.6 DIFERENÇAS ANALÍTICAS ENTRE O PEPTÍDEO OTIMIZADO E O PEPTÍDEO NÃO OTIMIZADO.

Na Tabela 5 estão descritas as diferenças entre a técnica de ELISA do peptídeo otimizado e do peptídeo não otimizado. Pode-se observar um aumento da sensibilidade do teste e segundo análises estatísticas esse aumento de sensibilidade não está relacionado com a classificação da doença diagnosticada.

TABELA 5: DIFERENÇAS ANALÍTICAS ENTRE O PEPTÍDEO OTIMIZADO E O PEPTÍDEO NÃO OTIMIZADO.

Diferenças	Técnica Alban, 2013 Peptídeo não otimizado	Técnica utilizada Peptídeo otimizado
Fase sólida	Placa Corning®	Placa Nunc®
Antígeno	3 Sequências Peptídicas	1 Sequência Peptídica + <i>LINKER</i> + C + Proteína Carreadora
Peptídeo	150 ng/mL	10 µg/mL
Diluição do soro	1:100	1:50
Sensibilidade	95%	95%
Especificidade	65%	96%

7.7 ANÁLISES DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA O SUBSTRATO DO BIOSSENSOR

Análise topográfica da superfície do sensor de ouro sem substrato e após a adsorção da monocamada automontada de peptídeos na superfície do ouro.

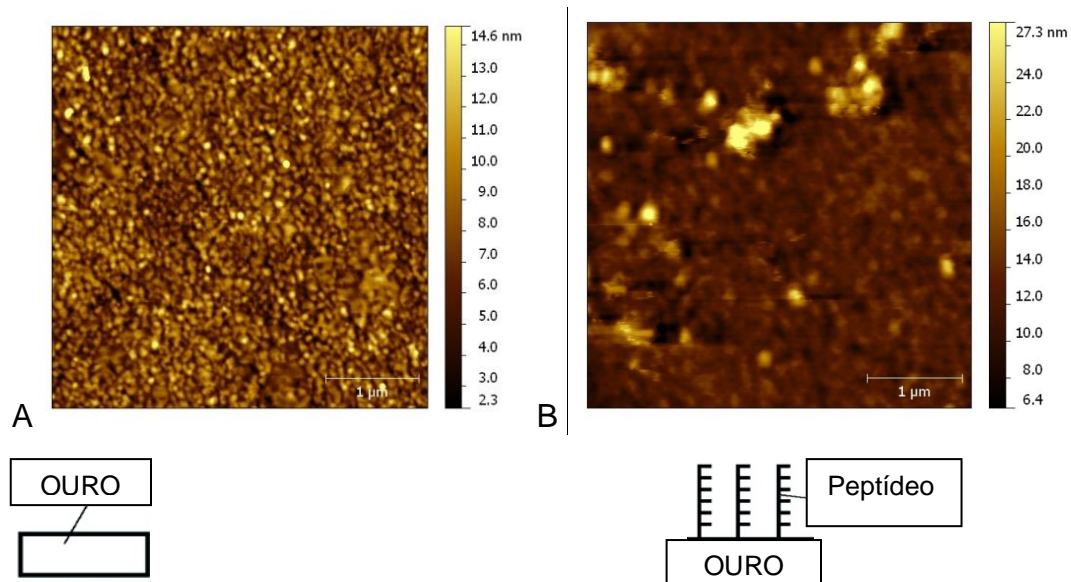


FIGURA 18: IMAGEM TOPOGRÁFICA DE FASE OBTIDA PELO MFA A – SENSOR DE OURO ANTES (A) E APÓS (B) ADSORÇÃO DO PEPTÍDEO OTIMIZADO.

A Figura 18 mostra em A, a topografia do ouro e em B, a topografia do material recobrendo o ouro, peptídeo + bloqueio, corroborando o resultado da análise de QCM. O substrato, neste caso, o peptídeo está aderido ao ouro modificando a sua estrutura, é este substrato que faz a interação com o anticorpo em análise quando submetido ao QCM.

7.8 ANÁLISES DE QCM

7.8.1 Adsorção do peptídeo otimizado a superfície do cristal.

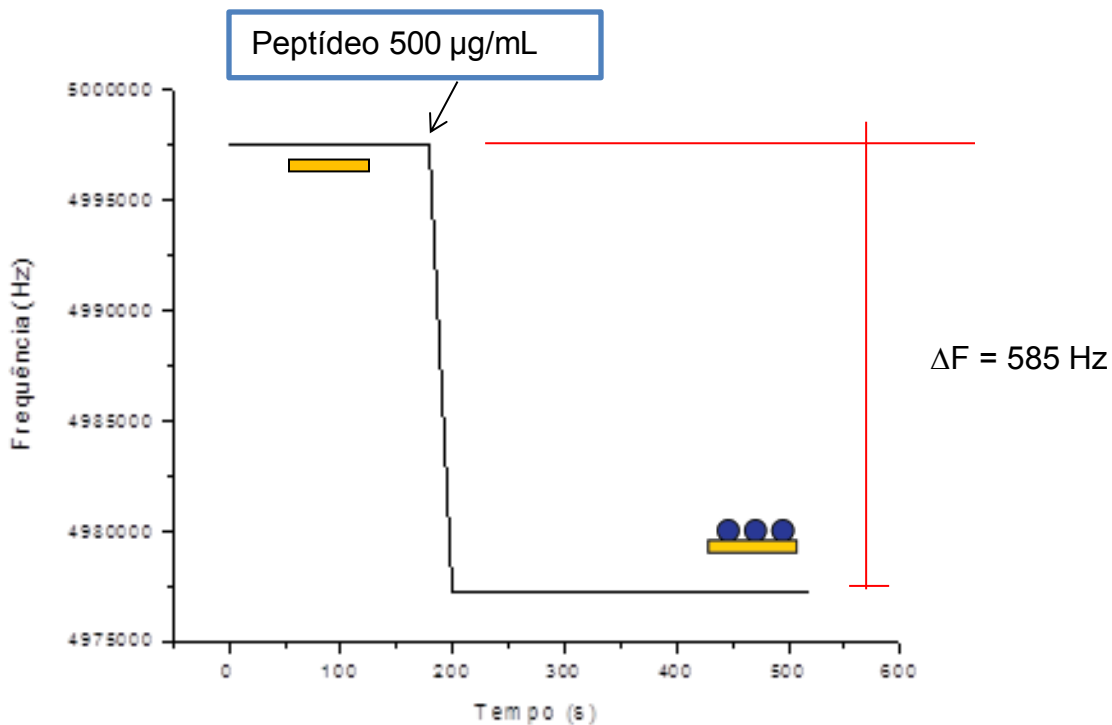


FIGURA 19: COMPORTAMENTO DO SENSOR FRENTE À ADSORÇÃO DO PEPTÍDEO AO SENSOR DE CRISTAL. Frequência (Hz) x Tempo (s).

A figura 19 ilustra a adsorção material injetado no sistema (peptídeo) ao sensor indicando a ligação do peptídeo ao material de ouro, ou seja, a cisteína adicionada ao peptídeo interagiu com o ouro como era esperado. Este resultado foi corroborado pela MFA do sensor adsorvido. A diferença foi de 585 Hz.

7.8.2 Análise da amostra positiva para hanseníase

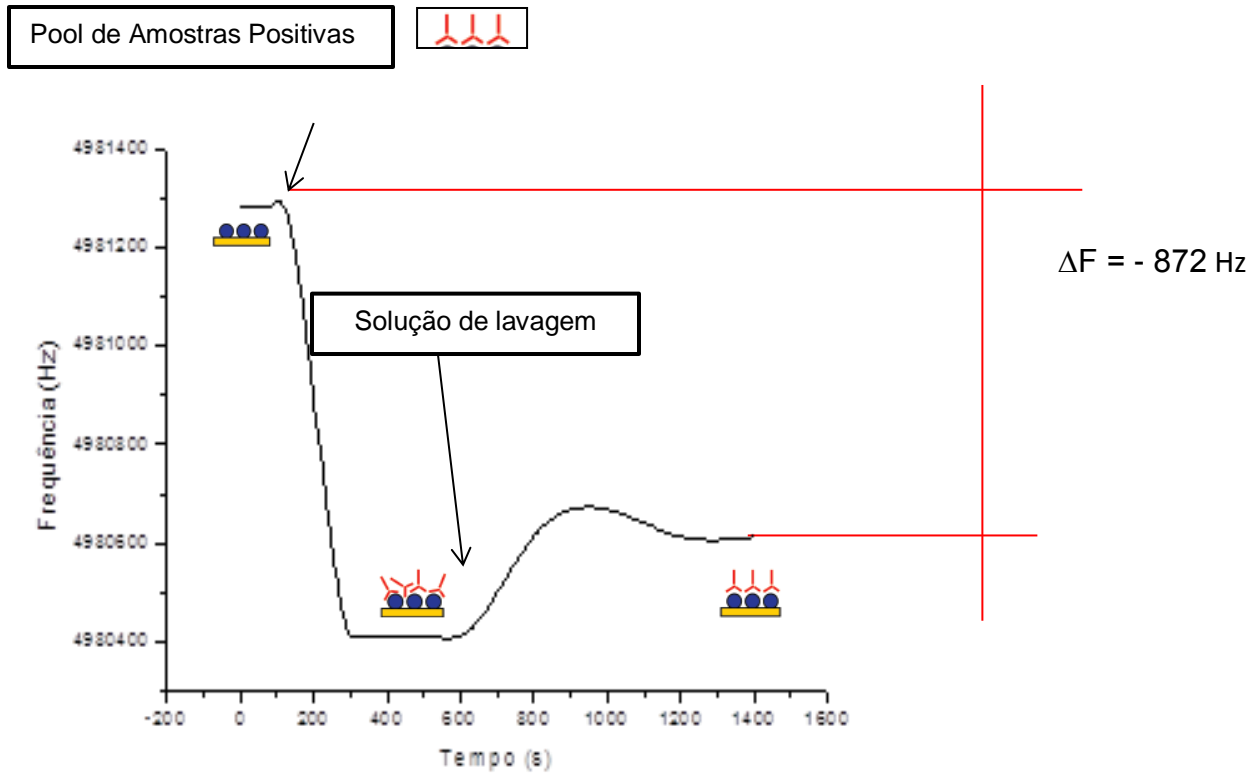


FIGURA 20: COMPORTAMENTO DO SENSOR FRENTE À AMOSTRA POSITIVA PARA HANSENÍASE. Diluição (1:50). Frequência (Hz) x Tempo (s).

Os dados da Figura 20 demonstram a adsorção do anticorpo ao peptídeo aderido ao sensor, ou seja, há evidentemente ligação antígeno-anticorpo. Após o tempo de estabilização da amostra, foi adicionada a solução de lavagem e a adsorção permaneceu com alta variação de frequência. A diferença de frequência da amostra foi de 872 Hz.

7.8.3 Análise da amostra negativa para hanseníase

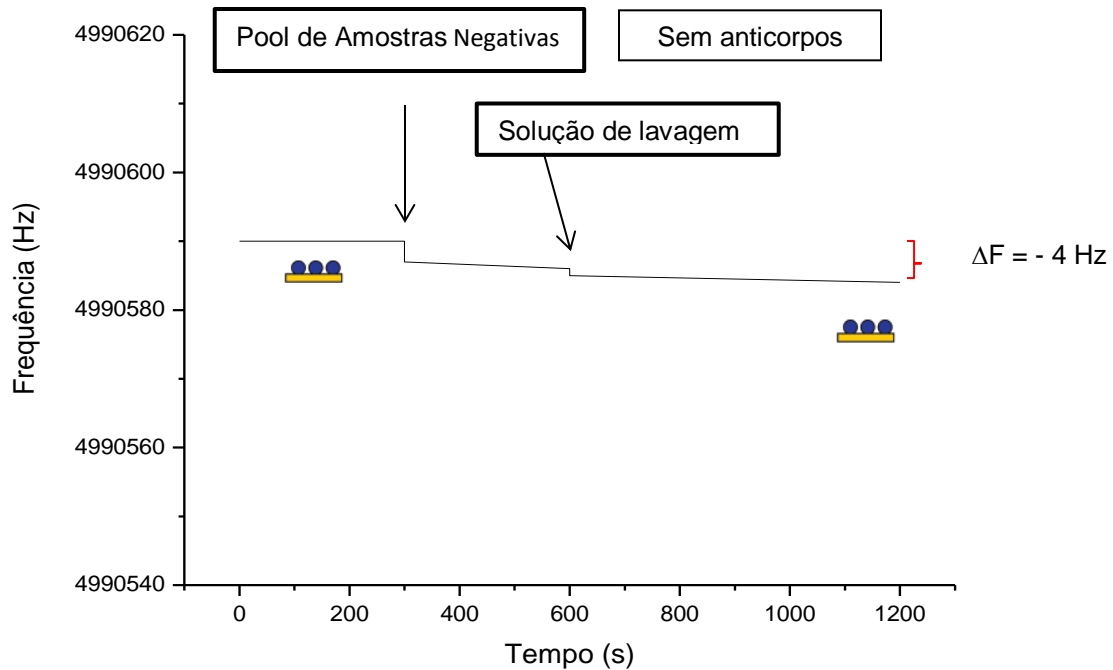


FIGURA 21: COMPORTAMENTO DO SENSOR FRENTE À AMOSTRA NEGATIVA. Diluição (1:50). Frequência (Hz) x Tempo (s).

Os resultados da Figura 21 demonstram a falta de interação antígeno-anticorpo sobre o sensor, pois houve uma queda de apenas 4Hz na frequência e não houve formação da curva clássica de adsorção do sistema, foi adicionada a solução de lavagem e o sistema continuou com o mesmo comportamento.

7.8.4 Análise de amostra positiva para tuberculose

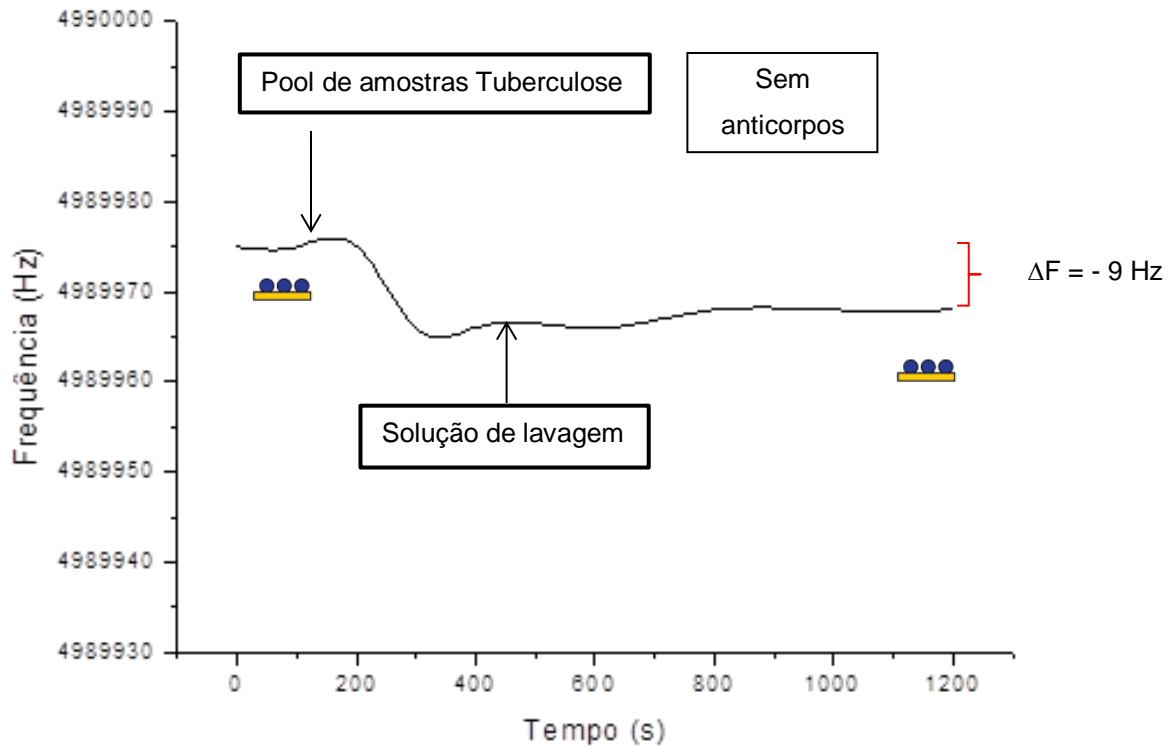


FIGURA 22: COMPORTAMENTO DO SENSOR FRENTE À AMOSTRA DE TUBERCULOSE. Diluição (1:50). Frequência (Hz) x Tempo (s).

Os dados plotados na Figura 22 mostram um perfil de similaridade com a amostra negativa, ou seja, baixa interação da amostra com o substrato do sensor. Houve uma pequena adsorção e baixa diferença de frequência quando a solução de lavagem foi adicionada ao sistema no tempo. Neste caso pode-se inferir baixa reação cruzada com antígenos semelhantes. A variação de frequência foi de 9 Hz.

7.9 CÁLCULOS DE RUGOSIDADE DA SUPERFÍCIE DO SENSOR FRENTE A DIFERENTES ETAPAS

TABELA 6: MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA PARA MEDIDAS DE RUGOSIDADE REALIZADAS A PARTIR DA TOPOGRAFIA DO MFA.

	Sensor Limpo (ouro)	Peptídeo + BSA	Substrato + Anticorpo
Rugosidade (RMS)	2,05 \pm 0,02	3,74 \pm 1,17	3,79 \pm 0,15

Embora não se tenha observado nível de significância para as amostras, é evidente uma tendência de aumento da rugosidade para o sensor tratado.

7.10 CÁLCULOS DO ÂNGULO DE CONTATO DA SUPERFÍCIE DO SENSOR FRENTE A DIFERENTES ETAPAS

TABELA 7: MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA PARA MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO REALIZADAS A PARTIR DA TÉCNICA DE TENSÍOMETRIA. Todos os grupos diferem significativamente entre si.

	Sensor Limpo (ouro)	Substrato + BSA	Substrato + Anticorpo
Ângulo de Contato (θ)	81,6 \pm 0,62 ^a	63,12 \pm 1,00 ^b	46,35 \pm 1,84 ^c

Neste caso encontramos diferença significativa de ângulo de contato entre os diferentes passos de depósitos do material sobre o sensor, indicando que em cada situação houve modificação da superfície do sensor.

8. DISCUSSÃO

Há uma grande demanda para o desenvolvimento de teste diagnóstico para hanseníase que seja capaz de diagnosticar a doença antes mesmo de aparecerem os sintomas e independente da classificação clínica, pois pacientes paucibacilares possuem dificuldade em diagnóstico devido à baixa produção de anticorpos e diminuição do agente etiológico nos locais de lesão para análise por baciloscopia. (WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Algumas ferramentas diagnósticas disponíveis até o momento são: baciloscopia (visualização e reconhecimento do *M. Leprae* através de microscopia óptica), teste de Mitsuda (aplicação de antígeno na derme para verificação de reação imunológica) e, em alguns centros de pesquisa, o teste sorológico com o antígeno PGL-I (glicolípido fenólico I) (WALKER; LOCKWOOD, 2006).

O PGL-I foi descoberto nos anos 80 como sendo o primeiro antígeno identificado do *M. Leprae*. Por ser altamente imunogênico tornou-se produto de uso em testes sorológicos. Porém, PGL-I é um peptídeo semissintético, sendo necessário o cultivo *in vivo* de *M. Leprae* para obtenção do peptídeo. Nos anos 70 descobriu-se a capacidade de alguns animais de serem incubadores do *M. Leprae*, assim o tatu da espécie *Dasypus novemcinctus* tornou-se o principal meio de cultivo do *M. leprae* para a obtenção do PGL-I. (SPENCER *et al.*, 2011; SPENCER; BRENNAM, 2011).

Com o objetivo de desenvolver um antígeno totalmente sintético e eficiente, Alban e colaboradores (2013) utilizaram a técnica de *Phage Display* para a seleção de um peptídeo mimético selecionado por anticorpos de pacientes, o qual foi eficiente na diferenciação entre pacientes positivos e negativos para hanseníase.

Porém, com o objetivo de melhorar a sensibilidade e especificidade do teste e o torná-lo acessível, o presente trabalho fez modificações deste peptídeo necessárias para torná-lo mais acessível a anticorpos e que permitissem a adsorção a um biossensor avaliado pela técnica de microbalança de cristal de quartzo.

Adotando-se a técnica de monocamada automontada como substrato houve a necessidade de inserir um aminoácido capaz de se ligar ao ouro, material este utilizado como suporte ao substrato do biossensor desenvolvido. Os dados apresentados mostraram sucesso na inserção da cisteína ao peptídeo, pois se obteve aderência do peptídeo ao sensor de ouro confirmado pelo QCM e corroborado pelo MFA.

Com o objetivo de aumentar a interação antígeno-anticorpo foi inserido também um *linker* espaçador de glicina-serina, demonstrado em trabalhos anteriores (SHANG *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2005). A inserção de um *linker* espaçador na sequência do peptídeo o torna mais flexível e aumenta a sua exposição para ligação com o anticorpo. (EVERS *et al.*, 2006). O *linker* glicina-serina foi escolhido por ser uma sequência não imunogênica e possuir baixa interferência na ligação antígeno-anticorpo alvo. Os

resultados encontrados para o peptídeo modificado revelaram um aumento na detecção de pacientes cujo título de anticorpos é mais baixo para o teste de ELISA. Desta forma o *linker* espaçador aumentou a eficiência do teste.

Na tentativa de obter um ensaio eficiente, o peptídeo modificado foi implementado em várias configurações de imunoenaios, sendo o primeiro deles o dot blot.

O dot blot é uma técnica analítica simples utilizada para identificar proteínas específicas presentes no soro de pacientes. Primeiramente, a proteína a ser analisada deve ser dispensada sobre a membrana de nitro celulose e o anticorpo presente no soro do paciente deve-se ligar a esta proteína aderida à membrana. Para tal são utilizados marcadores para visualização da detecção. (LUTZ *et al.*, 2006).

Apesar de se tratar de uma técnica simples, os resultados apresentados para esta técnica não foram satisfatórios, pois se obteve alta reatividade cruzada com a proteína carreadora. No ensaio de dot blot, epítomos importantes do antígeno podem ser comprometidos durante o processo de adsorção, diminuindo assim a reatividade do anticorpo (GOURLET *et al.*, 1990). Outro ponto importante reconhecido pela literatura é o fato de terem sido testados anticorpos policlonais, pois a variabilidade de interação antígeno-anticorpo é muito alta, podendo-se desta forma aumentar a possibilidade de epítomos alvo não estarem devidamente expostos para ligação (GOURLET *et al.*, 1990; LUTZ *et al.*, 2006).

Paralelamente, o peptídeo modificado foi avaliado por ELISA comparando com o desempenho do peptídeo original descrito por Alban e colaboradores (2013). Obteve-se um aumento em relação à especificidade de 95% para 96% e sensibilidade de 65% para 95%. Esta diferença pode ser explicada pela presença do espaçador inserido na sequência do peptídeo sintetizado. Segundo SHANG e colaboradores (2011) a inserção de um espaçador na sequência peptídica pode conferir maior flexibilidade e exposição de sítios de ligação com os anticorpos em análise.

Com a otimização, o peptídeo modificado e conjugado à KLH foi capaz de indicar diferentes grupos de pacientes hansênicos com médio e baixo título de anticorpos no teste de ELISA. Curiosamente, após teste estatístico constatou-se que não houve correlação entre o título de anticorpos detectados e a classificação da doença. Desta

forma, independentemente da classificação, o teste se mostra eficaz no diagnóstico da hanseníase ao contrário do que foi encontrado por outros autores em que a sensibilidade do ELISA depende da classificação da doença, sendo esta menor para pacientes paucibacilares onde encontramos valores de 30 a 50% de sensibilidade. (SPENCER, 2011; ALBAN *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2008).

O teste de ELISA foi desenvolvido em 1960 e deste então é o ensaio imunológico mais utilizado em diagnóstico laboratorial. Trata-se de um ensaio com variáveis conhecidas e controladas. Já existem muitos mecanismos de controle de qualidade para os testes desenvolvidos. Porém, é um teste que demanda muitos reagentes e equipamentos específicos. Para realizar o teste também é necessária uma equipe especializada. Não é um teste simples, pois demanda tempo, reagentes específicos e controle das diversas etapas do processo (CROWTHER, 2001).

Na tentativa de contornar esses problemas, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biossensor. A construção do biossensor tem a finalidade de diminuir o uso de inúmeros reagentes bem como as etapas do processo, além de simplificar o procedimento para que este possa ser executado por equipe não especializada.

Desta forma encontramos como avaliação para o desenvolvimento de um biossensor a técnica de QCM. A microbalança de cristal de quartzo é uma metodologia já empregada em muitos trabalhos cujo objetivo foi observar a interação antígeno-anticorpo como, por exemplo, a detecção de produtos de degradação da fibrina para o diagnóstico de tromboembolismo pulmonar e coagulação intravascular disseminada apresentada por Aizawa e colaboradores (2003), detecção de *Salmonella sp.* obtida através da sensibilização de anticorpos ao sensor de ouro apresentado por Park e colaboradores (2000).

Estes são apenas alguns dos trabalhos citados onde a interação antígeno-anticorpo é medida através da técnica de QCM, existem vários outros que utilizam marcadores diversos. Vashist e Vashist (2011) no seu artigo de revisão sobre os recentes avanços baseados em sensores de QCM publicaram que houve um grande aumento na última década no desenvolvimento de imunossensores utilizando esta técnica.

Levando em consideração os dados encontrados, comprovou-se que a inserção de um *linker* ao peptídeo tornou o teste mais sensível e específico e a inserção da cisteína na porção C-terminal tornou o peptídeo capaz de formar uma monocamada automontada na superfície do sensor de QCM, podendo assim formar o substrato do biossensor desenvolvido.

Em relação à análise do substrato do sensor, as imagens obtidas por MFA corroboram os dados obtidos pelo QCM, após o tratamento de sensibilização do peptídeo e o bloqueio com solução de BSA, pode-se observar a formação da monocamada automontada resultante da interação dos grupos tióis do peptídeo e o ouro, características identificadas também por outros autores (SHANG *et al.*, 2011).

Através da topografia obtida pelo MFA pode-se inferir a rugosidade da superfície em análise, e através das imagens nota-se diferença na superfície do sensor após sensibilização com o peptídeo+BSA, demonstrando a formação da monocamada automontada do peptídeo na superfície do sensor.

Para avaliação estatística da rugosidade, embora a diferença não tenha sido comprovada, houve uma tendência de aumento da rugosidade para as diferentes etapas do processo. Segundo alguns autores (YANG *et al.*, 2011; YING, 2006), quanto maior a rugosidade da superfície maior a superfície de contato com o antígeno e assim maior a interação com o anticorpo e conseqüente efetividade de reação.

A modificação da superfície após adsorção do peptídeo foi também constatada ao se avaliar o ângulo de contato, o qual diferiu significativamente entre os diferentes processos de tratamento do sensor, corroborando os resultados de QCM apresentados. Em trabalhos anteriores foram encontradas respostas semelhantes para o ângulo de contato de superfícies modificadas por peptídeo e peptídeo + anticorpo que as torna mais hidrofílicas (SMITH *et al.*, 1992; LESTELIUS *et al.*, 1997; LAIBINIS *et al.*, 1991).

Com resultados favoráveis para a montagem da monocamada automontada do peptídeo sintético, as amostras de pacientes com hanseníase foram testadas no biossensor através de análises de QCM e foram encontrados resultados de 100% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Segundo Eun e colaboradores (2002) a afinidade de um antígeno com o anticorpo pode ser medida pela variação da frequência de oscilação do sensor, desta

forma quanto maior a variação de frequência maior será a afinidade antígeno anticorpo em análise.

Após desenvolvimento próprio de protocolo de utilização do sistema QCM 200; 5MHz para amostras biológicas, ensaios foram realizados com amostras de pacientes com hanseníase e de controle negativo.

Os resultados obtidos para amostras de pacientes com hanseníase mostraram um decréscimo na frequência de oscilação do sistema, assim demonstrando a interação dos anticorpos presentes na amostra com o peptídeo adsorvido ao sensor.

Os dados foram confirmados pela análise do teste com amostra negativa na qual a variação da frequência de oscilação foi baixa. Outros autores também observam resultados semelhantes com o controle negativo quando em análise de interação antígeno-anticorpo (CHEN *et al.*, 2009; SADHASIVAM *et al.*, 2012; SHANG *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2006).

Imunossensores traduzem a interação antígeno-anticorpo diretamente pela mudança na frequência do QCM (LEE *et al.*, 2005). O aumento de massa na superfície do cristal devido à interação antígeno-anticorpo pode ser traduzido como a diminuição da frequência de oscilação ressonante do cristal (EUN *et al.*, 2002).

Para análise da reação cruzada também foram testadas amostras de pacientes com tuberculose, cujo agente etiológico é do mesmo gênero que o *M. leprae*. O resultado encontrado foi semelhante aquele descrito para amostra negativa, assim descartando a possível reação cruzada com demais antígenos. A Tuberculose foi o teste de escolha por se tratar de doença causada por agente etiológico (*Mycobacterium tuberculosis*) do mesmo gênero que o agente da hanseníase, ou seja, podendo-se admitir que haja possibilidade de reação cruzada por se tratar de agentes etiológicos com antígenos semelhantes. Porém, conseguiu-se uma resposta diferente podendo-se assim diferenciar antígenos semelhantes.

Felizmente, os resultados foram mais satisfatórios do que os encontrados pelo teste de ELISA, pois a amostra positiva mostrou interação com o peptídeo enquanto que as amostras negativas e de outra doença (tuberculose) não demonstraram interação efetiva, não havendo decréscimo significativo na frequência de oscilação do sensor. Neste caso, obteve-se 100% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Com a obtenção dos dados satisfatórios para o biossensor desenvolvido, a próxima etapa para o grupo de pesquisa será a miniaturização do sistema, utilizando-se da nano biotecnologia, de forma que o teste desenvolvido alcance áreas endêmicas afastadas dos grandes centros, ou seja, que o teste possa ser útil para a detecção da doença a campo e, permitindo a identificação dos doentes antes mesmo do início da sintomatologia bem como o tratamento precoce e assim, diminuir o índice de transmissão da hanseníase.

9. CONCLUSÃO

A imunização do coelho com o peptídeo de escolha para fins de controle positivo foram obtidos com satisfatória reatividade;

A técnica de dot spot conseguiu detectar apenas pacientes cujo título de anticorpos é mais alto, se mostrando uma técnica menos sensível que as demais técnicas utilizadas e com baixa especificidade tendo em vista a reatividade cruzada com a proteína carreadora;

É evidente que a otimização da sequência do peptídeo melhorou o seu desempenho no teste de ELISA, conseguindo assim identificar grupos com menor título de anticorpos;

A detecção dos anticorpos de pacientes multibacilares e paucibacilares pelo teste de ELISA utilizando-se o peptídeo otimizado foi superior ao obtido com o peptídeo sem modificação, ou seja, o peptídeo otimizado foi reconhecido por anticorpos de pacientes mesmo quando estes apresentam um baixo título, mostrando a eficiência do teste realizado;

Não houve correlação entre a classificação da doença e os diferentes grupos classificados por título de anticorpos, ou seja, o teste padronizado foi capaz de detectar anticorpos tanto em pacientes multibacilares como em pacientes paucibacilares, desta forma o seu uso não é limitado;

O teste de ELISA apresentado com o peptídeo otimizado obteve 95 % de sensibilidade e 96 % de especificidade;

Embora a reação não tenha sido alta, amostras de pacientes com tuberculose ficaram acima *do cut-off* nos testes de ELISA mas quando analisados por QCM, não houve reatividade, mostrando a influência da metodologia utilizada;

A implementação do biossensor bem como a padronização do protocolo de utilização de amostras biológicas para o QCM foi eficiente, para o QCM a sensibilidade e a especificidade foram de 100%.

10. PERSPECTIVAS

Avaliar individualmente os soros de pacientes pelo método de QCM (inclusive com outras doenças);

Após a montagem do biossensor o próximo objetivo do grupo é realizar a miniaturização deste procedimento, através do uso da nano biotecnologia, com o objetivo de atingir grupos distantes de grandes centros, tornado-se acessível o diagnóstico de teste rápido;

Realizar ensaios para determinar os limites de detecção para os anticorpos em análise;

Realizar teste de validação como reprodutibilidade inter e intra ensaio.

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, O L.; RODRIGUES, A C S; LIRANI, J. **Tolerâncias, ajustes, desvios e análise de dimensões**. S Paulo: Editora Edgard Blucher. 2004.

AIZAWA, H.; KUROSAWA, S.; TOZUKA, M.; PARK, J.W.; KOBAYASHI, K. TANAKA, H. Conventional detection method of fibrinogen and fibrin degradation products using latex piezoelectric immunoassay. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 18, p. 765-771, 2003.

ALBAN, S. M.; MOURA, J. F.; MINOZZO, J.C.; MIRA, M. T.; SOCCOL, V. T. Identification of mimotopes of Mycobacterium leprae as potential diagnostic reagents. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 42, 2013.

AUGE, J., HAUPTMANN, P., HARTMANN, J., ROSLER, S., LUCKLUM, R. New design for QCM sensors in liquids. **Sensors and Actuators B**, p.24-25: 43-48, 1995.

BANERJEE, B.; GREENBERGER, P. A.; FINK, J. N.; KURUP, V. P. Conformational and linear B-cell epitopes of Asp f 2, a major allergen of Aspergillus fumigatus bind differentially with IgE antibody in the sera of ABPA patients. **Infect Immun**, v. 67, p.2284-2291, 1999.

BARON, M. H. E BALTIMORE, D. Antibodies against the chemically synthesized genome-Linked protein of poliovirus react with native virus-specific proteins. **Cell** 28, 395-404, 1982.

BEN-DOV, I.; WILLMER, I.; ZISMAN, E.; Piezoelectric immunosensors for urine specimens of *Chlamydia trachomatis* employing quartz crystal microbalance microgravimetric analyses. **Anal. Chem.** 69, 3506–3512, 1997.

BÍBLIA SAGRADA. 82. ed. São Paulo: Editora Ave Maria, 1992.

BINNING, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. H. Atomic Force Microscope. **Phys. Rev. Lett.** 56, 930–933, 1986.

BLOOM, B. R.; MEHRA, V. Immunological Unresponsiveness in Leprosy. **Immunological Reviews**, v.80, 1984.

BONNELL, D. A.; HUEY, B. D., in Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy. Theory, **Techniques and Applications**, 2.^a edição, D. A. Bonnell (ed.), Wiley-VCH, New York, , cap 2, 7, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: DNDS/NUTES, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Distribuição da Hanseníase no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia enzimática**, Lidel, 2003.

CAPELLI-PEIXOTO, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C; CHAVES-MOREIRA, D.; MINOZZO, J.C.; GABARDO, J.; TEIXEIRA, K.N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; ALVARENGA, L.M.; DE MOURA, J. Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis. **Vaccine**, v.29, p.9473-9479, 2011.

CARUSO, F., RODDA, E., FURLONG, D. N., NIIKURA, K., OKAHATA, Y. Quartz crystal

microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development. **Analytical Chemistry**, v.69, p. 2043-2049, 1997.

CARUSO, F., SERIZAWA, T., FURLONG, D. N., OKAHATA, Y. Quartz crystal microbalance and surface plasmon resonance study of surfactant adsorption onto gold and chromium oxide surfaces. **Langmuir**, v. 11, p. 1546-1552, 1995.

CHEN, HSIU-MEI.; HUANG, TSUN-HAN.; TSAI, RUEY-MING. A biotin-hydrogel-coated quartz crystal microbalance biosensor and applications in immunoassay and peptide-displaying cell detection. **Analytical Biochemistry**. v. 392, p. 1-7, 2009.

CHICHESTER, B. L.; **Procedures in Scanning Probe Microscopies**, John Wiley & Sons, Inc.: England, 1998

CROWTHER, J. R. **Methods in Molecular Biology**, vol. 149: The ELISA Guidebook. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2001.

CURIE, J.; CURIE, P. "An oscillating quartz crystal mass detector," **Rendu**, vol. 91, pp. 294-297, 1880.

DESIKAN, K.V.; JOB, C.K. A review of post-mortem findings in 37 cases of Leprosy; *Internal. J. Leprosy*, 32-36, 1968.

ENGVALL, E. PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

EUN, A. J. C.; HUANG, L. Q.; CHEW, F. T; LI, S. F. Y.; WONG, S. M. Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors. **Journal of Virological Methods**, v.99, n.1-2, p. 71-79, 2002.

EVERS, T. H.; van DONGEN, E. N. W. N.; FAESEN, A. C.; MEIJER, E. W.; MERKX, M. Quantitative understanding of the energy transfer between fluorescent proteins connected via flexible peptide linkers. **Biochemistry**, 2006.

FERREIRA, A. A. P; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. *Quimica Nova*, v. 29, n. 1, 2006.

FRESCHI, A. P. P. Desenvolvimento de aplicações tecnológicas da metodologia de Phage Display no diagnóstico do câncer de próstata. (Dissertação Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

GERALDO, V. P. N. **Filmes nanoestruturados contendo lipossomas pr liberação controlada de ibuprofeno**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

GEYSEN, H. M.; RODDA, S. J.; MASON, T. J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. **Molecular Immunology**. v. 23, n. 7, p. 709-715, 1986.

GOETZ, M.; PHILIPPE, R.; LONDOS-GAGLIARDI, D. Immunoreactivity and conformation of the immunodominant domain of HTLV-I envelope surface glycoprotein. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 4, p. 351-358, 1997.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Immunology**. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company; chapters 10 and 2, 2000.

GOULERT, P.; SVOBODA, M.; CAUVIN, A.; CHRISTOPHE, J. The sensitivity of dot immunoassay for the peptides helodermin histidine-isoleucinamide (PHI) and histidine-methioninamide (PHM) increases after peptide cross-linking to proteins prefixed on nitrocellulose. **Journal of Immunological Methods**, v.133, p. 151-157, 1990.

GUIBAULT, G. G. Analytical uses of immobilized Enzymes: Modern Monographs in

Analytical Chemistry, v. 2, Marcel Dekker, New York, 1984.

GUILBAULT, G. G.; HOCK, B.; SCHIMID, R. A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water. **Biosens. Bioelectron.** 7, 411–419, 1992.

HENGERER, C.; KÖSSLINGER, J. DECKER, S. HAUCK, I. QUEITSCH, H. WOLF AND S. DÜBEL, Determination of Phage Antibody Affinities to Antigen by a Microbalance Sensor System, **BioTechniques**, v. 26, p.956-964, 1999.

HOLMLIN, R. E.; CHEN, X.; CHAPMAN, R. G.; TAKAYAMA, S.; WHITESIDES, G. M. Zwitterionic SAMs that resist nonspecific adsorption of protein from aqueous buffer. **Langmuir**, v. 17, p. 2841, 2001.

KAMINSKI, G. A. T. **Desenvolvimento de lipossomas revestidos por biopolímeros a fim de controlar a cinética de liberação proteica.** (Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, 2013.

KANAZAWA, K. K.; GORDON, J. G. Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 1771-1772, 1985.

KAPLAN, G.; COHN, Z. A. The Immunobiology of Leprosy. **Int Rev Exp Pathol**, 28, 45-78, 1986.

KARMANOV, I. Wetting or non-wetting liquid? **Phys. Edu.**, 77, 58, 2000.

KISSMANN, K. G. **Adjuvantes para caldas de produtos fitossanitários.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 21., 1997, Caxambu, MG. Palestras... Caxambu, MG: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, p.61-77, 1997.

KÖSSLINGER, C.; DROST, S.; ABERL, F.; WOLF, H.; KOCH, S.; WOIAS, P. A quartz

- crystal biosensor for measurement in liquids. **Biosens. Bioelectron.** 7: 397–404, 1992.
- KUMADA, Y.; SASAKI, E.; KISHIMOTO, M. Preparation of scFv-immobilized quartz crystal microbalance sensor by PS-tag-mediated solid-phase refolding. **J. Biosci Bioeng**, v. 4 n. 111, p. 753 – 767, 2011.
- LAIBINIS, P.E.; WHITESIDES, G.M.; ALLARA, D.L.; TAO, Y.T.; PARIKH, A.N.; NUZZO, R.G. Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold. **J Am Chem Soc**, v. 113, n. 2, p. 7152-7167, 1991.
- LEE, Y. G.; CHANG, K. S. Application of a flow type quartz crystal microbalance immunosensor for real time determination of cattle bovine ephemeral fever virus in liquid. **Talanta**, v.65, n.5, p. 1335-1342, 2005.
- LENG, Y.; CUMMINGS, P. T. Hydration structure of water confined between mica surfaces. **J. Chem. Phys**, 124, 2006.
- LESTELIUS, M.; LIEDBERG, B.; TENGVALL, P. *In vitro* plasma protein adsorption on ω - functionalized alkanethiolate self-assembled monolayers. **Langmuir**, v. 13, n. 2, p. 5900-5908, 1997.
- LIMA, C. S.; ZULIANELLO, L.; MARQUES, M. . M; KIM, H.; PORTUGAL, M. I.; ANTUNES, S. L.; MENOZZI, F. D.; OTTENHOFF, T. H. M.; BRENNAN, P. J.; PESSOLNI, M. C. V. Mapping the laminin-binding and adhesive domain of the cell surface-associated Hlp/LBP protein from *Mycobacterium leprae*. **Microbes and Infection**, 1097-1109, 2005.
- LO, C.C.; HOPKINSON, M. Influence of adjuvants on droplet spreading. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMICALS, 14., 1995, Melbourne. **Proceedings**. Rotorua: New Zealand Forest Research Institute, p.144-149, 1995.

LUTZ, G. Z.; CHEROUATI, N.; REINHART, C.; PATTUS, F.; WAGNER, R. Dot-blot immunodetection as a versatile and high-throughput assay to evaluate recombinant GPCRs produced in the yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. v. 50, p. 118-127, 2006.

MANNELLI, I., MINUNNI, M., TOMBELLI, S., WANG, R., SPIRITI, M. M., MASCINI, M. Direct immobilization of DNA probes for the development of affinity biosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 66, p. 129-138, 2005.

MANOUTCHARIAN, K.; SOTELO, J.; GARCIA, E.; CANO, A.; GEVORKIAN, G. Characterization of Cerebrospinal fluid Antibodies Specificities in Neurocysticercosis Using Phage Display Peptide Library. **Clinical Immunology**, v.91, n.1, p.117-121, 1999.

MECEA, V. M. From quartz crystal microbalance to fundamental principles of mass measurements, **Anal. Lett.** 38, 753–767, 2005.

MILES, M. Scanning probe microscopy. Probing the Future. **Science**, v. 277, n. 5333, p. 1845-1847, 1997.

MINUNNI, G. M.; MASCINI, M.; GUILBAULT, G. G.; HOCK, B. The Quartz Crystal Microbalance as Biosensor. A Status Report on its Future, **Anal. Lett.** v. 28, n. 5, p. 749, 1995.

MOITA NETO, J. M. **Molhamento e ângulo de contato**. Teresina: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí, 2006.

MOURA, R. S.; CALADO, K. L.; OLIVEIRA, M. L. W.; BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia da Hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 41, 2008.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **JOURNAL OF AM. ACAD. DERMATOLOGY**, v. 51, n. 3, p. 417-426, 2004.

NOLL, M. A. **Obtenção de anticorpos e peptídeos recombinantes através de Phage Display para aplicação em imunodignóstico**. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, 2011.

NUZZO, R. G.; ALLARA, D. L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. **J AM CHEM SOC**, v. 105, n. 13, p. 4481-4483, 1983.

NUZZO, R. G.; FUSCO, F. A.; ALLARA, D. L. Spontaneously organized molecular assemblies. 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces. **J AM CHEM SOC**, v. 109, n. 8, p. 2358-2368, 1987.

OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 1981.

OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD/ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OPS/OMS). Lepra al día: situación de la eliminación de la lepra en algunos países de la América Latina. **Boletín Eliminación de la Lepra de las Américas**, n. 9, nov. 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Expert Committee on Leprosy**. Sixth Report, TRS 768, Geneva, World Health Organization, 1988.

OSKAM L, SLIM E, BUHRER-SEKULA S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. **Leprosy Review**, v.74, p.196-205, 2003.

OSTUNI, E. C., R. G.; LIANG, M. N.; MELULENI, G.; PIER, G.; INGBER, D. E.; WHITESIDES, G. M. A survey of structure – property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. **Langmuir**, v. 17, p. 6336, 2001.

PAIVA, J. G. **Interacção entre anestésicos e sistemas biomembranares modelo**. (Dissertação Mestrado em Engenharia Farmacêutica) – Universidade técnica de Lisboa, 2010.

PARK, IN-SEON, KIM, WOO-YEON, KIM, N. Operation characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting *Salmonella* spp. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 15, p. 167-172, 2000.

POON, C.Y.; BHUSHAN B., “Comparison of surface roughness measurements by stylus profiler, AFM, and non-contact optical profiler”, **Wear**, 190, pp. 76-88, 1995.

POSNER, B.; SMILEY, J.; LEE, I.; BENKOVIC, S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. **Trends in Biochemical Sciences**. v.19, n. 4, p.145-150, 1994.

POTIPITAK, T.; NGRENNGARMLERT, W.; PROMPTMAS, C.; CHONEAN, S.; ITTARAT, W. D Diagnosis and genotyping of *Plasmodium falciparum* by a DNA biosensor based on quartz crystal microbalance (QCM), **Article in press**, 2010.

REGENMORTEL, M. H. V.; MULLER, S. **Synthetic peptide as antigens**, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, v. 28, 1 Ed. Ed. Elsevier, 1999.

RODRIGUES, R. C. Uso de peptídeo sintético selecionado por Phage Display para imunodiagnóstico da neurocisticercose humana. (Dissertação Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.

ROGERS, K. R. Principles of Affinity Based Biosensors, **Molecular Biotechnology**, v.14, p. 109, 2000.

ROMANI, A.; MINUNNI, M.; MULINACCI, N.; PINELLI, P.; VINCIERI, F.F. Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric bisensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination. **J. Agric. Food Chem**, v.48, p. 1197-1203, 2000.

SADHASIVAM, S.; CHEN, JUNG-CHIH.; SAVITHA, S.; LIN, FENG-HUEI. YANG, YI-YUAN.; LEE, CHI-HSIN. A real time detection of the ovarian tumor associated antigen 1 (OVTA 1) in human serum by quartz crystal microbalance immobilized with anti-OVTA 1 polyclonal chicken IgY antibodies. **Material Science and Engineering**, v. 32, p. 2073-2078, 2012.

SALGADO, A. M. **Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

SAUERBREY, G. Z. "Use of quartz vibration for weighing thin films on a microbalance," **Physik Journal**, vol. 155, pp. 206–212, 1959.

SCOTT J. K.; SMITH G. P. Searching for peptides ligands with an epitope library. **Science**. v. 249, n. 4967, p. 386-390, 1990.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO (SESSP), Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. "Alexandre Vranjac" . Divisão de Vigilância Epidemiológica em Hanseníase. Programa de Controle da Hanseníase. **Situação Epidemiológica da Hanseníase, 2011**. Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, 2012.

SERVIÇO NACIONAL DE LEPROA. **Manual de leprologia**. Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Saúde, 1960.

SHANG, Y.; SINGH, P. R.; CHISTI, M. M.; MERNAUGH, R.; ZENG, X. Immobilization of a human epidermal growth factor receptor 2 mimotope-derived synthetic peptide on Au and its potential application for detection of Herceptin in human serum by quartz crystal microbalance. **Anal. Chem**, v. 83, p. 8928-8936, 2011.

SHEN, Z.; MERNAUGH, R. L.; YAN, H.; YU, L.; ZHANG, Y. ZENG, X. Engineered recombinant single-chain fragment variable antibody for immunosensors. **Anal. Chem.**, v. 77, p. 6834-6842, 2005.

SIDHU, S.S.; LOWMAN, H.B.; CUNNINGHAM, B.C.; WELLS, J.A. Phage Display for selection of novel bindings peptides. **Methods in Enzymology**. v.63, p. 328-333, 2000.

SKLADAL, P.; MINUNNI, M.; MASCINI, M.; KOLAR, V.; FRANEK, M., Characterization of monoclonal antibodies to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a piezoelectric quartz crystal microbalance in solution. **J. Immunol. Methods** 176: 117–125, 1994.

SMITH, E.L.; ALVES, C.A.; ANDEREGG, J.W.; PORTER, M.D.; SIPERKO, L.M. Deposition of metal overlayers at end-group-functionalized thiolate monolayers adsorbed at gold. 1. Surface and interfacial chemical characterization of deposited copper overlayers at carboxylic acid-terminated structures. **Langmuir**, v.8, n.2, p. 2707 – 2714, 1992.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**. v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, 1985.

SPENCER, J. S. E BRENNAN, P. J. The role of Mycobacterium leprae phenolic glycolipi I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Lepr. Rev.** v. 82, p. 844-857, 2011.

SPENCER, J. S. *et al.* Analysis of antibody responses to Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**. p. 260-267, 2011.

SPETZ, A. Chemical Sensor Technologies, **Tutorial**, 2006.

TAKAHASHI, S., MATSUNO, H., FURUSAWA, H., OKAHATA, Y. Kinetic analyses of divalent cation-dependent EcoRV digestions bilized quartz crystal microbalance. **Analytical Biochemistry**, v. 361, p. 210-217, 2007.

TANG, DIAN-QUAN; ZHANG, DIAN-YOUNG.; AI, H. Amplification of the antigen-antibody interaction from quartz crystal microbalance immunosensors via back-filling immobilization of nanogold on biorecognition surface. **Journal of Immunological Methods**, v. 316, p 144-152, 2006.

THOMAS, T.R., **Rough Surfaces**, 2nd ed., Imperial College Press, London, 1999.

TIDWELL, C. E.; S.; RATNER, B.; TARASEVICH, B.; ATRE, S.; ALLARA, D. Endothelial cell growth on adsorbed monolayers of terminally substituted alkyl thiols. **Langmuir**, v.13, p. 3404, 1997.

TOMBELLI, S.; MASCINI, M. Piezoelectric Quartz Crystal Biosensor: Recent Immobilisation Schemes, **Anal. Lett.** v.33, n.11, p. 2129-2151, 2000.

TOWERY, R. B., FAWCETT, N. C., EVANS, J. A. Determination of chloroplast DNA in a cultured soybean line using a QCM biosensor. **IEEE Sensors Journal**, v.4, n.4, p. 489-493, 2004.

ULUDAG, Y. What is a biosensor? Biosensors, Glasgow, 2009.

UTTENTHALER, E.; KÖSSLINGER, C.; DROST, S. Characterization of immobilization methods for African swine fever virus protein and antibodies with a piezoelectric immunosensor. **Biosens. Bioelectron.** v.13, p. 1279–1286, 1998.

VALENGA, F. **Desenvolvimento, caracterização e funcionalização de nanofilmes a partir de galactomanana e alginato.** Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

VASHIST, S. K. E VASHIST, P. Recent advances in quartz crystal microbalance-based sensors. Review Article. **Journal of Sensors**, 2011.

WALKER, S. L. E LOCKWOOD, D. N. J. The clinical and immunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, p. 103-121, 2006.

WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n.16,,p. 3011-3016, 2000.

WELLER, T. H.; COONS, A. H. **Proc. Soc. exp. Biol.** (N.Y.), 86, 789, 1954.

WIESENDANGER, R., in Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and Applications, R. Wiesendanger (ed.), **Cambridge Univ. Press**, Cambridge, 1994.

WORCESTER, D. L.; MILLER, R. G.; BRYANT, P. J.; **J. Micros.** 152, 817, 1988.

YANG, MING-HUI.; JONG, SHIANG-BIN.; CHUNG, TZE-WEN.; HUANG, YING-FONG.; TYAN, YU-CHANG. Quartz crystal microbalance in clinical application, Biosensors for Health, **Environment and Biosecurity**, Prof. Pier Andrea Serra (Ed.), 2011.

YING, L. Neuron-ligand Pathfinding on Surfaces Modified by Laminin and Laminin-derived Peptides. Ed. Summer, USA, 2006.

YUQIN, S.;PANKAJ, R.S; MOHAMMAD, M.C.;MERNAUGH, R.; XIANGQUN, Z. Immobilization of a Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Mimotope-Derived Synthetic Peptide on Au and Its Potential Application for Detection of Herceptin in Human Serum by Quartz Crystal Microbalance. **Anal. Chem.** v. 83, p. 8928–8936, 2011.

YUAN, Y.; LEE, R. Contact angle and Wetting Properties. In: BRACCO, G.; HOLST, B. **Surface Science Techniques**, Springer – Verlag, Belin, Heidelberg, 2013.

ZHOU, X. C., HUANG, L. Q., LI, S. F. Y. Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 16, p. 85-95, 2001.

ZHU, L., GAO, Y., SHEN, H., YANG, Y., YUAN, L. A quartz crystal microbalance (QCM) study of single-strand DNA hybridization and hydrolytic cleavage. **Journal of Analytic Chemistry**, v. 60, n. 8, p. 780-783, 2005.

ANEXOS

TABELA 6: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA (PB – Paucibacilar, MB – Multibacilar, IND – diagnóstico indefinido) e CLASSIFICAÇÃO SOROLÓGICA ADOTADA PELA ABSORVÂNCIA OBSERVADA NO TESTE DE ELISA (TB – títulos baixos: absorvância entre o *cut off* e 2 vezes o valor deste; TM – títulos médios: absorvância entre 2 e 3 vezes o valor de *cut off*; TA – absorvância acima de 3 vezes o valor de *cut off*; NEG – amostra negativa: valores de absorvância abaixo do *cut off*). Para o valor de *cut off*, foi realizada a média de 44 amostras de controle negativo + 2 desvios padrões.

PACIENTE	CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA	ABSORVÂNCIA	CLASSIFICAÇÃO POR ELISA
AAD 97	PB	0.366	TM
AALM 63	IND	0.423	TM
ABF 31	PB	0.284	TB
ACPC 127	PB	0.103	NEG
AF 99	PB	0.225	TB
AFLS 120	MB	0.433	TM
AL 85	MB	0.297	TB
ALS 04	MB	0.275	TB
AM 82	IND	3.482	TA
AMA 14	MB	0.307	TM
AMC 56	PB	0.359	TM
AMP 53	MB	0.186	TB
AN 70	PB	0.364	TM
APPC 23	PB	0.107	NEG
ARM 84	PB	0.663	TM
ARS 64	PB	0.776	TA

ASF	MB	0.586	TM
ASV 11	MB	0.211	TB
AVS 18	MB	1.292	TA
BBF 128	IND	0.426	TM
BSS 115	MB	0.375	TM
EES 68	MB	0.311	TM
CL 93	PB	0.358	TM
CMCB 57	MB	0.328	TM
CNR 139	MB	0.315	TM
CSM 34	IND	0.342	TM
DBFS	MB	0.127	NEG
DBS 75	PB	0.399	TM
DGC 106	IND	0.790	TA
DJN 102	IND	0.409	TM
DLE	IND	0.413	TM
DMSF 134	PB	0.273	TB
ECS 66	MB	0.520	TM
EF 03	MB	1.119	TA
EJCH109	IND	0.189	TB
EFM 128	PB	0.565	TM
EMS 65	IND	2.815	TA
EPF 118	IND	0.360	TM
ESS	PB	0.364	TM
EVS 39	PB	0.243	TB
FB 61	IND	0.267	TB
FB 86	PB	0.492	TM
FP 46	MB	0.306	TM
FPS 29	MB	0.322	TM
FSL 132	IND	0.506	TM
GA 48	MB	0.385	TM

GBL 110	IND	0.517	TM
GF 20	PB	0.234	TB
HAR 136	IND	0.520	TM
IGS 94	PB	0.596	TM
JAG 35	MB	0.411	TM
JASC 90	PB	0.272	TB
JBMR 129	MB	0.383	TM
JCL 59	IND	0.653	TM
JCN 71	PB	0.503	TM
JCS 140	MB	0.197	TB
ICS 52	PB	0.630	TM
JCS 74	MB	0.533	TM
JFP 67	MB	0.691	TM
JFS 09	MB	0.484	TM
JG 54	MB	0.298	TB
JL 06	MB	0.469	TM
JCS 104	MB	0.232	TB
JM 14	PB	0.562	TM
JM 141	PB	0.287	TB
JN 101	PB	1.659	TA
JFA 105	MB	0.238	TB
JPA 42	MB	0.321	TM
JPC	IND	0.389	TM
JPC 26	PB	0.353	TM
JRG 60	PB	0.128	NEG
JS 123	PB	0.151	TB
JSS 107	MB	0.327	TM
JTN 45	MB	1.074	TA
LAF 51	MB	0.300	TB
LAR 38	IND	3.142	TA

LGS 73	PB	0.311	TM
LL 7	MB	0.215	TB
LMP 32	PB	0.314	TM
LRP 24	PB	1.034	TA
LSL 137	PB	0.124	NEG
LSS 36	MB	0.380	TM
LTM 122	PB	0.524	TM
LV 01	MB	2.709	TA
LVC 96	PB	0.184	TB
MAF 76	PB	0.131	NEG
MAO 41	MB	0.153	TB
MAS 138	PB	0.221	TB
MC 100	IND	0.272	TB
MDS	PB	1.940	TA
MIC 28	PB	0.351	TM
MJF 69	IND	0.739	TM
MLS 125	PB	0.456	TM
MD 44	MB	0.388	TM
MP 08	MB	0.273	TB
MPG 131	PB	0.283	TB
MPS 126	PB	0.479	TM
MPW 58	PB	0.468	TM
MDFS 89	PB	0.211	TB
MSC 130	PB	0.270	TB
MSD 42	MB	0.265	TB
MSP 43	MB	0.484	TM
NF 103	PB	0.438	TM
NV 72	PB	0.878	TA
NPJ 10	MB	0.370	TM
NSGS 33	PB	0.465	TM

NCM 02	MB	0.527	TM
OAM 124	PB	0.777	TA
OGLS	MB	0.884	TA
PDS 133	PB	0.186	TB
PS 119	MB	0.199	TB
PSA 113	IND	0.478	TM
RJP 30	MB	0.442	TM
RS 115	IND	0.261	TB
RS 12	MB	0.493	TM
RSR 35	IND	0.256	TB
SAA	IND	0.377	TM
SADS 92	PB	0.513	TM
SBS 55	PB	0.238	TB
SFS 83	PB	0.271	TB
SLS	IND	0.299	TB
SNB 40	MB	0.612	TM
SS 127	PB	0.523	TM
TRS 81	PB	0.323	TM
VLM 121	MB	1.820	TA
VM 114	MB	0.947	TA
VMP37	PB	0.221	TB
VPB 112	IND	0.525	TM
VSN 117	MB	0.194	TB
WSS 22	PB	0.505	TM
LS 12	IND	0.297	TB
MCS	IND	0.291	TB