

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**SILVANA MARIA ALBAN**

**USO DE PEPTÍDEOS PARA O DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA HANSENÍASE**

**CURITIBA**

**2011**

**SILVANA MARIA ALBAN**

**USO DE PEPTÍDEOS PARA O DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA HANSENÍASE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos, Área de concentração: Saúde Humana e Animal.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz Soccol

Co-Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Ferreira de Moura

**CURITIBA**

**2011**

Aos meus pais, Selvino e Neiva.

A minha irmã, Sandra.

Por todo o amor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter-me permitido chegar até aqui e pela certeza de Sua presença ao longo dessa caminhada.

À professora Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz Soccol, toda a minha admiração, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pelos ensinamentos não apenas acadêmicos como também aqueles que levarei para a vida, pela atenção, dedicação, infinita paciência e compreensão.

À professora Dr<sup>a</sup>. Juliana Ferreira de Moura, pela iniciação na técnica de *Phage Display*, pelos ensinamentos transmitidos e, juntamente com professora Dr<sup>a</sup>. Larissa Magalhães Alvarenga, por colocar a disposição o laboratório de Imunoquímica, imprescindível para a realização do trabalho.

Ao Dr. John Spencer, da Universidade do Colorado, pelo fornecimento de células de *M. leprae*, indispensáveis para a pesquisa.

Ao professor Dr. Marcelo Távora Mira, pela atenção e disposição em ajudar a conseguir células de *M. leprae*, fundamentais para a execução do estudo.

Ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), em especial, à Sandra R. B. R. Sella, Rubens L. F. Gusso, Dr. João Carlos Minozzo, Regina E. F. Dlugokenski, Wilma R. Guerra, Rosana Z. Guimarães, Neide F. B. Binder e Regiane A. Szargiki, e suas respectivas equipes, pela atenção, colaboração, disponibilização dos laboratórios, materiais, insumos, animais e equipamentos e pelo apoio desmedido na realização deste trabalho.

À professora Dr.<sup>a</sup> Samira Bühler-Sékula, da Universidade Federal de Goiás, pelo auxílio e disponibilização de *kit* ELISA, reagentes, insumos e laboratórios para detecção de anticorpos anti-PGL-I nas amostras de soros de pacientes e controles.

À Dr.<sup>a</sup> Jamie K. Scott, da Universidade de Simon Fraser, pelo fornecimento das bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos, fundamentais para a realização do estudo.

Ao professor Dr. Carlos Chávez-Olórtegui, da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo fornecimento de fagos silvestres, necessários na pesquisa.

À Fundação Pró-Hansen, especialmente professor Dr. Ruy N. Miranda (*in memoriam*), à Ivone T. Dechamdt e Arnaldo Tod por todo o auxílio com amostras e informações.

As instituições, Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná, Centro Regional de Especialidades-Barão, Sociedade Filantrópica Humanitas e Hospital Regional da Lapa São Sebastião, por permitir o acesso a suas dependências para coleta de amostras de pacientes.

A todos os voluntários, doentes ou não, que se dispuseram em contribuir com amostras para a pesquisa.

Aos professores do programa de pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Dr. Carlos R. Soccol, Dr<sup>a</sup>. Luciana P. de Souza Vandenberghe, Dr<sup>a</sup>. Michele R. Spier, MSc. Luiz Alberto Júnior Letti, Dr<sup>a</sup>. Adenise L. Woiciechowski, Dr. Júlio C. de Carvalho e Dr<sup>a</sup>. Adriane B. P. Medeiros, pelos conhecimentos transmitidos e cooperação.

Aos professores do Departamento de Patologia Básica, Dr<sup>a</sup>. Edilene A. de Castro, Dr<sup>a</sup>. Rosângela C. Paulino e Dr. Silvio M. Zanata, ao professor do Departamento de Biologia Celular, Dr. Silvio S. Veiga e ao professor do Departamento de Bioquímica, Dr. Luciano F. Huergo, seja pela atenção, auxílio ou disponibilização de laboratórios.

A Dr<sup>a</sup>. Maria Fernanda Torres, do Biotério da Universidade Positivo, e sua equipe pelo fornecimento, manutenção de camundongos e manuseio na coleta de amostras desses animais.

Aos colegas de pós-graduação e de laboratório, especialmente, Luiz E. R. de Souza, Dr<sup>a</sup>. Magda Costa Ribeiro, Janaína C. Peixoto, Daniele C. Moreira, Valéria P. Ferrer, João C. D. Muzzi, Karla Y. Katayama, Sidnei Bordignon, Alessandra B. Finco, Saloê Bispo, André Melo, Ricardo Fendrich, Tatiana Gazda, Ellen Marques, Juliana Tracz, Luciane Henning, seja pelo auxílio, companheirismo ou amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Enfim, sou grata a todos aqueles, que gentilmente contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho.

## RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* que acomete principalmente a pele e os nervos periféricos. Apesar da redução da prevalência no mundo, o número de novos casos tem se mantido constante nos últimos anos. Uma das dificuldades encontradas no controle da doença reside na falta de teste de diagnóstico específico de detecção de infecção por *M. leprae*. O objetivo desse estudo foi identificar antígenos para fins de diagnóstico. Nesse sentido, peptídeos ligantes de anticorpos de pacientes hansenianos foram selecionados de bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos. Dentre sete clones de fagos selecionados, três clones se mostraram promissores e suas sequências peptídicas foram sintetizadas quimicamente. O teste ELISA usando *pool* dos três peptídeos permitiu identificar 52,2% (12/23) dos pacientes hansenianos multibacilares. Cinco de um total de trinta pacientes (16,7%) com tuberculose apresentaram teste positivo frente aos peptídeos. Nenhuma das amostras de pacientes hansenianos paucibacilares, bem como de contatos de pacientes hansenianos e sadios foi positiva pelo ensaio. Os peptídeos não foram reativos frente aos antisoros de diferentes micobactérias produzidos em coelhos. Peptídeos conjugados a proteína carreadora albumina sérica bovina (BSA) induziram a produção de anticorpos em animais. Os anticorpos anti-peptídeos foram capazes de reconhecer antígenos de aproximadamente 30 kDa em *M. leprae* por *Western Blotting*. Todos os soros anti-peptídeos produziram o mesmo perfil de reatividade por análise de *Western Blotting* a partir de um gel bidimensional de antígenos de *M. leprae*, indicando que os peptídeos são derivados de uma mesma proteína do bacilo. Dados experimentais associados aos obtidos por bioinformática indicam que a proteína se trata do antígeno 85B. Dois dos três peptídeos mostraram evidências em estimular células T através de teste de reação de hipersensibilidade do tipo tardio. Os resultados indicaram que os peptídeos são reagentes potenciais em ensaios imunológicos, tanto sorológicos, quanto celulares, para detecção da doença. O uso da metodologia descrita aqui permitirá a identificação de outros peptídeos, que combinados aos propostos neste trabalho, possibilitarão aumentar a sensibilidade do diagnóstico de pacientes hansenianos.

Palavras-chave: Hanseníase. *Mycobacterium leprae*. *Phage Display*. Peptídeos. Imunodiagnóstico.

## ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that mainly affects the skin and peripheral nerves. Despite reductions in prevalence worldwide, the number of new cases has remained constant in recent years. One of the difficulties in controlling the disease is the lack of specific diagnostic test for detecting infection by *M. leprae*. The aim of this study was to identify antigens for diagnostic purposes. For these purposes, antibody binding peptides of leprosy patients were selected from phage displayed peptide libraries. Among seven clones of selected phages, three clones were promising and their peptides sequences were chemically synthesized. The ELISA test using three peptides pool permitted the identification of 52.2% (12/23) of multibacillary leprosy patients. Five out of thirty patients (16.7%) with tuberculosis had a positive test with the peptides. None of the samples coming from the paucibacillary leprosy patients, contacts of leprosy patients and healthy individuals for the test were positive. The peptides were not reactive to antisera against different mycobacteria produced in rabbits. The peptides conjugated to the carrier protein bovine serum albumin (BSA) induced the production of antibodies in animals. Anti-peptides antibodies were able to recognize antigens of approximately 30 kDa in *M. leprae* by Western blotting. All sera anti-peptides produced the same profile of reactivity by Western blot analysis from a two-dimensional gel of *M. leprae* antigens, indicating that the peptides are derived from the same bacillus protein. Experimental data associated with those obtained by bioinformatics indicated that the protein is the antigen 85B. Two of the three peptides showed evidence of stimulating T cells through delayed-type hypersensitivity reaction. The results indicated that the peptides are potential reagents in immunological assays, both serologic and cellular, to detect the disease. Using the methodology described here will allow the identification of other peptides, that when matched those proposed in this research, will enable the increase of the sensitivity of leprosy patients diagnosis.

Key words: Leprosy. *Mycobacterium leprae*. Phage Display. Peptides. Immunodiagnostic.

## LISTA DE FIGURAS

|           |                                                                                                                                                              |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1  | - COEFICIENTE DE DETECÇÃO DE CASOS NOVOS NO INÍCIO DE 2009.....                                                                                              | 26 |
| FIGURA 2  | - NÚMERO DE CASOS NOVOS DETECTADOS DE HANSENÍASE NO MUNDO EM 2003-2009.....                                                                                  | 27 |
| FIGURA 3  | - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS REALIZADAS NO ESTUDO....                                                                                                             | 48 |
| FIGURA 4  | - ESTRATÉGIAS DE SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS USANDO BIBLIOTECAS DE PEPTÍDEOS APRESENTADOS EM FAGOS A PARTIR DE IMUNOGLOBULINAS ANTÍGENO-ESPECÍFICAS.....            | 59 |
| FIGURA 5  | - REATIVIDADE DOS ANTÍGENOS DE MICOBACTÉRIAS FRENTE AOS SOROS HIPERIMUNES AVALIADA POR ELISA.....                                                            | 70 |
| FIGURA 6  | - SDS-PAGE DE IgGs TOTAIS DE PACIENTES PURIFICADAS POR PRECIPITAÇÃO POR SULFATO DE AMÔNIO E CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....                                  | 72 |
| FIGURA 7  | - SDS-PAGE DE <i>M. leprae</i> E <i>M. tuberculosis</i> E WESTERN BLOTTING.....                                                                              | 74 |
| FIGURA 8  | - REATIVIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS ANTÍGENO-ESPECÍFICAS POR ELISA.....                                                                                        | 75 |
| FIGURA 9  | - REATIVIDADE DOS FAGOS SELECIONADOS PELAS ESTRATÉGIAS I E II A CADA CICLO DE SELEÇÃO POR ELISA.....                                                         | 77 |
| FIGURA 10 | - REATIVIDADE DOS CLONES DE FAGOS POR ELISA COM SOROS DE PACIENTES E CONTROLES.....                                                                          | 79 |
| FIGURA 11 | - REATIVIDADE DOS CLONES DE FAGOS SELECIONADOS VERSUS REATIVIDADE DO FAGO SILVESTRE COM AMOSTRAS DE SORO POSITIVAS FRENTE AOS CLONES DE FAGOS POR ELISA..... | 80 |
| FIGURA 12 | - REATIVIDADES DOS PEPTÍDEOS COM SOROS DE PACIENTES HANSENIANOS E CONTROLES POR ELISA....                                                                    | 81 |
| FIGURA 13 | - AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS SOROS DE PACIENTES E CONTROLES FRENTE AOS ANTÍGENOS BRUTOS DE MICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS E PEPTÍDEOS.....                      | 82 |
| FIGURA 14 | - IDENTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS-CHAVE EM PEPTÍDEOS...                                                                                                            | 85 |
| FIGURA 15 | - REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEOS POR ELISA.....                                                                                                     | 86 |
| FIGURA 16 | - REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEOS COM <i>M. leprae</i> POR WESTERN BLOTTING.....                                                                     | 87 |
| FIGURA 17 | - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DO EXTRATO TOTAL DE <i>M. leprae</i> .....                                                                                      | 88 |
| FIGURA 18 | - WESTERN BLOTTING DO GEL BIDIMENSIONAL DO EXTRATO TOTAL DE <i>M. leprae</i> .....                                                                           | 88 |
| FIGURA 19 | - ISOLAMENTO DE PROTEÍNA DO EXTRATO TOTAL DE <i>M. leprae</i> POR IMUNOPRECIPITAÇÃO COM ANTICORPO ANTIPEPTÍDEO 1B.....                                       | 89 |

|           |                                                                                         |    |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 20 | - REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO<br>INDUZIDA POR PEPTÍDEOS EM COBAIAS..... | 91 |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE QUADROS

|          |                                                                                                                                  |     |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| QUADRO 1 | - FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE RELACIONADAS COM BACILOSCOPIA E REAÇÃO DE MITSUDA, SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE MADRI.....         | 28  |
| QUADRO 2 | - CORRELAÇÃO ENTRE AS CLASSIFICAÇÕES DE MADRI (1953), DE RIDLEY E JOPLING (1966) E DA OMS (1982) ADOTADAS PARA A HANSENÍASE..... | 29  |
| QUADRO 3 | - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE.....                                                              | 30  |
| QUADRO 4 | - ALINHAMENTO DE AMINOÁCIDOS ENTRE O ANTÍGENO 85B DE <i>M. leprae</i> E AS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS 5A, 6A E 1B.....                | 90  |
| QUADRO 5 | - RESULTADO DA BUSCA POR SIMILARIDADE ENTRE A SEQUÊNCIA PEPTÍDICA 1B E SEQUÊNCIA EM MICOBACTÉRIAS.....                           | 90  |
| QUADRO 6 | - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EM HANSENÍASE.....                                         | 100 |

## LISTA DE TABELAS

|           |                                                                                                                                                                                                      |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1  | - GENÔMICA COMPARATIVA DE <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i>                                                                                                                                  | 24 |
| TABELA 2  | - PREVALÊNCIA E NÚMERO DE CASOS NOVOS<br>DETECTADOS DE HANSENÍASE NO MUNDO, POR<br>REGIÃO, EM 2009 E NO PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2010..                                                                 | 26 |
| TABELA 3  | - COEFICIENTES DE PREVALÊNCIA E DETECÇÃO DA<br>HANSENÍASE NO BRASIL EM 2009, POR REGIÃO.....                                                                                                         | 27 |
| TABELA 4  | - CEPAS REFERÊNCIA DE MICOBACTÉRIAS PARA<br>PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E<br>OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTÍGENO-ESPECÍFICOS<br>EM PACIENTES.....                                                 | 49 |
| TABELA 5  | - CARREGAMENTOS FATORIAS E COMUNALIDADE<br>ESTIMADA.....                                                                                                                                             | 70 |
| TABELA 6  | - SOROREATIVIDADE ANTI-PGL-I NAS AMOSTRAS DE<br>SORO ESTUDADAS.....                                                                                                                                  | 72 |
| TABELA 7  | - FAGOS DE ENTRADA E SAÍDA OBTIDOS DA<br>BIOSSELEÇÃO POR <i>PHAGE DISPLAY</i> COM ANTICORPOS<br>ANTÍGENO-ESPECÍFICOS.....                                                                            | 76 |
| TABELA 8  | - SEQUÊNCIAS DE PEPTÍDEOS LIGANTES A<br>IMUNOGLOBULINAS G TOTAL DE PACIENTES<br>MULTIBACILARES OBTIDAS DE ACORDO COM AS<br>ESTRATÉGIAS USADAS PARA A SELEÇÃO DE<br>MIMOTOPOS E SUAS FREQUÊNCIAS..... | 78 |
| TABELA 9  | - NÚMERO DE TESTES ELISA POSITIVOS E NEGATIVOS<br>COM PGL-I E PEPTÍDEOS OBTIDOS NOS GRUPOS<br>ESTUDADOS.....                                                                                         | 83 |
| TABELA 10 | - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS TESTES ELISA<br>COM PGL-I E PEPTÍDEOS.....                                                                                                                      | 84 |

## **LISTA DE SIGLAS**

|      |                                                    |
|------|----------------------------------------------------|
| ATCC | - American Type Culture Collection                 |
| CPPI | - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos |
| OMS  | - Organização Mundial da Saúde                     |
| WHO  | - World Health Organization                        |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|           |                                                                                            |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| B         | - <i>Borderline</i>                                                                        |
| BB        | - <i>Borderline-Borderline</i>                                                             |
| BCG       | - Bacilo Calmette-Guérin                                                                   |
| BL        | - <i>Borderline</i> -Lepromatoso                                                           |
| BSA       | - Albumina sérica bovina                                                                   |
| BT        | - <i>Borderline</i> -Tuberculóide                                                          |
| C         | - Contatos                                                                                 |
| CHAPS     | - 3-[(3-Colamidopropil)-dimetil ammônio]-propano-sulfonato                                 |
| D         | - Dimorfo                                                                                  |
| DTT       | - Ditionotreitól                                                                           |
| ELISA     | - <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>                                                 |
| DNA       | - Ácido Desoxirribonucléico                                                                |
| DTH       | - Hipersensibilidade do tipo tardio                                                        |
| G+C       | - Guanina + citosina                                                                       |
| GM-CSF    | - Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos                               |
| HLA       | - Antígeno leucocitário humano                                                             |
| I         | - Indeterminado                                                                            |
| IgG       | - Imunoglobulina G                                                                         |
| IL        | - Interleucina                                                                             |
| INF       | - Interferon                                                                               |
| KLH       | - <i>keyhole limpet hemocyanin</i> - hemocianina do caramujo<br><i>Megathura crenulata</i> |
| L         | - Lepromatoso                                                                              |
| LB        | - Luria-Bertani                                                                            |
| LL        | - Lepromatoso-Lepromatoso                                                                  |
| MALDI-TOF | - <i>Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight</i>                        |
| MB        | - Multibacilar                                                                             |
| MCP       | - <i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>                                                  |
| NF-κB     | - Fator nuclear-κB                                                                         |
| NT-P-BSA  | - Trissacarídeo natural-fenol-BSA                                                          |

|                  |                                                            |
|------------------|------------------------------------------------------------|
| OPD              | - Dicloridrato de o-fenilenodiamina                        |
| PB               | - Paucibacilar                                             |
| PBS              | - Tampão fosfato salina                                    |
| PBST             | - Tampão fosfato salina – Tween 20                         |
| PCR              | - Reação em Cadeia da Polimerase                           |
| PEG              | - Polietilenoglicol                                        |
| PGL              | - Glicolípídeo Fenólico                                    |
| PI3K             | - Fosfatidilinositol 3-quinase                             |
| PVDF             | - Fluoreto de polivinilideno                               |
| RNA              | - Ácido Ribonucléico                                       |
| RNA <sub>m</sub> | - RNA mensageiro                                           |
| RNA <sub>r</sub> | - RNA ribossômico                                          |
| RT-PCR           | - Transcrição reversa – PCR                                |
| S                | - Sádios                                                   |
| SDS              | - Dodecil sulfato de sódio                                 |
| SDS-PAGE         | - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS |
| T                | - Tuberculóide                                             |
| TB               | - Tuberculosos                                             |
| TBS              | - Tampão Tris salina                                       |
| TBST             | - Tampão Tris salina - Tween                               |
| TLRs             | - Receptores <i>Toll-like</i>                              |
| TNF              | - Fator de necrose tumoral                                 |
| Tris             | - Tris(hidroximetil)aminometano                            |
| TT               | - Tuberculóide-Tuberculóide                                |
| UTR              | - Região não traduzida                                     |
| V                | - Virchowiano                                              |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|      |   |                                     |
|------|---|-------------------------------------|
| %    | - | Por cento                           |
| °C   | - | Graus Celsius                       |
| >    | - | Maior que                           |
| ≤    | - | Menor ou igual que                  |
| X    | - | Vezez                               |
| cm   | - | Centímetros                         |
| g    | - | Gramma ou força centrífuga relativa |
| kDa  | - | Kilodalton                          |
| kg   | - | Kilograma                           |
| M    | - | Molar                               |
| mA   | - | Miliampère                          |
| mg   | - | Miligramas                          |
| mL   | - | Mililitros                          |
| mm   | - | Milímetros                          |
| mM   | - | Milimolar                           |
| N    | - | Normal                              |
| nm   | - | Nanômetro                           |
| pH   | - | Potencial dos íons hidrogênio       |
| pI   | - | Ponto isoeletrico                   |
| rpm  | - | Rotações por minuto                 |
| s    | - | Segundo                             |
| V    | - | Volts                               |
| Vh   | - | Volts-hora                          |
| µg   | - | Micrograma                          |
| µL   | - | Microlitro                          |
| µmol | - | Micromol                            |
| µM   | - | Micromolar                          |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                 | 17        |
| 1.1 OBJETIVO GERAL .....                                                                                                           | 21        |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                                                    | 21        |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                                                               | <b>22</b> |
| 2.1 HANSENÍASE: ASPECTOS GERAIS .....                                                                                              | 22        |
| 2.2 ETIOLOGIA .....                                                                                                                | 22        |
| 2.3 TRANSMISSÃO .....                                                                                                              | 25        |
| 2.4 EPIDEMIOLOGIA .....                                                                                                            | 25        |
| 2.5 CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA .....                                                                                                  | 28        |
| 2.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS .....                                                                                                 | 29        |
| 2.7 IMUNOPATOGENESE DA HANSENÍASE .....                                                                                            | 31        |
| 2.8 GENÉTICA HUMANA NA SUCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE .....                                                                          | 36        |
| 2.8.1 Genes ligados ao complexo do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) .....                                                        | 36        |
| 2.8.1.1 Genes <i>HLA</i> .....                                                                                                     | 36        |
| 2.8.1.2 Fator de necrose tumoral ( <i>TNF</i> ) e Linfotóxina alfa ( <i>LTA</i> ) .....                                            | 37        |
| 2.8.2 <i>SLC11A1</i> ou <i>NRAMP1</i> .....                                                                                        | 37        |
| 2.8.3 Receptor de vitamina D ( <i>VDR</i> ) .....                                                                                  | 38        |
| 2.8.4 Interleucina 10 ( <i>IL-10</i> ) .....                                                                                       | 38        |
| 2.8.5 Região cromossômicas .....                                                                                                   | 38        |
| 2.8.6 <i>PARK2/PACRG</i> .....                                                                                                     | 39        |
| 2.9 DIAGNÓSTICO .....                                                                                                              | 39        |
| 2.9.1 Pesquisa de antígenos para o diagnóstico imunológico da hanseníase .....                                                     | 42        |
| 2.10 TRATAMENTO .....                                                                                                              | 46        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                  | <b>48</b> |
| 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....                                                                                                     | 49        |
| 3.2 MICOBACTÉRIAS .....                                                                                                            | 49        |
| 3.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTIMICOBACTÉRIAS<br>CULTIVÁVEIS .....                                                      | 50        |
| 3.3.1 Cultivo de microrganismos e preparação de antígenos micobacterianos .....                                                    | 50        |
| 3.3.2 Imunização .....                                                                                                             | 51        |
| 3.3.3 Pesquisa de anticorpos em soro de coelhos imunizados com micobactérias .....                                                 | 51        |
| 3.3.3.1 Análise de dados .....                                                                                                     | 52        |
| 3.4 PACIENTES HANSENIANOS E GRUPOS CONTROLES .....                                                                                 | 52        |
| 3.4.1 Amostras de soros positivos e negativos .....                                                                                | 52        |
| 3.4.2 Pesquisa de anticorpos anti-PGL-I .....                                                                                      | 53        |
| 3.5 PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI- <i>M. leprae</i> e ANTI- <i>M. tuberculosis</i><br>DE AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES ..... | 54        |
| 3.5.1 Purificação de imunoglobulinas de soro por precipitação com sulfato de<br>amônio .....                                       | 54        |
| 3.5.2 Purificação de imunoglobulinas anti- <i>M. leprae</i> e anti- <i>M. tuberculosis</i> por<br>imunoafinidade .....             | 55        |
| 3.6 <i>PHAGE DISPLAY</i> .....                                                                                                     | 56        |
| 3.6.1 Bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos .....                                                                         | 56        |
| 3.6.2 Biosseleção de bibliotecas apresentadas em fagos .....                                                                       | 57        |
| 3.6.3 ELISA de avaliação da reatividade dos fagos nos ciclos de biosseleção .....                                                  | 59        |
| 3.6.4 Seleção de clones de fagos .....                                                                                             | 60        |

|                                                                                                                                |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.6.5 Sequenciamento do DNA.....                                                                                               | 61         |
| 3.6.6 Avaliação da reatividade dos clones de fagos com soros de pacientes e controles .....                                    | 61         |
| 3.7 PEPTÍDEOS.....                                                                                                             | 62         |
| 3.7.1 Síntese de peptídeos solúveis.....                                                                                       | 62         |
| 3.7.2 Avaliação da reatividade dos peptídeos por ELISA.....                                                                    | 62         |
| 3.7.3 Identificação de resíduos ligantes de anticorpos em peptídeos .....                                                      | 63         |
| 3.7.3.1 Síntese de peptídeos em membrana de celulose .....                                                                     | 63         |
| 3.7.3.2 Imunoensaio com peptídeos em membrana .....                                                                            | 64         |
| 3.8 PESQUISA DO ANTÍGENO ORIGINAL EM <i>M. leprae</i> .....                                                                    | 65         |
| 3.8.1 Conjugação de peptídeos a proteína carreadora .....                                                                      | 65         |
| 3.8.2 Produção de anticorpos anti-peptídeos .....                                                                              | 66         |
| 3.8.3 SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i> .....                                                                                 | 66         |
| 3.8.4 Eletroforese bidimensional e <i>Western Blotting</i> .....                                                               | 66         |
| 3.9 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO .....                                                                          | 67         |
| 3.9.1 Animais e antígenos.....                                                                                                 | 67         |
| 3.9.2 Teste de hipersensibilidade do tipo tardio .....                                                                         | 68         |
| <b>4 RESULTADOS.....</b>                                                                                                       | <b>69</b>  |
| 4.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTIMICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS .....                                                     | 69         |
| 4.1.1 Reatividade entre soros hiperimunes e antígenos homólogos e heterólogos. ....                                            | 69         |
| 4.2 PACIENTES HANSENIANOS E GRUPOS CONTROLES.....                                                                              | 70         |
| 4.2.1 Amostras de soros positivos e negativos .....                                                                            | 70         |
| 4.2.2 Pesquisa de anticorpos anti-PGL-I .....                                                                                  | 71         |
| 4.3 PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI- <i>M. leprae</i> e ANTI- <i>M. tuberculosis</i> DE AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES..... | 72         |
| 4.3.1 Purificação de imunoglobulinas por precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de afinidade.....                  | 72         |
| 4.3.2 SDS-PAGE de <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i> e <i>Western Blotting</i> .....                                    | 73         |
| 4.3.3 Purificação de anticorpos de <i>immunoblots</i> .....                                                                    | 74         |
| 4.4 PHAGE DISPLAY.....                                                                                                         | 76         |
| 4.4.1 ELISA de avaliação da reatividade dos fagos nos ciclos de biosseleção.....                                               | 76         |
| 4.4.2 Seleção de clones .....                                                                                                  | 77         |
| 4.4.3 Avaliação da reatividade dos clones de fagos com soros de pacientes e controles .....                                    | 78         |
| 4.5 PEPTÍDEOS.....                                                                                                             | 81         |
| 4.5.1 Avaliação da reatividade dos peptídeos por ELISA.....                                                                    | 81         |
| 4.5.2 Comparação do desempenho do teste de ELISA com peptídeos e ELISA com PGL-I na detecção da hanseníase .....               | 83         |
| 4.5.3 Identificação de resíduos ligantes de anticorpos em peptídeos .....                                                      | 84         |
| 4.6 PESQUISA DO ANTÍGENO ORIGINAL EM <i>M. leprae</i> .....                                                                    | 86         |
| 4.6.1 Análise <i>in silico</i> dos peptídeos .....                                                                             | 90         |
| 4.7 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO .....                                                                          | 91         |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                       | <b>93</b>  |
| 5.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTIMICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS .....                                                     | 93         |
| 5.2 PHAGE DISPLAY.....                                                                                                         | 94         |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                       | <b>109</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                        | <b>110</b> |
| <b>APÊNDICES .....</b>                                                                                                         | <b>131</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo patógeno intracelular *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). A doença é considerada como uma das mais antigas de conhecimento do homem. Sua origem parece ter ocorrido na África Oriental ou Oriente Próximo e foi introduzida nas Américas através da colonização por europeus e pelo comércio de escravos da África Ocidental, no século XVIII (MONOT *et al.*, 2005).

A hanseníase ainda está longe de ser uma doença do passado. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 211 mil pessoas (casos registrados em tratamento), distribuídas em 141 países, incluindo o Brasil, estão infectadas (WHO, 2010). Apesar da redução da prevalência a partir da introdução da poliquimioterapia em 1981, o número de novos casos detectados tem permanecido constante nos últimos anos (WHO, 2010), indicando que a transmissão ainda continua (GELUK *et al.*, 2008).

A doença acomete a pele e os nervos periféricos, podendo afetar outros órgãos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). As deformidades em consequências dos danos neurais são a principal causa do estigma da doença (SPIERINGS *et al.*, 2000). Anualmente, cerca de 12 a 14 mil casos com incapacidades grau 2 são detectados entre os casos novos no mundo (WHO, 2010), indicando que ainda há diagnóstico tardio da doença.

A maioria dos indivíduos infectados com *M. leprae* não desenvolve a hanseníase e os poucos indivíduos que desenvolvem a doença podem manifestá-la sob um amplo espectro de formas clínicas (SPIERINGS *et al.*, 2000). As formas clínicas são determinadas pela resposta imune do indivíduo ao *M. leprae* e são classificadas em cinco grupos segundo Ridley and Jopling. Em um pólo do espectro estão os pacientes com hanseníase lepromatosa que possuem uma exacerbada resposta imune humoral, ausência de uma imunidade celular específica e alta carga bacilar. No outro pólo do espectro estão os pacientes com hanseníase tuberculóide que mostram uma intensa resposta imune celular, nenhum ou poucos bacilos em lesões e títulos baixos ou ausência de anticorpos a antígenos de *M. leprae*. A maioria dos pacientes é posicionada entre esses dois pólos e são classificados

como *borderline*-tuberculóide, *borderline-borderline* e *borderline*-lepromatoso (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

O diagnóstico da doença é essencialmente clínico e ocasionalmente é acompanhado de exame baciloscópico ou exame histológico (LOCKWOOD, 2005). Para fins de tratamento, a OMS recomenda a classificação dos pacientes baseando-se no número de lesões de pele. Pacientes com até cinco lesões são classificados como paucibacilares (PB) e pacientes com mais de cinco lesões são referidos como multibacilares (MB) (WHO, 1998). Porém, a classificação baseada unicamente no número de lesões dificulta o diagnóstico correto da hanseníase. Muitos casos multibacilares por apresentarem poucas lesões são incorretamente classificados como paucibacilares e, por consequência, serão tratados inadequadamente e ainda correm o risco de recidivar (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2007). O contrário também ocorre, muitos pacientes paucibacilares são tratados como multibacilares através do sistema de contagem de número de lesões (MOURA *et al.*, 2008). Portanto, ferramentas de diagnóstico que permitam um diagnóstico correto e precoce é uma prioridade em pesquisa na hanseníase.

Em função do amplo espectro de manifestações clínicas da doença, o diagnóstico da hanseníase deve ser arraigado em exames baciloscópicos e histológicos, ensaios baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), exames sorológicos e ensaios de célula T em combinação com o exame clínico (ASEFFA *et al.*, 2005).

No que tange aos ensaios imunológicos, dois testes surgem como os mais avaliados e padronizados, ensaios de detecção de anticorpos ao glicolípido fenólico I (PGL-I) e o teste de Mitsuda. A sorologia anti-PGL-I permite detectar a maioria dos pacientes multibacilares, mas tem valor limitado na identificação de pacientes paucibacilares. Além do que, em áreas endêmicas uma proporção significativa de indivíduos saudáveis pode ter anticorpos anti-PGL-I (STEFANI, 2008). O teste de Mitsuda avalia a resposta imune celular do indivíduo ao *M. leprae* como também auxilia na classificação da doença (GODAL, 1978). Uma resposta positiva ao desafio intradérmico com mitsudina está associada aos pacientes com hanseníase tuberculóide, enquanto, uma resposta negativa ao teste reflete os casos de hanseníase lepromatosa. Porém, esse teste não é específico, pois a maioria dos pacientes saudáveis apresenta resultados positivos (HASTINGS *et al.*, 1988).

A busca de antígenos para uso em diagnóstico imunológico pausou-se inicialmente em pesquisas com extratos totais de *M. leprae* e suas frações, seguindo posteriormente com avanços oferecidos pela tecnologia do DNA recombinante e, mais recentemente, por estudos de análise de genômica comparativa e bioinformática. A principal dificuldade reside na obtenção de reagentes mais sensíveis e específicos (SPENCER *et al.*, 2004; GELUK *et al.*, 2005; GELUK *et al.*, 2009). A baixa especificidade é decorrente da reação cruzada com outras micobactérias (BRAHMBHATT *et al.*, 2002) e que se torna ainda mais problemática em países com altas taxas de incidência de tuberculose e prática de vacinação com BCG (GELUK *et al.*, 2009).

Neste sentido, o presente trabalho propõe a técnica de *Phage Display* como ferramenta de identificação de novos reagentes de diagnóstico imunológico em hanseníase. A técnica *Phage Display* foi descrita por Smith (1985) e se baseia na apresentação de peptídeos ou proteínas na superfície de fagos filamentosos (HOF *et al.*, 2006). Em *Phage Display* os bacteriófagos (fagos) filamentosos mais usados são M13 e Fd e são vírus de DNA fita simples que infectam células de *Escherichia coli* (*E. coli*) através do *pilus* sexual. Bibliotecas de fagos compreendem uma coleção de clones, cada qual carregando um inserto de DNA exógeno diferente, codificante para peptídeo ou proteína, no genoma do vírus. A sequência de DNA exógena inserida no genoma do vírus é expressa fusionada com proteínas estruturais do fago (SMITH *et al.*, 2005). As três principais proteínas utilizadas para esse fim são as proteínas pIII, pVIII e pVI. A proteína pVIII forma o capsídio cilíndrico e flexível do fago e existe em cerca de 2700 cópias, enquanto, cinco cópias de cada uma das proteínas pIII e pVI estão localizadas na extremidade proximal do capsídio (SMITH; PETRENKO, 1997). O peptídeo exógeno incorporado no genoma do fago e expresso na superfície do vírus torna-se disponível ao reconhecimento por uma molécula-alvo de interesse. Dessa forma, fagos ligantes a esse alvo podem ser isolados dos demais fagos não ligados. A sequência peptídica carregada pelo fago pode ser obtida pelo sequenciamento do DNA do inserto no genoma viral (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002). Entre as aplicações da técnica *Phage Display* estão o estudo de interações proteína-proteína (SIDHU; KOIDE, 2007), identificação de epítomos para anticorpos monoclonais (SCOTCHER *et al.*, 2009) e policlonais (HELL *et al.*, 2009), identificação de ligantes para receptores (BONETTO; CARLAVAN; BATY,

2005; FREDERICKSON *et al.*, 2006), seleção de substratos para enzimas (BECKHAM *et al.*, 2009) e no desenvolvimento de vacinas (CHIANG *et al.*, 2009).

Neste estudo, peptídeos ligantes de anticorpos de pacientes hansenianos foram selecionados de bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos. Os peptídeos, podendo compreender epítomos ou mimotomos (epítomos que mimetizam o epítomo natural), foram avaliados em ensaios sorológicos e quanto à habilidade de estimular células T. Essa última propriedade seria de particular importância uma vez que os peptídeos poderiam substituir o uso da Mitsudina.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar, através da técnica de *Phage Display*, mimo- ou epítomos específicos para anticorpos de pacientes hansenianos que, após a síntese química, possam ser empregados no diagnóstico sorológico e/ou na avaliação da resposta celular de pacientes.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir anticorpos policlonais em animais de experimentação contra micobactérias cultiváveis como *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. avium*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. terrae*, *M. bovis BCG* e *M. scrofulaceum* visando estudar reações cruzadas;
- Selecionar mimo- ou epítomos a partir de bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos utilizando-se soros de pacientes hansenianos através da técnica de *Phage Display*;
- Avaliar as sequências peptídicas selecionadas pela técnica de *Phage Display* frente a amostras de soros positivos e negativos;
- Sintetizar quimicamente as sequências de aminoácidos selecionadas pela técnica de *Phage Display*;
- Avaliar os peptídeos sintéticos solúveis em ensaios sorológicos frente a amostras de soro de pacientes e controles, bem como, frente a soros antimicobactérias cultiváveis;
- Avaliar os peptídeos sintéticos solúveis quanto à capacidade de induzir resposta imune celular e humoral em animais experimentais;
- Identificar, pela técnica de *Western Blotting*, proteínas nativas de *M. leprae* resolvidas por eletroforese bidimensional quanto à reatividade frente a anticorpos anti-peptídeos sintéticos e caracterizá-las empregando-se espectrometria de massa.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HANSENÍASE: ASPECTOS GERAIS

A hanseníase é uma doença infecciosa granulomatosa crônica causada por *M. leprae* que acomete principalmente a pele e o sistema nervoso periférico (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). A doença é um problema de saúde pública em muitos países, incluindo o Brasil, (STEFANI, 2008) e deixa milhões de pacientes curados com sequelas como consequência de danos neurais (BÜHRER-SÉKULA, 2008). Desde a introdução da poliquimioterapia em 1981 pela OMS, a prevalência da hanseníase reduziu drasticamente, mas ao longo dos últimos cinco anos mais de 200 mil casos novos são ainda detectados a cada ano. A hanseníase apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que são determinadas pela resposta imune do indivíduo ao bacilo. Evidências indicam que a exposição ao *M. leprae* é necessária, mas não explica a susceptibilidade à hanseníase e vários genes e regiões genômicas do hospedeiro estão implicados no complexo mecanismo genético que controla a susceptibilidade à doença (GULIA; FRIE; MASSONE, 2010). O desenvolvimento de testes de diagnóstico precoces e rápidos é considerado uma prioridade iminente em pesquisa (STEFANI, 2008).

### 2.2 ETIOLOGIA

O agente etiológico da hanseníase – *M. leprae* – é um bacilo imóvel, não formador de esporos, microaerófilo, ácido-resistente, reto ou levemente curvado (SCOLLARD *et al.*, 2006). Esse patógeno foi descoberto pelo médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen em 1873 quando investigava nódulos de pacientes hansenianos (MARMOR, 2002).

A parede celular do bacilo é um complexo covalentemente ligado de peptidoglicano-arabinogalactana-ácido micólico semelhante na composição a todas as micobactérias. A camada de peptidoglicano está ligada covalentemente a

camada de galactana e está por sua vez, ligada a camada de arabinana. Os ácidos micólicos estão ligados aos terminais das cadeias de arabinana para formar o folheto interno da bicamada pseudolipídica. O folheto externo é composto de ácidos micólicos de monomicolatos de trealose e ácidos micoserósicos de dimicocerosatos de ftiocerol (PDIMs) e glicolípídeos fenólicos (PGLs). Pressupõe-se que PGLs e outras moléculas como PDIMs, manosídeos de fosfatidilinositol e fosfolípídios são liberados da parede celular após a síntese, formando uma cápsula. O lipídio dominante na parede celular, que confere ao *M. leprae* especificidade imunológica é o glicolípídeo fenólico I (PGL-I) (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Apesar de muitas tentativas, *M. leprae* não é cultivável em meios de cultura artificiais (SCOLLARD *et al.*, 2006). Essa incapacidade de cultivar *M. leprae in vitro* provavelmente se deve a extrema evolução reductiva do seu genoma (COLE *et al.*, 2001). No entanto, *M. leprae* pode crescer experimentalmente em tatus e camundongos normais, atímicos ou nocaute.

Em 1960, Shepard demonstrou uma limitada multiplicação de *M. leprae*, obtido de pacientes, em coxim plantar de camundongos CFW (SHEPARD, 1960). Um segundo grande progresso na propagação de *M. leprae* foi feito em 1971 por Kirchheimer e Storrs através do desenvolvimento de infecção disseminada por *M. leprae* em tatus de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) (KIRCHHEIMER; STORRS, 1971).

O uso de animais imunodeficientes tal como camundongos timectomizados e irradiados (REES *et al.*, 1967) ou camundongos *nude* (COLSTON; HILSON, 1976), na propagação de *M. leprae*, possibilitou um aumento da proliferação de bacilos e disseminação da doença, o que não ocorria com o emprego de camundongos normais.

Outro modelo animal utilizado na propagação de *M. leprae* são camundongos nocaute. O emprego desses animais permite estudar o papel de genes individuais na resposta a infecção. Entre os modelos de estudo usando camundongos nocaute em *M. leprae* estão óxido nítrico sintase induzível (ADAMS; JOB; KRAHENBUHL, 2000), interferon- $\gamma$  (ADAMS, 2002) e linfotoxina- $\alpha$  (HAGGE *et al.*, 2009).

A comparação do genoma de *M. leprae* com o genoma de *M. tuberculosis* sugere que o primeiro sofreu um caso extremo de evolução reductiva. O genoma completo de *M. leprae* contém 3.27 megabase (Mb) com um conteúdo G+C (guanina

+ citosina) de 57,8%. Esses valores são muito menores que aqueles relatados para o genoma de *M. tuberculosis*, o qual contém 4.41 Mb e um conteúdo G+C de 65,6%. Apenas 49,5% do genoma de *M. leprae* contêm genes codificantes de proteínas, enquanto 27% compreendem pseudogenes. Os restantes 23,5% do seu genoma pode corresponder a sequências regulatórias ou vestígio de genes mutados. O genoma de *M. leprae* contém 1.604 genes codificantes de proteínas funcionais, dos quais 1.439 são encontrados também em *M. tuberculosis* (TABELA 1) (COLE *et al.*, 2001).

TABELA 1 – GENÔMICA COMPARATIVA DE *M. leprae* e *M. tuberculosis*

| PARÂMETRO                               | <i>M. leprae</i> | <i>M. tuberculosis</i> |
|-----------------------------------------|------------------|------------------------|
| Tamanho do genoma (pb)                  | 3.268.203        | 4.411.532              |
| Nº de genes codificantes para proteínas | 1.604            | 3.959                  |
| Nº de pseudogenes                       | 1.116            | 6                      |
| Genes codificantes para proteínas (%)   | 49,5             | 90,8                   |
| Conteúdo G + C (%)                      | 57,8             | 65,6                   |

FONTE: COLE *et al.* (2001)

Embora *M. leprae* apresente um grande número de pseudogenes, resultados de Suzuki *et al.* (2006a) mostraram por técnicas de microarranjo a expressão de alguns pseudogenes como RNA e sugeriram que os mesmos podem ser funcionais. A fim de explorar detalhadamente o perfil de expressão de RNA de pseudogenes bem como de genes e de regiões não codificantes em *M. leprae*, Akama *et al.* (2009) utilizaram a ferramenta *tiling arrays*. A metodologia de estudo demonstrou que pseudogenes e regiões não codificantes (não anotadas) não são silenciosas e em vez disso são altamente expressas. O papel dos RNAs derivados de tais regiões não é conhecido, porém no estudo, os pseudogenes foram classificados em categorias funcionais.

Por ferramentas de bioinformática e análises de microarranjo de DNA e RT-PCR, Williams *et al.* (2009) demonstraram que apesar de ocorrer a transcrição de pseudogenes seus produtos são inativos e que a princípio não trazem benefícios ao *M. leprae*. Entretanto, foi observado que alguns transcritos de pseudogenes foram capazes de produzir proteínas.

## 2.3 TRANSMISSÃO

O mecanismo preciso da transmissão de *M. leprae* é desconhecido (SCOLLARD *et al.*, 2006). A principal via de eliminação do bacilo pelo doente de hanseníase e a mais provável via de entrada do bacilo no organismo são as vias respiratórias (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Dados que suportam essa informação são baseados nas observações de que DNA de *M. leprae* foi encontrado em *swabs* nasais de pacientes hansenianos e de indivíduos sadios de áreas endêmicas (WIT *et al.*, 1993), bem como em contatos (PATTYN *et al.*, 1993). A presença de bacilos na cavidade nasal em indivíduos sadios (HATTA *et al.*, 1995; BEYENE *et al.*, 2003) e contatos (JOB *et al.*, 2008) se mostrou transitória. Ainda, a presença de DNA de *M. leprae* na mucosa nasal em contatos indica uma infecção subclínica que pode ser resolvida espontaneamente ou pode progredir para doença (MARTINS *et al.*, 2010).

Indivíduos que estão em contato direto com paciente de hanseníase têm chance aumentada de adquirir a doença. Contatos de pacientes multibacilares apresentam maior risco de desenvolver a doença em comparação com os contatos de pacientes paucibacilares (BRITTON; LOCKWOOD, 2004) e esses por sua vez, apresentam maior risco de infecção comparado com a população em geral (MOET *et al.*, 2004).

## 2.4 EPIDEMIOLOGIA

O número de casos de hanseníase relatados a OMS mostra que, no início de 2010, mais de 211 mil pessoas se infectaram principalmente na África, Américas e Sudeste Asiático. Em 2009, 244.796 casos novos foram detectados em todo o mundo (TABELA 2 e FIGURA 1).

TABELA 2 – PREVALÊNCIA E NÚMERO DE CASOS NOVOS DETECTADOS DE HANSENÍASE NO MUNDO, POR REGIÃO, EM 2009 E NO PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2010

| REGIÃO                | Nº DE CASOS REGISTRADOS E COEFICIENTE DE PREVALÊNCIA <sup>1</sup> (%), PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2010 | Nº DE NOVOS CASOS DETECTADOS E COEFICIENTE DE DETECÇÃO <sup>2</sup> , 2009 |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| África                | 30.947 (0.40)                                                                                     | 28.935 (3.75)                                                              |
| Américas              | 43.370 (0.49)                                                                                     | 40.474 (4.58)                                                              |
| Sudeste Asiático      | 120.456 (0.68)                                                                                    | 166.115 (9.39)                                                             |
| Mediterrâneo Oriental | 8.495 (0.15)                                                                                      | 4.029 (0.70)                                                               |
| Pacífico Ocidental    | 8.635 (0.05)                                                                                      | 5.243 (0.29)                                                               |
| TOTAL                 | 211.905                                                                                           | 244.796                                                                    |

FONTE: WHO (2010)

NOTAS: <sup>(1)</sup> Número de casos em tratamento por 10.000 habitantes

<sup>(2)</sup> Número de casos novos diagnosticados por 100.000 habitantes

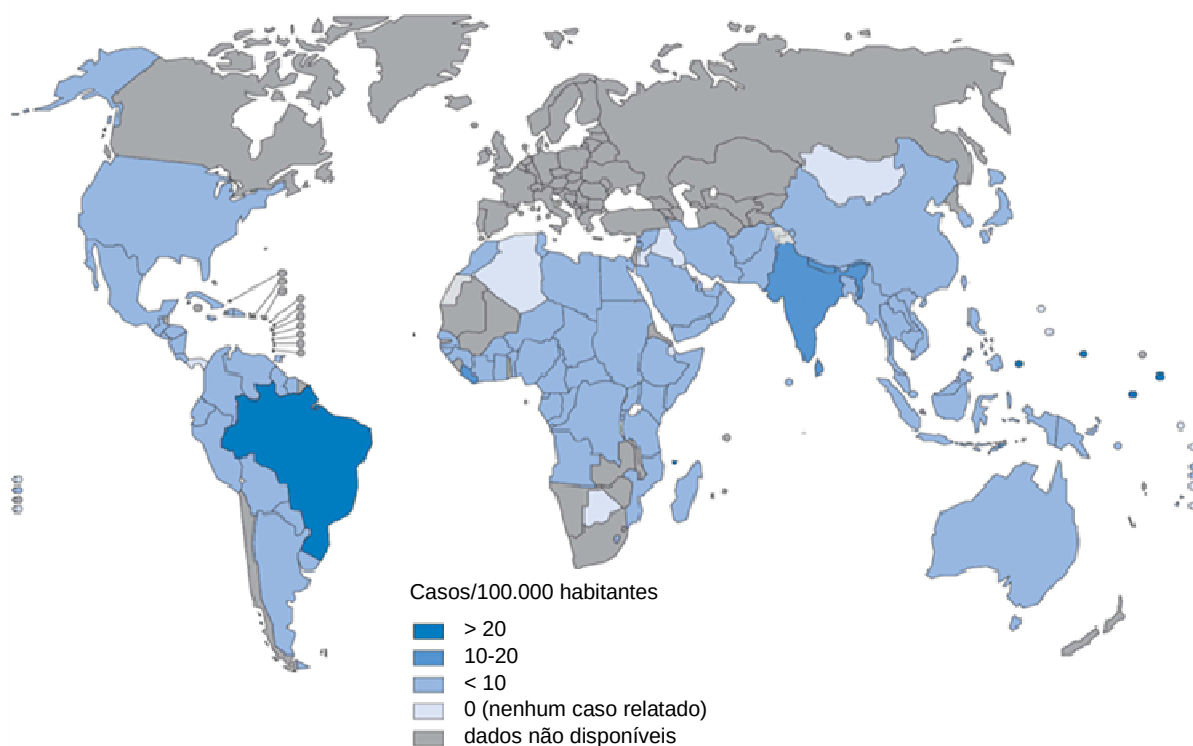


FIGURA 1 – COEFICIENTE DE DETECÇÃO DE CASOS NOVOS NO INÍCIO DE 2009

FONTE: WHO (2011)

Áreas de alta endemicidade ainda permanecem em Angola, Brasil, República da África Central, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e República Unida da Tanzânia. Em comparação com anos anteriores, o declínio do número de casos detectados é muito baixo (WHO, 2010)

(FIGURA 2), o que indica que a transmissão de *M. leprae* ainda continua (GELUK *et al.*, 2008).

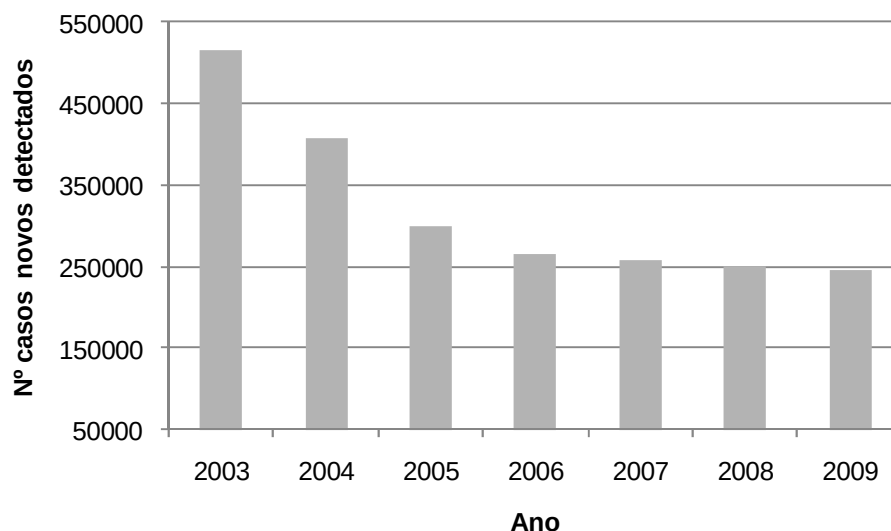


FIGURA 2 – NÚMERO DE CASOS NOVOS DETECTADOS DE HANSENÍASE NO MUNDO EM 2003-2009

FONTE: WHO (2010)

Na tabela 3 são apresentados os coeficientes de prevalência e detecção por região no Brasil, no ano de 2009. As regiões com os maiores coeficientes são Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Dos casos novos detectados no Brasil em 2009, 55,2% se trataram de indivíduos do sexo masculino, 56,9% foram casos multibacilares, 7,2% apresentaram incapacidade de grau 2 no diagnóstico e 7,1% dos casos foram detectados em menores de 15 anos. O percentual de pacientes curados em 2009 foi de 82,1% (BRASIL, 2011).

TABELA 3 – COEFICIENTES DE PREVALÊNCIA E DETECÇÃO DA HANSENÍASE NO BRASIL EM 2009, POR REGIÃO

| REGIÃO       | COEFICIENTE DE PREVALÊNCIA <sup>1</sup> | PARÂMETRO | COEFICIENTE DE DETECÇÃO <sup>2</sup> | PARÂMETRO     |
|--------------|-----------------------------------------|-----------|--------------------------------------|---------------|
| Norte        | 5,02                                    | Alto      | 49,94                                | Hiperendêmico |
| Nordeste     | 2,98                                    | Médio     | 28,80                                | Muito alto    |
| Sudeste      | 0,75                                    | Baixo     | 8,42                                 | Médio         |
| Sul          | 0,50                                    | Baixo     | 5,54                                 | Médio         |
| Centro-Oeste | 5,04                                    | Alto      | 44,28                                | Hiperendêmico |
| Brasil       | 1,99                                    | Médio     | 19,64                                | Alto          |

FONTE: BRASIL (2011)

NOTAS: <sup>(1)</sup> Número de casos em tratamento por 10.000 habitantes

<sup>(2)</sup> Número de casos novos diagnosticados por 100.000 habitantes

## 2.5 CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA

A hanseníase pode ser classificada segundo os esquemas de Madri, Ridley-Jopling ou da OMS. No Brasil, a classificação mais utilizada na prática clínica é a de Madri.

A classificação de Madri, proposta em 1953, define a hanseníase em tuberculóide (T), lepromatosa (L), indeterminada (I) e em *borderline* ou dimorfa (B), de acordo com critérios clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos (INTERNATIONAL CONGRESS LEPROLOGY, 1953). As formas clínicas da hanseníase, na classificação de Madri, considerando-se aspectos bacteriológicos e imunológicos (resposta à intradermoreação de Mitsuda), estão relacionadas no quadro 1.

|                   | Indeterminada<br>(I) | Tuberculóide<br>(T) | <i>Borderline</i><br>(B)  | Lepromatosa<br>(L) |
|-------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|--------------------|
| Reação de Mitsuda | Positiva ou negativa | Fortemente positiva | Negativa a positiva fraca | Negativa           |
| Baciloscopia      | Negativa             | Negativa            | Positiva a raros bacilos  | Positiva           |

QUADRO 1 – FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE RELACIONADAS COM BACILOSCOPIA E REAÇÃO DE MITSUDA, SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE MADRI

FONTE: SOUZA (1997)

Em 1966, Ridley e Jopling propuseram uma classificação para formas clínicas da hanseníase, segundo rígidos critérios clínicos, histopatológicos, imunológicos e bacteriológicos. Segundo estes autores, a hanseníase pode ser classificada em cinco grupos: tuberculóide-tuberculóide (TT), lepromatosa-lepromatosa (LL), *borderline*-tuberculóide (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline*-lepromatosa (BL). Pacientes que não se enquadram em nenhum dos cinco grupos acima são definidos com portadores de hanseníase indeterminada (I) (RIDLEY; JOLPLING, 1966).

No Brasil, usa-se o termo “virchowiana” para referir-se a hanseníase lepromatosa ou a hanseníase lepromatosa-lepromatosa, uma homenagem a Virchow, que descreveu as células espumosas encontradas na hanseníase.

Em 1982, o Grupo de Estudos em Quimioterapia da Hanseníase para Programas de Controle da OMS recomendou uma classificação para hanseníase baseada na classificação de Ridley-Jopling e na carga bacteriana em esfregaços de

linfa. Nesta classificação, criada essencialmente para fins terapêuticos, os pacientes I, TT e BT com índice bacteriológico (IB)  $\leq 2+$  foram classificados como doença paucibacilar e BB, BL e LL com IB  $> 2+$  foram classificados como doença multibacilar. O IB reflete o número de bacilos ácido-resistentes por média dos campos microscópicos imersos em óleo e é expresso em uma escala semilogarítmica de 0 a 6+.

Em 1988, o Comitê Técnico em Hanseníase da OMS recomendou que qualquer paciente com esfregaço positivo fosse classificado como doente multibacilar (MOSCHELLA, 2004). Em 1998, esse Comitê declarou que os esfregaços não eram essenciais para dirigir o tratamento e que o número de lesões presentes deveria ser a base para a classificação. As normas para diagnóstico clínico recomendadas foram: pacientes com uma lesão são classificados como paucibacilares de lesão única, pacientes com duas a cinco lesões são classificados como paucibacilares e pacientes com mais de cinco lesões são classificados como multibacilares (WHO, 1998).

As classificações adotadas para as formas clínicas da hanseníase, a de Madri, a de Ridley e Jopling e da OMS, podem ser correlacionadas frouxamente, como mostrado no quadro 2.

| CLASSIFICAÇÃO    | FORMAS CLÍNICAS   |                  |                       |                |                 |
|------------------|-------------------|------------------|-----------------------|----------------|-----------------|
| Madri            | Indeterminada (I) | Tuberculóide (T) | <i>Borderline</i> (B) |                | Lepromatosa (L) |
| Ridley e Jopling |                   | TT               | BT                    | BB             | BL              |
| OMS              | Paucibacilares    |                  |                       | Multibacilares |                 |

QUADRO 2 – CORRELAÇÃO ENTRE AS CLASSIFICAÇÕES DE MADRI (1953), DE RIDLEY E JOPLING (1966) E DA OMS (1982) ADOTADAS PARA A HANSENÍASE

FONTE: SOUZA (1997)

NOTA: TT: tuberculóide-tuberculóide; BT: *borderline*-tuberculóide; BB *borderline-borderline*; BL: *borderline*-lepromatoso e LL: lepromatoso-lepromatoso

## 2.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Segundo Worobec (2009), inicialmente, a doença se apresenta como hanseníase indeterminada, a qual é caracterizada por uma ou mais máculas hipopigmentadas ou eritematosas. A hanseníase indeterminada pode ser resolvida espontaneamente ou evoluir para outras formas da doença. Os casos tuberculóides

apresentam uma resposta imune celular vigorosa que limita o número de lesões e poucos ou mesmo nenhum bacilo são observados nas lesões. Enquanto, os casos lepromatosos se caracterizam por numerosas lesões com alta carga bacilar e por uma resposta imune humoral. As formas *borderline* apresentam fenótipos clínicos e histopatológicos intermediários das formas citadas acima e são resultado de respostas imunológicas instáveis (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). O quadro 3 apresenta os principais achados clínicos das diferentes formas da hanseníase.

| FORMA CLÍNICA | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I             | poucas máculas hipopigmentadas; pode ocorrer leve perda da sensibilidade; índice baciloscópico 0, ocasionalmente 1+                                                                                                                                                                |
| TT            | lesão única ou poucas; máculas hipopigmentadas ou eritematosas; placas eritematosas; acometimento neural e perda da sensibilidade; índice baciloscópico 0                                                                                                                          |
| BT            | lesões semelhantes a forma TT, porém menores e em maior número; lesões satélites; acometimento neural e perda da sensibilidade; índice baciloscópico 0-2+                                                                                                                          |
| BB            | lesões intermediárias em número e tamanho entre a forma tuberculóide e lepromatosa; perda moderada da sensibilidade; lesões “esburacadas”; lesões satélites; índice baciloscópico 2-5+                                                                                             |
| BL            | lesões numerosas; lesões podem ser máculas, pápulas, placas e nódulos; lesões “esburacadas”; acometimento neural; índice baciloscópico 4-5+                                                                                                                                        |
| LL            | lesões numerosas; máculas ou pápulas eritematosas e simétricas; placas e nódulos; edema de pés e pernas; perda de cílios e sobrancelhas; fáceis leonina; acometimento neural e perda da sensibilidade; acometimento de olhos, nariz, ossos e testículos; índice baciloscópico 5-6+ |

QUADRO 3 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE  
FONTE: RIDLEY e JOLPLING (1966)

Durante o curso do tratamento ou em um período anterior ou mesmo após o tratamento podem ocorrer as reações hansênicas. As reações hansênicas são fenômenos inflamatórios agudos, mediados imunologicamente, cujas causas e mecanismos são desconhecidos. Os principais tipos de reação são a reação reversa (reação tipo 1) e eritema nodoso da hanseníase (reação tipo 2) (SCOLLARD *et al.*, 2006). A reação tipo 1 ocorre em pacientes com as formas *borderline*, bem como em pacientes paucibacilares de lesão única classificados histopatologicamente em indeterminados (I) e tuberculóides (TT) (SOUZA *et al.*, 2007). As lesões de pele tornam-se inflamadas e edemaciadas e podem ulcerar. Em nervos, a instalação de uma neurite aguda pode conduzir a perda permanente da função de nervos

causando, por conseguinte, uma neuropatia motora e sensorial (WALKER; LOCKWOOD, 2007). A reação tipo 2 ocorre em pacientes multibacilares (BL e LL). Essa reação é caracterizada, na pele, pelo aparecimento de pápulas e nódulos que se distribuem na face e extremidades. Algumas das lesões podem ulcerar. Sistemáticamente os pacientes podem apresentar febre, uveíte, neurite, artrite, linfadenite, orquite e dactilite (WALKER; LOCKWOOD, 2007).

## 2.7 IMUNOPATOGENESE DA HANSENÍASE

Muitos avanços em imunopatogênese na hanseníase estão sendo obtidos e como consequência, poderá haver um melhor combate a doença. Aqui, nesta revisão, serão descritos alguns estudos, entre os mais recentes, sobre o tema. Desde que *M. leprae* não é cultivável *in vitro*, os estudos de imunidade do hospedeiro ao microrganismo e patogênese da hanseníase são limitados a investigações em lesões cutâneas obtidas de pacientes e em leucócitos de sangue periférico (SINSIMER *et al.*, 2010).

Uma vez no organismo através das vias respiratórias o bacilo atinge os nervos periféricos e a pele via circulação periférica. Nesses locais, a bactéria preferencialmente prolifera no interior de macrófagos, células de Schwann e células endoteliais (PESSOLANI *et al.*, 2003). A infecção das células de Schwann pelo bacilo resulta na perda das funções motoras e sensoriais (SPIERINGS *et al.*, 2000).

A hanseníase apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que se correlacionam com a resposta imune do hospedeiro ao *M. leprae*. Em um dos pólos do espectro está a hanseníase tuberculóide que se caracteriza por uma infecção localizada e pela expressão de citocinas tipo  $T_H1$  que promovem uma imunidade mediada por células. No outro pólo do espectro, a hanseníase lepromatosa se caracteriza por uma infecção disseminada e pela expressão de citocinas tipo  $T_H2$  que promovem uma resposta imune humoral (MODLIN, 1994).

A resposta imune inata é o mecanismo universal de defesa do hospedeiro contra infecção. A habilidade do sistema imune em reconhecer patógenos é mediada por famílias altamente conservadas de receptores de reconhecimento padrão que ativam as vias de defesa do hospedeiro. Uma dessas famílias

compreende os receptores *Toll-like* (TLRs) que são expressos por uma variedade de células do sistema imune inato. Há dois diferentes mecanismos pelos quais a ativação dos TLRs pode contribuir no combate a infecções: primeiro, a ativação de TLRs pode diretamente mediar uma resposta inata por fagocitose e atividade antimicrobiana, segundo, a ativação de TLRs pode desencadear a liberação de citocinas e diferenciação de células dendríticas, permitindo assim o sistema imune intato instruir uma resposta imune adaptativa (KRUTZIK *et al.*, 2005).

*M. leprae* e suas lipoproteínas ativam células do sistema imune inato através de TLR2 e heterodímeros TLR1-TLR2. *In vitro*, citocinas do tipo 1, que predominam em lesões da forma TT, ativaram TLR1 e TLR2 em monócitos e células dendríticas na presença de lipoproteínas, enquanto, citocinas do tipo 2, predominantes em lesões da forma LL, inibiram a ativação. Além disso, citocinas do tipo 1 aumentaram a expressão de TLR1 em células, enquanto, citocinas do tipo 2 (IL-4) diminuíram a expressão de TLR2 em células. Em estudos *in vivo*, a frequência de monócitos e células dendríticas expressando TLR1 e TLR2 foi muito maior em pacientes com hanseníase tuberculóide quando comparado com pacientes com hanseníase lepromatosa. Em vista disso, o curso da resposta imune em hanseníase é determinado pelas citocinas locais, uma vez que, essas atuam na regulação da expressão e ativação de TLR1 e TLR2 (KRUTZIK, 2003).

Outra família de receptores de reconhecimento padrão expressos em células imune são lectinas tipo C. *Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Nonintegrin* (DC-SIGN) é uma lectina que reconhece patógenos via domínio de reconhecimento de carboidrato (GEIJTENBEEK *et al.*, 2000). Krutzik *et al.* (2005) exploraram a diferenciação, distribuição e função de células DC-SIGN<sup>+</sup> e células CD1<sup>+</sup> em hanseníase. CD1 (CD1a e CD1b) são moléculas que apresentam lipídios a células T (BRICARD; PORCELLI, 2007). A ativação de receptores TLR conduz a diferenciação de precursores de monócitos periféricos humanos em células DC-SIGN<sup>+</sup> e células CD1b<sup>+</sup>. Células DC-SIGN<sup>+</sup> apresentaram um fenótipo macrófago-*like* e foram fagocíticas. As células CD1b<sup>+</sup> apresentaram um fenótipo de células dendríticas e atuaram como células apresentadoras de antígeno. Após ativação TLR, monócitos periféricos de pacientes com hanseníase tuberculóide foram diferenciados em macrófagos DC-SIGN<sup>+</sup> e células dendríticas CD1b<sup>+</sup>. Já os monócitos periféricos de pacientes com hanseníase lepromatosa foram diferenciados em macrófagos DC-SIGN<sup>+</sup>, mas não em células dendríticas CD1b<sup>+</sup>. Em

lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide ambas as células, DC-SIGN<sup>+</sup> e CD1b<sup>+</sup>, foram identificadas, enquanto, em lesões de pacientes lepromatosos apenas as células DC-SIGN<sup>+</sup> foram encontradas. Nas lesões desses pacientes, os macrófagos estavam infectados com *M. leprae*, como esperado, nas lesões de pacientes tuberculóides o bacilo não foi detectado. A presença de *M. leprae* em macrófagos de lesões lepromatosas faz inferir que o sistema imune inato exerce seu efeito direto nesses pacientes, ou seja, fagocita a bactéria em macrófagos, porém é incapaz de mediar seu efeito indireto de induzir uma resposta de célula T adaptativa, necessária para a destruição de patógenos intracelulares. Sabe-se que receptores DC-SIGN são expressos em células dendríticas e esse estudo informou que células, expressando marcadores DC-SIGN, foram encontradas em monócitos e macrófagos. Esse achado foi confirmado posteriormente pelo mesmo grupo que demonstrou a presença, na pele normal, de duas distintas populações de células dendríticas. Na derme, foram localizadas células dendríticas imaturas que expressavam marcadores característicos dessas células e macrófagos que coexpressavam DC-SIGN, receptor de manose (CD206) e marcadores típicos de macrófagos/monócitos (OCHOA *et al.*, 2008).

*M. leprae* é um patógeno que sobrevive dentro de fagossomo de macrófagos do hospedeiro. Esse parasitismo é mais evidente em lesões de pacientes com hanseníase lepromatosa, onde os fagossomos estão aumentados e abrigam o bacilo em multiplicação. Em um estudo com *M. bovis* BCG foi demonstrado que a proteína CORO1A, também conhecida como TACO (*Tryptophan Aspartate-Containing Coat Protein*), se acumula na membrana do fagossomo. Como consequência desse evento, ocorreu a inibição da fusão fagossomo-lisossomo, assim como, a sobrevivência do bacilo no interior de macrófagos (FERRARI *et al.*, 1999). Suzuki *et al.* (2006b) investigaram a localização de CORO1A em macrófagos infectados com *M. leprae* *in vivo* e *in vitro*. Em lesões de pele de pacientes com hanseníase lepromatosa, foi observado a localização de CORO1A na membrana de fagossomos que continham *M. leprae*. Como não houve uma associação direta entre presença de bacilos e CORO1A foi sugerido que produtos de *M. leprae* acumulados dentro do fagossomo são importantes para a retenção de CORO1A na membrana fagossomal. Quando macrófagos de camundongos foram infectados com *M. leprae*, CORO1A foi recrutada da membrana plasmática para a membrana do fagossomo. Portanto, esses dados indicam que CORO1A é um importante fator na patogênese

da hanseníase. Visto que CORO1A e TLR-2 estão co-localizados na membrana do fagossomo sob infecção com *M. leprae* (SUZUKI *et al.*, 2006) foi sugerido a existência de interação entre as duas moléculas. De fato, foi encontrado que CORO1A suprime a sinalização mediada por TLR em macrófagos humanos e que a ativação mediada por TLR2 resulta na supressão de expressão de CORO1A. Foi demonstrado que *M. leprae* usa a proteína CORO1A para inibir a sinalização mediada por TLR-2 a fim de criar um ambiente mais adequado para sua sobrevivência (TANIGAWA *et al.*, 2009).

Os fagossomos em macrófagos de lesões de pacientes com hanseníase lepromatosa, além de conter *M. leprae*, são caracterizados por apresentar acúmulo de lipídios. Acredita-se que *M. leprae* utiliza lipídios como fonte de nutrientes, porém o mecanismo pelo qual esses compostos são acumulados em fagossomos não é conhecido. Tanigawa *et al.* (2008) propuseram um mecanismo de acúmulo de lipídios em macrófagos infectados com *M. leprae* ao investigar o papel das proteínas ADRP (*adipophilin/adipose differentiation-related protein*) e perilipina em hanseníase. Essas proteínas são admitidas atuar na acumulação de lipídios em células animais. No estudo foi demonstrada a detecção de ADRP e perilipina na membrana de fagossomos em macrófagos que continham *M. leprae* em lesões de pacientes com hanseníase lepromatosa. Também foi mostrado que a infecção por *M. leprae* aumenta a expressão de ADRP e perilipina em cultura de células e que *M. leprae* inibe a supressão da expressão de ADRP. Portanto, os resultados sugerem que *M. leprae* possui habilidade de induzir e sustentar a expressão de ADRP e perilipina para criar um ambiente rico em lipídios favorável para sua sobrevivência dentro de macrófagos.

A diferenciação de monócitos em células dendríticas é um mecanismo chave pelo qual o sistema imune inato induz uma resposta de célula T adaptativa. Lee *et al.* (2007) investigaram o papel do receptor A2 leucócito Ig-like (LILRA2) na diferenciação de células dendríticas em hanseníase. Os receptores LILRs são expressos em linfócitos e células mielomonocíticas, incluindo macrófagos e células dendríticas e atuam na regulação das respostas imune inata e adaptativa. Bleharski *et al.* (2003) mostraram uma maior expressão de RNAm codificantes para LILR, principalmente de LILRA2, em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase lepromatosa comparado com lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide. Essa observação foi confirmada por Lee *et al.* (2007) em que células expressando a

proteína LILRA2 foram mais frequentes em lesões de pacientes com hanseníase lepromatosa versus lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide. Além disso, foi observado que essas células apresentaram um fenótipo macrófago-like. Em estudos *in vitro*, a ativação de LILRA2 inibiu a diferenciação de monócitos em células dendríticas induzida por GM-CSF e subsequente apresentação de antígenos restrita ao MHC classe II e CD1b. A ativação LILRA2 também alterou o fenótipo de superfície de monócitos e o perfil de secreção de citocinas. Os resultados do estudo forneceram evidências que a expressão de LILRA2 pode contribuir no desenvolvimento da forma lepromatosa da hanseníase.

*M. leprae* é relatado como sendo pobre ativador de células dendríticas em estudos *in vitro*. Células dendríticas quando estimuladas com *M. leprae* não aumentaram a expressão de marcadores de superfície de maturação e ativação como também não induziram a proliferação de células T (MURRAY *et al.*, 2007). Além de inibir a ativação de células dendríticas, *M. leprae* também possui efeito inibitório sobre monócitos. Estudos *in vitro* têm mostrado que monócitos de indivíduos saudáveis após exposição ao *M. leprae* produzem baixos níveis de citocinas, como IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-10 e IL-12. Por comparação, *M. bovis* BCG, sob as mesmas condições, induziu níveis mais altos para todas as citocinas. Em contraste, *M. leprae* induz altos níveis de quimiocinas inibitórias MCP-1 e IL-1Ra em monócitos via mecanismos dependente de sinalização PI3K. Também foi sugerido que a via PI3K está envolvida na supressão da produção de IL-6 em monócitos. E parece que a demora na ativação caspase-1 e redução da ativação NF- $\kappa$ B são responsáveis pelos baixos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-18 produzidos por células estimuladas por *M. leprae*. Esses dados, portanto, indicam que o fracasso de monócitos em montar uma resposta de citocina efetiva ao *M. leprae* é devido a supressão induzida pelo bacilo através de múltiplas vias (SINSIMER *et al.*, 2010).

Outro mecanismo implicado na patogênese da hanseníase foi descrito por Montoya *et al.* (2009). Nesse estudo, as investigações indicaram que as duas funções do macrófago, fagocitose e atividade antimicrobiana, e logo, a determinação do curso da doença, patogênese ou resistência, são reguladas pelas citocinas IL-10 e IL-15. Em lesões de pacientes com hanseníase lepromatosa, os macrófagos apresentaram uma atividade predominantemente fagocítica induzida por IL-10. Em lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide, a expressão de IL-15 limitou a

fagocitose da micobactéria e juntamente com a ativação da atividade antimicrobiana dependente de vitamina D conduziu a defesa do hospedeiro contra a infecção.

## 2.8 GENÉTICA HUMANA NA SUCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE

Em hanseníase, como também em outras doenças infecciosas, a exposição ao agente infeccioso é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento da doença (ALTER *et al.*, 2008). Além da exposição ao agente etiológico e da influência de fatores ambientais, há componentes genéticos que são fundamentais para a manifestação da doença (MORAES *et al.*, 2006). A evidência que fatores genéticos do hospedeiro contribuem para a susceptibilidade à hanseníase foi demonstrada, inicialmente, por Mohamed e Ramanujam em 1966 em estudo realizado com gêmeos (ALTER *et al.*, 2011). Vários genes ou regiões cromossômicas estão implicados na modulação da suscetibilidade do hospedeiro à hanseníase e alguns desses genes e regiões serão aqui brevemente descritos. A investigação de fatores genéticos na susceptibilidade à hanseníase foi realizada através de estudos com gêmeos, estudos de agregação familiar e análise de segregação. Mais recentemente, a pesquisa tem sido feita por estudos de ligação e de associação a partir de genes candidatos ou regiões cromossômicas definidas por *scan* genômico.

### 2.8.1 Genes ligados ao complexo do Antígeno Leucocitário Humano (HLA)

#### 2.8.1.1 Genes *HLA*

O complexo HLA compreende uma região do genoma localizado no cromossomo 6 cujos genes da classe I (*HLA-A*, *-B* e *-C*) e classe II (*HLA-DP*, *-DQ*, e *-DR*) tem sido estudados em genética de susceptibilidade à hanseníase. Vries *et al.* (1980) apresentaram evidências para *HLA-DR2* como um marcador de susceptibilidade à hanseníase tuberculóide em um estudo conduzido na Índia. Essa associação foi posteriormente confirmada por van Eden *et al.* (1980), entre outros. MAT *et al.* (1988) mostraram a prevalência do antígeno *HLA-DR2* em pacientes com hanseníase lepromatosa na Turquia. Koçak *et al.* (2002) demonstraram que

antígenos da classe I (A9, A10, A32, B5, B21, Bw4, Bw6, Cw1, Cw2) e da classe II (DR9, DR10, DRw52, DQ1 e DQ3) foram significativamente mais frequentes em pacientes hansenianos quando comparado ao grupo controle na Turquia.

#### 2.8.1.2 *Fator de necrose tumoral (TNF) e Linfotóxina alfa (LTA)*

Diversos estudos têm mostrado o papel das alterações no gene *TNF* na susceptibilidade à hanseníase. Entre eles pode-se citar o estudo realizado por Roy *et al.* (1997) em que foi relatado uma alta frequência do alelo *TNF2* (alelo variante resultante do polimorfismo na posição -308 da região promotora do gene *TNF*) em pacientes com hanseníase lepromatosa na Índia. Enquanto, um estudo realizado por Santos *et al.* (2000) em uma população do Rio de Janeiro, Brasil, aponta o papel protetor do alelo *TNF2* na defesa contra o desenvolvimento da hanseníase.

SHAW *et al.* (2001) em um estudo em Belém, Brasil, verificaram associação do haplótipo *TNF1/LTA2* com susceptibilidade a hanseníase e proteção com o haplótipo *TNF2/LTA2*.

#### 2.8.2 *SLC11A1* ou *NRAMP1*

O gene *SLC11A1*, anteriormente chamado *NRAMP1*, é o homólogo humano do gene *Slc11a1* em camundongo. Uma mutação de ponto no gene *Slc11a1* em camundongos está relacionada à susceptibilidade a vários patógenos intracelulares, incluindo *M. bovis* e *M. lepraemurium* (FITNESS; TOSH; HILL, 2002). Em um estudo realizado no Sudeste Asiático, Abel *et al.* (1998) demonstraram as primeiras evidências de ligação entre o gene *SLC11A1* e susceptibilidade à hanseníase. Uma associação entre o genótipo heterozigoto de uma inserção/deleção de TGTG na região 3'UTR e a forma multibacilar da hanseníase foi encontrada em Mali no Oeste Africano por Meisner *et al.* (2001). Estudos têm mostrado um componente genético influenciando a reação de Mitsuda. ALCAÏS *et al.* (2000) mostraram evidências de ligação do gene *SLC11A1* com a reação de Mitsuda em vietnamitas. RANQUE *et al.* (2005) forneceram evidências que a reação de Mitsuda é controlado por um gene principal, que por sua vez, é distinto de *SLC11A1*. Em um estudo posterior, Ranque *et al.* (2007) associaram duas regiões, 2q35 (lôcus do *SLC11A1*) e 17q21-25, no controle genético da reação de Mitsuda.

### 2.8.3 Receptor de vitamina D (VDR)

A forma ativa da vitamina D possui um papel imunoregulatório mediado pela sua ligação ao VDR em monócitos, macrófagos e linfócitos ativados. Em um estudo realizado na Índia, Roy *et al.* (1999) encontraram uma associação entre o polimorfismo no códon 352 do gene *VDR* com os subtipos de hanseníase. O genótipo *tt* foi mais frequente entre pacientes com hanseníase tuberculóide, enquanto, o genótipo *TT* foi mais frequente entre os pacientes com hanseníase lepromatosa. Enquanto, em um estudo em Malawi, onde os casos de hanseníase foram predominantemente paucibacilares, foi observado associação do genótipo *tt* com susceptibilidade a hanseníase *per se* (FITNESS *et al.*, 2004).

### 2.8.4 Interleucina 10 (IL-10)

A associação do polimorfismo na posição -819 na região promotora do gene *IL-10* foi mostrado por Santos *et al.* (2002), em um estudo realizado no Brasil. Foi observado uma maior frequência do genótipo -819TT entre pacientes com hanseníase comparado com o grupo controle. MORAES *et al.* (2004) encontraram que o haplótipo formado pelos polimorfismos -3575A/-2849G/-2763C está associado com resistência a hanseníase *per se* e ao desenvolvimento de hanseníase multibacilar, enquanto o haplótipo -3575T/-2849A/-2763C está associado a susceptibilidade a hanseníase *per se*. O estudo também confirma o achado de Santos *et al.* (2002), pois o haplótipo estendido da região promotora distal (-3575T/-2849A/2763C/-1082G/-819T) está associado a susceptibilidade à hanseníase.

### 2.8.5 Regiões cromossômicas

Siddiqui *et al.* (2001) detectaram a ligação da região cromossômica 10p13 com hanseníase paucibacilar usando *scan* genômico em duas populações indianas predominantemente paucibacilar. Posteriormente, o mesmo grupo identificou uma região no cromossomo 20 (20p12) ligada a susceptibilidade à hanseníase paucibacilar em umas das populações (Tamil Nadu, Índia), porém essa região não pareceu ser ligada a susceptibilidade na outra população estudada (Andhra Pradesh, Índia) (TOSH *et al.*, 2002).

Mira *et al.* (2003) identificaram um locus envolvido no controle da hanseníase *per se* na região cromossômica 6q25 por *scan* genômico em uma população vietnamita. Esse estudo também confirmou a presença de um locus de susceptibilidade na região cromossômica 10p13 em pacientes com hanseníase paucibacilar.

A região cromossômica 17q11-q21, identificada por Jamieson *et al.* (2004), também foi implicada na susceptibilidade à hanseníase em famílias de Belém, Brasil.

#### 2.8.6 *PARK2/PACRG*

Em uma investigação mais detalhada na região cromossômica 6q25, Mira *et al.* (2004), usando *scan* genômico em uma população vietnamita, identificaram uma associação da susceptibilidade à hanseníase com marcadores cuja localização se sobrepõe a uma região compartilhada pelos genes *PARK2* (parkina) e *PACRG* (*Parkin co-regulated gene*). Dois desses marcadores (polimorfismos de base única – SNPs), *PARK2\_e01*(-2599) e rs1040079, foram altamente preditivos para hanseníase. Subsequentemente, os dados foram confirmados em uma população do Brasil, portanto, indicando a região regulatória dos genes *PARK2* e *PACRG* como fator de risco para a hanseníase. Mutações no gene da parkina foram identificadas como causa de doença de Parkinson autossômica recessiva juvenil (KITADA *et al.*, 1998). Enquanto pouco é conhecido sobre a função de *PACRG*, parkina é uma E3 ubiquitina-ligase envolvida no metabolismo de ubiquitinação celular, importante modificação pós-traducional em muitas proteínas para direcioná-las a degradação no proteossoma na célula (SHIMURA *et al.*, 2000).

### 2.9 DIAGNÓSTICO

Ainda hoje o diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, podendo ocasionalmente ser acompanhado de exame baciloscópico ou exame histológico (LOCKWOOD, 2005). Segundo a OMS, um caso de hanseníase é definido como um indivíduo com um ou mais dos seguintes sinais: lesões de pele hipopigmentadas ou

avermelhadas com perda da sensibilidade; envolvimento dos nervos periféricos demonstrado por espessamento e perda da sensibilidade; *M. leprae* em baciloscopia de pele ou em exame histopatológico de pele ou nervo (WHO, 1998; WALKER; LOCKWOOD, 2006). Um recurso adicional para o diagnóstico da hanseníase é o teste de histamina. O teste fornece informações sobre a integridade das ramificações nervosas periféricas e pode ser utilizado como um apoio ao diagnóstico precoce da hanseníase em casos onde a pesquisa de sensibilidade é difícil ou duvidosa, em crianças, em adultos com algum tipo de deficiência que possa dificultar a pesquisa e nas manifestações iniciais da hanseníase nos casos paucibacilares (BRASIL, 2004). Outros testes de diagnóstico como sorológicos, cutâneos e PCR são limitados a locais onde tais técnicas são disponíveis e em centros acadêmicos ou de pesquisa (MOSCHELLA, 2004).

Ensaios sorológicos disponíveis para *M. leprae* são baseados na detecção de anticorpos anti-glicolípido fenólico I. O antígeno glicolípido fenólico I (PGL-I) foi identificado por Brennan e Barrow em 1980 em células de *M. leprae* e em tecidos de tatu infectados (HUNTER; BRENNAN, 1981). O desenvolvimento de derivados semi-sintéticos de PGL-I como o dissacarídeo natural-octil-BSA (ND-O-BSA) e o trissacarídeo natural-fenol-BSA (NT-P-BSA) viabilizou o uso do antígeno em diagnóstico e em estudos epidemiológicos. Entre as técnicas que utilizam o antígeno PGL-I estão ELISA (BRETT *et al.*, 1984), *dipsticks* (BÜHRER *et al.*, 1998) e fluxo lateral (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003). A presença de anticorpos anti-PGL-I correlaciona-se com a carga bacilar em pacientes hansenianos, ou seja, a maioria dos pacientes paucibacilares são soronegativos, enquanto a maioria dos pacientes multibacilares são soropositivos (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003). Em áreas endêmicas, resultados falso-positivos são relativamente altos chegando a mais de 10% (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003; FROTA *et al.*, 2010). Portanto, a detecção de anticorpos anti-PGL-I não deve ser utilizada como um teste de diagnóstico, mas pode ser utilizado no processo diagnóstico quando resultados sorológicos são considerados junto com o exame clínico e demais dados de diagnóstico (BÜHRER-SÉKULA, 2008).

O teste de Mitsuda é o teste cutâneo empregado em hanseníase, o qual é usado na classificação da doença e na avaliação da resposta imune celular do indivíduo ao *M. leprae* (GODAL, 1978). O teste consiste na aplicação intradérmica da mitsudina, também chamada de lepromina, na face anterior do antebraço

(TOMIMORI-YAMASHITA *et al.*, 1996). A mitsudina é uma suspensão de bacilos inativados obtidos de pacientes que se encontram na forma clínica lepromatosa ou de tatus (*Dasypus novemcinctus*) infectados experimentalmente (BEIGUELMAN, 2002). Seguindo a aplicação do antígeno, dois tipos de reação são descritas: a reação precoce (Reação de Fernandez) lida após 48-72 horas e a reação tardia (Reação de Mitsuda) lida após 3-4 semanas. A leitura final do teste é realizada entre 21º e 28º dias após a aplicação da mitsudina. A reação de Mitsuda é expressa em milímetros, tomando-se a média das medidas longitudinal e transversal da endureção, e é considerada positiva quando ultrapassa 5 mm (TOMIMORI-YAMASHITA *et al.*, 1996). A maioria dos contatos e indivíduos não expostos assim como em pacientes com hanseníase tuberculóide apresentam uma reação Mitsuda positiva. Pacientes com hanseníase lepromatosa são caracterizados por uma reação Mitsuda negativa. Logo, a reatividade a mitsudina não é utilizada em diagnóstico, mas pode ser usada no prognóstico da hanseníase (HASTINGS *et al.*, 1988).

No Brasil, o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) é o único fornecedor da mitsudina para o Ministério da Saúde cuja produção é baseada na extração de bacilos de hansenomas de pacientes. Os problemas encontrados na produção do antígeno residem na grande dificuldade de obtenção dos hansenomas, na presença de outras espécies de micobactérias (ALBAN *et al.*, 2009), sem contar os riscos associados à manipulação e inoculação de material biológico humano.

Técnicas baseadas em PCR foram desenvolvidas para a detecção de *M. leprae* em diferentes amostras clínicas como esfregaços de pele (SANTOS *et al.*, 1993; TORRES *et al.*, 2003), esfregaços de mucosa nasal (WIT *et al.*, 1993; BEYENE *et al.*, 2003), biópsias de pele (CLARK-CURTISS; DOCHERTY, 1989; TORRES *et al.*, 2003; ALBAN *et al.*, 2009), sangue (SANTOS *et al.*, 1993; ALMEIDA *et al.*, 2004), lesões de nervos (CHEMOUILLI *et al.*, 1996; JARDIM *et al.*, 2003), lesões oculares (CARUS *et al.*, 1995; SHAMSI *et al.*, 2007) e urina (PARKASH *et al.*, 2004). Diferentes regiões-alvo são utilizadas em PCR para a detecção de *M. leprae* como gene que codifica a proteína de 18 kDa (WILLIAMS *et al.*, 1990), gene que codifica o antígeno de 36 kDa (HARTSKEERL; de WIT; KLATSER, 1989), gene *groE-L* (WOODS; COLE, 1989), gene para 16S RNAr (ARNOLDI *et al.*, 1992), sequência repetitiva (RLEP) (CLARK-CURTISS; DOCHERTY, 1989), gene *LSR/A15* (GUERRERO *et al.*, 2002), região intergênica 85 A-C (*fbpA-fbpC*) e região do gene Ag85 B (*fbpB*) (MARTINEZ *et al.*, 2006), 16S RNAr (KURABACHEW; WONDIMU;

RYON, 1998) e hsp18 RNAm (LINI; SHANKERNARAYAN; DHARMALINGAM, 2009). Os métodos baseados em PCR também permitem avaliar a resposta do indivíduo ao tratamento (KURABACHEW; WONDIMU; RYON, 1998) como também a detecção de mutações associada à resistência a medicamentos (SAPKOTA *et al.*, 2007). Métodos baseados em PCR se mostram mais sensíveis e específicos na detecção de *M. leprae* em amostras clínicas comparado aos métodos convencionais (MARTINEZ *et al.*, 2006) e logo são ferramentas úteis no diagnóstico e no monitoramento do tratamento em hanseníase.

### 2.9.1 Pesquisa de antígenos para o diagnóstico imunológico da hanseníase

Várias estratégias têm sido utilizadas na identificação de antígenos para uso no diagnóstico da hanseníase. Inicialmente, estudos baseados no uso de soro de pacientes hansenianos ou anticorpos monoclonais produzidos contra proteínas de frações subcelulares do bacilo permitiram identificar antígenos em *M. leprae* (GILLIS; BUCHANAN, 1982; IVANYI *et al.*, 1983; BRITTON *et al.*, 1985). Com o surgimento da biologia molecular, Young *et al.* (1985) construíram uma biblioteca de DNA recombinante e com o emprego de anticorpos monoclonais foram capazes de isolar genes codificantes de antígenos em *M. leprae* (MARQUES *et al.*, 2004).

Estudos subsequentes, como os selecionados abaixo, numa vasta literatura existente, caracterizaram antígenos em *M. leprae* quanto à suas propriedades bioquímicas e/ou imunológicas. As proteínas foram estudadas como moléculas totais ou na forma de peptídeos compreendendo parte das proteínas totais.

Mckenzie *et al.* (1991) demonstraram uma proteína de 70 kDa, obtida pela tecnologia do DNA recombinante, que foi capaz de induzir resposta humoral e celular, avaliada por ensaio de proliferação, em indivíduos expostos a micobactérias.

Estrada *et al.* (1992) sintetizaram peptídeos correspondentes a segmentos das proteínas 65 kDa, 28 kDa, 28 kDa superóxido dismutase e 18 kDa de *M. leprae* e avaliaram a habilidade dos mesmos em induzir resposta celular em cobaias. Os peptídeos foram capazes de induzir reação de hipersensibilidade do tipo tardio em 17-58% dos animais.

Rivoire *et al.* (1994) através de métodos bioquímicos caracterizaram a

proteína de 10 kDa em *M. leprae* e por engenharia genética produziram a forma recombinante. Posteriormente, Chua-Intra *et al.* (1998) identificaram uma sequência peptídica do antígeno de 10 kDa como um determinante estimulatório de células T em pacientes com hanseníase tuberculóide com base em ensaio de proliferação. O peptídeo, logo, se apresentou como um reagente interessante de teste cutâneo ou teste sanguíneo para hanseníase tuberculóide.

Wilkinson *et al.* (1999) avaliaram a resposta celular (ensaio de proliferação e determinação de INF- $\gamma$ ) e humoral (ELISA) de quatro proteínas recombinantes, 10 kDa, 28 kDa, 36 kDa e 65 kDa. O antígeno de 10 kDa estimulou uma resposta predominantemente celular em pacientes paucibacilares. O antígeno de 65 kDa foi o melhor indutor de resposta celular em pacientes paucibacilares. Já o antígeno 36 kDa estimulou uma resposta em pacientes multibacilares e o antígeno de 28 kDa foi um estimulador fraco de resposta de celular e humoral.

Macfarlane *et al.* (2001) compararam a resposta celular induzida por diferentes proteínas recombinantes em pacientes e controles. Os dados mostram que a proteína 45 kDa foi reconhecida por células T de pacientes com hanseníase e contatos e em menor extensão por controles saudáveis. Brahmbhatt *et al.* (2002) avaliaram a resposta celular a um conjunto de peptídeos abrangendo o antígeno de 45 kDa de *M. leprae* em pacientes e controles. Alguns peptídeos foram reconhecidos por pacientes com hanseníase tuberculóide, porém também foram reconhecidos por pacientes com tuberculose.

Spencer *et al.* (2002) sintetizaram peptídeos sobrepostos abrangendo a proteína ESAT-6 de *M. leprae* e dois peptídeos de ESAT-6 de *M. tuberculosis*. Anticorpos policlonais e monoclonais anti-ESAT-6 de *M. leprae* e hibridomas de células T permitiram a identificação de epítomos de células B e T em ESAT-6 de *M. leprae*.

Geluk *et al.* (2004) tentaram identificar peptídeos da proteína CFP-10 que deveriam ser somente reconhecidos por células T específicas a *M. leprae*, uma vez que a proteína total forneceu reações cruzadas, em análise de produção de IFN- $\gamma$ . Nenhum dos peptídeos foi reconhecido somente por pacientes hansenianos. Contrariamente, Spencer *et al.* (2004) conseguiram identificar peptídeos de célula B e T específicos para *M. leprae* ao empregar soro imune produzidos em animais e hibridomas de células T gerados frente a proteínas CFP-10 de *M. leprae* e *M. tuberculosis* e soro de pacientes.

Hussain *et al.* (2004) avaliaram a resposta de células T e B a um conjunto de peptídeos sobrepostos da proteína GroES de *M. leprae*. Os resultados mostraram que peptídeos indutores de resposta humoral são diferentes daqueles que induzem resposta celular. Também foi observado que as respostas foram direcionadas a epítomos compartilhados entre *M. leprae* e *M. tuberculosis*.

Com o sequenciamento do genoma de *M. leprae* como também de outras espécies de micobactérias, estudos recentes, como citados abaixo, utilizaram essa informação juntamente com a bioinformática para a identificação de antígenos *in silico*. Uma vez identificados esses antígenos foram avaliados por ensaios imunológicos.

Geluk *et al.* (2005) identificaram vários antígenos candidatos em *M. leprae* que não possuíam homologia em *M. tuberculosis* e em outras micobactérias por análise de genômica comparativa. Proteínas potenciais foram produzidas pela tecnologia de DNA recombinante e avaliadas quanto sua habilidade de reconhecer célula T em pacientes e controles através da determinação da produção de INF- $\gamma$ . A maioria dos pacientes multibacilares não respondeu aos antígenos testados. Pacientes paucibacilares, multibacilares reacionais e contatos foram altamente responsivos a várias proteínas. As proteínas também foram reconhecidas por controles endêmicos e pacientes com tuberculose que responderam ao extrato bruto de *M. leprae*. Em seguida, o grupo avaliou peptídeos sintéticos compreendendo sequências de cinco proteínas de *M. leprae*, que foram previamente identificadas, quanto à capacidade de reconhecimento por células T de pacientes e controles. Quando a resposta cumulativa para quatro peptídeos foi analisada, observou-se um aumento da sensibilidade do teste no grupo paucibacilar e no grupo contato. Peptídeos também foram reconhecidos por controles saudáveis endêmicos expostos ao *M. leprae* (GELUK *et al.* 2008). Em outro estudo, potenciais peptídeos e proteínas selecionados dos trabalhos anteriores foram avaliados quanto à resposta de células T em pacientes e controles de diferentes regiões. Os resultados mostraram que proteínas recombinantes e a maioria dos peptídeos foram reconhecidos por pacientes infectados com *M. leprae* e contatos, porém a resposta não foi específica a esses grupos. Três peptídeos se mostraram específicos nas populações estudadas ao induzirem resposta de célula T em pacientes hansenianos e contatos. Além disso, foi observada variabilidade na reatividade aos peptídeos nos diferentes locais (GELUK *et al.*, 2009).

Spencer *et al.* (2005) identificaram genes específicos em *M. leprae* por análise de genômica comparativa e testaram os mesmos na forma de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos quanto à capacidade de estimular células T em pacientes e controles. Alguns peptídeos foram especificamente reconhecidos por pacientes paucibacilares e contatos.

Aráoz *et al.* (2006a) usaram a genômica comparativa para a identificação de antígenos potenciais em *M. leprae*. Doze desses antígenos foram selecionados e na forma de proteínas recombinantes foram avaliados quanto à capacidade de reconhecimento frente a soro de pacientes e controles e de estimular células T. Entre as proteínas investigadas, algumas foram capazes de induzir resposta celular e apresentar reatividade com anticorpos de pacientes hansenianos. Posteriormente, o mesmo grupo expandiu o estudo ao testar as mesmas proteínas como também cinco outras proteínas, anteriormente identificadas, quanto a respostas de célula T e B em pacientes e controles de duas distintas regiões. Nenhum dos antígenos induziu a mesma resposta nas populações estudadas, o que provavelmente reflete a heterogênea resposta imune relacionada as características genéticas de cada indivíduo. O peptídeo derivado de uma das proteínas não induziu resposta imune celular em animais sensibilizados com micobactérias ambientais, mostrando a especificidade da resposta imune ao peptídeo (ARÁOZ *et al.*, 2006b).

Reece *et al.* (2006) empregaram o método de *serological expression cloning* com um *pool* de soros de pacientes lepromatosos para a identificação de proteínas. Duas proteínas recombinantes (ML 0405 e ML 2331) apresentaram maior reatividade sorológica com pacientes hansenianos multibacilares quando comparado com os controles. Posteriormente, o grupo avaliou proteínas recombinantes que foram previamente identificadas e uma proteína de fusão quanto à capacidade de detectar infecção por teste sorológico em pacientes de duas outras regiões. Foram observadas diferenças nas respostas frente aos antígenos em pacientes das diferentes regiões. A proteína de fusão permitiu o diagnóstico antes do aparecimento de sinais clínicos (DUTHIE *et al.*, 2007).

Groathouse *et al.* (2006) avaliaram padrões de resposta imune humoral em pacientes com microarranjo de proteínas para definir perfis de proteínas que refletem as formas da doença. Os *arrays* foram construídos com proteínas isoladas de parede celular, de membrana e proteínas recombinantes que são únicas ou possuem seletividade ao *M. leprae* conforme análises de bioinformática comparativa.

A triagem de soros de pacientes em microarranjo permitiu a identificação de padrões específicos de reatividade sorológica que se correlacionam com as formas paucibacilar e multibacilar da doença.

Duthie *et al.* (2010) analisaram peptídeos sintéticos, derivados de proteínas de *M. leprae*, previamente identificadas, quanto à presença de sítios de ligação a anticorpos por ELISA. Uma proteína de fusão recombinante contendo os sítios ligantes de anticorpos foi construída. Anticorpos de soros de pacientes multibacilares reconheceram o novo antígeno, demonstrando sua utilidade em diagnóstico.

Em termos gerais, nenhum dos antígenos já identificado possui sensibilidade ou especificidade para detectar infecção por *M. leprae*. Os trabalhos descritos elegem dentro da população de estudo, que pode ser compreendida de poucos indivíduos, por exemplo, dez por grupo, antígenos com potencial utilidade em diagnóstico (SPENCER *et al.*, 2005). Além disso, muitos antígenos são sugeridos em diagnóstico com base em comparações com controles não endêmicos (REECE *et al.*, 2006), ou seja, contrário ao propósito, uma vez que, esses antígenos são destinados, principalmente, a áreas endêmicas para a doença. Portanto, há uma necessidade de avaliar os antígenos sugeridos em populações de estudo maiores para verificar se suas potencialidades iniciais em diagnóstico são mantidas (STEFANI, 2008). Além disso, são válidas iniciativas de descoberta de novos antígenos, principalmente de detecção precoce da doença, de forma a contribuir com o controle da hanseníase. Para abranger os pacientes de todo o espectro da doença são requeridos reagentes para uso em testes sorológicos como também reagentes para testes baseados em células T, uma vez que, aqueles apresentam como alvo os pacientes multibacilares e esses, os pacientes paucibacilares (ASEFFA *et al.*, 2005). Sem contar que a busca de novos antígenos candidados pode auxiliar no entendimento da imunopatogênese da doença.

## 2.10 TRATAMENTO

A OMS em 1981 introduziu o tratamento poliquimioterápico que consiste na utilização de medicamentos associados (WHO, 1998). De acordo com as recomendações da OMS, pacientes paucibacilares são tratados, por um período de

seis meses, com rifampicina 600 mg em dose mensal supervisionada e dapsona 100 mg/dia. Os pacientes multibacilares são tratados com dapsona 100 mg/dia, clofazimina 50 mg/dia e rifampicina 600 mg e clofazimina 300 mg em dose mensal supervisionada, durante 12 meses. Já os pacientes paucibacilares de lesão única recebem rifampicina 600 mg, ofloxacina 400 mg e minociclina 100 mg em dose única (WHO, 1998; WALKER; LOCKWOOD, 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma abaixo resume as principais etapas realizadas no estudo (FIGURA 3).

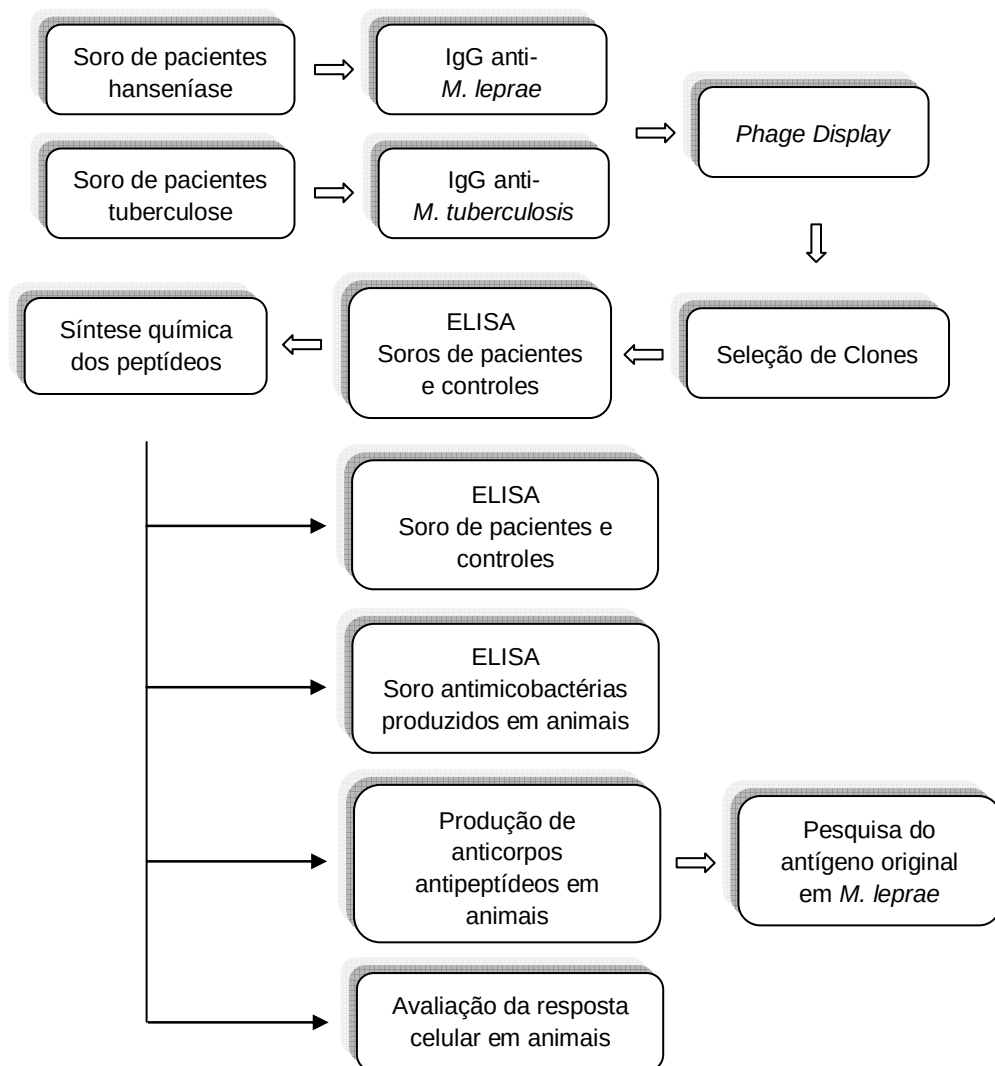


FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS REALIZADAS NO ESTUDO

### 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná (registro CEP/SD: 428.108.07.10) como também pelo Comitê de Ética em Pesquisa Conselhos Humanos da Secretária de Estado de Saúde do Paraná (processo nº 002/2008).

### 3.2 MICOBACTÉRIAS

As cepas referência de micobactérias cultiváveis usadas no estudo (TABELA 4) são parte de uma coleção mantida no Laboratório da Seção de Insumos do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI). Células totais de *M. leprae*, obtidas de fígado de tatu, foram fornecidas por Dr. J. S. Spencer da Universidade do Colorado, Fort Collins, EUA, através do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas/Instituto Nacional de Saúde sob contrato N01-AI-25469.

TABELA 4 – CEPAS REFERÊNCIA DE MICOBACTÉRIAS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTÍGENO-ESPECÍFICOS EM PACIENTES

| ESPÉCIE                                     | CÓDIGO     |
|---------------------------------------------|------------|
| <i>M. kansasii</i>                          | ATCC 12478 |
| <i>M. scrofulaceum</i>                      | ATCC 19981 |
| <i>M. avium</i>                             | ATCC 25291 |
| <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> | ATCC 6841  |
| <i>M. szulgai</i>                           | ATCC 35799 |
| <i>M. gordonae</i>                          | ATCC 14470 |
| <i>M. terrae</i>                            | ATCC 15755 |
| <i>M. phlei</i>                             | ATCC 11758 |
| <i>M. smegmatis</i>                         | ATCC 607   |
| <i>M. bovis</i>                             | BCG-MORAEU |
| <i>M. tuberculosis</i> H37Rv                | ATCC 27294 |

### 3.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTIMICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS

#### 3.3.1 Cultivo de microrganismos e preparação de antígenos micobacterianos

As cepas micobacterianas foram cultivadas em caldo Middlebrook 7H9 ou ágar Middlebrook 7H10. Para cultivo em meio líquido, uma alçada da cultura em ágar Middlebrook 7H10 foi usada para inocular 20 mL de caldo Middlebrook 7H9. O período de incubação foi de 3-5 dias, para micobactérias de crescimento rápido e de 14-21 dias, para micobactérias de crescimento lento, a 37°C. Em seguida, 10 mL da cultura foram inoculados em 100 mL de caldo que permaneceu 37°C por períodos de tempo conforme acima. Para cultivo em meio sólido, alçadas da cultura em ágar Middlebrook 7H10 foram estriadas sobre a superfície de 40 mL de ágar inclinado em garrafas de leite (*milk dilution bottles*).

Após o cultivo, as células micobacterianas cultivadas em ágar Middlebrook 7H10, primeiramente, foram removidas por raspagem da superfície do meio em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%. Uma vez as culturas em meio líquido, as células foram coletadas por centrifugação a 2500 g por 25 minutos. O pélete foi lavado três vezes com NaCl 0,9% e ressuspendido em 10 mL de NaCl 0,9%. A suspensão foi inativada a 100°C por 15 minutos. A suspensão celular, contendo 100 µg/mL fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) e 2 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), foi submetida a sonicação (Sonopuls HD 2200, Bandelin, Berlim, Alemanha) por quatro ciclos de 15 minutos em banho de gelo (PESSOLANI; BRENNAN, 1992). A concentração de proteínas do extrato solúvel, obtido por centrifugação a 10000 g por 20 minutos a 4°C, foi determinada por fluorescência usando o *kit* Quant-iT™ Protein Assay (Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA).

### 3.3.2 Imunização

Anticorpos policlonais contra as micobactérias cultiváveis *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. avium*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. terrae*, *M. bovis BCG* e *M. scrofulaceum* foram produzidos em coelhos para estudar reações cruzadas. Para tanto, foram usados coelhos fêmeas de 2,5 a 3,0 Kg da raça Nova Zelândia albinos, sendo dois coelhos para cada espécie de micobactéria. Cada animal recebeu quatro imunizações de 250 µg de proteína. Coelhos imunizados com antígeno de *M. terrae* e *M. avium* receberam 100 µg de proteína em cada imunização, devido ao menor rendimento do antígeno. Cada imunização foi constituída de volumes iguais de antígeno e adjuvante de Freund incompleto. Os animais foram inoculados na região dorsal, por via subcutânea e em quatro pontos distintos. As imunizações foram realizadas a cada 14 dias. Como controle, dois animais receberam adjuvante incompleto de Freund em NaCl 0,9%. Soro pré-imune foi coletado antes da imunização e o soro imune foi coletado uma semana após a última dose de antígeno. O sangue após a coleta foi mantido em banho-maria a 37°C por uma hora e em seguida centrifugado a 2000 g por 10 minutos para obtenção do soro e armazenado a -20°C até seu uso.

### 3.3.3 Pesquisa de anticorpos em soro de coelhos imunizados com micobactérias

O teste ELISA foi utilizado para avaliação da produção de anticorpos dirigidos contra antígenos micobacterianos em soros de animais imunizados. Seguindo-se a titulação, as reações cruzadas foram avaliadas usando os antígenos e soros heterólogos. Para tanto, placas para ELISA (Falcon 353912, BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno a 10 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M pH 9.6 *overnight* a 4°C. Após lavagem (NaCl 0,9%-Tween 20 0,05%) as placas foram bloqueadas (caseína 2% em PBS pH 7.4) por uma hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes e incubadas por uma hora a 37°C com soros dos animais imunizados diluídos 1:4000

em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7.4-Tween 20 0,05%). As placas foram lavadas quatro vezes e incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (A4914, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluído 1:4000 em tampão de incubação por uma hora a 37°C. Seguindo-se quatro lavagens a reação foi revelada adicionando solução substrato 0,2 mg/mL de OPD (dicloridrato de o-fenilenodiamina) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) em tampão citrato pH 5.0 contendo 0,2 µL/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%. A incubação ocorreu em ambiente escuro por 15 minutos e após esse período a reação foi interrompida por adição de 10 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:20. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm. Todos os soros foram testados em duplicata e os resultados foram expressos como média da absorbância das duplicatas.

#### 3.3.3.1 Análise de dados

Buscou-se demonstrar o interrelacionamento entre as diferentes espécies de micobactérias através da análise multivariada. A análise foi realizada a partir de uma matriz constituída de dez variáveis, que representam as micobactérias e dez repostas que foram originadas da interação antígeno-anticorpo. Dentre os métodos da análise multivariada, utilizou-se a análise fatorial que tem por objetivo é descrever a estrutura de covariância dos relacionamentos entre as variáveis em teste em termos de novas variáveis reduzidas ou fatores.

### 3.4 PACIENTES HANSENIANOS E GRUPOS CONTROLES

#### 3.4.1 Amostras de soros positivos e negativos

Foram recrutados pacientes com hanseníase, de diferentes formas da doença, não tratados e em tratamento, sem histórico de tuberculose ou contato com pacientes tuberculosos. Os voluntários da pesquisa foram atendidos no Hospital de

Dermatologia Sanitária do Paraná (Piraquara-PR), no Centro Regional de Especialidades-Barão (Curitiba-PR), na Fundação Pró-Hansen (Curitiba-PR) e na Sociedade Filantrópica Humanitas (São Jerônimo da Serra-PR). Os pacientes tiveram o diagnóstico confirmado por médico especialista obedecendo aos critérios da OMS. Os dados clínicos dos pacientes como idade, tempo de tratamento e forma clínica segundo a classificação de Madri e OMS foram obtidos de prontuários médicos.

Foram coletadas amostras de sangue de pacientes com tuberculose pulmonar, não tratados e em tratamento, sem histórico de hanseníase ou contato com pacientes hansenianos. Os recrutados foram atendidos no Centro Regional de Especialidades-Barão (Curitiba-PR) e Hospital Regional da Lapa São Sebastião (Lapa-PR). Todos os pacientes tiveram o diagnóstico confirmado por profissionais especializados nas unidades de saúde.

Foram também coletadas amostras de sangue de contatos de pacientes hansenianos e amostras de sangue de indivíduos saudáveis. Os indivíduos saudáveis incluídos foram aqueles que não apresentaram histórico de hanseníase ou tuberculose e contato com pacientes infectados com essas doenças. Os contatos de pacientes hansenianos incluíram aqueles que residem no mesmo domicílio do paciente por um período mínimo de três meses (CALADO *et al.*, 2005).

A história de doença ou contato prévio com doentes nos indivíduos recrutados foi baseada no autorelato.

Todos os indivíduos autorizaram a coleta de sangue por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubo sem anticoagulante e o soro foi obtido por centrifugação a 2000 g por 15 minutos e armazenado em alíquotas a -20°C até seu uso.

#### 3.4.2 Pesquisa de anticorpos anti-PGL-I

Para a detecção de anticorpos IgM ao PGL-I de *M. leprae* foi empregado o kit ELISA desenvolvido pelo *Royal Tropical Institute Amsterdam* na Holanda e a técnica foi realizada no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - UFG sob supervisão da Dr<sup>a</sup>. Samira Bühner-Sékula.

O teste foi realizado como descrito previamente (BRETT, 1986) usando NT-P-BSA como análogo semi-sintético de PGL-I. Placas previamente sensibilizadas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0.1% Tween-20 (PBST) e em seguida bloqueadas por uma hora com BSA 1% em PBS. Após esse período, soro diluído 1:300 em tampão Tris 0,1 M (p.H 6.8) contendo Kathon CG 0,1%, sulfato de gentamicina 0,02% e ácido carmínico 0,01% foi adicionado a placa. As placas foram incubadas a 37°C por uma hora seguido por outro passo de lavagem. O conjugado anti-IgM humana ligado à peroxidase (Capple/Organon Teknika, Turnhout, Bélgica) foi adicionado em uma diluição 1:2000 em tampão Tris 10 mM (pH 6.8) contendo Kathon GC 0,1%, sulfato de gentamicina 0,02% e ácido carmínico 0,01%. Após incubação a 37°C por uma hora, o procedimento de lavagem foi repetido e a solução substrato 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) foi adicionada. A reação foi interrompida com 50 µL 2,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> quando a absorbância em 450 nm do soro controle referência atingiu um valor de 0.6. Todos os soros foram testados em duplicata e os resultados foram expressos como média da absorbância das duplicatas. Soros com absorbância maior que 0,150 foram considerados positivos (SILVA *et al.*, 2008)

### 3.5 PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-*M. leprae* e ANTI-*M. tuberculosis* DE AMOSTRAS DE SOROS DE PACIENTES

#### 3.5.1 Purificação de imunoglobulinas de soro por precipitação com sulfato de amônio

As imunoglobulinas de soro de pacientes hansenianos e tuberculosos foram purificadas por precipitação com solução saturada de sulfato de amônio. Um *pool* de 0,5 ou 1,0 mL de soro de cada paciente hanseniano multibacilar ou 0,4 mL de soro de cada paciente tuberculoso foi preparado. Em seguida, o *pool* de soro foi centrifugado a 3000 g por 30 minutos a 4°C. Ao sobrenadante adicionou-se, sob agitação em banho de gelo, gota a gota, igual quantidade do soro de solução saturada de sulfato de amônio. Após três horas de agitação, a suspensão foi

deixada em repouso a 4°C *overnight*. O precipitado foi recuperado por centrifugação a 3000 g por 30 minutos a 4°C e o pélete foi ressuspendido em PBS pH 7.4. A remoção de sulfato de amônio e concentração foi realizada usando o dispositivo Amicon® Ultra-15 10 KDa (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) conforme instruções do fabricante. A solução de anticorpos foi armazenada a -20°C até seu uso.

### 3.5.2 Purificação de imunoglobulinas anti-*M. leprae* e anti-*M. tuberculosis* por imunoafinidade

A purificação de IgGs ocorreu em dois passos, inicialmente as IgGs foram purificadas por cromatografia de afinidade em proteína G-agarose seguido da purificação das imunoglobulinas a partir de antígenos transferidos a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF).

Para a purificação das IgGs por cromatografia de afinidade, uma fração das imunoglobulinas purificadas por precipitação em sulfato de amônio foi aplicada a coluna de proteína G-agarose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). A suspensão ficou sob agitação por uma hora, a temperatura ambiente, seguido de incubação, sob agitação, *overnight* a 4°C. Após incubação o efluente foi removido e a coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.0 até não se detectar proteínas por teste com Bradford. Os anticorpos retidos foram eluídos com glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2.8 sendo as frações neutralizadas com Tris-HCl 1M pH 9.0. A coluna foi reequilibrada com tampão fosfato de sódio e utilizada para subseqüentes purificações. As frações contendo anticorpos, identificadas por teste com Bradford, foram reunidas, dialisadas e concentradas usando Amicon® Ultra-15 10 KDa. A concentração de IgG (mg/mL) foi obtida dividindo a absorbância em 280 nm por 1.4 (STOSCHECK, 1990). A pureza dos anticorpos foi avaliada por SDS-PAGE sob condições redutoras (LAEMMLI, 1970).

As IgGs obtidas por cromatografia de afinidade foram purificadas frente a antígenos micobacterianos através da eluição dos anticorpos da membrana de PVDF após *Western Blotting*. Nesse método, dois miligramas de antígeno solúvel de *M. leprae* ou *M. tuberculosis* foram primeiro separados em gel gradiente de

poliacrilamida 10-20% sob condições redutoras a 30 mA (ROSENKRANDS *et al.*, 2000; ARAÓZ *et al.*, 2006a). Após eletroforese as proteínas foram transferidas a uma membrana de PVDF (Immobilon-P<sup>SQ</sup>, Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) em tampão composto de 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol por 16 horas a 24 V seguido de uma hora a 48 V. Após transferência, a membrana foi bloqueada com 0,3% de Tween 20 em PBS por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS Tween 20-0,05% (PBST-0,05%) por três vezes de cinco minutos e incubada com 3 mg de IgG diluídas em PBST-0,05% por duas horas a temperatura ambiente sob agitação. Após incubação, a membrana foi lavada com PBST-0,05% por cinco vezes de cinco minutos. Os anticorpos ligados foram eluídos por adição de 3 mL de glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 2.8 (solução de eluição) sob agitação por 30 minutos. A solução com anticorpos eluídos foi recuperada e imediatamente neutralizada com 1 M Tris-HCl, pH 9.0. A membrana foi lavada com PBS por quatro vezes de cinco minutos sob agitação e os anticorpos eluídos foram dialisados e concentrados com Amicon® Ultra-15 10 KDa. As imunoglobulinas G foram dosadas pelo método de Bradford e avaliadas quanto sua reatividade por ELISA, conforme descrito em 3.3.3 e empregando anticorpo anti-IgG humana Fc-específica conjugado à peroxidase (A0170, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluído 1:10000 para detecção da reação.

### 3.6 PHAGE DISPLAY

#### 3.6.1 Bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos

Quatro bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos foram utilizadas para identificação de mimotopos de antígenos micobacterianos. As bibliotecas foram descritas por Bonnycastle *et al.* (1996) e foram obtidas de J. Sott (Simon Fraser University, Burnaby BC, Canada). Duas das bibliotecas apresentaram sequências peptídicas lineares (X15 e X8CX8) enquanto outras duas apresentaram sequências peptídicas flanqueadas por resíduos de cisteína (XCX4CX e XCX8CX). Os

peptídeos são expressos fusionados a porção N-terminal da proteína pVIII do fago f88.4.

### 3.6.2 Biosseleção de bibliotecas apresentadas em fagos

Duas estratégias de biosseleção foram empregadas. Na estratégia I, os fagos das quatro bibliotecas não ligados as imunoglobulinas anti-*M. tuberculosis* imobilizadas em imunotubo foram utilizados no primeiro ciclo de seleção com imunoglobulinas anti-*M. leprae*. Na estratégia II, os fagos provenientes das quatro bibliotecas foram diretamente utilizados no primeiro ciclo de seleção com imunoglobulinas anti-*M. leprae*.

A biosseleção foi realizada conforme descrito por Villard *et al.* (2003). Um imunotubo (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foi revestido com imunoglobulinas anti-*M. leprae* em 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.6 a 5µg/1,5 mL no primeiro ciclo, 1µg/1,5 mL no segundo ciclo e 0,5µg/1,5 mL para o terceiro e quarto ciclos, *overnight* a 4°C. Os anticorpos não ligados foram removidos por cinco lavagens com TBST-0,05% (TBS Tween 20-0,05%). Os sítios remanescentes de ligação foram bloqueados com TBST-0,05%, 3% BSA por duas horas a 37°C e após incubação, o imunotubo foi lavado cinco vezes com TBST-0,05% e incubado com os fagos *overnight* a 4°C. Para o primeiro ciclo de seleção, fagos de cada uma das bibliotecas, em título correspondente a 100 vezes a complexidade da biblioteca em TBST-0,05% foram incubados com os anticorpos imobilizados. Nos demais ciclos  $2 \times 10^{11}$  fagos foram utilizados. Fagos não ligados foram removidos por dez lavagens com TBST-0,5% seguido por cinco lavagens com TBST-0,05%. Os fagos ligados foram eluídos por adição de 1,5 mL de glicina 0,1M, pH 2.2, BSA 1 mg/mL e incubando o imunotubo a temperatura ambiente por 30 minutos. Os fagos eluídos foram neutralizados com Tris-HCl 2M, pH 9.0 e uma alíquota de 20 µL foi armazenada a 4°C para titulação parcial.

Os fagos eluídos foram amplificados em *E. coli* K91. As células usadas para infecção foram obtidas por inocular 110 mL de meio Luria-Bertani (LB) com 7 mL de um pré-inóculo que foi preparado *overnight* a 37°C e sob agitação a 225 rpm a partir

de uma colônia de *E. coli* K91 em 10 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37°C a 225 rpm até absorvância de 1.8 em 550 nm. A rotação foi diminuída para 50 rpm e as células foram mantidas nessa rotação a 37°C por 30 minutos para formação do *pilus*. Em 10 mL da cultura de *E. coli* foram adicionados os fagos eluídos e após 10 minutos a 37°C sem agitação, a resistência a tetraciclina nas células infectadas foi induzida por adição de 100 mL de meio LB pré-aquecido a 37°C contendo 0,2 µg/mL de tetraciclina. Após 30 minutos a 37°C sob agitação de 225 rpm, tetraciclina foi adicionada para atingir uma concentração final de 20 µg/mL e a cultura foi incubada *overnight* a 37°C a 225 rpm.

Após propagação, a cultura foi centrifugada a 5000 g por 20 minutos a 4°C. Ao sobrenadante contendo os fagos adicionou-se 15% de PEG 8000 20%, NaCl 2,5 M, a mistura foi homogeneizada por inversão (100 vezes) e incubada *overnight* a 4°C em gelo para a precipitação dos fagos. A solução foi centrifugada a 10000 g a 4°C por 40 minutos, o precipitado obtido foi ressuspendido com 1,5 mL de TBS e dissolvido por incubação a 37°C por 30 minutos a 150 rpm. A solução de fagos foi centrifugada duas vezes a 12000 g a 4°C por 15 minutos para remoção dos restos celulares. Os fagos amplificados foram usados no próximo ciclo de seleção ou armazenados a -20°C (FIGURA 4).

Para titulação dos fagos, diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  em meio LB foram preparadas para fagos eluídos não amplificados e diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  e  $10^{-12}$  foram preparadas para fagos amplificados. Duzentos microlitros de uma cultura de *E. coli* K91, após atingir a absorvância de 1.8 em 550 nm e expressando o *pilus*, foram distribuídos em microtubos, um para cada diluição. Dez microlitros de cada diluição de fagos foram adicionados a cada microtubo. Os microtubos foram incubados por 15 minutos a 37°C sem agitação seguido de incubação a 250 rpm a 37°C por 15 minutos. As células foram plaqueadas em ágar LB contendo 20 µg/ml de tetraciclina e as placas foram incubadas a 37°C *overnight*. O título foi determinado multiplicando o número de colônias pelo fator de diluição da placa e por 100 para obter o número de fagos por mL.

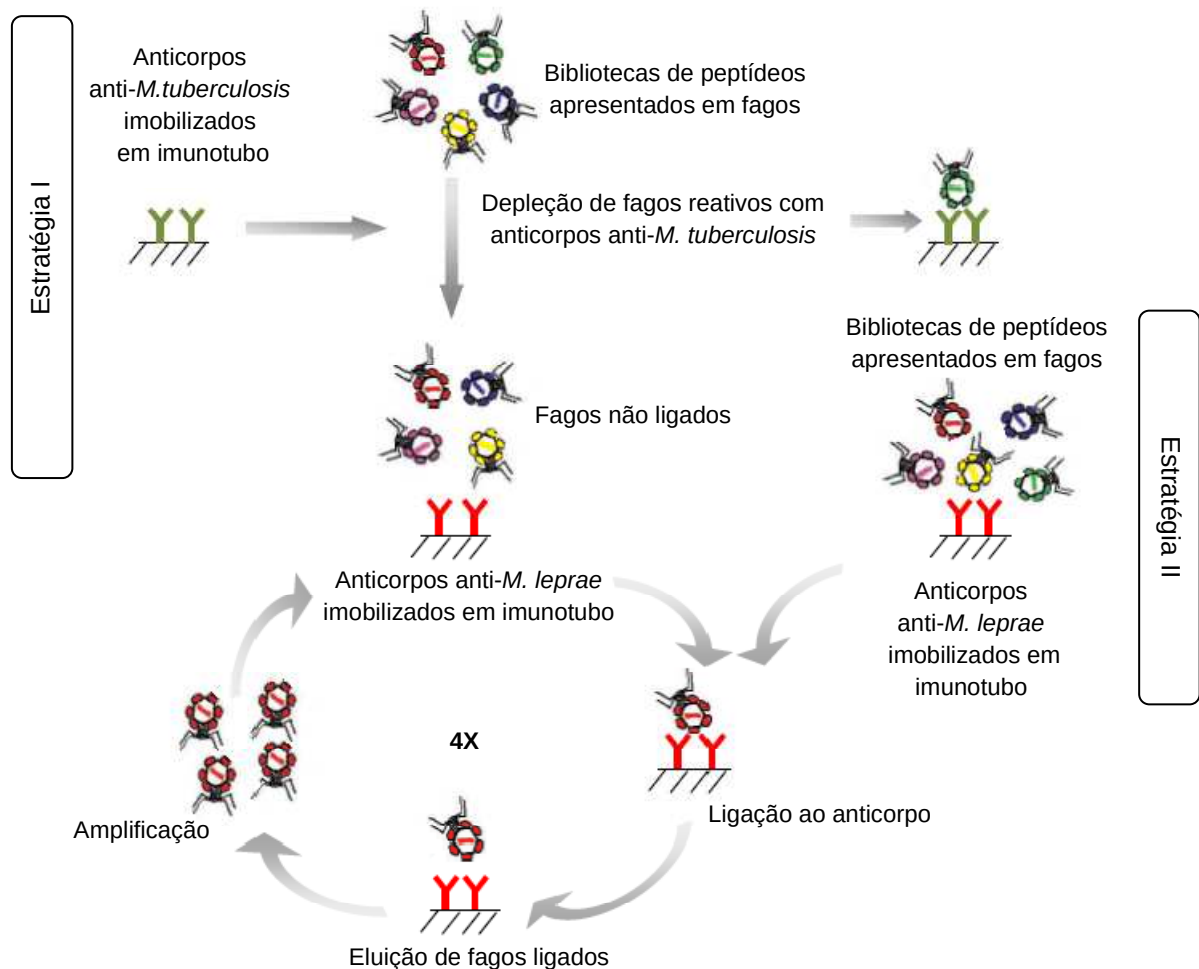


FIGURA 4 – ESTRATÉGIAS DE SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS USANDO BIBLIOTECAS DE PEPTÍDEOS APRESENTADOS EM FAGOS A PARTIR DE IMUNOGLOBULINAS ANTÍGENO-ESPECÍFICAS. Estratégia I, o *pool* de fagos incubado com anticorpos anti-*M. leprae* foi depletado de fagos reativos com anticorpos anti-*M. tuberculosis*. Estratégia II, o *pool* de fagos das quatro bibliotecas de fagos foi adicionado ao iminotubo sensibilizado com anticorpos anti-*M. leprae*. Após incubação dos fagos com anticorpos anti-*M. leprae*, as etapas seguintes de seleção foram as mesmas para ambas as estratégias.

### 3.6.3 ELISA de avaliação da reatividade dos fagos nos ciclos de biosseleção

Para avaliar a capacidade de ligação dos fagos amplificados obtidos em cada ciclo de seleção frente a anticorpos de pacientes hansenianos multibacilares realizou-se um teste ELISA. Uma placa (Falcon 353912, BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA) foi sensibilizada com 50  $\mu$ L de anticorpo antibacteriófago fd (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluído 1:800 em tampão  $\text{NaHCO}_3$  100 mM, pH

8.6, *overnight* a 4°C. A placa foi lavada três vezes com PBS Tween 20-0,05% (PBST-0,05%) e em seguida bloqueada com leite em pó desnatado a 2% em PBST-0,05% durante uma hora a 37°C. A placa foi lavada e incubada durante duas horas a 37°C com  $2 \times 10^{10}$  fagos/mL em solução de bloqueio. Em seguida, a placa foi lavada e incubada com 100 µg/mL imunoglobulinas G total de pacientes hansenianos por uma hora a 37°C. Após lavagem, adicionou-se anticorpo anti-IgG humana Fc-específica conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluído 1:10000 em solução de bloqueio durante uma hora a 37°C. As placas foram novamente lavadas e a reação foi revelada adicionando solução substrato (0,2 mg/mL de OPD em tampão citrato pH 5.0 contendo 0,2 µL/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%). Após incubação de 15 minutos a reação foi interrompida por adição de 10 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:20. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm. Os resultados foram expressos como média da absorbância de duplicatas.

#### 3.6.4 Seleção de clones de fagos

Para a identificação de clones de fagos com capacidade de ligação a anticorpos de pacientes multibacilares, uma titulação foi realizada usando os fagos eluídos do quarto ciclo de seleção. Cada colônia foi transferida para uma cavidade de uma placa de cultura de 96 cavidades e fundo em U contendo 200 µL de meio LB com 20 µg/mL de tetraciclina. Após cultivo *overnight* a 225 rpm a 37°C, a placa foi centrifugada a 1600 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante (50µl) da cultura de cada um dos clones foi adicionado a uma diferente cavidade de uma placa de ELISA previamente sensibilizada com anticorpo antibacteriófago e bloqueada conforme descrito acima. Como controle negativo foi empregado o sobrenadante da cavidade com *E. coli* K91. As demais etapas do teste ELISA seguiram aquelas do item 3.6.3.

Os clones mais reativos foram selecionados para sequenciamento do DNA e posterior identificação da sequência de aminoácidos inserida nos fagos.

### 3.6.5 Sequenciamento do DNA

O DNA de cada clone de fago foi extraído usando o *kit* QIAprep Spin M13 (Qiagen, Hilden, Alemanha) e seguindo as instruções do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas com o *kit* BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante e usando o *primer reverse* 5'-TCG GCA AGC TCT TTT AGG-3'. A purificação da reação de sequenciamento foi realizada por precipitação com isopropanol. Em cada tubo contendo 10 µL de reação de sequenciamento, acidionou-se 40 µL de isopropanol 75%. Após homogeneização, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 20 minutos e, em seguida, centrifugados a 15000 g por 25 minutos em temperatura ambiente. Após remoção do isopropanol, adicionou-se 200 µL de etanol 70%, centrifugou-se os tubos a 15000 g por cinco minutos a temperatura ambiente e seguindo a remoção do etanol, o pélete foi seco a temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em formamida Hi-Di e aplicadas no sequenciador ABI PRISM 377 DNA (Applied Biosystems Carlsbad, Califórnia, EUA).

Cada sequência foi avaliada quanto à presença das regiões “CC TTC TGC AGC”, situada anteriormente ao início do inserto no DNA viral, e “GGC AAA”, que antecede o término do inserto. Para a obtenção da sequência de aminoácidos do inserto a partir da sequência de nucleotídeos utilizou-se o programa Proteomics disponível em ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/>), usando a ferramenta tradução e selecionando a primeira janela de leitura no sentido 3' 5'.

### 3.6.6 Avaliação da reatividade dos clones de fagos com soros de pacientes e controles

Os clones de fagos mais reativos foram amplificados e avaliados quanto sua reatividade frente aos soros dos grupos de pacientes e controles por ELISA conforme item 3.6.3. Placas para ELISA foram sensibilizadas com antifago e

incubadas com  $2 \times 10^{10}$  fagos/mL seguido da adição de soros de pacientes hansenianos, pacientes tuberculosos, contatos de pacientes hansenianos e indivíduos sadios diluídos 1:100. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG Fc-específica conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno. Os clones de fagos mais reativos foram selecionados para estudos posteriores.

### 3.7 PEPTÍDEOS

#### 3.7.1 Síntese de peptídeos solúveis

Uma vez selecionados os peptídeos pela técnica de *Phage Display*, os mesmos foram sintetizados por PepTron (Daejon, Korea) usando a estratégia química 9-fluorenilmetoxycarbonila (Fmoc) de fase sólida. Peptídeos foram sintetizados como peptídeos não modificados, como também com adição da sequência KKG a porção N-terminal a fim de conferir hidrofiliabilidade. Os peptídeos foram fornecidos liofilizados e com 70% de pureza.

#### 3.7.2 Avaliação da reatividade dos peptídeos por ELISA

A avaliação da reatividade dos peptídeos, combinados em *pool*, frente aos soros de pacientes hansenianos e controles foi realizada através do teste ELISA. Placas para ELISA (Corning 2592, Lowell, Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas com 100  $\mu$ L de um *pool* de peptídeo (modificados pela inserção KKG) a 1,5  $\mu$ g/mL em tampão carbonato 0,05 M pH 9.6 *overnight* a 4°C. Após duas lavagem (NaCl 0,9%-Tween 20 0,05%) as placas foram bloqueadas (tampão bloqueio livre de proteínas em PBS pH 7.4 com 0,05% Tween 20, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, EUA) por uma hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes e incubadas durante uma hora a 37°C com soros diluídos 1:50 em PBS pH 7.4 com 0,1% (p/v) de BSA. As placas foram lavadas quatro vezes e incubadas com

anticorpo anti-IgG humana Fc-específica conjugado à biotina (B3773, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluído 1:2500 em PBS com 0,1% de BSA (albumina sérica bovina) durante uma hora a 37°C. As placas foram lavadas quatro vezes e incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase (S5512, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluída 1:2500 em PBS com 0,1% de BSA por uma hora a 37°C. Após quatro lavagens, a solução com substrato cromogênico OPD foi adicionada e a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida por adição de 20 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:20 e a densidade óptica foi determinada a 492 nm. Todos os soros foram testados em duplicata e os resultados foram expressos como média da absorbância das duplicatas.

Também foi avaliada a reatividade dos soros antimicobactérias cultiváveis produzidos em coelhos com os peptídeos. Na análise, a solução de bloqueio foi caseína 2% em PBS pH 7.4, os anticorpos foram diluídos em tampão de incubação e a ligação de anticorpos aos peptídeos foi detectada por anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase na diluição 1:4000 e OPD como cromógeno.

### 3.7.3 Identificação de resíduos ligantes de anticorpos em peptídeos

#### 3.7.3.1 Síntese de peptídeos em membrana de celulose

Os peptídeos e seus análogos de alanina foram preparados por *Spot Synthesis*. A síntese de peptídeos foi realizada em membranas de celulose contendo grupos amino livres e espaçadores de polietilenoglicol (membranas amino-PEG, Intavis Bioanalytical Instruments AG, Nattermannallee, Köln, Alemanha) usando um sintetizador de peptídeos automático MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments AG). A síntese foi conduzida segundo o protocolo recomendado pelo fabricante e empregando aminoácidos Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonila). Resumidamente, aminoácidos Fmoc foram ativados para acoplamento com DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida) e HOBt (1-hidroxibenzotriazol). Após o acoplamento, os grupos amino livres foram bloqueados por acetilação. O grupo Fmoc foi removido por tratamento com piperidina 20% em DMF (N,N-dimetilformamida) para preparar a

membrana para o próximo ciclo de acoplamento. Um passo final de acetilação foi realizado após o último ciclo da síntese. A remoção dos grupos de proteção de cadeia lateral foi realizada por tratamento da membrana com uma solução composta de 92% ácido trifluoroacético, 4% de triisopropilsilano e 4% de água por três horas, seguido de lavagens com diclorometano (DCM), DMF e etanol. Após secagem, a membrana foi armazenada a -20°C.

### 3.7.3.2 Imunoensaio com peptídeos em membrana

A membrana, após três lavagens com metanol e três lavagens com PBS, foi incubada *overnight* com solução de bloqueio (PBS Tween 20-0,05%, BSA 3%). A membrana foi lavada por três vezes de 10 minutos com PBS Tween 20-0,05% (PBST) e incubada com um *pool* de soros de pacientes hansenianos multibacilares diluído 1:250 em PBST por uma hora a temperatura ambiente. Após lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG humana Fc-específica diluído 1:120000 em PBS-T por uma hora. A membrana foi lavada e a detecção da reação foi realizada usando o substrato quimiluminescente ECL Plus™ (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) e Hyperfilm™ ECL™ (GE Healthcare). A intensidade dos *spots* foi obtida com o software ImageJ (v. 1.43, National Institutes of Health, EUA). Para reutilização da membrana, a mesma foi lavada por três vezes de 10 minutos com o reagente de regeneração A (uréia 8M, SDS 1%, β-mercaptoetanol 0,1%), seguido de três lavagens de 10 minutos com o reagente de regeneração B (etanol 50%, água ultrapura 40%, ácido acético 10%). Após três lavagens de 10 minutos com metanol a membrana foi seca e armazenada a -20°C.

### 3.8 PESQUISA DO ANTÍGENO ORIGINAL EM *M. leprae*

#### 3.8.1 Conjugação de peptídeos a proteína carreadora

Os peptídeos acrescidos da sequência KKG foram conjugados a proteína carreadora BSA via glutaraldeído, conforme descrito por Harlow e Lane (1988). Glutaraldeído é um reagente de acoplamento bifuncional que liga dois componentes principalmente através de grupos amina primários, incluindo grupos  $\epsilon$ -amino em lisina e grupos  $\alpha$ -amino livres. A proteína carreadora (0,03  $\mu$ mol) dissolvida em PBS foi adicionada a solução de peptídeo (0,6  $\mu$ mol) também preparada em PBS. Igual volume de 0,2% de glutaraldeído (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) em PBS foi lentamente adicionado a solução proteína carreadora/peptídeo que permaneceu sob constante agitação por uma hora a temperatura ambiente. A mistura foi incubada por uma hora sob agitação após adição de glicina 1M em PBS (pH 7.2) para uma concentração final de 200 mM. Alíquotas foram estocadas a -20°C até o uso.

#### 3.8.2 Produção de anticorpos anti-peptídeos

Grupos de cinco camundongos *Swiss* fêmeas de oito semanas foram imunizados com cinco doses de 20  $\mu$ g de peptídeo-BSA em adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich). A primeira e segunda doses foram administradas por via subcutânea e de terceira a quinta doses foram feitas via intraperitoneal. As injeções foram realizadas em intervalos de duas semanas. Soro não-imune foi utilizado como controle negativo e o sangue imune foi coletado uma semana após a última imunização.

Para avaliar a produção de anticorpos anti-peptídeos em camundongos, uma placa para ELISA (Cornig 2592) foi sensibilizada com 100  $\mu$ L de peptídeo a 1,5  $\mu$ g/mL em tampão carbonato 0,05 M pH 9.6 *overnight* a 4°C. Após lavagem (NaCl

0,9%-Tween 20 0,05%) a placa foi bloqueada (caseína 2% em PBS pH 7.4) por uma hora a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada e incubada por uma hora a 37°C com soros dos animais imunizados diluídos em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7.4-Tween 20 0,05%). Após lavagem, a detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG de camundongo  $\gamma$ -específica conjugado à peroxidase (A3673, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) (1:2500) e OPD como cromógeno.

### 3.8.3 SDS-PAGE e *Western Blotting*

Quarenta microgramas de proteína *M. leprae* foram separados em gel de poliacrilamida a 15% sob condições redutoras. Após eletroforese as proteínas foram transferidas a uma membrana de PVDF em tampão composto de 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol por 16 horas a 24 V seguido de uma hora a 48 V. Após transferência, a membrana foi bloqueada com 0,3% de Tween 20 em PBS e, em seguida, lavada com PBS Tween 20-0,05% (PBST-0,05%) e incubada com soro anti-peptídeo em PBST-0,05%. A membrana foi lavada e incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo  $\gamma$ -específica conjugado à peroxidase diluído 1:5000 em PBST-0,05%. O substrato quimiluminescente ECL Plus<sup>TM</sup> (GE Healthcare) combinado com filme autoradiográfico Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> (GE Healthcare) foi usado para a detecção da reação.

### 3.8.4 Eletroforese bidimensional e *Western Blotting*

Um total de 200  $\mu$ g de proteína de *M. leprae* foram purificadas por precipitação usando o *kit* 2-D Clean-Up (GE Healthcare). As proteínas precipitadas foram ressuspensas em 250  $\mu$ L de solução de reidratação (uréia 8M, CHAPS 2%, DTT 20 mM, IPG *buffer* 0,5%, azul de bromofenol 0,002%), a qual foi aplicada a tira de IPG (Immobiline<sup>TM</sup> DryStrip gel, GE Healthcare), pH 4-7 de 13 cm. A tira IPG foi

reidratada por reidratação passiva de quatro horas seguida de reidratação ativa a 50V por 12 horas a 20°C em Ettan IPGphor II (GE Healthcare). A focalização isoeétrica das proteínas foi realizada usando o seguinte programa: 500 V até acumular 550 Vh; 500-1000 V até acumular 880 Vh; 1000-8000 V até acumular 12440 Vh e 8000 V até acumular 5940 Vh; totalizando 21400 Vh. A tira IPG foi equilibrada em tampão A (uréia 6M, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002% e DTT 0,065 M) por 15 minutos seguido por equilíbrio em tampão B (uréia 6M, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002% e iodoacetamida 0,14 M) por 15 minutos. A separação em segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida a 15% usando o sistema de eletroforese vertical SE 600 Ruby (GE Healthcare). A eletroforese foi realizada a 15 mA/gel por 15 minutos e a 25 mA/gel até o azul de bromofenol atingir o final do gel.

Após eletroforese as proteínas foram transferidas a uma membrana de PVDF. A membrana foi bloqueada com 0,3% de Tween-20 em PBS, lavada com PBST-0,05% e incubada com soro anti-peptídeo em PBST-0,05%. Após lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo  $\gamma$ -específica conjugado à peroxidase diluído 1:5000 em PBS-T 0,05%. O substrato quimiluminescente ECL Plus<sup>TM</sup> combinado com Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> foi usado para a detecção da reação. Para reutilização da membrana com diferentes anticorpos, a membrana foi incubada com solução de *stripping* (glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 2.8) por uma hora a temperatura ambiente.

### 3.9 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO

#### 3.9.1 Animais e antígenos

Três grupos de cinco cobaias (*Cavia porcellus*) fêmeas de 250-300 g foram utilizados no teste cutâneo. Os antígenos foram diluídos em solução salina (NaCl 0,9%). Como controle positivo foi empregado o antígeno de Mitsuda ( $4 \times 10^7$  bacilos/mL) que foi fornecido pelo Centro de Produção e Pesquisa de

Imunobiológicos (Piraquara, Paraná) e como controle negativo, utilizou-se solução salina.

### 3.9.2 Teste de hipersensibilidade do tipo tardio

Cinco animais (grupo I) foram sensibilizados através da inoculação de 200 µg (MELANCON-KAPLAN *et al.*, 1988) de antígeno de *M. leprae* em adjuvante incompleto de Freund via subcutânea. Nos cinco animais do grupo II foi administrado solução salina (NaCl 0,9%) em adjuvante incompleto de Freund por via subcutânea. O grupo III foi constituído de animais não sensibilizados. Após 30 dias, cada animal recebeu por via intradérmica 0,1 mL dos seguintes antígenos: peptídeos (10 e 2 µg), *pool* dos peptídeos (10 e 2 µg), mitsudina (controle positivo), extrato solúvel de *M. leprae* (10 µg, controle positivo) e solução salina (controle negativo). O diâmetro da reação cutânea foi medido após 24, 48 e 72 horas, 21 e 28 dias.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTIMICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS

#### 4.1.1 Reatividade entre soros hiperimunes e antígenos homólogos e heterólogos

Nesse estudo avaliaram-se as reações cruzadas dos anticorpos produzidos em coelhos frente aos diferentes antígenos micobacterianos. O soro empregado para cada micobactéria refere-se ao *pool* de soros de dois coelhos no tempo de imunização de sete dias após a quarta imunização. Os resultados indicam que há forte reação cruzada entre as diferentes micobactérias. O antisoro de *M. phlei* seguido pelo antisoro de *M. avium* foram os mais reativos com os diferentes antígenos micobacterianos. Menores reatividades foram observadas com antígenos de *M. fortuitum* (FIGURA 5).

De acordo com a reatividade observada entre soros imunes e os diferentes antígenos, foi possível agrupar as distintas espécies de micobactérias em dois grupos (fatores) através da análise multivariada usando o método de análise fatorial.

O grupo 1 foi constituído pelas seguintes espécies *M. szulgai*, *M. terrae*, *M. avium*, *M. gordonae*, *M. bovis* BCG e *M. kansasii*, enquanto o grupo 2, foi constituído por *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis* e *M. phlei*.

Ainda na análise fatorial, a comunalidade estimada representa a proporção de variância explicada pela solução fatorial para cada variável.

A tabela 5 mostra os resultados obtidos da comunalidade estimada resultante da análise fatorial o que indica, pelos elevados valores, que as variáveis podem ser bem explicadas e sustenta a formação dos dois grupos de micobactérias.

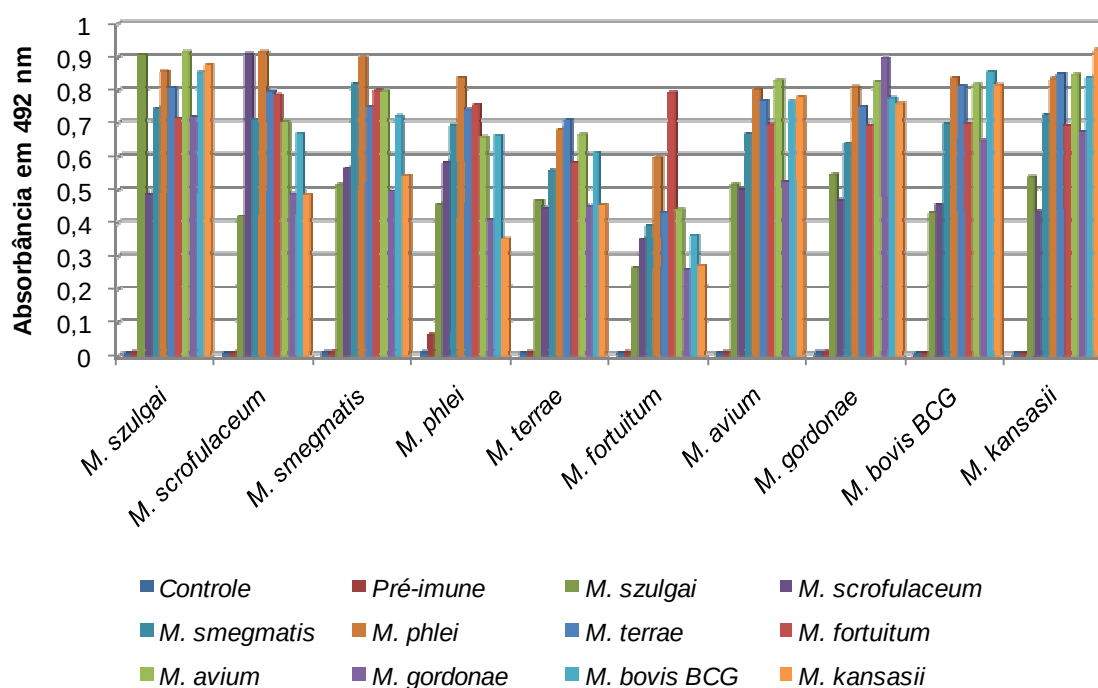


FIGURA 5 – REATIVIDADE DOS ANTÍGENOS DE MICOBACTÉRIAS FRENTE AOS SOROS HIPERIMUNES AVALIADA POR ELISA. Placas para ELISA foram sensibilizadas com 10 µg/mL de antígeno e incubadas com soro diluído 1:4000. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG de coelho molécula total conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.

TABELA 5 – CARREGAMENTOS FATORIAS E COMUNALIDADE ESTIMADA

| ESPÉCIE                | FATOR 1   | FATOR 2   | COMUNALIDADE ESTIMADA |
|------------------------|-----------|-----------|-----------------------|
| <i>M. szulgai</i>      | 0,780859  | 0,130065  | 62%                   |
| <i>M. scrofulaceum</i> | -0,238007 | 0,91111   | 96%                   |
| <i>M. smegmatis</i>    | 0,578377  | 0,750813  | 88%                   |
| <i>M. phlei</i>        | 0,461195  | 0,866905  | 89%                   |
| <i>M. terrae</i>       | 0,728285  | 0,612529  | 96%                   |
| <i>M. avium</i>        | 0,934344  | 0,32749   | 90%                   |
| <i>M. gordonae</i>     | 0,882402  | 0,0519997 | 98%                   |
| <i>M. bovis BCG</i>    | 0,952304  | 0,0146214 | 78%                   |
| <i>M. kansasii</i>     | 0,909942  | 0,368479  | 90%                   |

## 4.2 PACIENTES HANSENIANOS E GRUPOS CONTROLES

### 4.2.1 Amostras de soros positivos e negativos

Um total de 33 pacientes hansenianos (27 do sexo masculino e 6 do sexo feminino) foram recrutados para o estudo. A idade média do grupo foi de 49,2 anos,

com idade variando de 18-87 anos. Um paciente apresentou a forma clínica indeterminada, nove foram classificados como tuberculóides, seis eram dimorfos e 17 foram virchowianos (forma lepromatosa). Do total, 14 não haviam iniciado o tratamento no momento da coleta de sangue e 19 estavam em tratamento por um período de até quatro meses. O grupo de contatos intradomiciliares foi constituído de 26 indivíduos (8 do sexo masculino e 18 do sexo feminino), sendo que quatro indivíduos eram contatos de pacientes paucibacilares e 22 eram contatos de pacientes multibacilares. Do total, 12 eram contatos aparentados e 14 eram não aparentados. A idade média do grupo foi de 43,6 anos (estendendo-se entre 23-78 anos). O grupo de sadios foi composto 30 indivíduos (14 do sexo masculino e 16 do sexo feminino), sendo a idade média de 38,6 anos (faixa de 19-63 anos). Todos os 30 pacientes com tuberculose (26 do sexo masculino e 4 do sexo feminino) estavam em tratamento por períodos de até três meses no momento da coleta de sangue. A idade média do grupo foi 40,5 anos, com idade variando de 22-60 anos.

#### 4.2.2 Pesquisa de anticorpos anti-PGL-I

Nos 23 pacientes hansenianos classificados como multibacilares foram detectados anticorpos anti-PGL-I em 100% deles, enquanto nos pacientes hansenianos paucibacilares não se observou a presença de anticorpo frente ao PGL-I de *M. leprae* por ELISA (TABELA 6).

Dos 30 pacientes tuberculosos analisados, um paciente apresentou resultado próximo ao valor do *cut-off* (0,150) e dois (6,7%) pacientes apresentaram anticorpos anti-PGL-I em suas amostras.

Em uma das amostras do grupo de contatos de pacientes hansenianos como também em uma das amostras de indivíduos saudáveis foi verificado a presença de anticorpo anti-PGL-I.

Portanto, reações inespecíficas ou possível infecção subclínica foram observadas em indivíduos saudáveis ou expostos a outras micobactérias usando teste ELISA baseado em PGL-I.

TABELA 6 – SOROREATIVIDADE ANTI-PGL-I NAS AMOSTRAS DE SORO ESTUDADAS

|                                        | MB  | PB | TB  | CONTATOS | SADIOS |
|----------------------------------------|-----|----|-----|----------|--------|
| Nº indivíduos por grupo                | 23  | 10 | 30  | 26       | 30     |
| % indivíduos detectados com anti-PGL-I | 100 | 0  | 6,7 | 3,8      | 3,3    |

NOTA: MB, pacientes hansenianos multibacilares; PB, pacientes hansenianos paucibacilares; TB, pacientes tuberculosos

### 4.3 PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-*M. leprae* e ANTI-*M. tuberculosis* DE AMOSTRAS DE SOROS DE PACIENTES

#### 4.3.1 Purificação de imunoglobulinas por precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de afinidade

A pureza das imunoglobulinas totais foi avaliada por SDS-PAGE sob condições redutoras (FIGURA 6). As IgGs são evidenciadas em duas bandas de aproximadamente 25 kDa e 55 kDa.

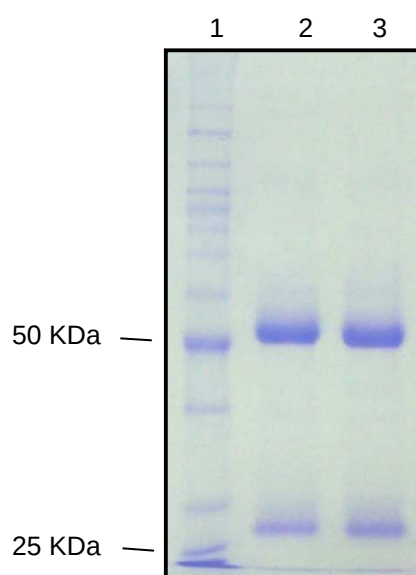


FIGURA 6 – SDS-PAGE DE IgGs TOTAIS DE PACIENTES PURIFICADAS POR PRECIPITAÇÃO POR SULFATO DE AMÔNIO E CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDADE. Colunas: 1: Padrão de massa molecular; 2: IgGs totais de pacientes hansenianos multibacilares; 3: IgGs totais de pacientes tuberculosos. Três microgramas de proteína foram aplicados em cada canaleta de um gel de poliácridamida a 10% corado por azul de Coomassie.

#### 4.3.2 SDS-PAGE de *M. leprae* e *M. tuberculosis* e Western Blotting

O perfil eletroforético do extrato total de *M. leprae* e *M. tuberculosis* foi obtido em gel com gradiente de poliacrilamida 10-20% em condições redutoras (FIGURA 7A). Para ambas as espécies, as proteínas se distribuíram na faixa de aproximadamente 10-100 kDa, sendo que a maioria se concentrou na região de baixa massa molecular.

O perfil de reatividade das imunoglobulinas G totais de pacientes frente aos antígenos de *M. leprae* e *M. tuberculosis* foi avaliado através do Western Blotting. IgGs totais de três grupos, hansenianos multibacilares, hansenianos paucibacilares e tuberculosos foram testadas com antígenos de *M. leprae*, como também as IgGs totais dos três grupos foram testadas com antígenos de *M. tuberculosis* (FIGURA 7B). Para fins de comparação, foram obtidas IgGs totais de pacientes hansenianos paucibacilares. As IgGs foram provenientes de um *pool* de soros de pacientes hansenianos paucibacilares e purificadas por precipitação com sulfato de amônio seguido de cromatografia de afinidade em proteína G-agarose. Anticorpos de hansenianos multibacilares, bem como de pacientes tuberculosos, reconheceram proteínas em *M. leprae* e em *M. tuberculosis*, demonstrando que antígenos são compartilhados entre as duas espécies. Porém, entre as semelhanças, foram observados padrões de reatividade exclusivos para cada espécie. Anticorpos de pacientes hansenianos paucibacilares apresentaram uma reatividade maior frente a antígenos de *M. tuberculosis* em comparação com os antígenos de *M. leprae*, mostrando que baixos títulos de anticorpos a antígenos de *M. leprae* são encontrados nesses pacientes.

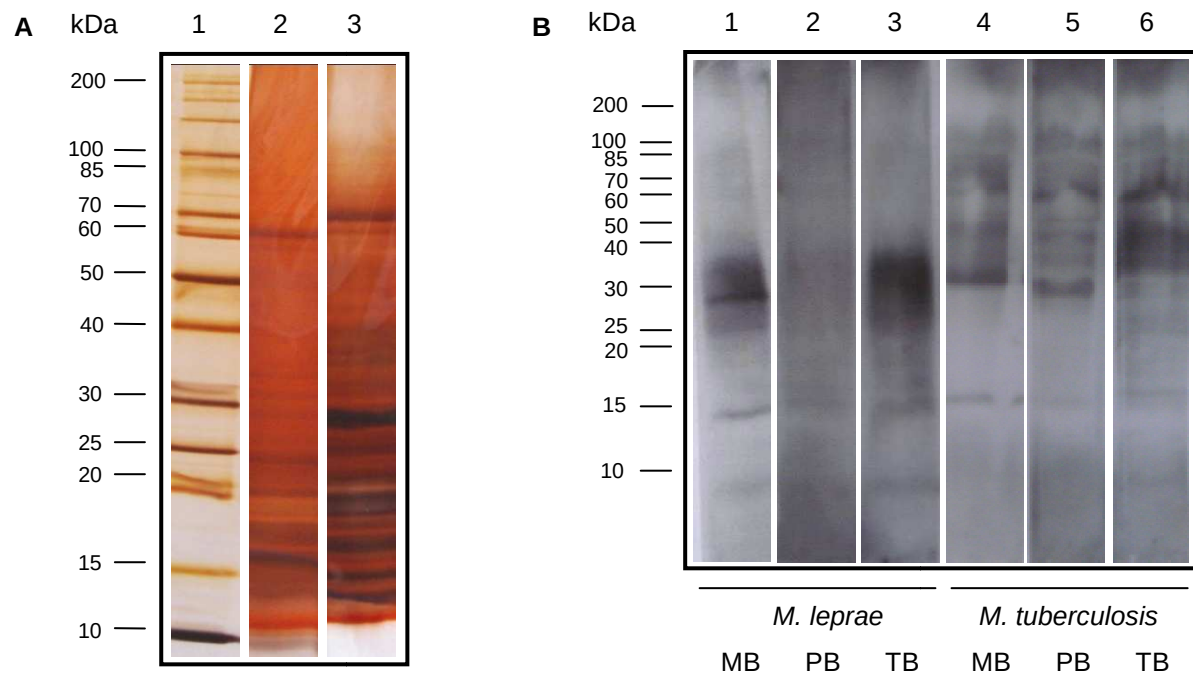


FIGURA 7 – SDS-PAGE DE *M. leprae* E *M. tuberculosis* E WESTERN BLOTTING. (A) SDS-PAGE do extrato total de *M. leprae* e *M. tuberculosis*. Colunas: 1: Padrão de massa molecular; 2: *M. leprae*; 3: *M. tuberculosis*. Vinte microgramas de proteína foram aplicados em cada canaleta de a um gel gradiente de poliacrilamida a 10%-20% corado por nitrato de prata. (B) Reatividade das IgGs totais de pacientes frente aos antígenos de *M. leprae* e *M. tuberculosis*. Colunas: 1 e 4: membrana incubada com 1 µg/mL de IgGs totais de pacientes hansenianos multibacilares (MB); 2 e 5: membrana incubada com 4 µg/mL de IgGs totais de pacientes hansenianos paucibacilares (PB); 3 e 6: membrana incubada com 2,5 µg/mL de IgGs totais de pacientes tuberculosos (TB). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humana Fc-específica conjugado à peroxidase 1:30000 e por quimiluminescência.

#### 4.3.3 Purificação de anticorpos de *immunoblots*

A purificação de anticorpos a partir de *immunoblots* foi usada para o isolamento de anticorpos específicos aos antígenos de *M. leprae*, uma vez que o *pool* de imunoglobulinas G total contém anticorpos contra outros antígenos. Da mesma forma, também foram recuperados anticorpos ligados a antígenos de *M. tuberculosis* imobilizados em membrana. A reatividade dos anticorpos obtidos foi avaliada por ELISA (FIGURA 8). O ensaio demonstra que as imunoglobulinas antígeno-específicas mesmo em menores concentrações apresentaram absorvâncias maiores que aquelas encontradas com imunoglobulinas totais. Portanto, o método de purificação permitiu a concentração de anticorpos antígeno-

específicos. Esses anticorpos, os quais representam a fração de imunoglobulinas de interesse, foram empregados na técnica de *Phage Display*.

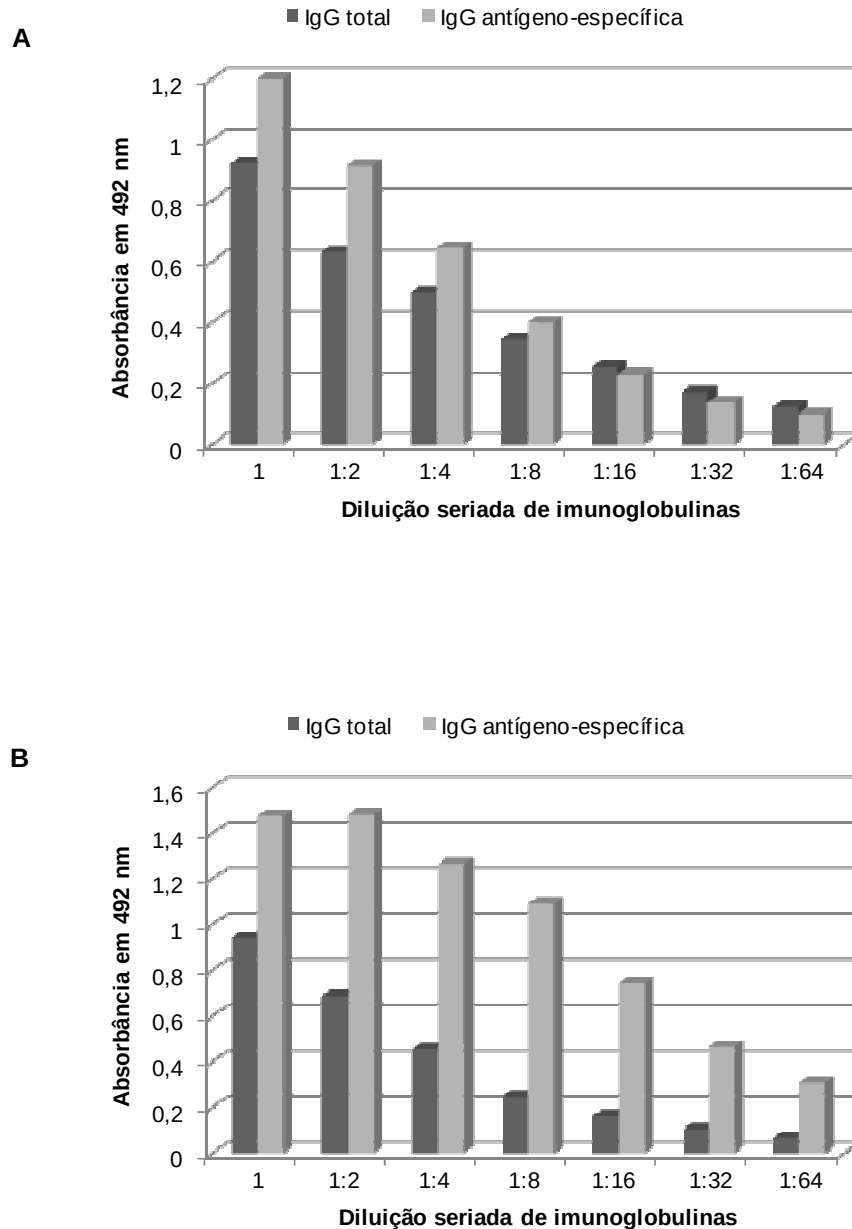


FIGURA 8 – REATIVIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS ANTÍGENO-ESPECÍFICAS POR ELISA. Uma placa para ELISA foi sensibilizada com 10 µg/mL de antígeno (*M. leprae* – A e *M. tuberculosis* – B) e incubada com imunoglobulinas partindo-se de 25 µg/mL para a total (barras escuras) e 5 µg/mL para a antígeno-específica (barras claras). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humana Fc-específica conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno.

#### 4.4 PHAGE DISPLAY

##### 4.4.1 ELISA de avaliação da reatividade dos fagos nos ciclos de biosseleção

Mimotopos de antígenos micobacterianos foram isolados de bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos através de ciclos de seleção frente a anticorpos antígeno-específicos obtidos de pacientes hansenianos multibacilares. A tabela 7 apresenta os dados de fagos de entrada e saída a cada ciclo de seleção para as duas estratégias. Observou-se que o número de fagos de saída aumentou ao final dos ciclos de seleção.

Também após seleção, foi avaliada a reatividade do *pool* de fagos selecionados a cada ciclo frente a imunoglobulinas G totais por ELISA (FIGURA 9). Em ambas as estratégias, foi observado um aumento na reatividade, entretanto, melhor resultado foi detectado entre os fagos e imunoglobulinas G totais da estratégia II. Portanto, esses resultados indicam que ocorreu a seleção de fagos reativos com anticorpos de pacientes hansenianos.

TABELA 7 – FAGOS DE ENTRADA E SAÍDA OBTIDOS DA BIOSSELEÇÃO POR *PHAGE DISPLAY* COM ANTICORPOS ANTÍGENO-ESPECÍFICOS

| CICLO DE SELEÇÃO | FAGO DE ENTRADA <sup>a</sup><br>(cfu) | FAGO DE SAÍDA <sup>b</sup> (cfu) |                            |
|------------------|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
|                  |                                       | ESTRATÉGIA I <sup>c</sup>        | ESTRATÉGIA II <sup>d</sup> |
| 1                | 7,98x10 <sup>11</sup>                 | 2,31x10 <sup>6</sup>             | 1,50x10 <sup>6</sup>       |
| 2                | 2,0x10 <sup>11</sup>                  | 1,50x10 <sup>6</sup>             | 4,35x10 <sup>5</sup>       |
| 3                | 2,0x10 <sup>11</sup>                  | 6,58x10 <sup>6</sup>             | 1,95x10 <sup>7</sup>       |
| 4                | 2,0x10 <sup>11</sup>                  | 2,25x10 <sup>7</sup>             | 9,45x10 <sup>7</sup>       |

NOTA: <sup>(a)</sup>: número de unidades formadoras de colônias (cfu) de fagos incubado com anticorpos. Para a estratégia I, fago de entrada no primeiro ciclo de seleção se refere aos fagos incubados com anticorpos *anti-M. tuberculosis*

<sup>(b)</sup>: número total de cfu de fagos contido no eluato (fagos ligados a anticorpos *anti-M. leprae*)

<sup>(c)</sup>: o *pool* de fagos usados no primeiro ciclo de seleção com anticorpos *anti-M. leprae* foi depletado de fagos reativos com anticorpos *anti-M. tuberculosis*

<sup>(d)</sup>: fagos das bibliotecas foram usados diretamente no primeiro ciclo de seleção

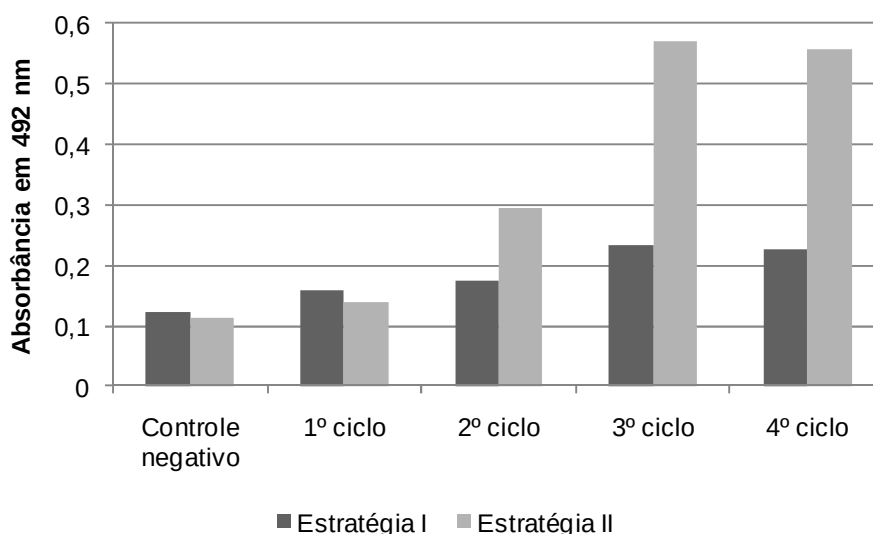


FIGURA 9 – REATIVIDADE DOS FAGOS SELECIONADOS PELAS ESTRATÉGIAS I E II A CADA CICLO DE SELEÇÃO POR ELISA. Uma placa para ELISA foi sensibilizada com anticorpo antifago (1:800) e incubada com  $2 \times 10^{10}$  fagos/mL seguido da adição de imunoglobulina G total (100  $\mu$ g/mL). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG Fc-específica conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno. Fago silvestre foi utilizado como controle negativo.

#### 4.4.2 Seleção de clones

Colônias bacterianas isoladas do quarto ciclo de seleção foram aleatoriamente selecionadas e os correspondentes fagos foram avaliados quanto sua capacidade de ligação a imunoglobulina G total de pacientes multibacilares por ELISA. Na estratégia I, entre os 400 clones analisados, 24 mostraram reconhecimento frente a imunoglobulina G (reatividade ao menos duas vezes maior que o controle negativo) e seis sequências peptídicas diferentes foram identificadas. Enquanto na estratégia II, dos 342 clones, 36 foram reconhecidos por ligação a imunoglobulina G e todos expressaram uma sequência de 15 aminoácidos idêntica. As sequências de aminoácidos inserida nos clones são apresentadas na tabela 8. Sete sequências diferentes foram obtidas, sendo que em três observou-se a região consenso DPAW. Quatro peptídeos originaram-se da biblioteca X15 e os outros três da biblioteca XCX8CX.

TABELA 8 – SEQUÊNCIAS DE PEPTÍDEOS LIGANTES A IMUNOGLOBULINAS G TOTAIS DE PACIENTES HANSENIANOS MULTIBACILARES OBTIDAS DE ACORDO COM AS ESTRATÉGIAS USADAS PARA A SELEÇÃO DE MIMOTOPOS E SUAS FREQUÊNCIAS

| ESTRATÉGIA | CLONE | SEQUÊNCIA                            | FREQUÊNCIA |
|------------|-------|--------------------------------------|------------|
| I          | 1A    | M T Σ P Y H Σ Q A G Σ P G P E        | 1/24       |
|            | 2A    | Q C T Σ T G Σ I W Σ C N              | 1/24       |
|            | 3A    | T Σ Y H Σ S P T Σ D A Σ P P H        | 1/24       |
|            | 4A    | V C Σ <b>D P A W</b> Σ F Σ C S       | 12/24      |
|            | 5A    | A P Σ <b>D P A W</b> Q N Σ F N Σ R R | 8/24       |
|            | 6A    | I C P Σ <b>D P A W</b> S Σ C N       | 1/24       |
| II         | 1B    | N Σ I H Σ H Σ Y W G Σ D L N A        | 36/36      |

#### 4.4.3 Avaliação da reatividade dos clones de fagos com soros de pacientes e controles

Cada clone de fago, após amplificação, foi avaliado por ELISA frente aos soros de pacientes hansenianos e controles (FIGURA 10 e APÊNDICES 1-4). Os clones 5A, 6A, e 1B foram selecionados para estudos posteriores por detectar maior número de pacientes hansenianos em relação aos controles. Mesmo para os clones selecionados foi observada uma baixa sensibilidade na detecção de pacientes hansenianos.

Cada amostra de soro foi também testada com fago silvestre por ELISA com o objetivo de avaliar a reação cruzada do soro com o fago sem o inserto (FIGURA 11). Os resultados demonstraram que a reatividade dos clones de fagos foi maior que aquela do fago silvestre com as amostras de soros positivas frente aos clones de fagos, exceto para a amostra 25 de paciente hanseniano, a qual apresentou uma reatividade maior frente ao fago silvestre quando comparada a aquela obtida com o clone 1B. Portanto, indicando que reatividade observada ocorreu entre amostras de soro e peptídeos expressos na superfície de fagos.

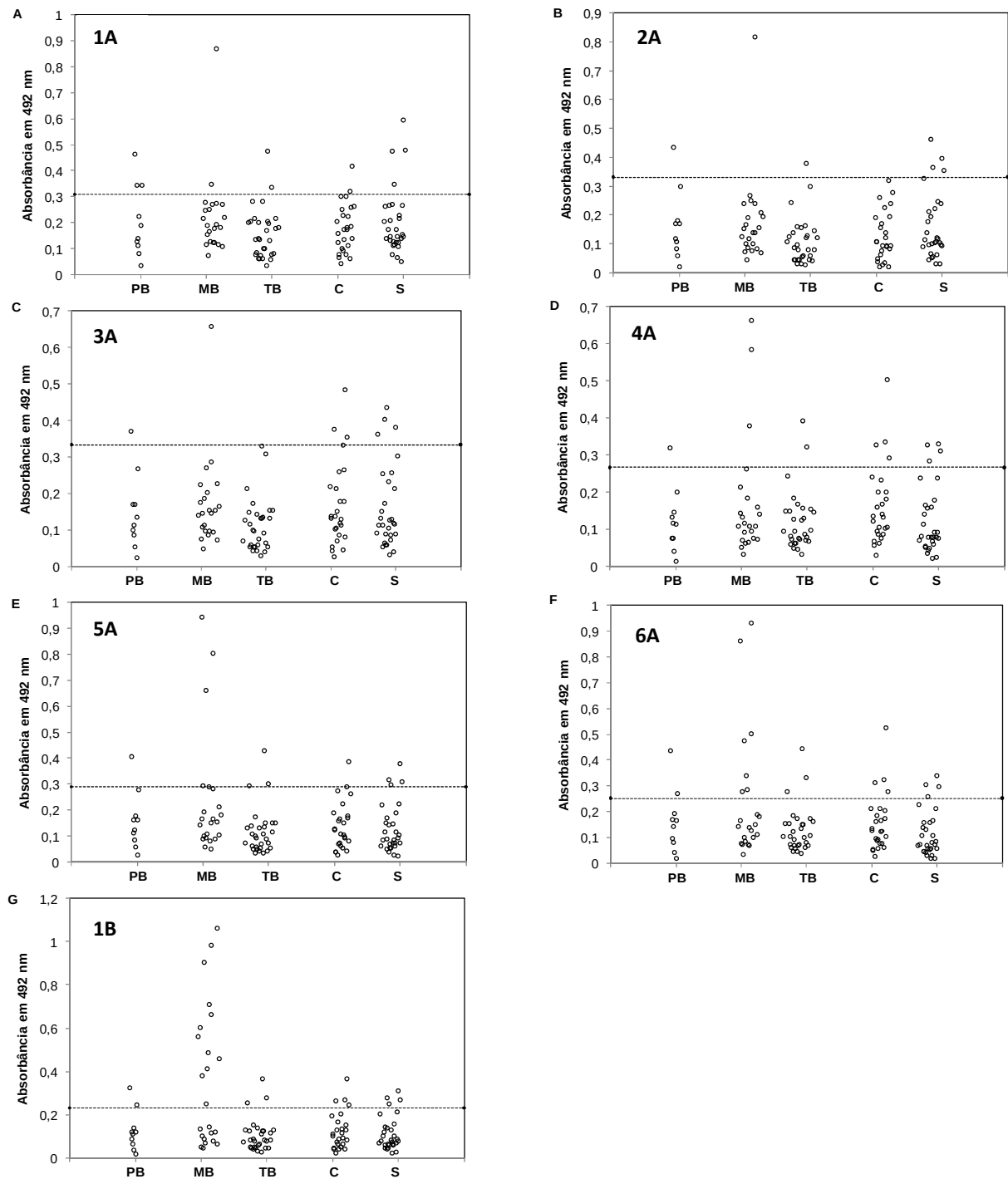


FIGURA 10 – REATIVIDADE DOS CLONES DE FAGOS POR ELISA COM SOROS DE PACIENTES E CONTROLES. Em A, clone 1A, em B, clone 2A, em C, clone 3A, em D, clone 4A, em E, clone 5A, em F, clone 6A e em G, clone 1B. Placas para ELISA foram sensibilizadas com anticorpo antifago (1:800) e incubadas com  $2 \times 10^{10}$  fagos/mL seguido da adição de soro de (1:100). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG Fc-específica conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno. MB, pacientes hansenianos multibacilares; PB, pacientes hansenianos paucibacilares; TB, pacientes tuberculosos; C, contatos; S, indivíduos saudáveis. Linha pontilhada representa o valor de *cut-off* (média da absorbância em 492 nm das amostras de indivíduos saudáveis mais duas vezes o desvio padrão, contudo a aceitação de cada amostra no grupo de saudáveis foi avaliada pelo z-score). Os pontos no gráfico representam os indivíduos.

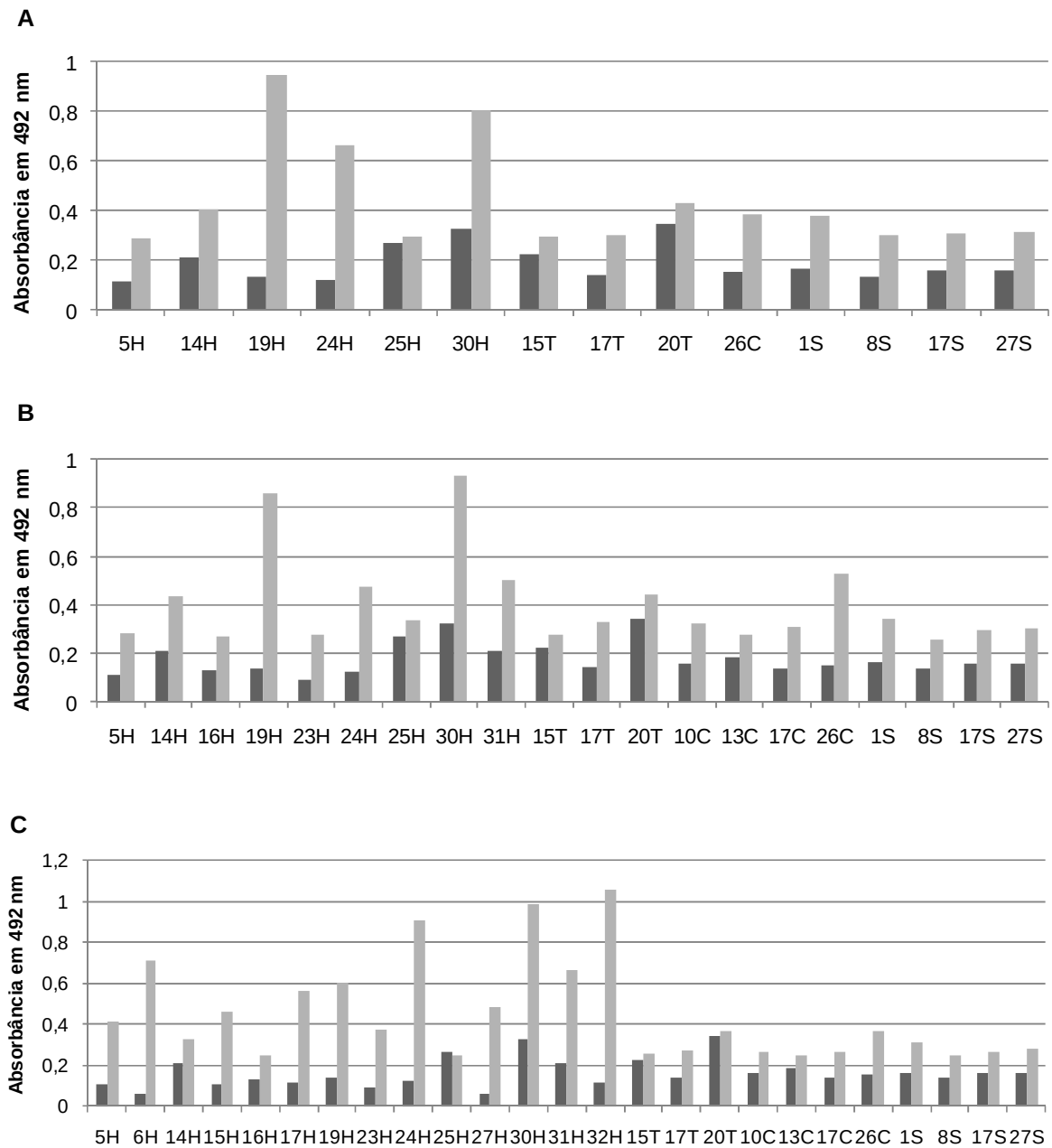


FIGURA 11 – REATIVIDADE DOS CLONES DE FAGOS SELECIONADOS VERSUS REATIVIDADE DO FAGO SILVESTRE COM AMOSTRAS DE SORO POSITIVAS FRENTE AOS CLONES DE FAGOS POR ELISA. Em A, clone 5A, em B clone 6A e em C clone 1B. Placas para ELISA foram sensibilizadas com anticorpo antifago (1:800) e incubadas com  $2 \times 10^{10}$  fagos/mL seguido da adição de soro de (1:100). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG Fc-específica conjugado à peroxidase e OPD como cromógeno. H, pacientes hansenianos; T, pacientes tuberculosos; C, contatos; S, indivíduos saudáveis. Clones de fagos selecionados, barras claras e fago silvestre, barras escuras.

## 4.5 PEPTÍDEOS

### 4.5.1 Avaliação da reatividade dos peptídeos por ELISA

Uma vez que os clones 5A, 6A e 1B permitiram detectar maior número de pacientes hansenianos do que indivíduos dos grupos de pacientes tuberculosos, contatos e indivíduos saudáveis, as sequências peptídicas expressas pelos respectivos fagos foram sintetizadas quimicamente. Os peptídeos 5A, 6A e 1B foram testados combinados para abranger a detecção de maior número de pacientes.

Das amostras analisadas, os peptídeos detectaram 52,2% pacientes hansenianos multibacilares (12/23). Cinco amostras de pacientes com tuberculose de um total de 30 (16,7%) foram reativas com os peptídeos. Porém, a reatividade observada com as amostras de tuberculosos foi menor em comparação àquela encontrada com pacientes hansenianos multibacilares. Nenhuma das amostras de pacientes hansenianos paucibacilares, contatos e indivíduos sadios foi considerada positiva pelo ensaio (FIGURA 12).

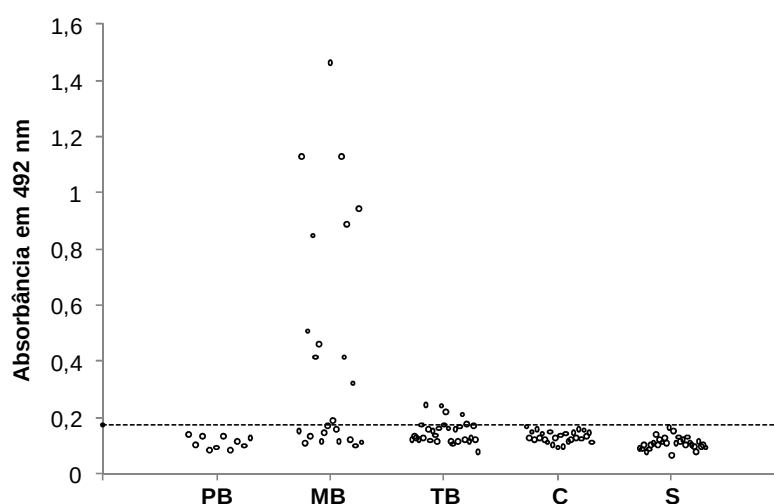


FIGURA 12 – REATIVIDADES DOS PEPTÍDEOS COM SOROS DE PACIENTES HANSENIANOS E CONTROLES POR ELISA. Placas para ELISA foram sensibilizadas com 1,5 µg/mL do *pool* peptídeo e incubadas com soro diluído 1:50. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humana Fc-específica-biotina e estreptavidina conjugada à peroxidase. PB, pacientes hansenianos paucibacilares; MB, pacientes hansenianos multibacilares; TB, pacientes tuberculosos; C, contatos; S, indivíduos sadios. Linha pontilhada representa o valor de *cut-off* (média da absorbância em 492 nm das amostras de indivíduos sadios mais três vezes o desvio padrão).

Os peptídeos não se mostraram reativos frente aos soros antimicobactérias cultiváveis produzidos em coelhos por ELISA (dados não mostrados). Três diluições de soros foram testadas, 1:4000, 1:400 e 1:40 e nenhuma das diluições apresentou reatividade com os peptídeos. A absorbância média em 492 nm para as dez espécies de micobactérias com soro pré-imune foi de 0,028, enquanto com o soro imune foi de 0,043, na diluição 1:40.

Uma vez que os antisoros das micobactérias cultiváveis não foram reativos com os peptídeos, um teste ELISA foi realizado para avaliar se os soros humanos positivos com os peptídeos também reconhecem os diferentes antígenos micobacterianos. Neste teste, um *pool* de soros hansenianos positivos com os peptídeos, um *pool* de soros de pacientes tuberculosos positivos com os peptídeos e um *pool* de soros de indivíduos sadios foram empregados e avaliados com antígenos de micobactérias cultiváveis (FIGURA 13). Os resultados demonstram que os soros de pacientes hansenianos e tuberculosos são igualmente reativos com todos os antígenos micobacterianos, porém em menor extensão com antígenos de *M. terrae* e *M. fortuitum*. Contudo, os peptídeos se mostraram mais específicos que o antígeno bruto de *M. leprae* frente aos soros de pacientes hansenianos e de pacientes com tuberculose.

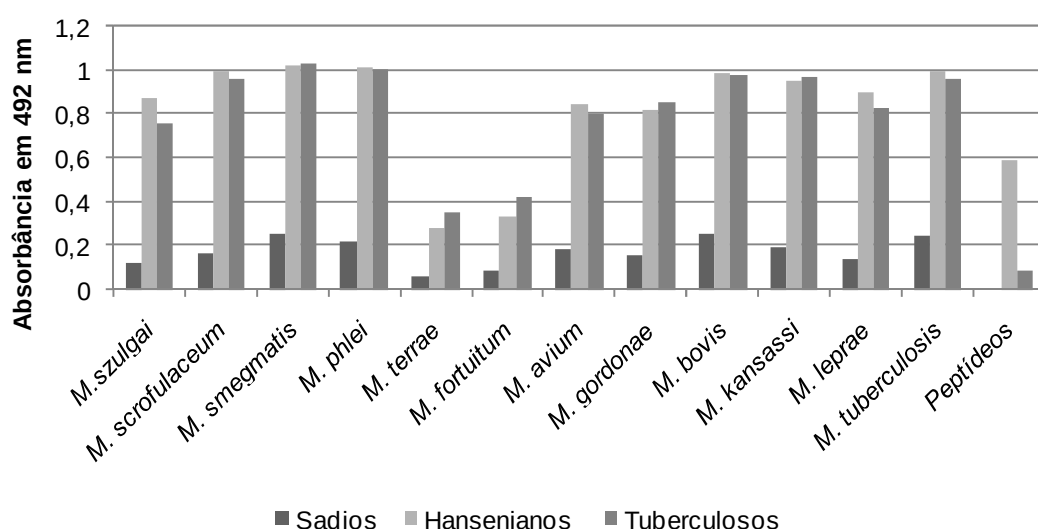


FIGURA 13 – AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS SOROS DE PACIENTES E CONTROLES FRENTE AOS ANTÍGENOS BRUTOS DE MICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS E PEPTÍDEOS. Placas para ELISA foram sensibilizadas com 10 µg/mL de antígeno bruto de micobactérias ou com 1,5 µg/mL do *pool* peptídeo e incubadas com soro diluído 1:100. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG Fc-específica conjugado à peroxidase ou anticorpo anti-IgG humana Fc-específica-biotina e estreptavidina conjugada à peroxidase e OPD como cromógeno.

#### 4.5.2 Comparação do desempenho do teste ELISA com peptídeos e ELISA com PGL-I na detecção da hanseníase

Os resultados do teste ELISA com peptídeos e ELISA com PGL-I (TABELA 9) foram utilizados para calcular a sensibilidade e especificidade (TABELA 10). Nenhum dos testes foi positivo com amostras de soro pacientes hansenianos paucibacilares. O teste ELISA usando PGL-I detectou 100% das amostras de pacientes hansenianos multibacilares, enquanto, o ELISA usando peptídeos permitiu detectar 52,2% dessas amostras. Ambos os testes mostraram reação cruzada com pacientes com tuberculose. Porém, as amostras de soro de pacientes tuberculosos reativas com PGL-I foram diferentes daquelas reativas com peptídeos. Nenhuma das amostras de soro dos grupos contatos e sadios foi positiva com os peptídeos, enquanto, uma amostra de cada um desses grupos foi positiva frente ao antígeno PGL-I.

O teste ELISA com PGL-I apresentou uma sensibilidade e especificidade para o grupo de pacientes hansenianos multibacilares em relação ao grupo de não doentes constituído de tuberculosos, contatos e sadios, de 100% e 95,3%, respectivamente. Enquanto, a sensibilidade e especificidade observada com o teste ELISA com peptídeos, usando os mesmos grupos, foi de 52,2% e 94,2%, respectivamente. Considerando, para o cálculo da especificidade o grupo de doentes, pacientes multibacilares, e grupo de não doentes, indivíduos sadios, a especificidade passa a ser de 100% para o teste ELISA com peptídeos.

TABELA 9 – NÚMERO DE TESTES ELISA POSITIVOS E NEGATIVOS COM PGL-I E PEPTÍDEOS OBTIDOS NOS GRUPOS ESTUDADOS

|          | ELISA |    |    |    |    |           |    |    |    |    |
|----------|-------|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|
|          | PGL-I |    |    |    |    | Peptídeos |    |    |    |    |
|          | PB    | MB | TB | C  | S  | PB        | MB | TB | C  | S  |
| Positivo | 0     | 23 | 2  | 1  | 1  | 0         | 12 | 5  | 0  | 0  |
| Negativo | 10    | 0  | 28 | 25 | 29 | 10        | 11 | 25 | 26 | 30 |
| Total    | 10    | 23 | 30 | 26 | 30 | 10        | 23 | 30 | 26 | 30 |

NOTA: PB, pacientes hansenianos paucibacilares; MB, pacientes hansenianos multibacilares; TB, pacientes tuberculosos; C, contatos; S, indivíduos sadios

TABELA 10 – SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS TESTES ELISA COM PGL-I E PEPTÍDEOS

| ELISA     | GRUPO       | SENSIBILIDADE | ESPECIFICIDADE |
|-----------|-------------|---------------|----------------|
| PGL-I     | MB x S      | 100%          | 97%            |
| PGL-I     | MB x TB/C/S | 100%          | 95,3%          |
| Peptídeos | MB x S      | 52,2%         | 100%           |
| Peptídeos | MB x TB/C/S | 52,2%         | 94,2%          |

NOTA: MB, pacientes hansenianos multibacilares; TB, pacientes tuberculosos; C, contatos; S, indivíduos saudáveis

#### 4.5.3 Identificação de resíduos ligantes de anticorpos em peptídeos

Para caracterizar quais os resíduos de aminoácidos em peptídeos importantes para o reconhecimento com anticorpos uma série de análogos de alanina dos peptídeos 5A, 6A e 1B foram preparados por *Spot Synthesis* e avaliados quanto à reatividade com *pool* de soro de pacientes multibacilares positivos com peptídeos (FIGURA 14). O resultado indica que os resíduos de aminoácidos prolina (posição 2), aspartato (posição 4) e alanina (posição 6) são importantes para o reconhecimento do peptídeo 5A por anticorpos. Uma vez que a substituição desses aminoácidos por alanina ou serina (no caso quando alanina era encontrada na posição de geração do análogo), reduziu a reatividade do peptídeo quando comparada àquela do peptídeo não modificado.

Já para o peptídeo 1B, os resíduos de aminoácidos mais importantes para interação com anticorpos são: tirosina (posição 8), triptofano (posição 9), glicina (posição 10), aspartato (posição 12), leucina (posição 13) e asparagina (posição 14). A substituição desses aminoácidos por alanina resultou em diminuição acentuada na reatividade do peptídeo frente a anticorpos.

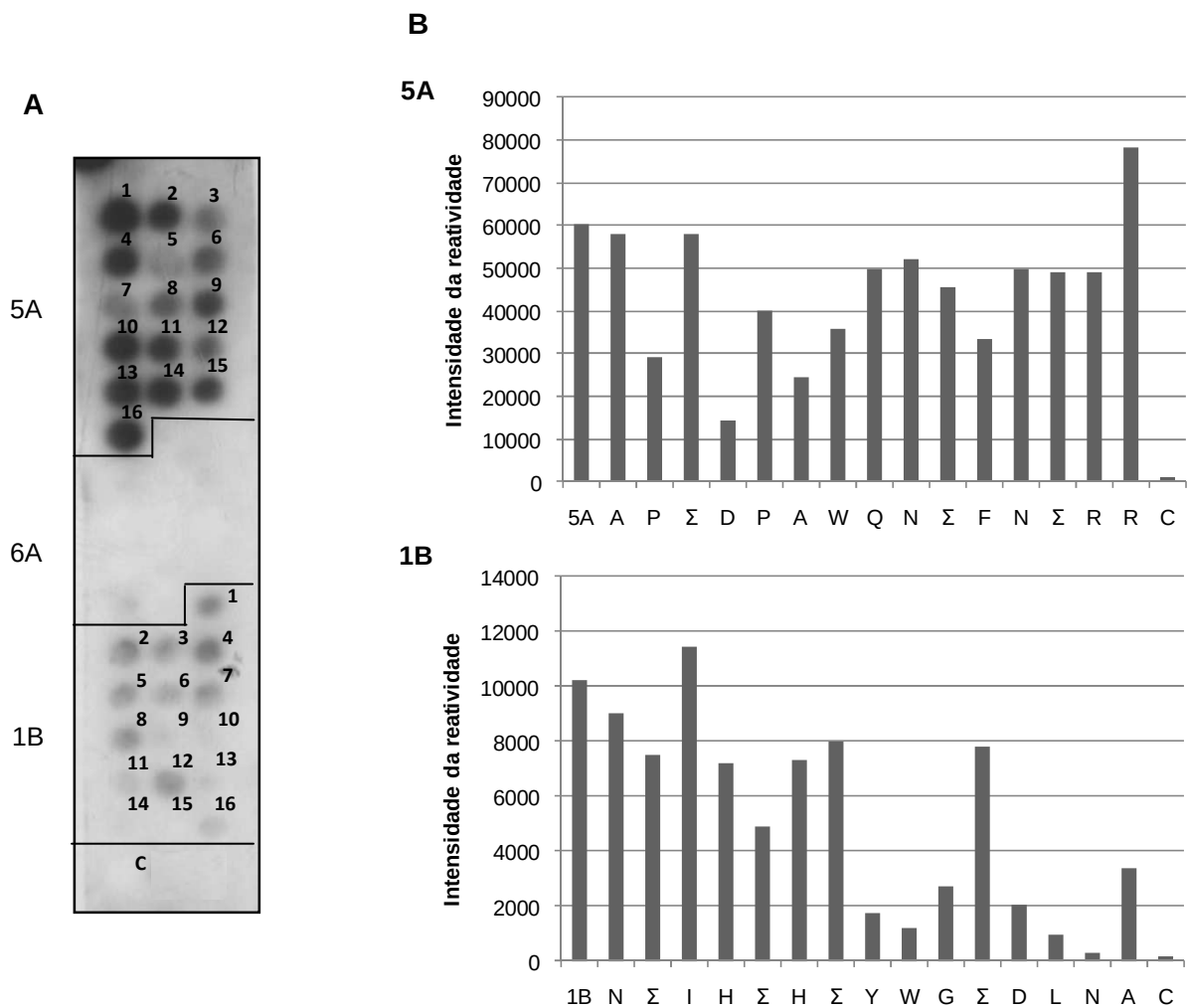


FIGURA 14 – IDENTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS-CHAVE EM PEPTÍDEOS. A ligação de anticorpos de pacientes hansenianos (1:250) aos peptídeos sobre membrana foi detectada por anti-IgG humana Fc-específica conjugada à peroxidase (1:120000). (A) Padrão de reatividade dos peptídeos. Na região superior da imagem, o peptídeo 5A está na posição 1 e os demais spots correspondem aos análogos de alanina do peptídeo 5A, na região mediana encontra-se o peptídeo 6A e seus análogos de alanina e na região inferior, peptídeo 1B está na posição 1 seguido de seus análogos de alanina. Um peptídeo não relacionado está indicado por C. (B) Intensidade da reatividade dos peptídeos. Gráfico superior e inferior se refere aos peptídeos 5A e 1B, respectivamente. O resíduo substituído por alanina está indicado para cada análogo. Quando alanina estava presente na posição de geração do análogo, o resíduo de alanina foi substituído por serina.

#### 4.6 PESQUISA DO ANTÍGENO ORIGINAL EM *M. leprae*

Tendo verificado que os peptídeos são reconhecidos por anticorpos de pacientes hansenianos o objetivo seguinte foi identificar o antígeno original em *M. leprae*. Inicialmente, anticorpos anti-peptídeos foram produzidos em animais, porém a produção de anticorpos com componentes pequenos como peptídeos requer a conjugação dos mesmos com proteínas carreadoras como BSA. Os resultados indicaram que os peptídeos conjugados a proteína BSA foram capazes de induzir a produção de anticorpos anti-peptídeos em animais (FIGURA 15). Os soros anti-peptídeos foram capazes de reconhecer o peptídeo isolado como também o peptídeo conjugado ao BSA, porém a reatividade observada ao último foi maior, visto que no soro dos animais são encontrados anticorpos anti-BSA. Os soros anti-peptídeos foram reativos com um peptídeo não relacionado conjugado ao BSA e a reatividade mostrada se deve a molécula carreadora. Os peptídeos não foram positivos com soro não-imune.

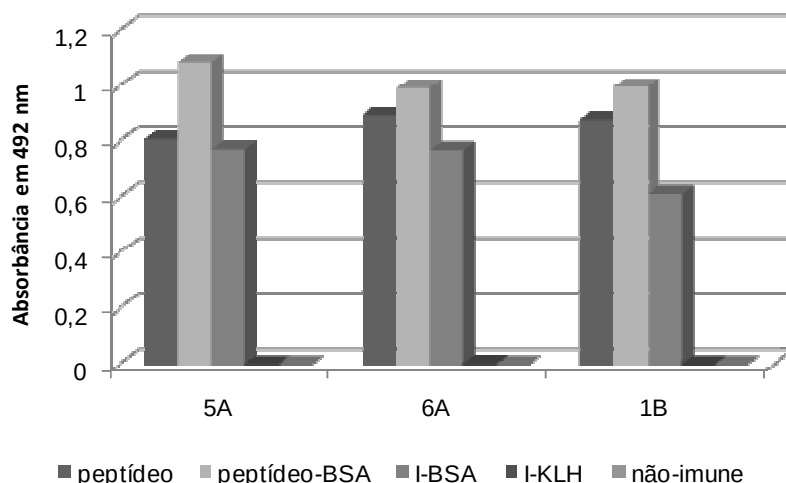


FIGURA 15 – REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEOS POR ELISA. Os soros anti-peptídeos foram avaliados frente ao peptídeo correspondente não-conjugado, peptídeo correspondente conjugado com BSA, peptídeo irrelevante conjugado com BSA (I-BSA), peptídeo irrelevante conjugado com KLH (I-KLH) e soro não-imune. Uma placa para ELISA foi sensibilizada com 100  $\mu$ L de peptídeo a 1,5  $\mu$ g/mL. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG de camundongo  $\gamma$ -específica conjugada à peroxidase e OPD como cromógeno.

Anticorpos anti-peptídeos não foram capazes de reconhecer antígenos totais de *M. leprae* imobilizados em placa de ELISA (dados não mostrados), porém foram

capazes de reagir com antígenos de *M. leprae* após eletroforese seguido de *Western Blotting* (FIGURA 16). Uma única banda de aproximadamente 30 kDa foi reconhecida com os três diferentes anticorpos anti-peptídeos.

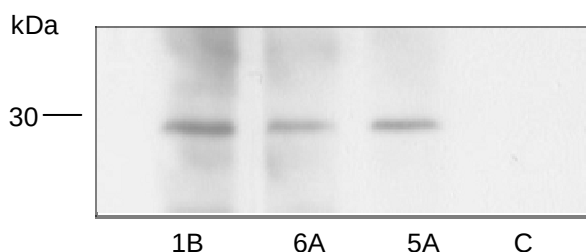


FIGURA 16 – REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEOS COM *M. leprae* POR *WESTERN BLOTTING*. Quarenta microgramas de extrato total de *M. leprae* foram separados por SDS-PAGE a 15% e após *Western Blotting* reagidos com soro anti-peptídeo 1B (1:12000), soro anti-peptídeo 6A (1:9000), soro anti-peptídeo 5A (1:4000) e soro não-imune(C) (1:4000). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG de camundongo  $\gamma$ -específica conjugado à peroxidase e por quimiluminescência.

Para identificar o antígeno original em *M. leprae*, uma eletroforese bidimensional com extrato total de *M. leprae* foi realizada, seguido de *Western Blotting* com anticorpos anti-peptídeos e subsequente espectrometria de massa.

A eletroforese bidimensional revelou vários *spots* com massa molecular entre 10 a 70 kDa (FIGURA 17), enquanto o *Western Blotting* revelou quatro *spots* de aproximadamente 30 kDa (FIGURA 18). Os três antisoros anti-peptídeos apresentaram o mesmo perfil de reatividade com *M. leprae*. O ponto isoelétrico (pI) estimado para os quatro *spots* foi 4,56, 4,64, 4,75 e 4,9.

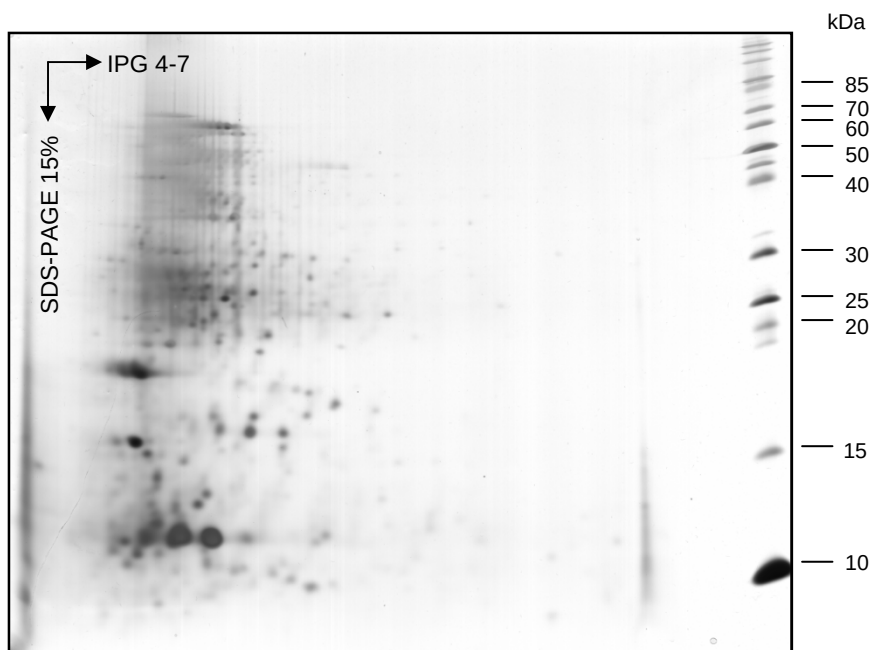


FIGURA 17 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DO EXTRATO TOTAL DE *M. leprae*. Cem microgramas de proteína foram separadas na primeira dimensão por focalização isoeétrica em tira IPG pH 4-7 de 13 cm e na segunda dimensão por SDS-PAGE em um gel a 15%. A detecção das proteínas foi realizada por coloração de prata.



FIGURA 18 – *WESTERN BLOTTING* DO GEL BIDIMENSIONAL DO EXTRATO TOTAL DE *M. leprae*. Duzentos microgramas de proteína foram separadas na primeira dimensão por focalização isoeétrica em tira IPG pH 4-7 de 13 cm e na segunda dimensão por SDS-PAGE em um gel a 15%. *Western Blotting* com soro anti-peptídeo 1B-1:4000 está mostrado. Os dois outros soros anti-peptídeos apresentaram o mesmo perfil de reatividade apresentado com o soro anti-peptídeo 1B. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG de camundongo  $\gamma$ -específica conjugado à peroxidase e por quimioluminescência.

Os *spots* de proteínas correspondentes aos *spots* reativos com anticorpos anti-peptídeos foram removidos do gel bidimensional, digeridos com tripsina e analisados por espectrometria em equipamento MALDI-TOF (Bruker Daltronics, Bremen, Alemanha), porém não foi ainda possível a identificação de proteínas devido a ausência de espectros de massas na análise.

Uma vez que a excisão de *spots* de proteínas em géis bidimensionais baseada na posição dos *spots* reativos por *Western Blotting* foi dificultada pela alta densidade de proteínas, uma nova tentativa de isolamento da proteína de *M. leprae* foi feita utilizando a técnica de imunoprecipitação. Anticorpo anti-peptídeo 1B foi incubado com extrato total de *M. leprae* e o complexo antígeno-anticorpo formado foi capturado em uma mistura de proteína A e G sepharose. Os imunocomplexos foram dissociados da resina e analisados por SDS-PAGE (FIGURA 19) seguido de espectrometria de massa.

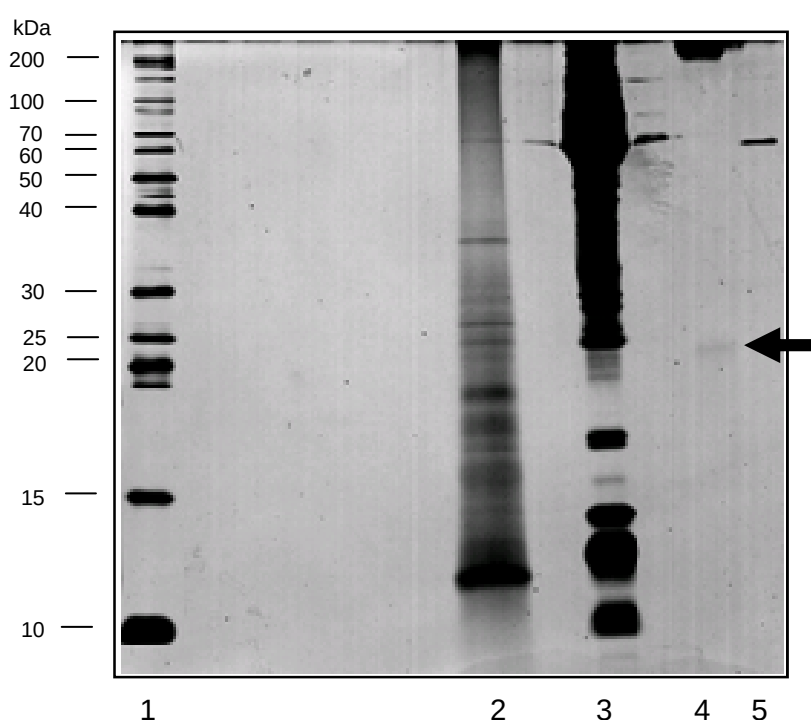


FIGURA 19 – ISOLAMENTO DE PROTEÍNA DO EXTRATO TOTAL DE *M. leprae* POR IMUNOPRECIPITAÇÃO COM ANTICORPO ANTIPEPTÍDEO 1B. A imunoprecipitação foi realizada com 500 µg de proteína de *M. leprae* e anticorpo anti-peptídeo 1B diluído 1:100. Os imunocomplexos foram resolvidos em SDS-PAGE a 15% em condições não-redutoras e corados por nitrato de prata. Linhas 1: padrão de massa molecular, 2: fração eluída da resina usada no pré-clareamento do lisado de *M. leprae*, 3: soro não-imune, 4: imunoprecipitação, 5: BSA. A seta indica a proteína isolada.

Para a espectrometria de massa, a proteína em *M. leprae* isolada por imunoprecipitação foi excisada do gel e submetida em seguida aos processos de descoloração, redução, alquilação e digestão com tripsina. E novamente, não foi possível a identificação da proteína, apesar da observação de alguns espectros de massa, os mesmos não se mostraram adequados para a caracterização da proteína.

#### 4.6.1 Análise *in silico* dos peptídeos

Em vista da conclusão do genoma completo de *M. leprae* e sua disponibilidade em banco de dados, buscou-se pesquisar a similaridade das sequências peptídicas com as sequências de proteínas armazenadas em banco de dados do *M. leprae* encontrado no endereço <http://genolist.pasteur.fr/Leproma/> utilizando o programa BLASTp. As três sequências peptídicas identificadas no presente estudo produziram significativo alinhamento com o antígeno 85-B (fbpB) de *M. leprae* (QUADRO 4). O antígeno 85-B é um dos membros do complexo 85 que possui massa molecular de 31kDa e ponto isoelétrico teórico de 4,9. Esses parâmetros, por sua vez, são semelhantes aos obtidos experimentalmente.

|                            |                                  |                            |                                  |                           |                                       |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| <i>M. leprae</i><br>Pep 5A | <b>PNDPAWQ</b><br><b>PΣDPAWQ</b> | <i>M. leprae</i><br>Pep 6A | <b>PNDPAWQ</b><br><b>PΣDPAWS</b> | <i>M. leprae</i><br>Pep1B | DGTHSWEYWGAQLNA<br>NΣ I HΣ HΣYWGΣDLNA |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|

QUADRO 4 – ALINHAMENTO DE AMINOÁCIDOS ENTRE O ANTÍGENO 85B DE *M. LEPRAE* E AS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS 5A, 6A E 1B. Os aminoácidos idênticos estão indicados por negrito.

As mesmas sequências também foram analisadas quanto sua similaridade em outras espécies de micobactérias cujos genomas completos já foram gerados. Para as sequências 5A e 6A não foram encontrados alinhamentos, enquanto para a sequência 1B foram observadas similaridades em diferentes espécies de micobactérias (QUADRO 5).

| ESPÉCIE                                                   | PROTEÍNA                                | SEQUÊNCIA               |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
| <i>M. tuberculosis</i> H37Rv                              | Rv 1886c (fbpB)                         | <b>NGTHSWEYWGAQLNA</b>  |
|                                                           | Rv 3804c (fbpA)                         | <b>HSWEYWGAQLNA</b>     |
| <i>M. bovis</i> BCG Pasteur 1173P2                        | BCG 1923c (fbpB)                        | <b>NGTHSWEYWGAQLNA</b>  |
|                                                           | BCG 3866c (fbpA)                        | <b>HSWEYWGAQLNA</b>     |
| <i>M. ulcerans</i> Agy99                                  | MUL 2970 (fbpB)                         | <b>NGTHSWEYWGAQLNA</b>  |
|                                                           | MUL 4987 (fbpA)                         | <b>NGTHSWEYWGAQLNA</b>  |
| <i>M. abscessus</i> ATCC 19977                            | -                                       | -                       |
| <i>M. avium</i> 104                                       | MAV 2816 (fbpB)                         | <b>NGTHSWEYWGAQLNA</b>  |
| <i>M. gilvum</i> PYR-GCK                                  | Mflv 3241 (Putative esterase precursor) | <b>NGTHGWGYWGSQNLNA</b> |
| <i>M. marinum</i> M                                       | MMAR 5368 (fbpA)                        | <b>NGTHSWEYWGAQLNA</b>  |
|                                                           | MMAR 2777 (fbpB)                        | <b>NGTHSWEYWGAQLNA</b>  |
| <i>M. smegmatis</i> MC2 155                               | -                                       | -                       |
| <i>M. vanbaalenii</i> PYR-1                               | -                                       | -                       |
| <i>M. paratuberculosis</i><br><i>paratuberculosis</i> K10 | MAP 1609c (fbpB)                        | <b>NGTHSWEYWGAQLNA</b>  |

QUADRO 5 – RESULTADO DA BUSCA POR SIMILARIDADE ENTRE A SEQUÊNCIA PEPTÍDICA 1B E SEQUÊNCIA EM MICOBACTÉRIAS

FONTE: INSTITUT PASTEUR/GENOLIST (2011)

NOTA: aminoácidos em negrito indicam identidade entre a sequência peptídica 1B e sequência em micobactérias.

#### 4.7 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO

O desafio intradérmico com peptídeos em cobaias previamente imunizados com *M. leprae* induziu uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio. A leitura máxima foi observada em 48 horas e, portanto, esse tempo foi considerado na descrição dos resultados. Não foi detectada qualquer reação em animais imunizados com adjuvante como também em animais não sensibilizados. No grupo sensibilizado com *M. leprae*, observou-se reação com o peptídeo 5A (2/5), peptídeo 1B (1/5), mitsudina (3/5) e com *M. leprae* (4/5) (FIGURA 20). Para o peptídeo 1B a reação cutânea foi observada nas doses de 2 e 10 µg, que foram de dimensões semelhantes, 16,5 e 15,5 mm, respectivamente, enquanto para o peptídeo 5A, apenas a dose de 10 µg gerou resposta.

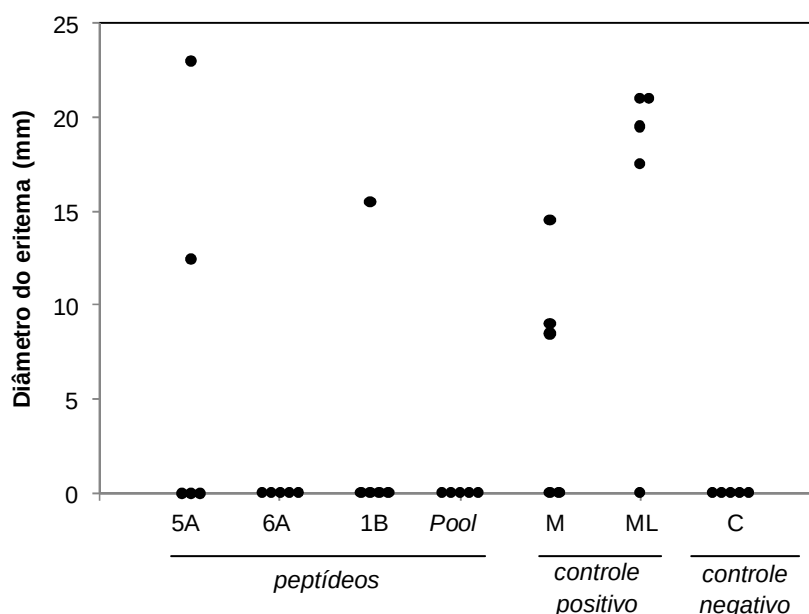


FIGURA 20 – REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO INDUZIDA POR PEPTÍDEOS EM COBAIAS. Cobaias foram sensibilizados com 200 µg de *M. leprae* em adjuvante incompleto de Freund e após 30 dias foram inoculados por via intradérmica com peptídeos e controles. O resultado em 48 horas após administração de 10 µg de peptídeo, mitsudina (M) com  $4 \times 10^6$  bacilos e 10 µg extrato solúvel de *M. leprae* (ML) está indicado. O diâmetro da reação corresponde a média dos diâmetros horizontal e vertical do eritema. Solução salina (C) foi empregada como controle negativo.

Os dois animais que não responderam a mitsudina no tempo de 48h, produziram resposta após 72 horas (enduração) ou 21 dias (enduração) após a

aplicação do antígeno. A detecção de resposta com mitsudina e extrato solúvel de *M. leprae* indica que os animais foram imunizados. As reações cutâneas observadas foram do tipo eritematoso, apenas um dos animais imunizados com *M. leprae* além de eritema desenvolveu uma pápula decorrente da aplicação do peptídeo 5A. Fazendo-se uma comparação entre as respostas obtidas com os peptídeos e o controle positivo, extrato de *M. leprae*, que também se trata de um antígeno solúvel, observa-se que 80% (4/5) dos animais responderam ao antígeno de *M. leprae*, enquanto, considerando a resposta cumulativa aos peptídeos, 60% dos animais (3/5) apresentaram reação cutânea.

Não foi possível a aplicação de qualquer análise estatística devido a presença de poucos animais respondedores, porém o estudo mostra evidências de que os peptídeos induzem uma resposta celular.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTIMICOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS

Antisoros de diferentes espécies de micobactérias foram produzidos em animais com a finalidade de avaliar a especificidade dos peptídeos em ensaios sorológicos. Não foram produzidos antisoros para *M. leprae* como também para *M. tuberculosis*, uma vez que, na população são encontradas amostras em quantidade suficientes contendo anticorpos contra antígenos para ambas as espécies. Tuberculose e hanseníase são as duas principais infecções causadas por micobactérias em humanos e assim sendo, a avaliação de especificidade para reagentes em hanseníase requer estudos de reação cruzada com tuberculose. Porém, outras espécies de micobactérias estão presentes no ambiente (KATOCH, 2004) e são responsáveis por reações cruzadas. Além disso, a prática de vacinação com *M. bovis* BCG também vem contribuir para a reatividade cruzada. Desse modo, é fundamental avaliar a possibilidade de reações inespecíficas de antígenos para hanseníase com diferentes espécies de micobactérias a fim de possibilitar o desenvolvimento de testes de diagnóstico mais adequados.

Os resultados da imunização de animais com micobactérias mostram que os antígenos micobacterianos são imunógenos capazes de induzir a produção de altos títulos de anticorpos. Os dados também indicam a ocorrência de reações sorológicas cruzadas. Uma exploração dos resultados do teste ELISA de reação cruzada pela análise multivariada apontou a formação de dois grupos: grupo 1, formado por *M. szulgai*, *M. terrae*, *M. avium*, *M. gordonae*, *M. bovis* BCG e *M. kansasii*, enquanto o grupo 2, constituído por *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis* e *M. phlei* foi formado. Em função da similaridade da resposta antígeno-anticorpo foi possível agrupar as espécies nesses dois grupos. A espécie *M. fortuitum* foi removida da análise, pois sua inclusão perturbou o teste, visto que, essa espécie apresentou menores medidas de absorbância quando comparada a outras espécies de micobactérias. Essa reação cruzada observada entre diferentes espécies de micobactérias já vinha sendo descrita logo nos primeiros estudos com micobactérias e se deve ao

compartilhamento de antígenos entre os membros do gênero (DANIEL; JANICKI, 1978). E mais recentemente, dados de sequenciamento de genomas de micobactérias mostram alta homologia entre as espécies, o que vem sustentar a observação de reação cruzada entre micobactérias (COLE *et al.*, 2001; GARNIER *et al.*, 2003).

## 5.2 PHAGE DISPLAY

A técnica de *Phage Display* se apresenta com uma alternativa de identificação de antígenos micobacterianos seja para uso em diagnóstico, prognóstico ou em vacinas. Os peptídeos identificados por *Phage Display* compreendem mimotopos, pois não são epítomos naturais, mas epítomos que mimetizam parte do epítomo natural. O mimetismo se deve a similaridade na sequência ou a similaridade em propriedades físico-químicas e na organização espacial (MOREAU *et al.*, 2006). Porém, em alguns casos, a identificação de peptídeos de bibliotecas de fagos pode ser suficiente para encontrar o ligante natural a um alvo (SMITH; PETRENKO, 1997).

Os métodos utilizados até o momento para a identificação de reagentes em diagnóstico se basearam no conhecimento prévio de antígenos. Uma vantagem da técnica de *Phage Display* é não requerer a identificação prévia do antígeno natural contra o qual uma resposta imune é dirigida (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

Deste modo, bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos foram rastreadas usando anticorpos e mais especificamente, anticorpos antígeno-específicos. Dentre os anticorpos encontrados em pacientes hansenianos poucos são específicos para antígenos de *M. leprae*. No mesmo indivíduo, além dos anticorpos específicos ao *M. leprae*, são encontrados anticorpos direcionados aos mais variados antígenos, que o indivíduo veio a entrar em contato, incluindo outras micobactérias.

Os anticorpos usados na seleção de peptídeos de bibliotecas de fagos foram provenientes de um *pool* de amostras de soro obtidos de pacientes hansenianos multibacilares, visto que, nesses pacientes há produção de altos títulos de anticorpos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Os anticorpos antígeno-específicos

denotam anticorpos obtidos de soro de pacientes que foram submetidos à precipitação com sulfato de amônio com subsequente purificação por cromatografia de afinidade em proteína-G e purificados frente a antígenos de *M. leprae* após *immunoblotting*. Todo o processo resultou na concentração e purificação de anticorpos de imunoglobulinas inespecíficas. O emprego de tais anticorpos antígeno-específicos para seleção de peptídeos em bibliotecas de fagos possibilita maior oportunidade de encontrar peptídeos miméticos (mimotopos) de antígenos micobacterianos.

Duas estratégias de biosseleção foram empregadas, na estratégia I, as bibliotecas de fagos foram inicialmente depletadas de fagos reativos a imunoglobulinas de pacientes tuberculosos por incubação dos fagos das bibliotecas com imunoglobulinas anti-*M. tuberculosis* imobilizadas em imunotubos, com o propósito de prevenir a seleção de mimotopos inespecíficos. Os fagos não ligados foram usados no primeiro ciclo de seleção com imunoglobulinas anti-*M. leprae*. Na estratégia II, os fagos das bibliotecas foram usados diretamente no primeiro ciclo de seleção com imunoglobulinas anti-*M. leprae*.

Geralmente, a determinação no número de fagos de entrada (fago *input*) e o número de fagos de saída (fago *output*) permite avaliar a eficiência de seleção de uma biblioteca. A biblioteca não selecionada é altamente diversa e contém pequeno número de ligantes específicos ao alvo e a cada ciclo de seleção o número de fagos específicos tende a aumentar (enriquecimento) com consequente aumento no número de fagos de saída (GOODYEAR; SILVERMAN, 2005). Em ambas as estratégias foi observado aumento do número de fagos de saída. Porém, recomenda-se o monitoramento do enriquecimento por ELISA (GOODYEAR; SILVERMAN, 2005). A cada ciclo de seleção pode-se observar um aumento na reatividade do *pool* de fagos frente a imunoglobulinas G de pacientes para ambas as estratégias. O terceiro e quarto ciclos de seleção mostraram reatividades semelhantes por ELISA, porém o último ciclo de seleção foi empregado para a seleção de clones por apresentar maior número de fagos de saída.

A análise de clones individuais do quarto ciclo de seleção por ELISA permitiu a identificação de clones mais reativos com imunoglobulinas G de pacientes hansenianos. A sequência peptídica dos clones positivos foi determinada por sequenciamento do inserto no DNA do fago, o qual revelou sete sequências diferentes. Os fagos correspondentes a essas sequências foram amplificados para

testá-los com soro de pacientes hansenianos e controles. Dentre os fagos avaliados, três foram selecionados por possibilitarem a identificação de maior número de pacientes em comparação aos controles.

Como esperado, diferentes estratégias resultaram na seleção de diferentes clones de fagos. Por sua vez, muitas variáveis contribuem na constituição da subpopulação de fagos recuperada no final da biosseleção. A seleção de clones de fagos de uma coleção é dependente da afinidade de interação entre o peptídeo expresso pelo fago e o ligante. Porém, se dois clones em uma mesma biblioteca possuem a mesma afinidade, mas diferentes níveis de expressão, o mais altamente expresso será preferencialmente selecionado. Além disso, se dois clones de mesma afinidade apresentam diferentes taxas de crescimento, haverá uma tendência de recuperação do clone de maior rendimento (MCCAFFERTY, 1996). Apesar de uma das estratégias incluir etapa de depleção de fagos de reação cruzada, ocorreu a seleção de fagos reativos em pacientes com tuberculose, indicando que um único passo de depleção não foi suficiente para remover todos os fagos inespecíficos.

Curiosamente, foi observado que fagos carregando a mesma sequência consenso (fagos 4A, 5A e 6A), porém, com diferentes sequências flanqueadoras, mostraram diferentes reatividades com amostras de soro de pacientes e controles, indicando um papel importante das regiões flanqueadoras da sequência consenso na ligação com anticorpo. Observações semelhantes foram relatadas por Irving, Pan e Scott (2001).

As sequências peptídicas dos fagos mais reativos foram sintetizadas quimicamente e avaliadas em *pool* frente a soros de pacientes e controles por ELISA. Diferenças na reatividade entre fagos e os correspondentes peptídeos solúveis foram observadas ao comparar os resultados do teste ELISA com fagos versus teste ELISA com peptídeos (FIGURAS 10 e 12, APÊNDICE 5). Minenkova *et al.* (2001) ao selecionarem peptídeos ligantes de anticorpos anti-HCV (vírus da hepatite C) a partir de bibliotecas de fagos, também encontraram peptídeos sintéticos cujas sequências correspondentes àquelas apresentadas na superfície de fagos perderam a capacidade de detectar pacientes infectados. A hipótese levantada pelos autores foi que os peptídeos não reproduzem o sistema de apresentação em múltiplas cópias encontrado nos fagos.

Outra possível explicação decorre do fato que peptídeos, quando apresentados em fagos, assumem uma configuração que os colocam em uma

posição favorável para atuar como um ligante (KISHCHENKO; BATLIWALA; MAKOWSKI, 1994) e, portanto, essa forma de apresentação pode desaparecer quando usados como peptídeos sintéticos. Do mesmo modo, a conformação do peptídeo expresso na superfície do fago poderá desfavorecer o reconhecimento por anticorpos e quando na forma de peptídeo livre sua configuração se torna acessível a ligação a anticorpos. Outra hipótese que não pode ser descartada é o reconhecimento inespecífico de proteínas do próprio fago por anticorpos no soro.

O emprego de peptídeos sintéticos em imunoenaios é mais atrativo quando comparado a fagos. A produção em larga escala de reagentes como fagos apresenta problemas de contaminação microbiológica, reprodutibilidade, controle de qualidade, purificação e custos de produção, enquanto a produção de peptídeos sintéticos é um processo mais controlável (MINENKOVA *et al.*, 2001). Além disso, pela tecnologia de *Phage Display* estar protegida por patente, o uso das bibliotecas de fagos requer o estabelecimento de contratos de licença (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

No presente estudo, o teste de ELISA com peptídeos sintéticos, permitiu detectar 52,2% (12/23) pacientes hansenianos multibacilares, enquanto nenhuma amostra de pacientes paucibacilares foi positiva pelo ensaio. Tanto no grupo de pacientes hansenianos multibacilares, que reconheceram os peptídeos, como no grupo de pacientes hansenianos multibacilares, que foram negativos com peptídeos, estão incluídos pacientes não tratados e em tratamento por um período de um a quatro meses. Também foi observado que pacientes na quarta dose de tratamento apresentaram títulos de anticorpos maiores que pacientes não tratados. Portanto, o tratamento, pelo menos no período de até quatro meses, não impediu a detecção de anticorpos frente aos peptídeos em amostras de soro.

Embora, todos os pacientes hansenianos estivessem infectados, com base na constatação clínica, a resposta humoral detectada por ELISA com peptídeos foi diferente entre os indivíduos. Foi observado que 47,8% (11/23) dos pacientes hansenianos multibacilares foram soronegativos. Estudos anteriores já vinham mostrando diferentes padrões de ligação a antígenos de *M. leprae* em análises de *immunoblot* com soro de pacientes hansenianos multibacilares (LEVIS *et al.*, 1986; Duthie *et al.*, 2008). Quando peptídeos derivados de proteína de *M. leprae* foram utilizados em teste de ELISA foi observado que alguns indivíduos foram reativos com peptídeos e que esses indivíduos mostraram preferências distintas aos

peptídeos testados (SPENCER *et al.*, 2004). Essa variação interindividual no reconhecimento de antígenos também foi relatada em outras doenças como tuberculose (LYASHCHENKO *et al.*, 1998).

A ausência de resposta aos peptídeos frente a soro de pacientes hansenianos pode resultar de vários fatores. Um desses fatores é o *background* genético do indivíduo infectado. O desenvolvimento de uma resposta imune humoral depende células T CD4<sup>+</sup> e sua posterior diferenciação em células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2 é influenciada, entre outros fatores, por haplótipos MHC (*Major Histocompatibility Complex*) (LIEW, 2001). Respostas a antígenos micobacterianos são HLA restritos, de modo que diferentes indivíduos e populações respondem a diferentes determinantes (MEYER; MAY; STARK; 1998). Em camundongos infectados com *M. bovis* BCG foi observado que genes MHC afetam o repertório de anticorpos contra antígenos micobacterianos (HUYGEN *et al.*, 1993). Influências genéticas na resposta de anticorpos também foram encontradas em camundongos infectados com *M. leprae* (ADELEYE *et al.*, 1991).

Lyashchenko *et al.* (1998) sugerem para tuberculose que o reconhecimento heterogêneo de antígenos pode decorrer da produção de diferentes antígenos em diferentes estágios da doença. Outro fator sugerido como causa de diferenças na resposta entre indivíduos está relacionado a diferenças em cepas de *M. leprae* (DUTHIE *et al.*, 2007). Porém, estudos têm mostrado que diferentes cepas possuem genomas altamente conservados, o que significa que as variações antigênicas seriam insignificantes (MONOT *et al.*, 2009).

Em vista das diferenças na resposta humoral entre indivíduos sugere-se que testes sorológicos para hanseníase sejam baseados na combinação de antígenos para permitir a detecção de maior número de pacientes infectados. Essas considerações são consistentes com observações feitas por outros autores como Spencer *et al.* (2005), Aráoz *et al.* (2006), Geluk *et al.* (2008) e Geluk *et al.* (2009).

Quando se compara os resultados do teste ELISA com peptídeos com o teste ELISA com o antígeno PGL-I foi observado que o ensaio com PGL-I foi mais sensível, permitindo a detecção de todos os pacientes hansenianos multibacilares. Em um estudo de revisão sobre sorologia usando PGL-I, Moura *et al.* (2008) demonstraram uma soropositividade de 6,9-57,3% em pacientes paucibacilares e de 51,2-97,4% em pacientes multibacilares, indicando que testes baseados em PGL-

I detectam a maioria dos pacientes multibacilares e tem valor limitado na detecção de pacientes paucibacilares (SPENCER *et al.*, 2004).

Das amostras analisadas no presente estudo, anticorpos anti-PGL-I foram observados em dois pacientes tuberculosos e em um indivíduo de cada grupo de contatos e saudáveis. Resultados falso-positivos em áreas endêmicas têm sido relatados em taxas relativamente altas (>10%) (DUTHIE *et al.*, 2007). Em vista disso, o consenso atual é que os testes anti-PGL-I deveriam ser usados juntamente com parâmetros clínicos para auxiliar a classificação da hanseníase em multibacilar e paucibacilar (STEFANI, 2008).

O antígeno PGL-I nativo é muito limitado em termos de disponibilidade (YOUN *et al.*, 2004), pois depende do cultivo de *M. leprae* em tecidos de animais. A síntese química do epítipo antigênico de PGL-I e sua conjugação a albumina soro bovina (BSA) viabilizou sua aplicação em ensaios sorológicos (BÜHRER-SÉKULA, 2008). Porém, a síntese química do epítipo de PGL-I e sua ligação ao BSA é um processo que requer mais de 20 passos (YOUN *et al.*, 2004).

Nenhuma das amostras de contatos e indivíduos sadios foi considerada positiva com o teste ELISA usando peptídeos, o que indica, apesar de necessidade da confirmação dos resultados em um amplo estudo, a utilidade dos peptídeos em diagnóstico. Os peptídeos também não se mostraram reativos a nenhum dos soros produzidos em coelhos frente a diferentes espécies de micobactérias. Embora os resultados obtidos com soros de animais possam não ser extrapolados para humanos, Spencer *et al.* (2004) demonstraram que os peptídeos reativos com amostras de soros de origem humana foram também reativos com amostras de soro de coelhos. A reação cruzada observada em pacientes tuberculosos não implica na restrição dos peptídeos selecionados em diagnóstico, uma vez que o diagnóstico para hanseníase deve resultar da combinação de testes como PCR e ensaios de célula T associados ao exame clínico (ASEFFA *et al.*, 2005) bem como outros testes relacionados a tuberculose que auxiliariam no diagnóstico diferencial. Estudos futuros poderão ser realizados para avaliar outros formatos de teste ELISA ou outros métodos de diagnóstico, de modo a eliminar as reações inespecíficas observadas, como por exemplo, uso de peptídeos biotinilados para posterior imobilização em placas revestidas com estreptavidina.

De modo ideal, um teste sorológico deveria abranger todos os pacientes hansenianos, neste caso os pacientes multibacilares, uma vez que esse grupo de

pacientes produz anticorpos, propósito este que poderá ser atingido com a identificação de outros antígenos que combinados aos então identificados proporcionarão aumentar a sensibilidade do teste. Visto que pacientes paucibacilares desenvolvem forte imunidade celular ao *M. leprae* e baixa produção de anticorpos, um teste laboratorial para o diagnóstico da doença paucibacilar deverá se basear na detecção da imunidade celular (STEFANI, 2008).

O quadro apresentado abaixo faz uma comparação em termos de sensibilidade e especificidade entre alguns métodos utilizados e propostos em diagnóstico da hanseníase.

| MÉTODO                                                    | RESPOSTA IMUNE | SENSIBILIDADE                   | ESPECIFICIDADE              | REFERÊNCIA                                       |
|-----------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------|
| Baciloscopia                                              | -              | 38,3%                           | 100%                        | Brasil (2011)<br>Patrocínio <i>et al.</i> (2005) |
| PCR em tempo real                                         | -              | 50%(PB)–100%(MB)                | 100%                        | Rudeeaneksin <i>et al.</i> (2008)                |
| Sorologia PGL-I                                           | Humoral        | 6,9-57,3%(PB)<br>51,2-97,4%(MB) | 1,9-18,4%(C),<br>1,3-27%(S) | Moura <i>et al.</i> (2008)                       |
| Proteínas recombinantes (ML0405) (ELISA)                  | Humoral        | 69%(PB)–87%(MB)                 | 4%(C), 3%(S),<br>12%(TB)    | Duthie <i>et al.</i> (2007)                      |
| Proteínas recombinantes (ML0405, ML2055) (INF- $\gamma$ ) | Celular        | 95%(PB)                         | 80%(C)                      | Sampaio <i>et al.</i> (2011)                     |
| Peptídeos (ELISA)                                         | Humoral        | 52,2%(MB)                       | 0%(C), 0%(S),<br>16,7%(TB)  | Neste trabalho                                   |

QUADRO 6 – SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EM HANSENÍASE

NOTA: PB, pacientes hansenianos paucibacilares; MB, pacientes hansenianos multibacilares; TB, pacientes tuberculosos; C, contatos; S, indivíduos sadios.

A sensibilidade da baciloscopia é muito baixa e pode variar de 10% a não mais que 50% na detecção de *M. leprae* (PATROCÍNIO *et al.*, 2005). Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2009, apenas em 53,7% dos casos novos foi realizada a baciloscopia e dentre os que efetuaram o exame o resultado foi positivo em 38,3% (BRASIL, 2011). Contudo, é questionável a especificidade do exame baciloscópico, uma vez que há outras espécies de micobactéria que morfologicamente podem ser confundidas e não é possível chegar a espécie por observação ao microscópio. Técnicas baseados em PCR se mostram mais sensíveis que o exame baciloscópico (MARTINEZ *et al.*, 2006), porém, ainda são técnicas de alto custo o que dificulta seu uso no serviço público e em grande escala. O emprego

de métodos sorológicos baseados em PGL-I, ou mesmo em proteínas recombinantes, resulta em reações cruzadas em indivíduos saudáveis (DUTHIE *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2008). Testes que avaliam a produção de INF- $\gamma$  detectam além de pacientes paucibacilares, contatos de pacientes hansenianos (SAMPAIO *et al.*, 2011). Portanto, não discriminam infecção de exposição ao *M. leprae*. Os peptídeos, descritos no presente estudo, quando usados em ensaios sorológicos apresentam sensibilidade de 52,2% na detecção de pacientes multibacilares e ao contrário dos de mais antígenos, não mostram reatividade em indivíduos saudáveis. Esse resultado, mostra o uso potencial dos peptídeos em diagnóstico de infecção. Além disso, peptídeos sintéticos se mostram muito atraentes para uso em testes diagnósticos por várias razões (ARÁOZ *et al.*, 2006). A primeira seria a reprodutibilidade na produção do antígeno. A segunda vantagem seria o controle de qualidade que pode ser feito reduzindo riscos de inoculação de proteína humana como é o caso do teste de Mitsuda. Enfim, deve-se levar em consideração a pureza, pois esses antígenos se ligariam apenas no alvo direcionado ao *M. leprae*.

Visto que os peptídeos reagem com soro de pacientes hansenianos, o próximo passo foi decifrar a contribuição de cada resíduo de aminoácido da sequência no reconhecimento pelo anticorpo. Para isso, uma série de análogos de alanina para cada uma das sequências de peptídeos identificadas foram sintetizados por *Spot Synthesis*. A substituição de cada aminoácido por vez por uma alanina e comparando a reatividade de cada peptídeo com a reatividade da sequência original apontou qual cadeia lateral de aminoácido não poderia ser alterada por um simples grupo metil, a cadeia lateral da alanina. Para o peptídeo 5A, os aminoácidos críticos para o reconhecimento por anticorpos foram prolina (posição 2, na sequência do peptídeo), aspartato (posição 4) e alanina (posição 6). Quando alanina estava presente na posição de geração do análogo, o resíduo de alanina foi substituído por serina e foi o que ocorreu na posição 6 na sequência do peptídeo 5A. A modificação do resíduo de alanina por serina reduziu a reatividade do peptídeo análogo para 40% quando comparado com o peptídeo original. O peptídeo 6A não apresentou qualquer reatividade, diferentemente do que ocorreu em teste ELISA. Uma possível explicação para o fato é que na adsorção em superfícies e em meio a soluções aquosas, peptídeos podem assumir múltiplas configurações e algumas das quais podem ser favoráveis para ligação com o anticorpo. Na síntese química em membranas, a flexibilidade conformacional pode ser restringida, diminuindo a

afinidade do peptídeo ao anticorpo. Essas considerações são consistentes com observações feitas por Van Regenmortel (2001) que informa resultados conflitantes quanto a antigenicidade de peptídeos em virtude de diferentes conformações assumida pelos mesmos em diferentes imunoensaios. Peptídeo1B mostrou baixa reatividade, mas suficiente para a identificação dos aminoácidos importantes para interação com anticorpo. Os resultados indicam que os aminoácidos da região C terminal foram responsáveis pela ligação com anticorpo. Por essa porção da sequência estar imobilizada a membrana, dificultou a acessibilidade do anticorpo aos aminoácidos e, logo, provavelmente justificando a pouca reatividade dos peptídeos derivados de 1B em ensaio em membrana. Confrontando com os resultados de bioinformática, os aminoácidos da região C terminal foram justamente aqueles emparelhados com sequências em micobactérias reforçando que de fato esses aminoácidos são requeridos para o reconhecimento pelo anticorpo.

No campo da pesquisa em hanseníase, há uma grande busca de novos antígenos para o diagnóstico que possam ser associados ao antígeno PGL-I para aumentar sua especificidade e especialmente sua sensibilidade para a hanseníase paucibacilar (STEFANI, 2008). Na pesquisa de antígenos confia-se em reagentes para análises sorológicas e em ensaios de célula T baseados na produção de INF- $\gamma$ .

Muitos antígenos, incluindo proteínas e peptídeos, foram identificados, porém as limitações de aplicação em diagnóstico são a baixa sensibilidade na detecção de pacientes hansenianos e resultados falso-positivos em decorrência de reações cruzadas com outras espécies de micobactérias. Até mesmo na era pós-genômica em que análises de genômica comparativa *in silico* e programas de bioinformática são usados para a seleção de proteínas exclusivas em *M. leprae* tem resultado na identificação de antígenos de reatividade cruzada. Diferentemente, esse trabalho mostra que antígenos encontrados em outras espécies de micobactérias se revelaram candidatos promissores em diagnóstico.

Testes cutâneos seguem como outra ferramenta imunológica com o propósito de diagnosticar exposição ao *M. leprae*. Esses testes se apóiam na resposta imune celular e como tal correlacionam-se com os testes que determinam a produção de INF- $\gamma$  (BRAHMBHATT *et al.*, 2002). Células de *M. leprae*, derivadas de diferentes origens e submetidas a diferentes processos de purificação são a base para diferentes tipos de preparações usadas em testes cutâneos. Dessas preparações, a mais usada é a lepromina que corresponde uma suspensão de

bacilos autoclavados. A resposta a lepromina não é específica para hanseníase, pois muitos indivíduos não expostos ao *M. leprae* desenvolvem uma reação positiva (SCOLLARD *et al.*, 2006), porém, a lepromina tem utilidade na classificação da doença (BRAHMBHATT *et al.*, 2002). Até o momento, nenhum antígeno para uso em teste cutâneo foi determinado como satisfatoriamente sensível e específico para esse fim (SCOLLARD *et al.*, 2006). Logo, é necessário o desenvolvimento de reagentes mais específicos. Testes cutâneos poderiam ser úteis em programas de controle em hanseníase e em estudos epidemiológicos (LEMASTER; ROCHE, 2000), além de auxiliar o diagnóstico.

Os testes cutâneos são mais viáveis e úteis em relação aos ensaios de determinação de produção de INF- $\gamma$ , pois esses são dependentes do acesso a serviços de laboratório relativamente avançados e de pessoal treinado, o que limita a sua utilização em países com recursos limitados (LILLEBAEK *et al.*, 2009).

Uma alternativa ao uso de células totais ou frações purificadas de *M. leprae* é o emprego de peptídeos sintéticos. Estudos anteriores têm demonstrado respostas de hipersensibilidade do tipo tardio a peptídeos em testes cutâneos. Estrada *et al.* (1992) avaliaram a habilidade de peptídeos sintéticos derivados das proteínas 65kDa, 28kDa, 28kDa superóxido dismutase e 18kDa de *M. leprae* em induzir respostas de hipersensibilidade do tipo tardio em cobaias. Peptídeos derivados da proteína gp120 do vírus da imunodeficiência humana (HIV) foram capazes de induzir respostas de (DTH) em voluntários humanos infectados com HIV (SITZ *et al.*, 1999). Aagaard *et al.* (2004) avaliaram a capacidade de peptídeos derivados da proteína de Rv2654 de *M. tuberculosis* em induzir respostas de DTH em cobaias. Outro estudo, uma mistura de peptídeos derivados das proteínas ESAT-6, CFP-10, MPB83 e Rv3615c de *M. bovis/M. tuberculosis* induziram respostas de DTH em bovinos (WHELAN *et al.*, 2010).

Desde que uma resposta humoral é dependente de resposta de célula T, foi avaliado se os peptídeos identificados neste trabalho poderiam induzir uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em cobaias infectados com *M. leprae*. Cobais são o modelo animal empregado em teste de hipersensibilidade do tipo tardio com antígenos de *M. leprae*, conforme descrito por Mehra e Bloom (1979), Melancon-Kaplan *et al.* (1988), Mehra *et al.* (1992) e Brennan (2000). Dos peptídeos testados, o peptídeo 5A e peptídeo 1B produziram resposta celular, em dois e um animal, respectivamente. Observou-se que os peptídeos reagiram com três de um grupo de

cinco animais. Essa reatividade aos peptídeos não é resultado de uma sensibilização inadequada, pois todos os animais imunizados produziram respostas a mitsudina. Esses resultados provavelmente se devem a influência de fatores genéticos na respostas dos animais aos peptídeos. Trabalhos anteriores também mostraram padrões semelhantes de reatividade como, por exemplo, os mostrados por Estrada *et al.* (1992) e Mackall *et al.* (1993). Como forma de aumentar a frequência de respondedores outros peptídeos poderiam ser identificados a fim de compor uma mistura para superar problemas de restrição genética a peptídeos individuais.

Outros fatores que necessitam ser mais avaliados quanto a resposta celular são dose e constituição do antígeno. Estrada *et al.* (1993) e Sitz *et al.* (1999) encontraram diferenças quanto a dose do peptídeo inoculado na resposta de DTH. Outros estudos testaram peptídeos na forma de peptídeos conjugados a proteínas (KEL *et al.*, 2008) ou como peptídeos modificados por adição de ácidos graxos e acetilação (OETTINGER; HOLM; HASLOV, 1997).

A mitsudina é provavelmente o único antígeno de teste cutâneo que reflete a habilidade de um indivíduo gerar uma resposta granulomatosa a antígenos micobacterianos, em oposição a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio de 48-72 horas encontrada com a tuberculina e outros testes cutâneos (SCOLLARD *et al.*, 2006). No teste de Mitsuda, a reação de Fernandez se assemelha a reação provocada pela tuberculina, uma vez que avalia a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio do indivíduo a antígenos solúveis de *M. leprae* (BRENNAN, 2000). Nesse sentido, esse estudo propõe o emprego de peptídeos em testes cutâneos na avaliação da resposta celular em indivíduos tal como o teste de Mantoux é usado em tuberculose. Dificilmente outros reagentes produzirão uma resposta em indivíduos tão peculiar como aquela encontrada com a utilização de mitsudina, um antígeno complexo e cuja reação de Mitsuda é geneticamente controlada. No entanto, face a difícil obtenção de antígenos outros testes têm que ser buscados.

Além de estudos *in vivo*, os peptídeos identificados poderão ser avaliados, futuramente, quanto à produção de INF- $\gamma$  por células mononucleares do sangue periférico obtidas de pacientes a fim de verificar se esses reagentes permitem a detecção da doença paucibacilar.

Tendo verificado que os peptídeos são capazes de reagir com amostras de soro de pacientes hansenianos, o próximo passo do estudo foi caracterizar o

antígeno original em *M. leprae*. Para isso, inicialmente, foram produzidos anticorpos antipeptídeos em camundongos e estes em seguida, foram utilizados em um *Western Blotting* de um gel bidimensional com o extrato total de *M. leprae*. Os resultados indicaram que todos os peptídeos foram imunogênicos e produziram idênticos padrões de reatividade em *Western Blotting*, indicando que os peptídeos compreendem epítomos de uma única proteína. Os dados obtidos por bioinformática emergem para uma proteína de 31kDa com pI de 4,9, que por sua vez, se correlacionam com os parâmetros estimados experimentalmente. Apesar de não ter sido possível ainda uma confirmação por espectrometria de massa e imunoprecipitação, os resultados indicam que a proteína se trata do antígeno 85-B de *M. leprae*.

O antígeno 85-B juntamente com o antígeno 85-A e antígeno 85-C formam o complexo antígeno 85 (WILKER; HARBOE, 1992). As proteínas do complexo antígeno 85 são proteínas secretadas, estreitamente relacionadas que mostram alto grau de homologia em diferentes espécies de micobactérias (PESSOLANI; BRENNAN, 1992). Esses antígenos possuem atividade ácido micólico transferase e estão envolvidas na biossíntese da parede celular (BELISLE *et al.*, 1997). São também proteínas ligantes de fibronectina (ABOU-ZEID *et al.*, 1988) e associadas com a patogenicidade (WILLIAMS *et al.*, 2004).

Resposta humoral ao antígeno 85 de *M. bovis* BCG em teste ELISA foi detectada em pacientes hansenianos lepromatosos, enquanto pacientes tuberculosos apresentaram reatividade menor e que foi comparável aquela de controles saudáveis (PESSOLANI *et al.*, 1991). Anticorpos anti antígeno 85 de *M. tuberculosis* foram detectados em pacientes com hanseníase lepromatosa como também em pacientes com tuberculose em teste ELISA e em análise de *Western Blotting* (ESPITA *et al.*, 1992). Pessolani *et al.* (1992) demonstraram que o antígeno 85B é o principal componente do complexo em *M. leprae*, pois, inicialmente proteínas de *M. leprae* seletivamente reagiram com soro anti-BCG 85B e não com anti-BCG 85A ou soro anti-BCG 85C e, posteriormente, quando o perfil do complexo antígeno 85 de *M. leprae* revelado por eletroforese bidimensional seguido de *Western Blotting* foi comparado com o perfil do complexo antígeno 85 de *M. bovis* BCG, três proteínas ácidas de 30kDa, consistindo de isoformas do componente 85B, foram predominantes. O grupo, em estudo anterior, mostrou que títulos maiores de anticorpos foram detectados com antígeno 85B em comparação com o antígeno

85A, sugerindo então que a resposta humoral ocorre predominantemente contra a proteína 85B em *M. leprae* (PESSOLANI *et al.*, 1991).

Fazendo uma comparação com *M. tuberculosis*, Samanich, Belisle e Laal (2001) mostraram forte reatividade entre soro de pacientes tuberculosos e os três componentes do complexo antígeno 85 em análise de *Western Blotting* de gel bidimensional com proteínas de *M. tuberculosis*. Porém, é importante notar que as proteínas usadas no ensaio foram derivadas de uma cultura de micobactérias cultivada *in vitro*. Entretanto, sabe-se que em cultura a quantidade produzida de antígeno 85B é maior que aquela para o antígeno 85A e esta por sua vez é maior que aquela para o antígeno 85C (HARTH, 1996). Portanto uma comparação em nível de expressão do antígeno 85 com estudos de Pessolani *et al.* (1991 e 1992) não é concebível pois naqueles trabalhos proteínas de *M. leprae* advinham de células crescidas *in vivo*.

Os antígenos do complexo 85 além de desencadear uma resposta humoral também causam uma resposta de célula T. Nagai *et al.* (1991) relataram que o antígeno 85B induziu reação de hipersensibilidade do tipo tardio em cobaias sensibilizadas com *M. tuberculosis* e nenhuma resposta foi observada com o antígeno 85A. Launois *et al.* (1991) mostram respostas de proliferação e produção de INF- $\gamma$  ao antígeno 85 de *M. bovis* BCG em pacientes hansenianos tuberculóide e controles saudáveis Mitsuda positivo. Embora os dados dos trabalhos acima mostrem epítomos de reação cruzada do antígeno 85 entre *M. leprae* e outras espécies de micobactérias, epítomos espécie-específicos também foram detectados (LAUNOIS *et al.*, 1994).

Esse estudo levou a identificação de um antígeno anteriormente avaliado. Naqueles estudos, o antígeno foi testado como molécula total e como os trabalhos mais recentes buscam antígenos exclusivos, o antígeno 85B deixou de ser explorado. O antígeno 85B foi aqui avaliado na forma de peptídeos, o que previne resultados inespecíficos observados com a proteína total e, além disso, esses peptídeos não compreendem epítomos verdadeiros, mas sim epítomos miméticos de antígenos micobacterianos com capacidade de ligação a anticorpos de pacientes hansenianos. Dois métodos de seleção de mimotopos foram utilizados, porém uma variedade de outros métodos são descritos (BRATKOVIC, 2010). A utilização desses protocolos, como também de muitos outros que poderão ser desenvolvidos, permitirão a identificação de novos peptídeos, cujas sequências podem mimetizar

antígenos conhecidos de *M. leprae*, podendo ser protéicos como não-protéicos, ou mesmo antígenos nunca antes relatados. Essa última vantagem da técnica de *Phage Display* é especialmente valiosa, pois, dado o processo de obtenção de células de *M. leprae* de tecidos animais, muitos antígenos perderam possivelmente a possibilidade de serem caracterizados. Além do que, a identificação de novos peptídeos é necessária a fim de aumentar a sensibilidade de detecção de pacientes hansenianos bem como, permitir o diagnóstico precoce de pacientes infectados.

Além de métodos de diagnóstico precoce, tratamento poliquimioterápico aos pacientes, o controle da hanseníase também depende de uma vacina eficaz. A vacinação BCG na hanseníase tem mostrado eficácia, porém o grau de proteção varia entre os estudos e não se sabe o real grau de proteção. Vacinas bacterianas vivas mostram algum grau de proteção, mas seu uso é limitado no que tange a segurança e produção. O uso de *M. leprae* ou de seus antígenos, os quais conferem proteção em animais, é limitado pela disponibilidade desses reagentes. Alguns antígenos recombinantes mostraram proteção em animais, porém muitos resultados são inconsistentes. Muitos desses antígenos não foram avaliados em pacientes e nem terão seu uso aprovado em humanos devido sua alta homologia com proteínas humanas. Com o sequenciamento do genoma de *M. leprae* e de outras micobactérias, ferramentas de biologia molecular e de bioinformática têm permitido a identificação de antígenos em *M. leprae* que podem ser úteis em vacinação (RAMAN *et al.*, 2009). Nesse campo da pesquisa em hanseníase, a técnica de *Phage Display* também se apresenta com uma ferramenta no desenvolvimento de vacinas. Testes futuros poderão ser realizados com o intuito de verificar se os peptídeos selecionados nesse estudo conferem proteção contra a hanseníase.

Trabalhos envolvendo a técnica de *Phage Display* e micobactérias já foram descritos. Youn *et al.* (2004) identificaram um mimotopo do antígeno PGL-I de *M. leprae*, porém o peptídeo não foi eficiente em detectar anticorpos em soro de pacientes hansenianos. Gevorkian *et al.* (2005) identificaram mimotopos de carboidratos de superfície em *M. tuberculosis* e os mesmos se mostraram antigênicos e imunogênicos. Em outro estudo, Sharma *et al.* (2006) demonstraram a utilidade de mimotopos de lipoarabinomanana no diagnóstico de tuberculose e como agentes imunomoduladores. Barenholz *et al.* (2007) identificaram mimotopos de lipoarabinomanana manossilada de *M. tuberculosis* e um desses mimotopos se mostrou promissor para uso em testes sorológicos em tuberculose.

Em suma, a identificação de antígenos específicos em diagnóstico para hanseníase é um grande desafio que se inicia pela incapacidade de cultivo de *M. leprae* em meios de cultura aliado a diferentes formas clínicas da doença e influência de fatores genéticos na determinação da hanseníase e suas formas. Um antígeno ou uma combinação de antígenos, como a maioria dos grupos defende, deve contemplar a heterogênea resposta imune determinada pelo bacilo associado ao perfil imunológico e genético de cada indivíduo. Pelo exposto, a técnica de *Phage Display* se apresenta como uma metodologia promissora na identificação de outros antígenos que junto aos identificados no presente estudo possam detectar especificamente indivíduos infectados em diferentes populações em áreas, principalmente, endêmicas.

No futuro, os peptídeos selecionados neste trabalho, conjuntamente com os peptídeos que serão identificados, poderão compor um novo produto. Com os resultados obtidos neste trabalho, duas possibilidades de produtos são sugeridas: *kit* para o teste ELISA ou reagente de teste cutâneo. Porém, não são limitadas a essas duas possibilidades, pois poderiam ser usados, por exemplo, em exames de *dot blot* ou fluxo lateral.

Para os testes aqui sugeridos, os peptídeos poderiam ser fornecidos liofilizados e quando usados seriam apenas diluídos em tampões adequados. Ou ainda, os peptídeos poderiam ser disponibilizados já adsorvidos a placas para o teste ELISA. Os peptídeos para uso em testes podem ser facilmente obtidos e a baixo custo de produção por síntese química. O processo de produção desses reagentes é passível de industrialização após estabelecimento de infra-estrutura adequada. Os peptídeos são componentes estáveis, de fácil manipulação e, além disso, são caracterizados por apresentar reprodutibilidade no processo de produção. Dessa forma, produtos baseados em peptídeos são candidatos interessantes para uso em diagnóstico da hanseníase. Métodos simples, rápidos e precisos, que dependem da continuidade desse trabalho, são extremamente desejados, a fim de auxiliar no diagnóstico da doença, consequentemente contribuir no controle da endemia e proporcionar aos pacientes um diagnóstico precoce para que não tenham qualquer sequela física e psicológica que assolam muitos indivíduos infectados em todo o mundo.

## 6 CONCLUSÕES

1. A avaliação da reação antígeno-anticorpo para as diferentes micobactérias cultiváveis mostra que determinantes antigênicos são compartilhados entre espécies de micobactérias;
2. A técnica de *Phage Display* permitiu a seleção de sete mimotopos de antígenos micobacterianos a partir de bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos utilizando soros de pacientes hansenianos;
3. Entre sete sequências identificadas, três se mostraram promissoras por detectar maior número de pacientes em comparação aos controles;
4. Peptídeos sintéticos solúveis, correspondentes às sequências apresentadas em fagos, foram reativos com 52,2% (12/23) das amostras de pacientes hansenianos multibacilares por ELISA. Amostras de soro de pacientes hansenianos paucibacilares, bem como, de contatos intradomiciliares de pacientes hansenianos e indivíduos saudáveis não foram positivas pelo ensaio. Cinco de um total de trinta pacientes tuberculosos apresentaram teste positivo frente aos peptídeos;
5. Soros policlonais antimicobactérias cultiváveis produzidos em coelhos não foram reconhecidos por peptídeos em ensaios de ELISA;
6. Peptídeos sintéticos quando conjugados a proteína carreadora BSA foram capazes de induzir a produção de anticorpos em animais;
7. Proteínas de *M. leprae* de cerca de 30 kDa foram reconhecidas por anticorpos anti-peptídeos em análise de *Western Blotting*;
8. O mesmo padrão de reatividade foi observado com os três anticorpos anti-peptídeos em análise de *Western Blotting* de um gel bidimensional do extrato solúvel total de *M. leprae*;
9. A caracterização da proteína em *M. leprae* por espectrometria de massa a partir de gel bidimensional ou mesmo de imunoprecipitação não foi possível, porém dados de bioinformática aliado aos resultados experimentais apontam para o antígeno 85-B de *M. leprae*;
10. Teste de reação de hipersensibilidade do tipo tardio em cobaias mostrou evidências que os peptídeos são indutores de células T, indicando assim, potencial utilidade dos mesmos em testes cutâneos.

## REFERÊNCIAS

AAGAARD, C. *et al.* Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654: two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n. 5, p. 812-819, mar. 2004.

ABEL, L. *et al.* Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 177, n. 1, p. 133-145, jan. 1998.

ABOU-ZEID, C. *et al.* Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, n. 12, p. 3046-3051, dec. 1988.

ADAMS, L.B.; JOB, C. K.; KRAHENBUHL, J. L. Role of inducible nitric oxide synthase in resistance to *Mycobacterium leprae* in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 9, p. 5462-5465, sept. 2000.

ADAMS, L. B. *et al.* The study of *Mycobacterium leprae* infection in interferon-gamma gene-disrupted mice as a model to explore the immunopathologic spectrum of leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 185 (suppl. 1), p. S1-S8, feb. 2002.

ADELEYE, T. A. *et al.* The antibody repertoire to proteins of *Mycobacterium leprae*. Genetic influences at the antigen and epitope level. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 147, n. 6, p. 1947-1953, sept. 1991.

AKAMA, T. *et al.* Whole-genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and noncoding regions. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, n. 10, p. 3321-3327, may 2009.

ALBAN, S. M. *et al.* PCR-restriction fragment length polymorphism analysis as a tool for *Mycobacterium* species identification in lepromas for lepromin production. **Leprosy Review**, London, v. 80, n. 2, p. 129-142, june 2009.

ALCAÏS, A. *et al.* Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 181, n. 1, p. 302-308, jan. 2000.

ALMEIDA, E. C. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 509-511, aug. 2004.

ALTER, A. *et al.* Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. **Human Genetics**, Berlin, v. 123, n. 3, p. 227-235, apr. 2008.

ALTER, A. *et al.* Leprosy as a genetic disease. **Mammalian Genome**, New York, v. 22, n. 1-2, p. 19-31, feb. 2011.

ARÁOZ, R. *et al.* Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 1, p. 175-182, jan. 2006a.

ARÁOZ, R. *et al.* Towards an immunodiagnostic test for leprosy. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 8, p. 2270-2276, july 2006b.

ARNOLDI, J. *et al.* Species-specific assessment of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies by in situ hybridization and polymerase chain reaction. **Laboratory Investigation**, New York, v. 66, n. 5, p. 618-623, may 1992.

ASEFFA, A. *et al.* Report on the first meeting of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) consortium held at Armauer Hansen Research Institute, ALERT, Addis Ababa, Ethiopia on 24-27 October 2004. **Leprosy Review**, London, v. 76, n. 2, p. 147-159, june 2005.

AZZAZY, H. M.; HIGHSMITH, E. E. Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, Tarrytown, v. 35, n. 6, p. 425-445, sept. 2002.

BARENHOLZ, A. *et al.* A peptide mimetic of the mycobacterial mannosylated lipoarabinomannan: characterization and potential applications. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 56, p. 579-586, may 2007.

BECKHAM, S. A. *et al.* Characterization of a serine protease homologous to house dust mite group 3 allergens from the scabies mite *Sarcoptes scabiei*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 49, p. 34413-34422, dec. 2009.

BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Ciência e Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 117-128, 2002.

BELISLE, J. T. *et al.* Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. **Science**, Washington, v. 276, n. 5317, p. 1420-1422, may 1997.

BEYENE, D. *et al.* Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 131, n. 2, p. 841-848, oct. 2003.

BLEHARSKI, J. R. *et al.* Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. **Science**, Washington, v. 301, n. 5639, p. 1527-1530, sept. 2003.

BONETTO, S.; CARLAVAN, I.; BATY, D. Isolation and characterization of antagonist and agonist peptides to the human melanocortin 1 receptor. **Peptides**, New York, v. 26, n. 11, p. 2302-2313, nov. 2005.

BONNYCASTLE, L. L. *et al.* Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 258, n. 5, p. 747-762, may 1996.

BRAHMBHATT, S. *et al.* Human T cell responses to peptides of the *Mycobacterium leprae* 45-kD serine-rich antigen. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 128, n. 1, p. 140-148, apr. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hanseníase**: atividades de controle e manual de procedimentos. Brasília: Área Técnica de Dermatologia Sanitária, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Distribuição da hanseníase no Brasil**. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31200](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31200)>. Acesso em: 07/2/2011.

BRATKOVIC, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 5, p. 749-767, mar. 2010.

BRENNAN, P. J. Skin test development in leprosy: progress with first-generation skin test antigens, and an approach to the second generation. **Leprosy Review**, London, v. 71, p. suppl: S50-S54, dec. 2000.

BRETT, S. J. *et al.* Analysis of the major antigenic determinants of the characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 89-96, apr. 1984.

BRETT, S. J. *et al.* Use of synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 476-783, june 1986.

BRICARD, G.; PORCELLI, S. A. Antigen presentation by CD1 molecules and the generation of lipid-specific T cell immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 64, n. 4, p. 1824-1840, july 2007.

BRITTON, W. J. *et al.* *Mycobacterium leprae* antigens involved in human immune responses. I. Identification of four antigens by monoclonal antibodies. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 135, n. 6, p. 4171-4177, dec. 1985.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Lancet**, London, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, apr. 2004.

BÜHRER, S. S. *et al.* A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Nothbrook, v. 58, n. 2, p. 133-136, feb. 1998.

BÜHRER-SEKULA, S. Simple dipstick assay for semi-quantitative detection of neopterin in sera. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 238, n. 1-2, p. 55-58, apr. 2000.

BÜHRER-SÉKULA, S. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 5, p. 1991-1995, may 2003.

BÜHRER-SÉKULA, S. *et al.* The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. **Leprosy Review**, London, v. 78, n. 1, p. 70-79, mar. 2007.

BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia PGL-I na hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41 (suppl. 2), p. 3-5, 2008.

CALADO, K. L. S. *et al.* Positividade sorológica antiPGL-I em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80 (suppl. 3), p. S301-S306, nov./dec. 2005.

CARUS, N. H. *et al.* Relapse of *Mycobacterium leprae* infection with ocular manifestations. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 20, n. 4, p. 776-780, apr. 1995.

CHEMOUILLI, P. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* in nerve lesions by the polymerase chain reaction. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, Lawrence v. 64, n. 1, p. 1-5, mar. 1996.

CHIANG, K. C. *et al.* A novel peptide mimotope identified as a potential immunosuppressive vaccine for organ transplantation. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 182, n. 7, p. 4282-4288, apr. 2009.

CHUA-INTRA, B. *et al.* Predominant recognition of species-specific determinants of the GroES homologues from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*. **Immunology**, Oxford, v. 93, n. 1, p. 64-72, jan. 1998.

CLARK-CURTISS, J. E.; DOCHERTY, M. A. A species-specific repetitive sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 159, n. 1, p. 7-15, jan. 1989.

COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, Basingstoke, v. 409, p. 1007-1011, feb. 2001.

COLSTON, M. J.; HILSON, G. R. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. **Nature**, Basingstoke, v. 262, n. 5567, p. 399-401, july 1976.

DANIEL, T. M.; JANICKI, B. M. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 42, n. 1, p. 84-113, mar. 1978.

DUTHIE, M. S. *et al.* Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 11, p. 1400-1408, nov. 2007.

DUTHIE, M. S. *et al.* Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, n. 10, p. 1590-1597, oct. 2008.

DUTHIE, M. S. *et al.* Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 17, n. 2, p. 298-303, feb. 2010.

ESPITA, C. *et al.* High antibody levels to the mycobacterial fibronectin-binding antigen of 30-31 kD in tuberculosis and lepromatous leprosy. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 362-367, mar. 1992.

ESTRADA, I. C. *et al.* Use of synthetic peptides corresponding to sequences of *Mycobacterium leprae* proteins to study delayed-type hypersensitivity response in sensitized guinea pigs. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, Lawrence, v. 60, n. 1, p. 18-27, mar. 1992.

FERRARI, G. *et al.* A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. **Cell**, Cambridge, v. 97, n. 4, p. 435-447, may 1999.

FITNESS, J.; TOSH, K.; HILL, A.V. Genetics of susceptibility to leprosy. **Genes and Immunity**, Houndmills, v. 3, n. 8, p. 441-453, dec. 2002.

FITNESS, J. *et al.* Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 71, n. 3, p. 330-340, sept. 2004.

FREDERICKSON, S. *et al.* A rationally designed agonist antibody fragment that functionally mimics thrombopoietin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 39, p. 14307-14312, sept. 2006.

FROTA, C. C. *et al.* Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 104, n. 7, p. 490-495, july 2010.

GARNIER, T. *et al.* The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, june 2003.

GEIJTENBEEK, T. B. H. *et al.* Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. **Cell**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 575-585, mar. 2000.

GELUK, A. *et al.* Immunological crossreactivity of the *Mycobacterium leprae* CFP-10 with its homologue in *Mycobacterium tuberculosis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 66-70, jan. 2004.

GELUK, A. *et al.* Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 9, p. 5636-5644, sept. 2005.

GELUK, A. *et al.* Rational combination of peptides derived from different *Mycobacterium leprae* proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of *M. leprae* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, n. 3, p. 522-533, mar. 2008.

GELUK, A. *et al.* From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 16, n. 3, p. 352-359, mar. 2009.

GEVORKIAN, G. *et al.* Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. **The Biochemical Journal**, London, v. 387, p. 411-417, apr. 2005.

GILLIS, T. P.; BUCHANAN, T. M. Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 37, n. 1, p. 172-178, july 1982.

GODAL, T. Immunological aspects of leprosy: present status. **Progress in Allergy**, Basel, v. 25, p. 211-242, 1978.

GOODYEAR, C. S.; SILVERMAN, G. J. Phage-display methodology for the study of protein-protein interactions. In: GOLEMIS, E. A.; ADAMS, P. D. **Protein-protein interactions: a molecular cloning manual**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor, 2005, p.141-165.

GROATHOUSE, N. A. *et al.* Use of protein microarrays to define the humoral immune response in leprosy patients and identification of disease-state-specific antigenic profiles. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 11, p. 6458-6466, nov. 2006.

GUERRERO, M. I. *et al.* Desarrollo y aplicación de una prueba de RCP para detectar la infección subclínica por *Mycobacterium leprae*. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 11, n. 4, p. 228-234, abr. 2002.

GULIA, A.; FRIED, I.; MASSONE, C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. **F1000 Medicine Reports**, London, v. 2, n. 30, p. 1-5, apr. 2010.

HAGGE, D. A. *et al.* Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 174, n. 4, p. 1379-1389, apr. 2009.

HARKINS, K. R. Polyclonal antibodies. In: HOWARD, G. C.; BETHELL, D. R. **Basic methods in antibody production and characterization**. Boca Baton: CRC Press, 2000, p.141-168.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

HARTH, G. *et al.* Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, n. 8, p. 3038-3047, aug. 1996.

HARTSKEERL, R. A.; WIT, M. Y. L. de; KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 135, p. 2357-2364, sept. 1989.

HASTINGS, R. C. Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 1, n. 3, 330-348, july 1988.

HATTA, M. *et al.* Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 89, n. 4, p. 381-385, july/aug. 1995.

HELL, R. C. *et al.* Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 131, n. 1, p. 129-138, apr. 2009.

HOF, D. *et al.* A novel subtractive antibody phage display method to discover disease markers. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 5, n. 2, p. 245-255, feb. 2006.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 147, n. 3, p. 728-735, sep. 1981.

HUSSAIN, R. *et al.* Immune profiling of leprosy and tuberculosis patients to 15-mer peptides of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* GroES in a BCG vaccinated area: implications for development of vaccine and diagnostic reagents. **Immunology**, Oxford, v. 111, n. 4, p. 462-471, apr. 2004.

HUYGEN, K. *et al.* Influence of genes from the major histocompatibility complex on the antibody repertoire against culture filtrate antigens in mice infected with live *Mycobacterium bovis* BCG. **Infection and immunity**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2687-2693, june 1993.

INSTITUT PASTEUR. **GenoList**. Disponível em: <<http://genodb.pasteur.fr>>. Acesso em: 04/3/2011.

INTERNATIONAL CONGRESS LEPROLOGY, 6., 1953, Madrid. Classification: technical resolutions. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, Lawrence, v. 21, p. 504-516, 1953.

IRVING, M. B.; PAN, O.; SCOTT, J. K. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 5, n. 3, p. 314-324, june 2001.

IVANYI, J. *et al.* Definition of species specific and cross-reactive antigenic determinants of *Mycobacterium leprae* using monoclonal antibodies. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 528-536, june 1983.

JAMIESON, S. E. *et al.* Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. **Genes and Immunity**, Houndmills, v. 5, n. 1, p. 46-57, jan. 2004.

JARDIM, M. R. *et al.* Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. **Journal of Neurology**, Berlin, v. 250, n. 7, p. 806-809, july 2003.

JOB, C. K. *et al.* Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 78, n. 3, 518-521, mar. 2008.

KATOCH, V. M. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v. 120, p. 290-304, oct. 2004.

KEL, J. M. *et al.* Immunization with mannosylated peptide induces poor T cell effector functions despite enhanced antigen presentation. **International Immunology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 117-127, jan. 2008.

KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, Washington, v. 39, n. 3, p. 693-702, july/sept. 1971.

KISHCHENKO, G.; BATLIWALA, H.; MAKOWSKI, L. Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 241, n. 2, p. 208-213, aug. 1994.

KITADA, T. *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, Basingstoke, v. 392, n. 6676, p. 605-608, apr. 1998.

KOÇAK, M. *et al.* Associations between human leukocyte antigens and leprosy in the Turkish population. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 235-239, may 2002.

KRUTZIK, S. R. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 5, p. 525-532, may 2003.

KRUTZIK, S. R. *et al.* TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nature Medicine**, New York, v. 11, n. 6, p. 653-660, june 2005.

KURABACHEW, M.; WONDIMU, A.; RYON, J. J. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 5, p. 1352-1356, may 1998.

LAUNOIS, P. *et al.* T cell response to purified filtrate antigen 85 from *Mycobacterium bovis* Bacilli Calmette-Guérin (BCG) in leprosy patients. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 286-290, nov. 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Basingstoke, v. 227, n. 5259, p. 680-685, aug. 1970.

LAUNOIS, P. *et al.* T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3679-3687, sept. 1994.

LEE, D. J. *et al.* LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 179, n. 12, p. 8128-8136, dec. 2007.

LEMASTER, J. W.; ROCHE, P. Are we any closer to being able to measure leprosy exposure? **Leprosy Review**, London, v. 71, n. 1, p. 2-4, mar. 2000.

LEVIS, W. R. *et al.* Serodiagnosis of leprosy: relationships between antibodies to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I and protein antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 24, n. 6, p. 917-921, dec. 1986.

LIEW, F. Y. T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2 cells: a historical perspective. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 2, n. 1, p. 55-60, jan. 2002.

LILLEBAEK, T. *et al.* Risk of sensitization in healthy adults following repeated administration of rdSAT-6 skin test reagent by the Mantoux injection technique. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 89, n. 2, p. 158-162, mar. 2009.

LINI, N.; SHANKERNARAYAN, N. P.; DHARMALINGAM, K. Quantitative real-time PCR analysis of *Mycobacterium leprae* DNA and mRNA in human biopsy material from leprosy and reactional cases. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 58, p. 753-759, june 2009.

LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Medicine**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 26-29, july 2005.

LYASHCHENKO, K. *et al.* Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3936-3940, aug. 1998.

MACFARLANE, A. *et al.* Presence of human T-cell responses to the *Mycobacterium leprae* 45-kilodalton antigen reflects infection with or exposure to *M. leprae*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, n. 3, p. 604-611, may 2001.

MACKALL, J. C. *et al.* A comparison of the T cell delayed-type hypersensitivity epitopes of the 19-kD antigens from *Mycobacterium tuberculosis* and *Myco. intracellulare* using overlapping synthetic peptides. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 172-177, aug. 1993.

MARMOR, M. F. The ophthalmic trials of G. H. A. Hansen. **Survey of Ophthalmology**, New York, v. 47, n. 3, p. 275-287, may/june 2002.

MARQUES, M. A. M. *et al.* Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 10, p. 2942-2953, oct. 2004.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 9, p. 3154-3159, sept. 2006.

MARTINS, A. C. *et al.* Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 76, n. 5, p. 579-587, oct. 2010.

MAT, M. C., *et al.* The HLA association of lepromatous leprosy and borderline lepromatous leprosy in Turkey. A preliminary study. **International Journal of Dermatology**, Lewiston, v. 27, n. 4, p. 246-247, may 1988.

MCCAFFERTY, J. Phage display: factors affecting panning efficiency. In: KAY, B. B.; WINTER, J.; MACCAFFERTY, J. **Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual**. San Diego: Academic Press, 1996, p. 261-276.

MCKENZIE, K. R. *et al.* Sequence and immunogenicity of the 70-kDa heat shock protein of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 147, n. 1, p. 312-319, july 1991.

MEHRA, V.; BLOOM, B. R. Induction of cell-mediated immunity to *Mycobacterium leprae* in guinea pigs. **Infection and Immunity**, Washington, v. 23, n. 3, p. 787-794, mar. 1979.

MEHRA, V. *et al.* A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10-KD heat-shock cognate protein. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 175, n. 1, p. 275-284, jan. 1992.

MEISNER, S. J. *et al.* Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 65, n. 6, p. 733-735, dec. 2001.

MELANCON-KAPLAN, J. *et al.* Immunological significance of *Mycobacterium leprae* cell walls. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, n. 6, p. 1917-1921, mar. 1988.

MEYER, C. G.; MAY, J.; STARK, K. Human leukocyte antigens in tuberculosis and leprosy. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 148-154, apr. 1998.

MINENKOVA, O. *et al.* ADAM-HCV, a new-concept diagnostic assay for antibodies to hepatitis C virus in serum. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 268, n. 17, p. 4758-4768, sept. 2001.

MIRA, M. T. *et al.* Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nature Genetics**, New York, v. 33, n. 3, p. 412-415, mar. 2003.

MIRA, M. T. *et al.* Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, Basingstoke, v. 427, n. 6975, p. 636-640, feb. 2004.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 102, n. 6, p. 828-832, june 1994.

MOET, F. J. *et al.* Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Leprosy Review**, London, v. 75, n. 4, p. 310-326, dec. 2004.

MONOT, M. *et al.* On the origin of leprosy. **Science**, New York, v. 308, n. 5724, p. 1040-1042, may 2005.

MONOT, M. *et al.* Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nature Genetics**, New York, v. 41, n. 12, p. 1282-1289, dec. 2009.

MONTOYA, D. *et al.* Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 343-353, oct. 2009.

MORAES, M. O. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes and Immunity**, Houndmills, v. 5, n. 7, p. 592-595, nov. 2004.

MORAES, M. O. *et al.* Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, London, v. 77, n. 3, p. 189-202, sep. 2006.

MOREAU, V. *et al.* Discontinuous epitope prediction based on mimotope analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 1088-1095, may 2006.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 51, p. 417-426, sept. 2004.

MOURA, R. S. de *et al.* Leprosy serology using PGL-I: systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41(suppl. 2), p. 11-18, 2008.

MURRAY, R. A. *et al.* *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 178, n. 1, p. 338-344, jan. 2007.

NAGAI, S. *et al.* Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, n. 1, p. 372-382, jan. 1991.

OCHOA, M. T. *et al.* "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1<sup>+</sup> dendritic cells and CD209<sup>+</sup> macrophages. **The Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 128, n. 9, p. 2225-2231, sept. 2008.

OETTINGER, T.; HOLM, A.; HASLOV, K. Characterization of the delayed type hypersensitivity-inducing epitope of MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 499-503, may 1997.

PARKASH, O. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA for 36Kda protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 5, p.275-277, sept./oct. 2004.

PATROCÍNIO, L. G. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 311-316, jun. 2005.

PATTYN, S. R. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, Lawrence, v. 61, n. 3, p. 389-393, sept. 1993.

PESSOLANI, M. C. *et al.* Serology and leprosy: immunoassays comparing immunoglobulin G antibody responses to 28- and 30-kilodalton proteins purified from *Mycobacterium bovis* BCG. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 10, p. 2285-2290, oct. 1991.

PESSOLANI, M. C.; BRENNAN, P. J. *Mycobacterium leprae* produces extracellular homologs of the antigen 85 complex. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 11, p. 4452-4459, nov. 1992.

PESSOLANI, M. C. V. *et al.* Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 7, p. 677-684, june 2003.

RAMAN, V. S. *et al.* Vaccination with the ML0276 antigen reduces local inflammation but not bacterial burden during experimental *Mycobacterium leprae* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 77, n. 12, p. 5623-5630, dec. 2009.

RANQUE, B. *et al.* A recessive major gene controls the mitsuda reaction in a region endemic for leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 192, n. 8, p. 1475-1482, oct. 2005.

RANQUE, B. *et al.* Genomewide linkage analysis of the granulomatous mitsuda reaction implicates chromosomal regions 2q35 and 17q21. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 196, n. 8, p. 1248-1252, oct. 2007.

REECE, S. T. *et al.* ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 13, n. 3, p. 333-340, mar. 2006.

REES, R. J. *et al.* Experimental lepromatous leprosy. **Nature**, Basingstoke, v. 215, n. 5101, p. 599-602, aug. 1967.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, Washington, v. 34, n. 3, p. 255-273, july/sept.1966.

RIVOIRE, B. *et al.* Chemical definition, cloning, and expression of the major protein of the leprosy bacillus. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 6, p. 2417-2425, june 1994.

ROSENKRANDS, I. *et al.* Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 21, n. 17, p. 3740-3756, nov. 2000.

ROY, S. *et al.* Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 176, n. 2, p. 530-532, aug. 1997.

ROY, S. *et al.* Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 179, n. 1, p. 187-191, jan. 1999.

RUDEEANEKSIN, J. *et al.* LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 263-270, nov. 2008.

SAMANICH, K.; BELISLE, J. T.; LAAL, S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 7, p. 4600-4609, july 2001.

SAMPAIO, L. H. *et al.* Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 11, n. 26, p. 1-11, jan. 2011.

SANTOS, A. R. *et al.* Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 39, n. 4, p. 298-304, oct. 1993.

SANTOS, A. R. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, Lawrence, v. 68, n. 3, p. 325-327, sept. 2000.

SANTOS, A. R. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 11, p. 1687-1691, dec. 2002.

SAPKOTA, B. R. *et al.* Development and evaluation of a novel multiple-primer PCR amplification refractory mutation system for the rapid detection of mutations conferring rifampicin resistance in codon 425 of the *rpoB* gene of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 57, p. 179-184, feb. 2008.

SCOTCHER, M. C. *et al.* Epitope characterization and variable region sequence of f1-40, a high-affinity monoclonal antibody to botulinum neurotoxin type a (Hall strain). **Plos One**, San Francisco, v. 4, n. 3, p. e4924, mar. 2009.

SCOLLARD, D. M. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 2, p. 338-381, apr. 2006.

SHAMSI, F. A. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* in ocular tissues by histopathology and real-time polymerase chain reaction. **Ophthalmic Research**, Basel, v. 39, n. 2, p. 63-68, feb. 2007.

SHARMA, A. *et al.* Specific and randomly derived immunoactive peptide mimotopes of mycobacterial antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 13, n. 10, p. 1143-1154, oct. 2006.

SHAW, M. A. *et al.* Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. **Genes and Immunity**, Houndmills, v. 2, n. 4, p. 196-204, june 2001.

SHEPARD, C. C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 112, p. 445-454, sept. 1960.

SHIMURA, H. *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nature Genetics**, New York, v. 25, n. 3, p. 302-305, july 2000.

SIDDIQUI, M. R. *et al.* A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nature Genetics**, New York, v. 27, n. 4, p. 439-441, apr. 2001.

SIDHU, S. S.; KOIDE, S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 17, n. 4, p. 481-487, aug. 2007.

SILVA, R. C. da *et al.* Comportamento dos testes sorológicos ML Flow e ELISA (PGL-I) em áreas endêmicas e não endêmicas de hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41(suppl. 2), p. 19-22, 2008.

SINSIMER, D. *et al.* *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 78, n. 1, p. 293-300, jan. 2010.

SITZ, K. V. *et al.* Delayed-type hypersensitivity skin testing using third variable loop peptides identifies T lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus-infected persons. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 176, n. 4, p. 1085-1089, oct. 1997.

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

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage Display. **Chemical Reviews**, Washington, v. 97, n. 2, p. 391-410, apr. 1997.

SMITH, J. *et al.* Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 19, n. 3, p. 331-341, mar. 2005.

SOUSA, A. L. O. M. *et al.* *Mycobacterium leprae* DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 77, n. 5, p. 829-833, nov. 2007.

SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 325-334, jul./set. 1997.

SPENCER, J. S. *et al.* Antigenic specificity of the *Mycobacterium leprae* homologue of ESAT-6. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 2, p. 1010-1013, feb. 2002.

SPENCER, J. S. *et al.* Comparative analysis of B- and T-cell epitopes of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate protein 10. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 6, p. 3161-3170, june 2004.

SPENCER, J. S. *et al.* Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 175, n. 12, p. 7930-7938, dec. 2005.

SPIERINGS, E. *et al.* Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 78, n. 4, p. 349-355, aug. 2000.

STEFANI, M. M. de A. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41(supl. 2), p. 89-94, 2008.

STOSCHECK, C. M. Quantitation of protein. **Methods in Enzymology**, New York, v. 182, p. 50-68, 1990.

SUSUKI, K. *et al.* High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 259, n. 2, p. 208-214, june 2006a.

SUSUKI, K. Localization of CORO1A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. **Acta Histochemica et Cytochemica**, Kyoto, v. 39, n. 4, p. 107-112, aug. 2006b.

TANIGAWA, K. *et al.* Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 289, n. 1, p. 72-79, dec. 2008.

TANIGAWA, K. *et al.* Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 156, v. 3, p. 495-501, june 2009.

TOMIMORI-YAMASHITA, J. *et al.* Hanseníase: novos métodos e recursos diagnósticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 4, p. 343-349, jul./ago. 1996.

TORRES, P. *et al.* Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical

samples in leprosy patients and contacts. **Leprosy Review**, London, v. 74, n. 1, p. 18-30, mar. 2003.

TOSH, K. *et al.* A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 8, p. 1190-1193, oct. 2002.

VAN EDEN, W. *et al.* HLA segregation of tuberculoid leprosy: confirmation of the DR2 marker. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 141, n. 6, p. 693-701, june 1980.

VAN REGENMORTEL, M. H. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. **Biologicals**, London, v. 29, n. 3-4, p. 209-213, sept./dec. 2001.

VILLARD, S. *et al.* Peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor. **Blood**, New York, v. 102, n. 3, p. 949-952, aug. 2003.

VRIES, R. R. de *et al.* HLA-linked control of susceptibility to tuberculoid leprosy and association with HLA-DR types. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 16, n. 4, p. 294-304, oct. 1980.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. The clinical and immunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, London, v. 77-78, p. 103-121, nov. 2006.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 25, n. 2, p. 165-172, mar./apr. 2007.

WHELAN, A. O. *et al.* Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 48, n. 9, p. 176-181, sep. 2010.

WILKER, H. G.; HARBOE, M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 56, n. 4, p. 648-661, dec. 1992.

WILKINSON, K. A. *et al.* Immune responses to recombinant proteins of *Mycobacterium leprae*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 179, n. 4, p. 1034-1037, apr. 1999.

WILLIAMS, D. L. *et al.* The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 162, p. 193-200, july 1990.

WILLIAMS, D. L. *et al.* Biological implications of *Mycobacterium leprae* gene expression during infection. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Basel, v. 8, n. 1, p. 58-72, 2004.

WILLIAMS, D. L. *et al.* Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 397, p. 1-40, aug. 2009.

WIT, M. Y. L. de *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 3, p. 502-506, mar. 1993.

WOODS, S. A.; COLE, S. T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amesterdan, v. 65, p. 305-310, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Expert Committee on leprosy: seventh report. **World Health Organization Technical Report Series**, Geneva, v. 874, p. 1-43, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leprosy situation, 2010. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 85. n. 35, p. 337-348, aug. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global situation**: new case detection. Disponível em: <[http://www.who.int/lep/situation/new\\_cases/en/index.html](http://www.who.int/lep/situation/new_cases/en/index.html)>. Acesso em: 07/2/2011.

WOROBEC, S. M. Treatment of leprosy/Hansen's disease in the early 21st century. **Dermatologic Therapy**, Copenhagen, v. 22, n. 6, p. 518-537, nov./dec. 2009

YOUN, J. H. *et al.* Production and characterization of peptide mimotopes of phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 51-57, may 2004.

YOUNG, R. A. *et al.* Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. **Nature**, Basingstoke, v. 316, n. 6027, p. 450-452, aug. 1985.

## APÊNDICE

|            |   |                                                                                                                                                          |     |
|------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| APÊNDICE 1 | - | RELAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES HANSENIANOS POSITIVAS COM CLONES DE FAGOS POR ELISA.....                                                        | 132 |
| APÊNDICE 2 | - | RELAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES TUBERCULOSOS POSITIVAS COM CLONES DE FAGOS POR ELISA.....                                                       | 133 |
| APÊNDICE 3 | - | RELAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO DE CONTATOS INTRADOMICILIARES DE PACIENTES HANSENIANOS POSITIVAS COM CLONES DE FAGOS POR ELISA.....                          | 134 |
| APÊNDICE 4 | - | RELAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS POSITIVAS COM CLONES DE FAGOS POR ELISA.....                                                         | 135 |
| APÊNDICE 5 | - | SOROPOSITIVIDADE DOS FAGOS SELECIONADOS E OS CORRESPONDENTES PEPTÍDEOS SOLÚVEIS EM POOL COM AMOSTRAS DE PACIENTES HANSENIANOS E CONTROLES POR ELISA..... | 136 |

APÊNDICE 1 – RELAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES  
HANSENIANOS POSITIVAS COM CLONES DE FAGOS POR  
ELISA

| GRUPO           | CÓDIGO | FAGOS |    |    |    |    |    |    |
|-----------------|--------|-------|----|----|----|----|----|----|
|                 |        | 1A    | 2A | 3A | 4A | 5A | 6A | 1B |
| PAUCIBACILARES  | 1      |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 7      |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 11     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 12     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 14     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 16     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 18     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 26     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 29     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 33     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 |        |       |    |    |    |    |    |    |
| MULTIBACILAREES | 2      |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 3      |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 4      |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 5      |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 6      |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 8      |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 9      |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 10     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 13     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 15     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 17     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 19     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 20     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 21     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 22     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 23     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 24     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 25     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 27     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 28     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 30     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 31     |       |    |    |    |    |    |    |
|                 | 32     |       |    |    |    |    |    |    |

APÊNDICE 2 – RELAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES  
TUBERCULOSOS POSITIVAS COM CLONES DE FAGOS POR  
ELISA

| GRUPO        | CÓDIGO | FAGOS |    |    |    |    |    |    |
|--------------|--------|-------|----|----|----|----|----|----|
|              |        | 1A    | 2A | 3A | 4A | 5A | 6A | 1B |
| TUBERCULOSOS | 1      |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 2      |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 3      |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 4      |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 5      |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 6      |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 7      |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 8      |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 9      |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 10     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 11     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 12     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 13     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 14     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 15     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 16     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 17     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 18     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 19     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 20     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 21     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 22     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 23     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 24     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 25     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 26     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 27     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 28     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 29     |       |    |    |    |    |    |    |
|              | 30     |       |    |    |    |    |    |    |

APÊNDICE 3 – RELAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO DE CONTATOS  
INTRADOMICILIARES DE PACIENTES HANSENIANOS  
POSITIVAS COM CLONES DE FAGOS POR ELISA

| GRUPO                      | CÓDIGO | FAGO |    |    |    |    |    |    |
|----------------------------|--------|------|----|----|----|----|----|----|
|                            |        | 1A   | 2A | 3A | 4A | 5A | 6A | 1B |
| CONTATOS INTRADOMICILIARES | 1      |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 2      |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 3      |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 4      |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 5      |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 6      |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 7      |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 8      |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 9      |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 10     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 11     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 12     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 13     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 14     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 15     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 16     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 17     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 18     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 19     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 20     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 21     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 22     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 23     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 24     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 25     |      |    |    |    |    |    |    |
|                            | 26     |      |    |    |    |    |    |    |

APÊNDICE 4 – RELAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS POSITIVAS COM CLONES DE FAGOS POR ELISA

| GRUPO                | CÓDIGO | FAGO |    |    |    |    |    |    |
|----------------------|--------|------|----|----|----|----|----|----|
|                      |        | 1A   | 2A | 3A | 4A | 5A | 6A | 1B |
| INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS | 1      |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 2      |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 3      |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 4      |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 5      |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 6      |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 7      |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 8      |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 9      |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 10     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 11     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 12     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 13     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 14     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 15     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 16     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 17     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 18     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 19     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 20     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 21     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 22     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 23     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 24     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 25     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 26     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 27     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 28     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 29     |      |    |    |    |    |    |    |
|                      | 30     |      |    |    |    |    |    |    |

APÊNDICE 5 – SOROPOSITIVIDADE DOS FAGOS SELECIONADOS E OS CORRESPONDENTES PEPTÍDEOS SOLÚVEIS EM *POOL* COM AMOSTRAS DE PACIENTES HANSENIANOS E CONTROLES POR ELISA

| Grupo        | Código | Tempo de tratamento | Fagos |    |    | Peptídeos   |
|--------------|--------|---------------------|-------|----|----|-------------|
|              |        |                     | 5A    | 6A | 1B | <i>Pool</i> |
| PAUCIBACILAR | 1      | 1ºdose              |       |    |    |             |
|              | 7      | 1ºdose              |       |    |    |             |
|              | 11     | 2ºdose              |       |    |    |             |
|              | 12     | -                   |       |    |    |             |
|              | 14     | -                   |       |    |    |             |
|              | 16     | 1ºdose              |       |    |    |             |
|              | 18     | 3ºdose              |       |    |    |             |
|              | 26     | -                   |       |    |    |             |
|              | 29     | -                   |       |    |    |             |
|              | 33     | -                   |       |    |    |             |
| MULTIBACILAR | 2      | 4ºdose              |       |    |    |             |
|              | 3      | 2ºdose              |       |    |    |             |
|              | 4      | 2ºdose              |       |    |    |             |
|              | 5      | 3ºdose              |       |    |    |             |
|              | 6      | 2ºdose              |       |    |    |             |
|              | 8      | 3ºdose              |       |    |    |             |
|              | 9      | -                   |       |    |    |             |
|              | 10     | -                   |       |    |    |             |
|              | 13     | 4ºdose              |       |    |    |             |
|              | 15     | 2ºdose              |       |    |    |             |
|              | 17     | -                   |       |    |    |             |
|              | 19     | 1ºdose              |       |    |    |             |
|              | 20     | 1ºdose              |       |    |    |             |
|              | 21     | 3ºdose              |       |    |    |             |
|              | 22     | 3ºdose              |       |    |    |             |
|              | 23     | -                   |       |    |    |             |
|              | 24     | 4ºdose              |       |    |    |             |
|              | 25     | 4ºdose              |       |    |    |             |
|              | 27     | -                   |       |    |    |             |
|              | 28     | -                   |       |    |    |             |
|              | 30     | -                   |       |    |    |             |
|              | 31     | -                   |       |    |    |             |
|              | 32     | -                   |       |    |    |             |

| Grupo        | Código | Fagos |    |    | Peptídeos   |
|--------------|--------|-------|----|----|-------------|
|              |        | 5A    | 6A | 1B | <i>Pool</i> |
| TUBERCULOSOS | 1      |       |    |    |             |
|              | 2      |       |    |    |             |
|              | 3      |       |    |    |             |
|              | 4      |       |    |    |             |
|              | 5      |       |    |    |             |
|              | 6      |       |    |    |             |
|              | 7      |       |    |    |             |
|              | 8      |       |    |    |             |
|              | 9      |       |    |    |             |
|              | 10     |       |    |    |             |
|              | 11     |       |    |    |             |
|              | 12     |       |    |    |             |
|              | 13     |       |    |    |             |
|              | 14     |       |    |    |             |
|              | 15     |       |    |    |             |
|              | 16     |       |    |    |             |
|              | 17     |       |    |    |             |
|              | 18     |       |    |    |             |
|              | 19     |       |    |    |             |
|              | 20     |       |    |    |             |
|              | 21     |       |    |    |             |
|              | 22     |       |    |    |             |
|              | 23     |       |    |    |             |
|              | 24     |       |    |    |             |
|              | 25     |       |    |    |             |
|              | 26     |       |    |    |             |
|              | 27     |       |    |    |             |
|              | 28     |       |    |    |             |
|              | 29     |       |    |    |             |
|              | 30     |       |    |    |             |
|              |        |       |    |    |             |
|              |        |       |    |    |             |
|              |        |       |    |    |             |
|              |        |       |    |    |             |

| Grupo                                  | Código | Fagos |    |    | Peptídeos   |
|----------------------------------------|--------|-------|----|----|-------------|
|                                        |        | 5A    | 6A | 1B | <i>Pool</i> |
| CONTATOS INTRADOMICILIARES HANSENIANOS | 1      |       |    |    |             |
|                                        | 2      |       |    |    |             |
|                                        | 3      |       |    |    |             |
|                                        | 4      |       |    |    |             |
|                                        | 5      |       |    |    |             |
|                                        | 6      |       |    |    |             |
|                                        | 7      |       |    |    |             |
|                                        | 8      |       |    |    |             |
|                                        | 9      |       |    |    |             |
|                                        | 10     |       |    |    |             |
|                                        | 11     |       |    |    |             |
|                                        | 12     |       |    |    |             |
|                                        | 13     |       |    |    |             |
|                                        | 14     |       |    |    |             |
|                                        | 15     |       |    |    |             |
|                                        | 16     |       |    |    |             |
|                                        | 17     |       |    |    |             |
|                                        | 18     |       |    |    |             |
|                                        | 19     |       |    |    |             |
|                                        | 20     |       |    |    |             |
|                                        | 21     |       |    |    |             |
|                                        | 22     |       |    |    |             |
|                                        | 23     |       |    |    |             |
|                                        | 24     |       |    |    |             |
|                                        | 25     |       |    |    |             |
|                                        | 26     |       |    |    |             |
| INDIVÍDUOS SÁDIOS                      | 1      |       |    |    |             |
|                                        | 2      |       |    |    |             |
|                                        | 3      |       |    |    |             |
|                                        | 4      |       |    |    |             |
|                                        | 5      |       |    |    |             |
|                                        | 6      |       |    |    |             |
|                                        | 7      |       |    |    |             |
|                                        | 8      |       |    |    |             |
|                                        | 9      |       |    |    |             |
|                                        | 10     |       |    |    |             |
|                                        | 11     |       |    |    |             |
|                                        | 12     |       |    |    |             |
|                                        | 13     |       |    |    |             |
|                                        | 14     |       |    |    |             |
|                                        | 15     |       |    |    |             |
|                                        | 16     |       |    |    |             |
|                                        | 17     |       |    |    |             |
|                                        | 18     |       |    |    |             |
|                                        | 19     |       |    |    |             |
|                                        | 20     |       |    |    |             |
|                                        | 21     |       |    |    |             |
|                                        | 22     |       |    |    |             |
|                                        | 23     |       |    |    |             |
|                                        | 24     |       |    |    |             |
|                                        | 25     |       |    |    |             |
|                                        | 26     |       |    |    |             |
|                                        | 27     |       |    |    |             |
|                                        | 28     |       |    |    |             |
|                                        | 29     |       |    |    |             |
|                                        | 30     |       |    |    |             |