

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA FERREIRA DE SANTANA

MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES DE ANTÍGENOS DE
MYCOBACTERIUM LEPRAE: CARACTERIZAÇÕES IN VITRO, IN VIVO E IN SILICO.

CURITIBA

2017

JULIANA FERREIRA DE SANTANA

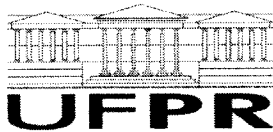
MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES DE ANTÍGENOS DE
MYCOBACTERIUM LEPRAE: CARACTERIZAÇÕES IN VITRO, IN VIVO E IN SILICO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Juliana Ferreira de Moura
Co-Orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga

CURITIBA

2017



ATA Nº118

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**

No dia quinze de Março de dois mil e dezessete às 09:00 horas, na sala Sala 03, Prédio de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **JULIANA FERREIRA DE SANTANA** para a Defesa Pública de sua dissertação intitulada **Mapeamento de Epitopos Imunodominantes de Antígenos de *Mycobacterium Leprae*: Caracterizações In Vitro, In Vivo e In Silico..** A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: JULIANA FERREIRA DE MOURA (UFPR), ANGÉLICA BEATE WINTER BOLDT (UFPR), KÁDIMA NAYARA TEIXEIRA (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela aprovação da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, JULIANA FERREIRA DE MOURA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 15 de Março de 2017.


JULIANA FERREIRA DE MOURA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ANGÉLICA BEATE WINTER BOLDT

Avaliador Externo (UFPR)


KÁDIMA NAYARA TEIXEIRA

Avaliador Externo (UFPR)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha irmã, pelo amor incondicional, apoio e compreensão de sempre.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roberto e Lucilaine, por se fazerem presentes mesmo distantes, pelo apoio e torcida de sempre. Obrigada por tudo!

À minha irmã, Paula, por ser minha melhor amiga, me entender, ajudar e estar sempre ao meu lado.

À professora e orientadora Dra. Juliana Ferreira de Moura, pela orientação nestes dois anos. Agradeço por todo conhecimento, ensinamentos e incentivo e também por toda a ajuda nesse tempo, tanto profissionalmente como pessoalmente.

À professora Dra. Larissa Magalhães Alvarenga, também pela orientação, contribuições e ensinamentos durante esse tempo no laboratório.

Ao professor Dr. Ricardo Andrez Machado de Avila e Dra Vanete Thomaz Soccol, pela síntese das membranas e por todos os ensinamentos neste período.

Ao professor Carlos Augusto Zanardini Pereira, membro da Fundação Pro-Hansen, por toda sua disponibilidade em ajudar e atenção.

Aos colegas de laboratório de Imunoquímica (LIMQ), Sabrina, Rafaela, Alessandra, Isabel, Michelle, Carla, Camila, Isabella e Guillermo pela convivência ao longo destes dois anos, pelo companheirismo, pelo apoio e aprendizado com cada um de vocês. A amizade de vocês foi essencial nessa caminhada.

Aos colegas do programa de mestrado de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia que entraram nessa etapa junto comigo, principalmente a Joyce, Lorenzo e Deborah. Esses dois anos em Curitiba não teriam sido o mesmo sem vocês, obrigada por tudo e principalmente, por estarem sempre presentes! Vou levar vocês sempre comigo!

Aos professores do programa de pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos, pelos conhecimentos transmitidos e aprendizado nessa etapa tão importante.

“Educar a mente sem educar o coração, não é educação.”

Aristóteles

RESUMO

A hanseníase é uma infecção granulomatosa crônica que afeta a pele, a mucosa nasal e os nervos periféricos. É causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo ácido-álcool resistente (BAAR) e obrigatório intracelular. A manifestação clínica da infecção dependerá da condição imunológica do hospedeiro. Para se tornar a terapia de escolha multidrogas mais fácil, de acordo com a OMS, os pacientes são divididos em duas categorias: paucibacilares e multibacilares. O primeiro grupo é caracterizado por apresentar baixos títulos de anticorpos e imunidade celular predominante enquanto que o segundo tem uma imunidade mediada por células ineficiente com títulos elevados de anticorpos. As atuais pesquisas possuem o objetivo de identificar e caracterizar biomarcadores e antígenos para o diagnóstico precoce da hanseníase de ambas as categorias de pacientes. Assim, nossa estratégia foi realizar um mapeamento de epítopo de sete proteínas de *M. leprae* usando uma membrana de celulose (SPOT Synthesis) através da reatividade com soros de pacientes com hanseníase. Nenhuma proteína possuiu reatividade com soro de voluntários saudáveis enquanto quatro proteínas mostraram “spots” reativos quando testadas com soro de pacientes com hanseníase. Um deles foi o antígeno 85B de *M. leprae* previamente identificado pelo nosso grupo como uma proteína imunodominante, devido ao fato de ter sido mimetizado por peptídeos conformacionais (mimotopos) através da técnica de Phage Display, dado confirmado nesse trabalho após análises *in silico* e *in vivo*. Após síntese química, espera-se que os peptídeos lineares encontrados neste trabalho possam ser capazes de identificar pacientes com hanseníase por meio de ensaios simples como ELISA, independentemente de suas classificações clínicas.

Palavras-chave: Hanseníase, diagnóstico sorológico, spot synthesis, peptídeos, marcadores.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic granulomatous infection that affects the skin, nasal mucosa and peripheral nerves caused by the *Mycobacterium leprae*, an acid-alcohol fast bacillus (AAFB) and obligate intracellular. The clinical manifestation of the infection with *M. leprae* depends on the immune condition of the host. To turn the multidrug choice therapy easier, according to WHO, the disease is divided into two categories: paucibacillary and multibacillary leprosy. The paucibacillary patients present low antibody titers and predominantly cell-mediated immunity. In contrast, multibacillary patients have an inefficient cell-mediated immunity with high antibody titers to *M. leprae* antigens. Current research aims to identify and characterize biomarkers and antigens for an early diagnosis of leprosy of both categories of patients. Thus, our strategy was to realize an epitope mapping of seven proteins from *M. leprae* by using an array-based oligo-peptide scanning (SPOT synthesis) onto a cellulose membrane probed for reactivity with sera from leprosy patients. No protein has reactivity with sera from healthy volunteers while four proteins have shown reactive spots when assayed with sera from leprosy patients. One of them was the 85B antigen from *M. leprae* previously identified by our group as an immunodominant protein after being mimicked by conformational peptides (mimotopes) by using Phage Display technique. Corroborating evidence of these data were obtained by *in silico* and *in vivo* analyses performed in this work. After chemical synthesis, we hope the linear peptides found here could identify leprosy patients by simple assays like as ELISA, independently of their clinical presentation.

Keywords: Leprosy, diagnostic, spot synthesis, peptides, targets

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Camundongo Nude inoculado com <i>M. leprae</i> na pata trazeira.....	16
FIGURA 2: Estrutura da parede celular do <i>M. leprae</i>	17
FIGURA 3: Aspecto da lâmina baciloscópica de <i>M. leprae</i>	17
FIGURA 4: Classificação da hanseníase de acordo com Ridley-Jopling.....	19
FIGURA 5: Distribuição geográfica de novos casos da hanseníase.....	21
FIGURA 6: Proteínas antigênicas do <i>M. leprae</i> sintetizadas pela técnica de Spot synthesis.....	32
FIGURA 7: Ilustração das etapas que ocorrem na síntese de peptídeos realizada em membrana de celulose.....	33
FIGURA 8: Ensaio geral de Spot Synthesis.....	34
FIGURA 9: Teste de ELISA com os soros dos camundongos imunizados.....	44
FIGURA 10: Reatividade dos peptídeos referentes aos antígenos de <i>M. leprae</i> frente ao anticorpo anti IgG humana-HRP.....	46
FIGURA 11: Reatividade dos peptídeos referentes às proteínas de <i>M. leprae</i> frente a 5mg/mL de IgG de pacientes hansenianos.....	47
FIGURA 12: Reatividade dos peptídeos referentes às proteínas de <i>M. leprae</i> frente a 10mg/mL de IgG de pacientes hansenianos.....	48
FIGURA 13: Reatividade dos peptídeos referentes às proteínas de <i>M. leprae</i> frente a 10mg/mL de IgG de voluntários saudáveis.....	50
FIGURA 14: Reatividade dos peptídeos referentes aos antígeno 85B frente ao anticorpo anti IgG mouse-HRP.....	51
FIGURA 15: Reatividade dos peptídeos referentes à proteína do antígeno 85B frente ao soro de pré imunização dos camundongos.....	52
FIGURA 16: Reatividade dos peptídeos referentes ao antígeno 85B frente ao soros de animais imunizados com o peptídeo APDDPAWQNIFNLRR.....	53
FIGURA 17: Alinhamento entre as sequências das proteínas do Antígeno 85B do <i>M. leprae</i> e a proteína Antígeno 85B do <i>M. tuberculosis</i>	57
FIGURA 18: Modelo do antígeno 85B do <i>M. leprae</i>	57
FIGURA 19: Modelo da proteína do Antígeno 85B e o posicionamento de seus peptídeos imunodominantes.....	58
FIGURA 20: Posicionamento do peptídeo linear mimetizado pelo peptídeo APDDPAWQNIFNLRR no modelo do antígeno 85B.....	61

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Concentrações das IgGs precipitadas.....	43
QUADRO 2: Peptídeos reativos do Antígeno 85B.....	54
QUADRO 3: Peptídeos reativos das proteínas ML0405, ML2055 e ML0091.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR – Bacilo ácido-álcool resistente

BSA – Albumina bovina sérica

BI – Índice de bactérias

DMF – Dimetilformamida

ECL – do inglês Electrochemiluminescence (eletroquimioluminescência)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático.

IgG – Imunoglobulina G

KLH – do inglês keyhole limpet hemocyanine (hemocianina de molusco)

MB – Multibacilar

OPD – do inglês orto phenylenediamine

PB – Paucibacilar

PBS – Tampão fosfato

PGL-I – Glicolípídeo fenólico I

PVDF – Fluoreto polivinidileno

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

TBS – Tampão tris

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	JUSTIFICATIVA.....	13
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1	HISTÓRIA DA HANSENÍASE	14
3.2	AGENTE ETIOLÓGICO.....	15
3.3	CLASSIFICAÇÃO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	18
3.4	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA	20
3.5	DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE	22
3.5.1	REAÇÃO INTRADÉRMICA.....	22
3.5.2	BACILOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA.....	23
3.5.3	BIOLOGIA MOLECULAR	25
3.5.4	TESTES SOROLÓGICOS.....	25
3.5.5	“SPOT SYNTHESIS”	26
4.	OBJETIVOS	29
4.1	OBJETIVO GERAL	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1	FLUXOGRAMA	30
5.2	COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	31
5.2.1	Amostras de pacientes com hanseníase.....	31
5.2.2	Amostras de doadores de sangue – Controle negativo.....	31
5.3	TÉCNICA “SPOT SYNTHESIS”	31
5.3.2	Dosagem de proteínas através do Bradford	35
5.3.3	Avaliação dos epítomos imunodominantes de proteínas de <i>M. Leprae</i> com os soros dos pacientes	35
5.3.4	Avaliação das propriedades miméticas do peptídeo APDDPAWQNIFNLRR	37
5.4	ANÁLISE IN SILICO POR BIOINFORMÁTICA	41
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.1	DOSAGEM DE PROTEÍNAS POR BRADFORD.....	42
6.2	ELISA INDIRETO.....	44
6.3	TÉCNICA “SPOT SYNTHESIS”	45
6.3.1	Spot Synthesis com soros humanos	45

6.3.2 Soros de camundongos imunizados	51
6.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> POR BIOINFORMÁTICA	54
7. CONCLUSÕES	62
8. PERSPECTIVAS.....	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
10. ANEXOS.....	70

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma infecção crônica granulomatosa que afeta a pele, mucosa nasal e nervos periféricos (EICHELMANN, 2013; VIRMOND, 2015). A doença é causada pelo microrganismo *Mycobacterium leprae* identificado, em 1873 (SALIPANTE, 2011), por Gerhard Henrik Armauer Hansen (EICHELMANN, 2013).

A replicação desta bactéria ocorre de maneira bastante lenta através de fusão binária (EICHELMANN, 2013), não é possível cultivá-la *in vitro*, porém é possível obtê-la através da inoculação em tatus (EICHELMANN, 2013) ou nas patas de camundongos (SHEPARD, 1964) (SALIPANTE, 2011). O fato do cultivo *in vitro* não ser possível, torna mais difícil o estudo do *M. leprae*.

As manifestações clínicas da infecção com *M. leprae* irão depender da condição imune do hospedeiro (LEGENDRE, 2012). O período de incubação é aproximadamente cinco anos, mas em alguns pacientes os sintomas podem levar até 20 anos para aparecerem (OMS, 2013). Geralmente os pacientes afetados pela hanseníase apresentam lesões hipopigmentadas e maculares as quais aparecem em pacientes que não apresentam resposta imune celular contra *M. leprae*. Usualmente as lesões possuem tamanho entre três e quatro centímetros, superfície macia e os pacientes têm insensibilidade ou uma menor capacidade de sentir variações de temperatura no local (TALHARI, 2015).

Atualmente, o diagnóstico da hanseníase é baseado na identificação de manifestações clínicas acompanhada de exames como a baciloscopia (FREITAS, 2015) e há uma perspectiva que testes mais sensíveis estejam disponíveis comercialmente em um futuro próximo para facilitar ou complementar o diagnóstico da doença (CARDOSO, 2013).

Por isso, um dos objetivos desse estudo foi encontrar biomarcadores que fossem capazes de constituir testes de diagnósticos mais precisos e confiáveis, além disso, que pudessem detectar a hanseníase na sua fase inicial ou em fase subclínica e, conseqüentemente,

evitar a transmissão, que continua estável e bastante alta, principalmente para crianças e jovens até 15 anos (SANTOS, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

O principal objetivo de muitos dos estudos sobre hanseníase, nos dias atuais, é identificar e caracterizar biomarcadores e possíveis antígenos para realizar um diagnóstico precoce da doença, a qual ainda é um problema em muitos países. Portanto, é importante que se desenvolvam testes universais de diagnóstico para que o controle seja possível em áreas endêmicas (NATH, 2015).

De acordo com a OMS, em 2013, a prevalência da hanseníase em 103 países era de 215.557 casos (excluindo o pequeno número de casos ocorridos na Europa) e no final do primeiro quadrimestre de 2014 era de 180.464 casos (OMS, 2013).

Apesar da hanseníase já ter sido considerada eliminada no ano 2000 (prevalência menor de 1 caso por 10000 pessoas no nível global), o número de casos permanece alto em países como a Angola, Brasil, República Africana Central, Índia, Madagascar, Nepal e República Unida da Tanzânia e em países endêmicos no passado, como a República Democrática do Congo e Moçambique (OMS, 2013). Na Índia, assim como no Brasil e Indonésia, mais de 10.000 novos casos de hanseníase são notificados a cada ano (REIBEL, 2015), fato que faz com que, principalmente nestes países, haja uma maior necessidade de aumentar o controle sobre a doença para reduzir o número de novos casos (OMS, 2013).

Uma possibilidade seria o desenvolvimento de testes sorológicos que pudessem ser um complemento ao diagnóstico clínico da doença e também que pudessem ser utilizados fora do ambiente ambulatorial, principalmente em áreas onde há alta incidência da hanseníase. Por isso, o objetivo deste trabalho foi identificar biomarcadores do *M. leprae* por meio da técnica de Spot Synthesis que possam ser capazes de identificar pacientes portadores do *M. leprae*, apresentem

eles as características clínicas da doença ou não, de forma a possibilitar o tratamento o mais precoce possível e assim evitar a transmissão.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRIA DA HANSENÍASE

Os pesquisadores ainda não chegaram a um consenso sobre a origem exata da hanseníase. Existem relatos de pessoas que possivelmente desenvolveram a doença durante a época bíblica, pois no antigo Testamento há orientações para identificar uma determinada doença caracterizada por manchas dermatológicas e, ainda, há menção aos cuidados que deveriam ser seguidos, porém não há comprovação de que se tratava da hanseníase (CUNHA, 2002; LEGENDRE, 2012).

Além disso, outras pesquisas mostram que também houve casos antes da data de 1550 A.C. Porém, os primeiros casos realmente documentados ocorreram na Índia e no Egito durante o século 7 a.C. (CUNHA, 2002; LEGENDRE, 2012).

Em relação à Idade Média, foram encontradas informações em manuscritos documentados por médicos. Alguns autores defendem que a hanseníase se tornou endêmica já nesta época. Provavelmente a doença se disseminou devido a diversos fatores como as más condições de higiene, alimentação e moradia, os quais foram causados pelo crescimento acelerado da população. Além disso, na Europa medieval movimentos como o das Cruzadas e dos peregrinos também foram considerados fatores que ajudaram a disseminar a doença naquela época (CUNHA, 2002).

As pessoas que possuíam a doença eram forçadas a viver em “colônias de leprosos”, por causa do medo do contágio e a falta de um tratamento efetivo. Isto ocorreu até aproximadamente a década de 40, quando os antibióticos se tornaram disponíveis (LEGENDRE, 2012).

Nas Américas, a hanseníase provavelmente chegou entre os séculos XVI e XVII com os colonizadores. Pesquisadores indicam que o maior fator de disseminação da doença nesta época foi o tráfico de escravos. Na América do Sul, colonizadores espanhóis e portugueses foram os responsáveis pela propagação da doença. Os primeiros casos de hanseníase no continente foram relatados na Colômbia e os pacientes eram espanhóis (EIDT, 2004).

Já no Brasil, os colonizadores portugueses foram os primeiros a contribuir para o alastramento da doença e alguns anos depois, outros povos europeus também colaboraram para a doença se espalhar pelo país. Os primeiros casos de hanseníase no Brasil foram observados no Rio de Janeiro, no ano de 1600 (EIDT, 2004).

3.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente causador da hanseníase é o *Mycobacterium leprae*, que foi identificado em 1873 por Gerhard Armauer Hansen, um médico norueguês (DEGANG, 2014), sendo este o primeiro patógeno humano descrito. O *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório, ácido-álcool-resistente (BAAR) e possui uma preferência pelo citoplasma das células de Schwann (único bacilo que infecta e reside nessas células) (EICHELMANN, 2013; NATH, 2015). Não é possível cultivar este microrganismo *in vitro* (EICHELMANN, 2013).

Além dos seres humanos, apenas tatus selvagens são conhecidos como hospedeiros naturais do *M. leprae* (LEGENDRE, 2012). Mas na década de 60, Charles C. Shepard provou ser possível obter grande número de *M. leprae* inoculando-o nas patas de camundongos, a Figura 1 mostra o aspecto do local em que ocorre a inoculação da bactéria nestes animais. Em 1971, Kirchheimer and Storrs realizaram a inoculação artificial da micobactéria na espécie de tatu *Dasypus novemcinctus*, que acabou sendo o melhor modelo animal para o estudo da hanseníase, devido à da temperatura corporal do animal e sua susceptibilidade ao *M. leprae* (REIBEL, 2015).



Figura 1 – Camundongo Nude inoculado com *M. leprae* na pata trazeira. Por não possuir timo sua imunidade celular é prejudicada. (Fonte: TORTORA. 2012. *Microbiologia*, 539. Brasil: Artmed).

O *Mycobacterium leprae* pertence ao gênero *Mycobacterium* e à família Mycobacteriaceae. É uma bactéria micro-aerofílica, com formato de bacilo e não apresenta movimento em análises microscópicas, seu comprimento varia de 1 a 8 μm e sua largura geralmente é igual a 0.3 μm . Sua temperatura ideal de crescimento é aproximadamente entre 30 e 35°C (REIBEL, 2015). Sua replicação acontece através de fusão binária de maneira bastante lenta, seu tempo de duplicação é em torno de 14 dias, sendo o mais longo entre os patógenos conhecidos (EICHELMANN, 2013; LEGENDRE, 2012).

A estrutura da parede celular do *M. leprae* mostra propriedades bem parecidas com todas as micobactérias, ilustrada na Figura 2. Adjacente à membrana citoplasmática há uma camada rígida composta por um complexo de polissacarídeos e glicolipídeos (zona elétron-densa). Em seguida existe uma camada intermediária composta por ácidos micólicos (zona elétron-intermediária), que constituem cerca de 60% da parede celular do *M. leprae* e são os principais responsáveis pela coloração ácido-resistente da micobactéria, como mostra a Figura 3. Por fim, a camada mais externa da parede celular provavelmente é composta por lipoglicanas, polissacarídeos livres, glicolipídeos e fosfolipídeos. A resistência do patógeno, em alguns casos, tanto à resposta imune celular como à humoral, é atribuída em grande parte a esta complexa parede celular das micobactérias (LEGENDRE, 2012; VISSA & BRENNAN, 2001).

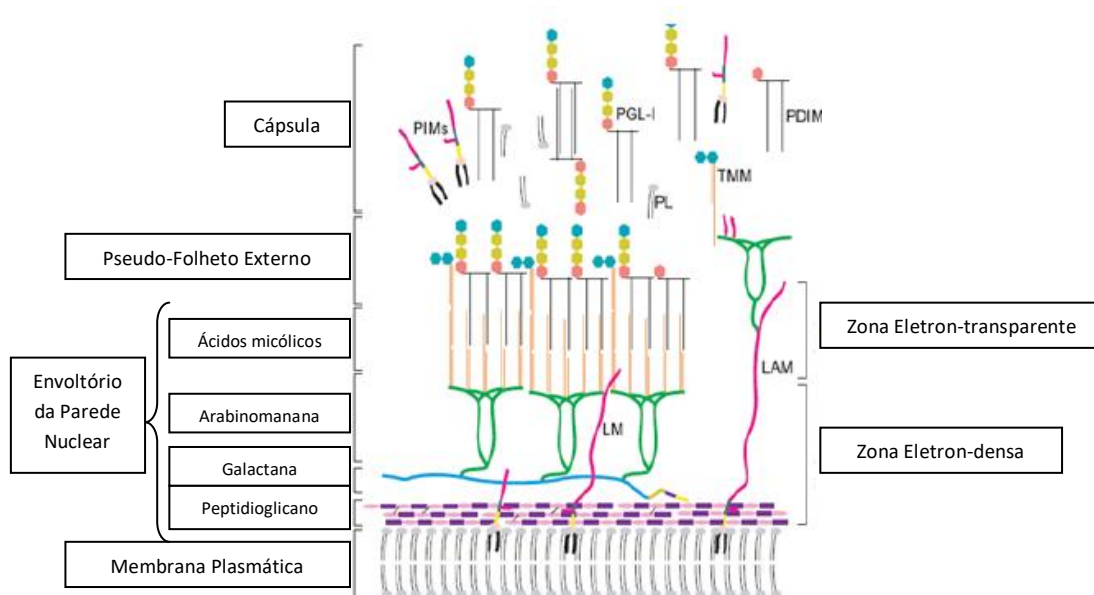


Figura 2 – Modelo esquemático da estrutura da parede celular do *M. leprae*. PIMs (Fosfatilinositol), PGL-1 (Glicolípido fenólico), TMM (Monomicolato de trealose), LAM (Lipoarabinomanana), PDIM (Dimicocerosate fitiocerol), LM (Lipomanana) - (Adaptado de VISSA e BRENNAN, 2001).

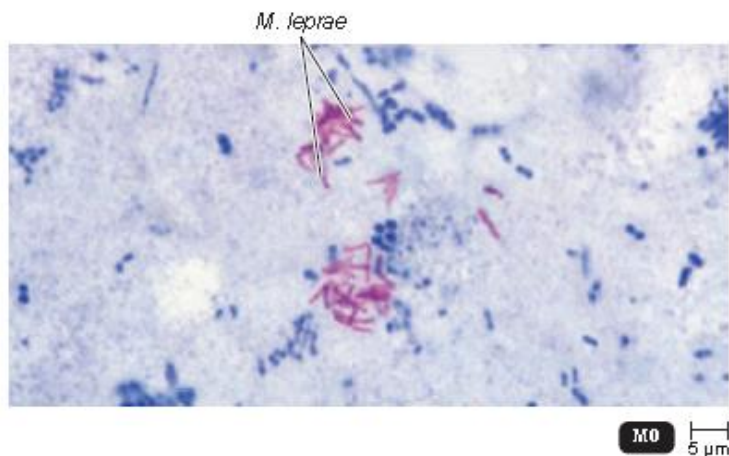


Figura 3 – Aspecto da lâmina baciloscópica de *M. leprae*. Devido à característica de ser álcool-ácido resistente, os bacilos coram-se em vermelho por carbolfucsina. As outras bactérias que não são álcool-ácido resistentes coram-se por azul de metileno. (Fonte: TORTORA. 2012. *Microbiologia*, 71. Brasil: Artmed).

O primeiro sequenciamento do genoma do *M. leprae* foi realizado em 2001, no estado indiano Tamil Nadu (LEGENDRE, 2012). O genoma completo do *M. leprae* contém aproximadamente 3,2 milhões de pares de bases (Mbp). Mas apenas 49,5% do genoma contém genes que codificam proteínas, 27% são constituídos por pseudogenes e os restantes 23,5% não parecem ser regiões codificadoras. Além disso, muitas vias metabólicas existentes em outras espécies de micobactérias aparentemente não existem ou são comprometidas no *M. leprae*, como por exemplo, a cadeia respiratória transportadora de elétrons e a habilidade de gerar energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) (COLE et al., 2001).

Em 2008, foi identificada uma nova espécie de micobactéria também causadora da hanseníase, conhecida como *M. lepromatosis*, a qual foi isolada de dois pacientes mexicanos classificados como lepromatosos. Já em 2014, *M. lepromatosis* também foi encontrado em pacientes tuberculoides (acompanhado ou não do *M. leprae*). O resultado do sequenciamento do *M. lepromatosis* mostrou que ele é muito parecido filogeneticamente com *M. leprae* (HAN et al., 2008; REIBEL, 2015).

3.3 CLASSIFICAÇÃO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A hanseníase pode ser classificada de três maneiras diferentes. A primeira classificação foi proposta em 1953, durante um congresso em Madri, e foi alvo de muitas controvérsias. Esta classificação baseava-se apenas em parâmetros clínicos e dividia os pacientes em: lepromatosos, tuberculoides, indeterminados e *bordeline* ou dimorfos (TALHARI, 2015). Porém, as classificações mais utilizadas atualmente baseiam-se na escala Ridley-Jopling ou na proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (LEGENDRE, 2012).

A classificação Ridley-Jopling, proposta em 1962 e 1966, utiliza características clínicas, histopatológicas e imunológicas, o índice de bactérias e a resposta imune celular contra *M. leprae* (medida pelo resultado do teste intradermal Mitsuda) para definir cinco tipos de hanseníase: as duas formas polares, tuberculoide-tuberculoide (TT) e lepromatoso-lepromatoso

(LL) e outras três formas intermediárias, *borderline-tuberculoide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-lepromatoso* (BL) (REIBEL, 2015), como é mostrado na Figura 4.

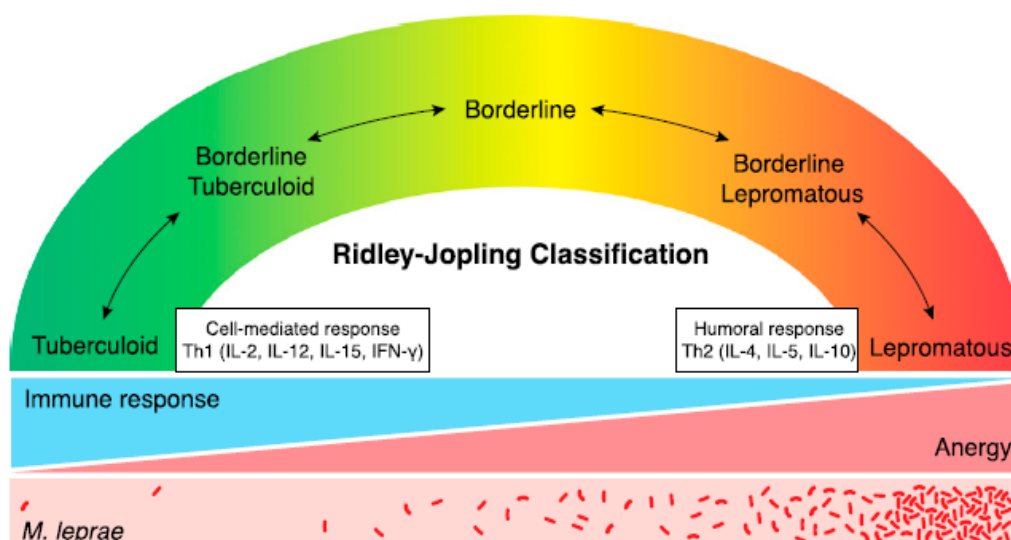


Figura 4 – Classificação da hanseníase, de acordo com Ridley-Jopling (Fonte: PARK, 2016)

Já em 1982, a OMS propôs uma classificação para facilitar a escolha da terapia multidrogas, separando os pacientes em paucibacilares e em multibacilares, caracterizados por possuir até cinco lesões na pele ou mais de cinco lesões, respectivamente (REIBEL, 2015).

Essa classificação é possível, uma vez que os paucibacilares apresentam características de resposta de células T auxiliares tipo 1 (Th1) e nos multibacilares predominam a resposta Th2 (LEGENDRE, 2012). Este perfil imunológico reflete no quadro clínico dos pacientes, pois os pacientes paucibacilares não apresentam ou têm baixo índice de bactérias (BI), ou seja, o número de bacilos “acid-fast” presentes na pele (em escala log), já os multibacilares não conseguem controlar a replicação das bactérias, possuindo alto BI (DUTHIE, 2014).

Essas diferentes apresentações da doença são uma das dificuldades em se propor um teste diagnóstico para a hanseníase uma vez que, enquanto os pacientes multibacilares apresentam alto título de anticorpos, os paucibacilares raramente apresentam ou não possuem anticorpos em concentração sérica detectável (LASTÓRIA, 2014).

Alguns autores mostram que anticorpos anti-PGL1 (anti glicolípídeo fenólico 1) são elevados em pacientes multibacilares e testes de fluxo lateral já são capazes de detectar resposta IgM para PGL-1 nesses pacientes (CARDOSO, 2013). Porém, esses testes são restritos a pacientes multibacilares, sendo limitados para a detecção de pacientes paucibacilares.

3.4 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

A hanseníase tem ocorrência tanto nos países com temperaturas tropicais, como naqueles com temperaturas subtropicais (LEGENDRE, 2012). No início dos anos 80, o número de casos da doença era próximo de 5,4 milhões, quando se iniciou a terapia com multidrogas. Atualmente, este número diminuiu consideravelmente (WHO, 2016).

Porém, em alguns países como Índia, Brasil e Indonésia, muitos novos casos ainda continuam surgindo. De acordo com a “World Health Organization” (WHO), em 2015, a Índia apresentou 127 326 novos casos, ou seja, 60% do número total de novos casos de hanseníase no mundo. Já o Brasil reportou 26 395 e a Indonésia noticiou 17 202 novos casos, compreendendo 13% e 8% do número total global, respectivamente.

Ainda de acordo com a WHO, da análise de 136 países em 2015, 30 países não apresentaram novos casos; 60 apresentaram entre 1 a 99 casos; 32 obtiveram entre 100 a 999 casos; 11 apresentaram entre 1000 a 9999 casos e apenas Índia, Brasil e Indonésia obtiveram mais de 10 000 novos casos, como é mostrado na Figura 5. Infelizmente, 92 países não se reportaram a WHO, sendo que muitos desses concentram uma alta taxa da doença, como por exemplo, países da África e países da região sudeste da Ásia (WHO, 2016).

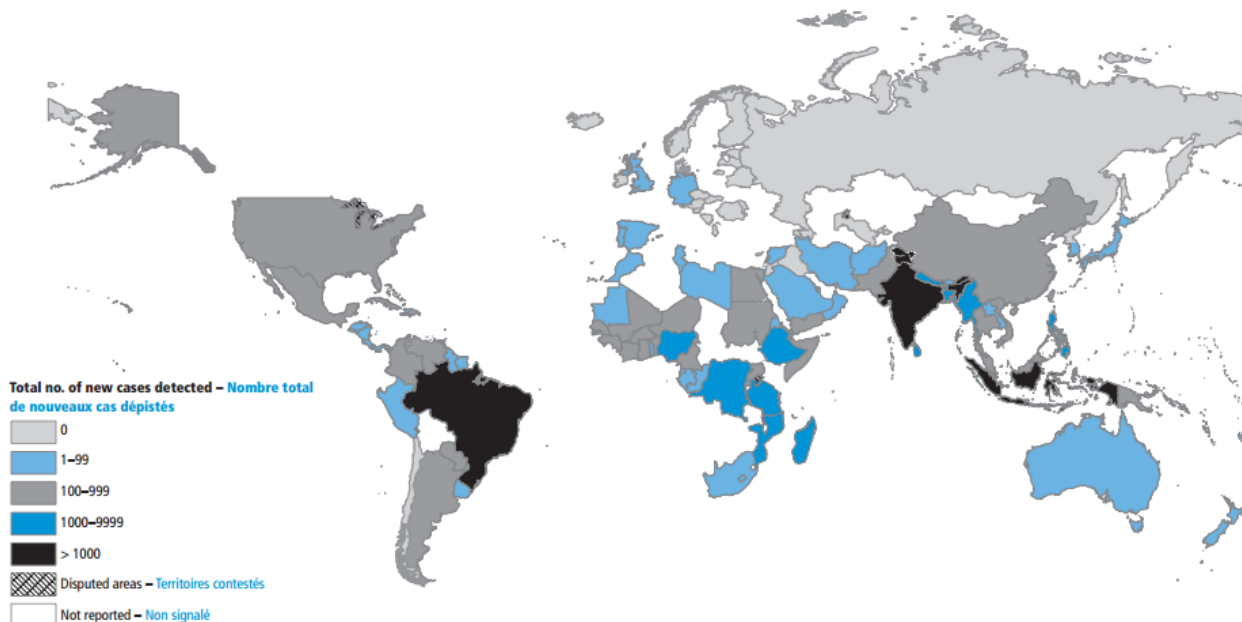


Figura 5 – Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2015 (OMS).

Apesar do número de casos de hanseníase ter diminuído na maioria dos países, o número de casos em crianças menores de 15 anos continua aumentando no Brasil, principalmente nas regiões endêmicas que possuem aglomerações urbanas com condições ruins de infraestrutura. Isso significa que crianças e adolescentes tornam-se vulneráveis como resultado da contínua exposição ao agente infeccioso. Com isso tem-se uma transmissão ativa da doença, pelo fato de crianças estarem mais em contato com outras pessoas (SANTOS, 2016). Observa-se isso pelos dados referentes à hanseníase no ano de 2013: no Brasil, foram notificados 31.044 novos casos de hanseníase, sendo que só em jovens abaixo de 15 anos o número de novos casos foi igual a 2.439. A taxa de detecção total foi igual a 15,44 casos por 100.000 habitantes, já em crianças até 15 anos a mesma taxa foi de 5,03 casos por 100.000 habitantes (FREITAS, 2016). Ou seja, o número de casos, principalmente nesta faixa etária, continua sendo bastante alto, devendo existir adultos sem diagnóstico ou tratamento disseminando a doença.

Para impedir que ocorra essa transmissão, é necessário realizar o diagnóstico correto e precoce da doença e em seguida, o tratamento de maneira adequada. Porém, ainda não existe um

teste de triagem que possa ser usado para encaminhar os pacientes para um centro médico, para que o diagnóstico seja confirmado.

Com estes problemas, além da falta de diagnóstico, pode haver a reincidência, que indica resistência a antibiótico em alguma etapa do tratamento. Em 2015, 46 países reportaram 3039 casos de reincidência da doença. De acordo com a WHO, os programas de controle da hanseníase são incentivados a estudar cada caso de reincidência para analisar o que houve de errado e adequar o tratamento (WHO, 2016).

3.5 DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE

3.5.1 REAÇÃO INTRADÉRMICA

A reação intradérmica consiste em utilizar o *Mycobacterium leprae* inativado extraído de lesões de pacientes com hanseníase para que o antígeno “lepromina” possa ser injetado na superfície flexora do antebraço do paciente. Em seguida, a reação é analisada em dois momentos: reação de Fernández (reação antecipada) e reação de Mitsuda (reação tardia) (EICHELMANN, 2012; LASTÓRIA, 2014).

A reação de Fernández está finalizada por volta de 24 a 72 horas depois da injeção da lepromina e é considerada positiva se aparecer um eritema de aproximadamente 10 a 20 mm. Esta reação possui boa sensibilidade, porém geralmente ocorre grande reatividade cruzada com outras micobactérias (EICHELMANN, 2012; LASTÓRIA, 2014).

Por sua vez, o teste de Mitsuda demora de 21 a 28 dias para se chegar a um resultado e a reação é considerada positiva se houver o aparecimento de um nódulo com o tamanho mínimo de 5 mm. A reação de Mitsuda indica, principalmente, o nível de imunidade celular do paciente. Por isso, geralmente, a reação é positiva nos pacientes tuberculoides (alta resposta celular) e negativa em pacientes lepromatosos (baixa resposta celular e alta resposta humoral) (EICHELMANN, 2012; LASTÓRIA, 2014). Porém, a produção do reagente necessário para este teste foi descontinuada.

Apesar de estes testes ajudarem a classificar a forma clínica da doença, o diagnóstico através deles não é eficiente e geralmente, são mais utilizados com o propósito de prognóstico. Além disso, é possível que em pacientes com hanseníase, apenas um dos testes seja positivo (EICHELMANN, 2012; LASTÓRIA, 2014).

3.5.2 BACILOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA

O diagnóstico da hanseníase através da baciloscopia consiste em uma análise do esfregaço do lóbulo da orelha, cotovelo ou de alguma outra lesão que o paciente possui (VIRMOND, 2015). Este teste é utilizado para detectar o *M. leprae* que é um bacilo ácido-álcool resistente (BAAR) através da técnica de coloração chamada de Ziehl-Neelsen, depois que o material coletado foi colocado em uma lâmina de vidro e fixado (LASTÓRIA, 2014; VIRMOND, 2015).

A coloração pelo método Ziehl-Neelsen utiliza um corante chamado de fucsina (cor magenta), o qual se liga aos ácidos micólicos presentes na parede celular do *M. leprae*. Em seguida, realiza-se a descoloração com ácido ou álcool, e então as micobactérias retêm a cor vermelha da fucsina (VIRMOND, 2015).

Depois que esta técnica é realizada, é possível analisar a morfologia e o índice de bactérias (BI) presentes nas lesões. A análise da morfologia determina se o bacilo presente é viável ou não. Já o índice de bactérias é uma análise quantitativa e é expressa de acordo com uma escala logarítmica (LASTÓRIA, 2014).

Porém, a baciloscopia é um teste de diagnóstico bastante restrito nos pacientes tuberculoides. Nesses pacientes, o teste geralmente possui resultado negativo, pelo fato destes não possuírem muitos bacilos (AZEVEDO, 2016). Então, geralmente utiliza-se este método de detecção da hanseníase apenas para identificar os pacientes lepromatosos (VIRMOND, 2015).

Como um complemento à baciloscopia, é possível realizar o diagnóstico também através de exames histopatológicos, que consistem na análise de biópsias das lesões cutâneas ou

nervos. Geralmente, utiliza-se a coloração hematoxilina-eosina, pela qual é possível diferenciar partes do tecido basófilas ou acidófilas e complementa-se com a coloração Fite-Faraco, que é utilizada para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (LASTÓRIA, 2014).

O diagnóstico histopatológico pode revelar a evolução para um dos polos da hanseníase: tuberculoide-tuberculoide (TT) ou lepromatosa-lepromatosa (LL). Sendo que na forma TT é possível observar granulomas tuberculoides bem definidos, constituídos por macrófagos e células de Langerhans, com linfócitos no centro. Outra característica importante é que nesta forma da doença, os bacilos não estão presentes ou são bem escassos. Já a forma LL apresenta granulomas que afetam a hipoderme, com diferentes níveis de alterações lipídicas. Estes são formados por células lepromatosas (ricas em bacilos), que podem se apresentar tanto isoladamente, como dispostas em globo. Sendo que nesta última forma, os linfócitos são bem escassos (LASTÓRIA, 2014).

É possível determinar os subtipos da hanseníase também através do exame histopatológico, já que os subtipos como: bordeline-tuberculoide (BT), bordeline-bordeline (BB) e bordeline-lepromatoso (BL) possuem características intermediárias entre as formas polares TT e LL.

O exame histopatológico é utilizado não só para o diagnóstico, mas também como acompanhamento dos pacientes. No caso dos pacientes multibacilares (lepromatoso-lepromatoso), a histopatologia deve ser realizada no final de cada ciclo de tratamento, que é aproximadamente igual a seis meses. Já nos casos dos pacientes paucibacilares (tuberculoide-tuberculoide), o exame é realizado apenas no final do tratamento (EICHLMANN, 2012).

Ainda assim, apesar destas técnicas já existentes, que são utilizadas mais com objetivo de classificar os pacientes e definir o tratamento, é necessário o desenvolvimento de novas técnicas que sejam mais simples para complementar o diagnóstico e que sejam capazes de detectar a doença logo no seu início, para evitar a sua transmissão (AZEVEDO, 2016).

3.5.3 BIOLOGIA MOLECULAR

Em relação às técnicas de biologia molecular para se diagnosticar a hanseníase, utiliza-se a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detectar, quantificar e determinar a viabilidade do *M. leprae* desde 1989. A investigação do *M. leprae* por PCR começa com a utilização de amostras como, por exemplo, fragmentos de biópsia da pele, nasal, mucosa oral ou cabelo e baseia-se na amplificação de sequências específicas do genoma do *M. leprae* e na identificação de ácido desoxirribonucleico (DNA) amplificado ou ácido ribonucleico (RNA) (LASTÓRIA, 2014).

A PCR pode ser usada para confirmar os casos paucibacilares iniciais, monitorar o tratamento, determinar se o paciente está curado ou não, se possui resistência aos medicamentos e também ajudar a entender os mecanismos de transmissão do *M. leprae* (LASTÓRIA, 2014).

Além da técnica convencional de PCR, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido considerado um método rápido e sensível para detectar e quantificar patógenos, incluindo o *M. leprae* (LASTÓRIA, 2014). No entanto, ainda é necessária uma validação desta técnica com um grande número de amostras coletadas de diferentes formas clínicas da hanseníase (AZEVEDO, 2016).

Pelo fato da PCR ser uma técnica de alto valor, incluindo reagentes e equipamentos específicos, ela ainda não é utilizada diretamente nos pacientes e na população em geral, é limitada apenas aos centros de pesquisa para o conhecimento da doença e do patógeno (LASTÓRIA, 2014).

3.5.4 TESTES SOROLÓGICOS

Para auxiliar o diagnóstico clínico e monitorar o tratamento da hanseníase, ainda é necessário encontrar marcadores laboratoriais que sejam capazes de detectar a doença no seu estágio inicial (SILVA, 2007). Seria muito útil no trabalho de campo possuir testes de laboratórios que sejam simples de se realizar, com baixo custo e que detectem anticorpos

específicos contra *M. leprae*, pois alguns pacientes com hanseníase não possuem características visíveis da doença, mas são capazes de transmiti-la a outras pessoas (LASTÓRIA, 2014).

Então, com esse objetivo, muitas pesquisas têm tentando encontrar o teste sorológico ideal, ou seja, aquele que utiliza antígenos imunodominantes do *M. leprae* capazes de ativar clones de linfócitos B específicos. Até o momento, o melhor teste padronizado utiliza o antígeno glicolípido fenólico 1 (PGL-1), descrito pela primeira vez em 1980 por Brennan & Barrow e utilizado em estudos da hanseníase a partir de 1982, por Payne (LASTÓRIA, 2014). O PGL-1 é um antígeno da parede celular do *M. leprae*. Neste teste, a medição de anticorpos séricos de PGL-1 é específica, contudo a sensibilidade é bastante limitada na detecção dos pacientes paucibacilares, por possuírem pouca resposta humoral (SILVA, 2007). De acordo com Nath et. al. (2015), anticorpos que respondem ao PGL-1 e seus glicoconjugados estão presentes em 90-95% dos pacientes lepromatosos (multibacilares) e apenas 25-60% nos pacientes tuberculoides (paucibacilares).

3.5.5 “SPOT SYNTHESIS”

A técnica de “Spot Synthesis” foi descrita pela primeira vez por Ronald Frank (1992). É um método utilizado em vários aspectos para reconhecimento molecular, principalmente na área de imunologia molecular. Frequentemente, é utilizado para o sequenciamento de peptídeos sintetizados em pequenos “spots” em um suporte sólido, de forma homogênea e que permite o acesso fácil do ligante, seja ele um anticorpo ou outra proteína de interesse. Geralmente, a celulose é utilizada como suporte por ter baixo custo, ser hidrofílica, por ser facilmente manipulada durante a síntese dos peptídeos e principalmente, por ser estável sob as várias condições das reações (FRANK, 1992; KATZ, 2011).

O método é rápido e simples por não serem necessários muitos reagentes, além de oferecer flexibilidade na escala da síntese e no uso dos peptídeos (FRANK, 1992). Desenvolveu-se a técnica em membrana de celulose, primeiramente para o mapeamento e

estudo de epítomos (FRANK, 1992). Porém, pode-se utilizar a síntese de peptídeos em suportes de celulose para diferentes objetivos e ensaios (KRAMER, 1999).

No que se refere à utilização da técnica no mapeamento de epítomos, em 2011, Lima-Junior et al., em estudos sobre a malária, tinham conhecimento de que a proteína PvMSP3 do *Plasmodium vivax* era considerada como uma potencial candidata à vacina. Então, o mapeamento de epítomos realizado através do Spot Synthesis confirmou o potencial imunogênico da proteína, avaliando sua antigenicidade frente a soros de pacientes.

Em 2013, Bottino et al. em estudos da doença de Chagas, identificaram epítomos pertencentes ao antígeno repetitivo citoplasmático (CRA) e ao antígeno repetitivo flagelar (FRA) do *Trypanosoma cruzi* utilizando a técnica de Spot Synthesis e pool de soros de pacientes com a doença de Chagas. Tais epítomos foram identificados para serem utilizados tanto para diagnóstico, como para o desenvolvimento de vacinas.

Já em 2015, Gauna et al. estudaram três proteínas do capsídeo do vírus da hepatite A. Estes autores analisaram estas sequências através do Spot Synthesis, para prever epítomos peptídicos de diagnóstico. Destes estudos, foram selecionadas duas sequências peptídicas que mostraram maior reconhecimento quando testadas com um pool de soros de pacientes com hepatite A.

Com o alto potencial que a técnica possui para o mapeamento de epítomos, neste trabalho, foram estudadas algumas proteínas do *M. leprae* selecionadas anteriormente por Spencer et al. (2012) quanto à antigenicidade por ELISA e Western blotting, frente a soros de pacientes com manifestações clínicas diferentes. Foram elas: ML2038, ML0405, ML2055, ML0286, ML0091 e ML0050.

De acordo com UNIPROT, a proteína ML2038 (número de acesso NP_302363) que também é chamada de bacterioferritina, é uma proteína de armazenamento de ferro,

funcionando como um depósito temporário de ferro. Já a proteína ML0405 (número de acesso NP_301387) ainda não possui sua função definida, porém é uma proteína hipotética conservada.

A proteína ML2055 (número de acesso NP_302372) provavelmente possui função relacionada com a ligação do *M. leprae* à matriz extracelular. Por sua vez, ML0286 (número de acesso NP_301326) é também conhecida como frutose-bisfosfato aldolase e participa da glicólise no *M. leprae*. A proteína ML0091 (número de acesso NP_301189) está presente no envelope celular e provavelmente é precursora de antígenos de superfície. Já ML0050 (número de acesso NP_301163) é uma proteína secretada que desempenha um papel na infecção do *M. leprae*.

Além de ter sido estudada por Spencer et al., 2012, incluiu-se também nesse estudo a sequência proteica referente ao antígeno 85B (número de acesso P31951) pelo fato desta proteína, aparentemente, ter sido o alvo de anticorpos de pacientes hansenianos em uma busca de mimotopos pela técnica de Phage Display. Nosso objetivo foi confirmar o indício de que o peptídeo APDDPAWQNIFNLRR encontrado por Alban et. al. (2013, 2014) tratava-se, realmente, de uma sequência mimética de um epítipo imunodominante deste antígeno, ou seja, um mimotopo.

Os mimotopos são peptídeos que, apesar de não possuírem a mesma sequência de aminoácidos do antígeno original (no caso do antígeno 85B), são capazes de imitá-lo funcionalmente, induzindo a produção de anticorpos que reagem com este antígeno (PACHOVA, 2016).

De acordo com UNIPROT novamente, em relação à sua função, a proteína do antígeno 85B é também conhecida como diacilglicerol acetiltransferase e, juntamente com as proteínas do antígeno 85A e 85C, é responsável pela alta afinidade da micobactéria à fibronectina (glicoproteína adesiva), o que facilita a ligação de micobactérias aos macrófagos murinos alveolares.

Neste trabalho, realizaram-se as análises imunoquímicas das proteínas supracitadas através da técnica de Spot Synthesis, para se conhecer os epítomos imunodominantes pertencentes a estas. Em um segundo momento, também foram realizadas análises de imunogenicidade e antigenicidade para a confirmação das características miméticas do Antígeno 85B e por fim, para confirmar os resultados obtidos e conhecer melhor os peptídeos do *M. leprae*, foram feitas análises *in silico*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

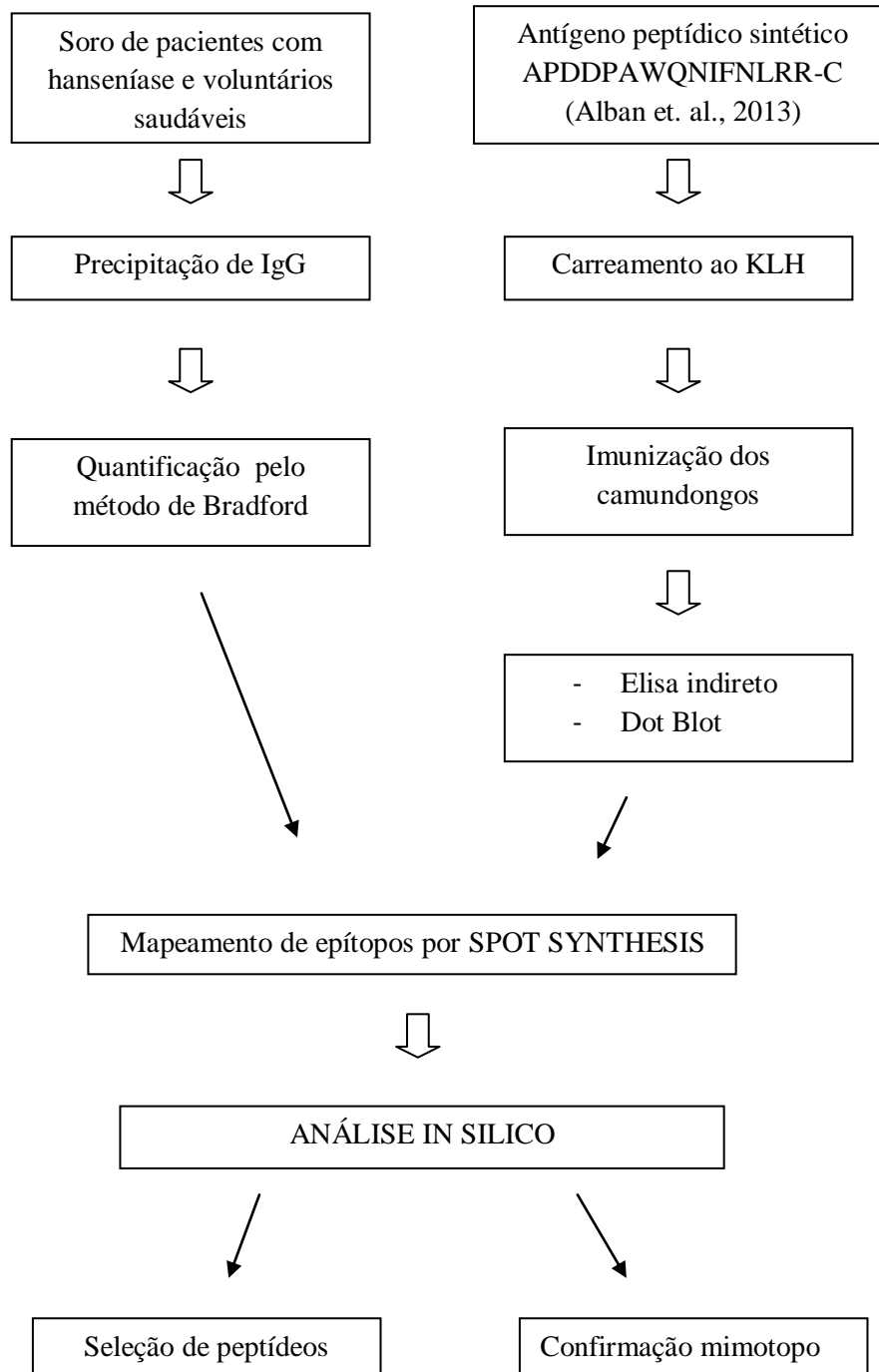
- Identificar epítomos lineares e caracterizar um epítomo conformacional de proteínas do *M. leprae* por meio da técnica de Spot Synthesis.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar sequências peptídicas imunodominantes de proteínas de *M. leprae* como potenciais marcadores sorológicos para o diagnóstico da hanseníase
- Padronizar as condições para teste da membrana de SPOT para soros de pacientes paucibacilares, multibacilares e de voluntários sadios;
- Obter anticorpos murinos anti-peptídeo mimético após carreamento do APDDPAWQNIFNLRR-C com KLH e imunização de camundongos;
- Caracterizar as propriedades do peptídeo APDDPAWQNIFNLRR como miméticas do antígeno 85B de *M. leprae*;
- Realizar um estudo *in silico* sobre a estrutura tridimensional do Antígeno 85B por homologia para identificar as regiões com potencial epitópico.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 FLUXOGRAMA



5.2 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

5.2.1 Amostras de pacientes com hanseníase

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Humano em Pesquisa em Seres Humanos sob o número: 1080.005.11.02. Após assinaturas dos termos de consentimentos, 140 amostras foram coletadas de pacientes da região de Guarantã do Norte – Mato Grosso com diagnóstico confirmado de hanseníase.

Foram coletadas amostras de sangue total e colocadas em tubos com gel de separação. Em seguida, amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos, o soro foi separado e congelado a – 20° C.

5.2.2 Amostras de doadores de sangue – Controle negativo

Depois dos termos de consentimento livre e esclarecido terem sido assinados, foram coletadas também 100 amostras de soros de doadores de sangue, após análise de sorologia, do Laboratório de Sorologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar) e congelados a – 20° C.

5.3 TÉCNICA “SPOT SYNTHESIS”

Utilizaram-se duas membranas de celulose com peptídeos sintetizados, como mostrado na Figura 6. As membranas continham as sequências das proteínas de interesse do *Mycobacterium leprae*, a membrana menor continha a sequência da proteína do antígeno 85B e na membrana maior, foram sintetizadas as sequências das seguintes proteínas do *M. leprae*: ML2038, ML0405, ML2055, ML0286, ML0091 e ML0050 baseando-se nos estudos de antigenicidade de Spencer et al. (2012).

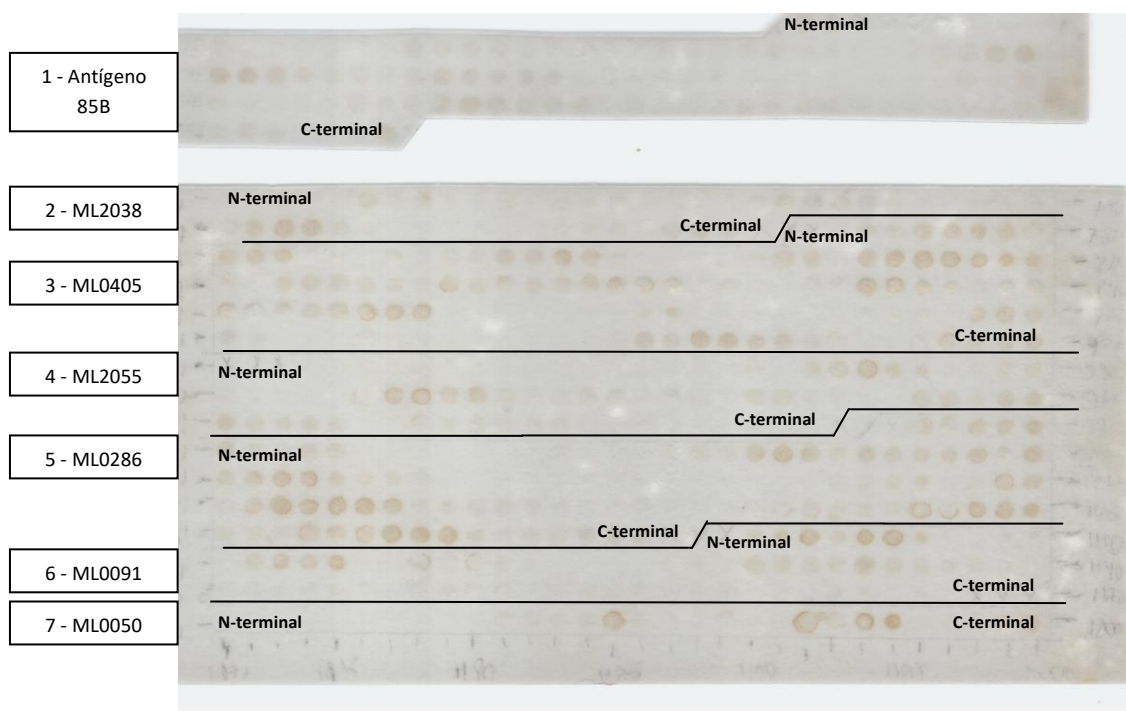


Figura 6 – Proteínas antigênicas do *M. leprae* sintetizadas pela técnica de Spot synthesis - Membranas de celulose correspondentes a sete proteínas do *M. leprae* quimicamente sintetizadas pela técnica de *Spot synthesis*. Cada círculo corresponde a um peptídeo componente da proteína que se diferencia do antecessor em três aminoácidos e assim, sucessivamente.

Como pode-se observar na Figura 6 acima, as membranas possuem vários “spots”. Em cada “spot” há uma sequência de 15 aminoácidos do peptídeo pertencente a determinada proteína de interesse, cobrindo toda a sequência da proteína. Sendo que, por exemplo, no primeiro “spot” foram sintetizados pela técnica Fmoc os primeiros 15 aminoácidos da proteína, já no segundo e terceiro “spots” peptídeos constituídos pelo 3º ao 18º aminoácido e pelo 6º ao 21º aminoácido, respectivamente, e assim por diante. Esta membrana foi sintetizada pelo Dr. Ricardo Andrez em equipamento automático chamado Multi pep Automatic Spot synthesizer – Intavis.

Sendo que o sintetizador automático primeiro acopla o resíduo C-terminal de todos os peptídeos em cada “spot” da membrana, em seguida ocorre o acoplamento do seguinte resíduo até completar o peptídeo desejado em cada “spot” com o resíduo N-terminal, como é representado pela Figura 7.

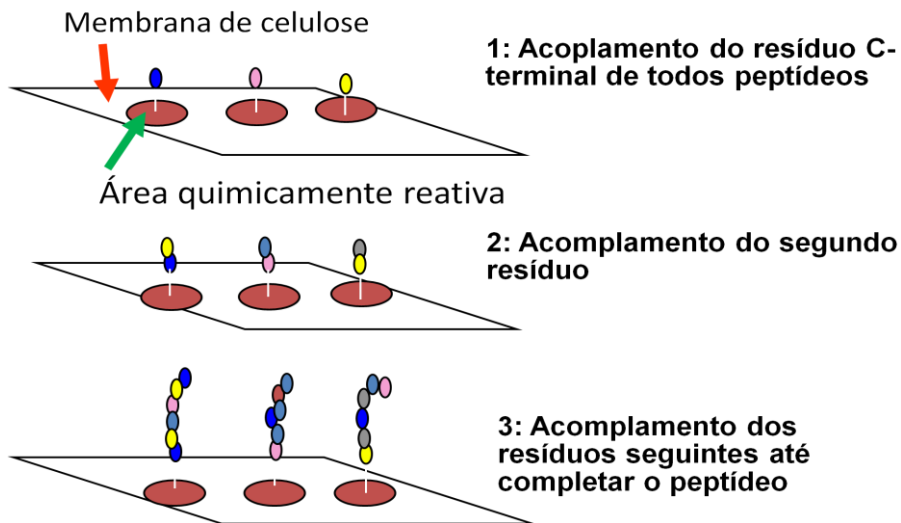


Figura 7 – Ilustração das etapas que se sucedem na síntese de peptídeos sobre a membrana de celulose. Nela, o primeiro resíduo C-terminal de todos os peptídeos é adicionado até completar os peptídeos desejados em cada spot e por fim, acopla-se o resíduo N-terminal.

Posteriormente à síntese, a membrana está pronta para ser utilizada e de forma geral, tem sua superfície bloqueada com uma proteína inerte. Como indica a Figura 8, os ensaios ocorrem com a adição dos anticorpos primários (indicados em azul). Após lavagem, segue-se com a incubação com os anticorpos secundários (indicados em rosa), geralmente conjugados à enzima peroxidase.

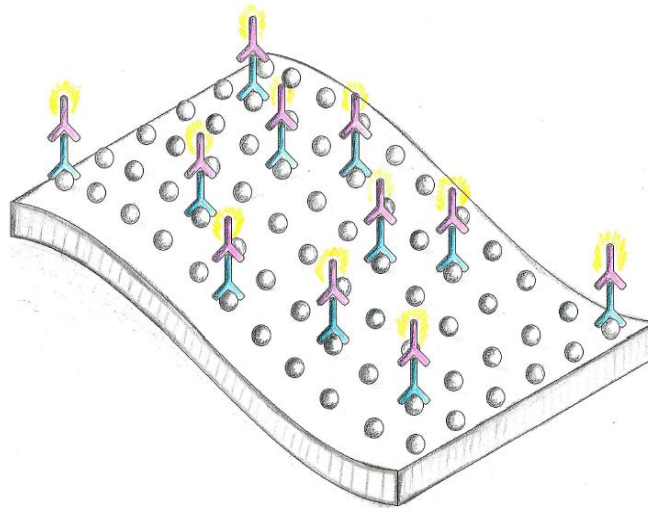


Figura 8 – Ensaio geral de Spot Synthesis. Ilustração de um ensaio geral em uma membrana de Spot Synthesis utilizando-se anticorpos. Em cinza estão indicados os “spots” com os peptídeos sintéticos, em azul, os anticorpos primários, e em rosa, os anticorpos secundários.

5.3.1. Precipitação de IgGs de Soros

Neste trabalho, foi utilizada a solução de sulfato de amônio supersaturada, a qual foi preparada 24 horas antes de se realizar a precipitação. Para o seu preparo, adicionou-se uma alta quantidade de sulfato de amônio (aproximadamente 300g) em 300 mL de água destilada sob agitação. A solução continuou sob agitação por cerca de 18 horas a temperatura ambiente. Em seguida, ela foi armazenada a 4°C até ser utilizada.

Primeiro, foram realizados pool dos soros dos pacientes com hanseníase e pool dos soros dos pacientes saudáveis (controle negativo). Em seguida, estes pools foram precipitados. Todas as precipitações foram realizadas da mesma maneira.

Utilizaram-se, em cada precipitação, 10mL dos soros. Centrifugou-se o soro durante 30 minutos por 8000 rpm a 4°C. Descartou-se o pellet para evitar a contaminação excessiva por lipídeos, o que comprometeria a precipitação.

Em seguida, o soro ficou sob lenta agitação à 4°C enquanto gotejaram-se lentamente 10 mL (50% de saturação) da solução de sulfato de amônio preparada anteriormente. Agitou-se a 4°C durante cerca de 18 horas. Escolheu-se utilizar 50% de saturação final de sulfato de amônio para precipitar praticamente todas IgGs presentes no soro.

No dia seguinte, centrifugou-se a solução obtida durante 20 minutos por 4000 rpm a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido com PBS (0,5M fosfato de sódio monobásico e dibásico). Primeiro, adicionou-se PBS ao pellet em quantidade equivalente a 20% do volume original do soro, ou seja, 2 mL. A seguir, completou-se o volume até 50% do volume original (5 mL).

Na próxima etapa, fez-se uma diálise em PBS para retirar todo sulfato de amônio presente na solução. Trocou-se a solução de PBS três vezes ao longo do dia e a diálise permaneceu aproximadamente por 16 horas a 4°C.

5.3.2 Dosagem de proteínas através do Bradford

Após a retirada das amostras da diálise, realizou-se uma dosagem de proteínas através do método de Bradford, utilizando-se BSA (Albumina Bovina Sérica) como proteína padrão.

Após as diluições de BSA e as amostras serem colocadas na placa, adicionaram-se 180 µL do reagente de Bradford em cada poço. A placa foi deixada no escuro durante 15 minutos e em seguida, foi lida no espectrofotômetro a 570nm. Com os resultados obtidos, foi possível construir a curva de Bradford e obter a concentração de proteínas (IgGs) em cada amostra (pacientes com hanseníase e pacientes saudáveis).

5.3.3 Avaliação dos epítomos imunodominantes de proteínas de *M. Leprae* com os soros dos pacientes

Na primeira etapa da técnica de Spot Synthesis, incubou-se a membrana durante 10 minutos com o tampão TBS sob agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, bloqueou-se com TBS juntamente com BSA 3% (m/v) durante 17 horas a 4°C, sob agitação.

Após o bloqueio, lavou-se a membrana com TBS-Tween 20 0,1% durante 10 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Então, a membrana pôde ser incubada com as IgGs precipitadas anteriormente, tanto dos soros dos pacientes com hanseníase como dos pacientes saudáveis (aproximadamente 12mg/mL foi utilizada em cada ensaio). A incubação foi realizada em bloqueio com TBS-Tween 20 e BSA 1% durante 1,5 horas a 37°C sob agitação.

Em seguida, a membrana foi lavada novamente com TBS-Tween 20 0,1% durante 10 minutos e o anticorpo secundário foi colocado. Nos ensaios com os soros de pacientes, utilizou-se o anti-humano peroxidase em uma concentração igual a 1:120.000, também em bloqueio com TBS-Tween 20 0,1% durante 1 hora a 37°C sob agitação.

Finalizando a incubação, lavou-se a membrana com TBS-Tween 20 0,1% durante 10 minutos e em seguida, ela foi mergulhada rapidamente no tampão TBS.

Como controle negativo desse ensaio, também foi realizada a incubação apenas do anti-humano peroxidase 1:120 000 na membrana.

Depois de finalizadas as etapas de incubação dos anticorpos nas membranas de Spot Synthesis, revelou-se a membrana por quimioluminescência (ECL), técnica na qual se utiliza um filme fotossensível em uma sala totalmente escura. As soluções utilizadas para revelação são os reagentes ECL Western Blotting Detection (GE) em igual quantidade. Em um cassete foi colocado a membrana de Spot Synthesis juntamente com esta solução. Então, em uma sala escura expõe-se a membrana a um filme fotossensível de revelação (Amersham Hyperfilm ECL – GE Healthcare). Neste trabalho, os tempos de exposição foram de 5, 15 e 30 minutos até encontrar o tempo ideal, que foi de 30 minutos.

Após o tempo necessário, removeu-se o filme e realizou-se a sua revelação. Primeiro, colocou-se o filme por aproximadamente 30 segundos a 1 minuto em uma solução reveladora, lavou-se em água, transferiu-se o filme para outra solução chamada de fixadora durante o

mesmo tempo e por fim, lavou-se com água novamente. Em seguida, foi possível visualizar os resultados.

5.3.4 Avaliação das propriedades miméticas do peptídeo APDDPAWQNIFNLRR

- Conjugação do peptídeo a proteína carreadora

O peptídeo do *Mycobacterium leprae* que foi utilizado neste trabalho, foi acoplado ao KLH via SMCC para depois ser utilizado para imunizar os camundongos (CAPELLI-PEIXOTO, 2011).

Para a acoplagem, primeiramente foram preparadas duas soluções, PBS (16 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaH_2PO_4 e 0,09 mM NaCl) e PBS com EDTA (100mM). Ajustou-se o pH de ambas com NaOH 10mM, até alcançar um valor entre 7,2 e 7,3.

Depois do preparo destas soluções, realizou-se a ativação do KLH com SMCC. Utilizou-se a proporção 1:1 entre KLH e peptídeo, pelo fato do KLH ter uma alta massa molecular. Então, como se utilizaram 2,5 mg/mL de peptídeo, 2,5 mg/mL de KLH foram preparados. Pesou-se 1mg de SMCC e diluiu-se em 100 μL de DMF para se obter uma concentração de 10 mg/mL. Porém, como se utilizaram 250 μL de KLH foi necessário adicionar apenas 25 μL da solução de SMCC. Então, incubou-se esta solução ao abrigo da luz, a temperatura ambiente, durante 1 hora, sob leve agitação.

Em seguida, realizou-se a separação do KLH ativado. Utilizou-se uma coluna de cromatografia PD 10, equilibrada com aproximadamente 100 mL de PBS a temperatura ambiente e posteriormente com 50 mL de PBS com EDTA.

Após estas lavagens, acrescentou-se o KLH ativado na coluna e iniciou-se a coleta das gotas em 30 microtubos de 1,5 mL. Coletaram-se aproximadamente 10 gotas em cada

microtubo e à medida que as gotas foram sendo coletadas, adicionou-se aproximadamente 1 mL de PBS com EDTA na coluna, evitando-se o ressecamento da resina.

Após a coleta das gotas, realizou-se uma diluição (1/25) em PBS com EDTA e a leitura destas amostras no espectrofotômetro a 280nm. Analisou-se a curva e escolheram-se os microtubos nos quais ocorreram o primeiro pico para serem incubados com o peptídeo.

Então para finalizar o acoplamento, foram pesados 2,5 mg do peptídeo, que foram dissolvidos em 250 µL de água destilada e em seguida adicionaram-se 250 µL do KLH ativado. Incubou-se a 4°C durante aproximadamente 16 horas.

No dia seguinte, realizou-se o bloqueio das cisteínas livres. Para esta etapa, preparou-se uma solução de cisteína a 5mg/mL para ajustar a solução dos peptídeos carregados para 1mM. Em seguida, como tínhamos 500 µL de solução com os peptídeos, adicionaram-se a ela 12,15 µL desta solução de cisteína e incubou-se ao abrigo da luz durante 20 minutos a temperatura ambiente sob leve agitação.

Por fim, para retirar os peptídeos não ligados ao KLH, dialisou-se a solução contendo os peptídeos carregados contra PBS. O primeiro processo de diálise com 2 litros de PBS durou 2 horas à 4°C, trocou-se o PBS e acrescentou-se novamente 2 litros; este segundo durou aproximadamente 16 horas também à 4°C. Após a diálise, os peptídeos carregados foram congelados.

- Imunização de animal para obtenção de anticorpos

Oito camundongos fêmeas Swiss com idade aproximada de 4 a 5 semanas foram mantidos no Biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba – PR, de acordo com as normas do Comitê de Ética Animal (Nº 986 – Processo: 23075.128846/2016-19). Desses animais, seis foram imunizados com um mimotopo, até então aparentemente referente ao antígeno 85B do *Mycobacterium leprae* (Alban et al., 2013; 2014) carregado com KLH (Hemocianina do molusco “Keyhole Limpet”) e dois animais foram utilizados como controle

negativo, sendo imunizados apenas com KLH. Todos os animais tiveram livre acesso a comida e água.

Na primeira imunização (dia 0), os camundongos foram injetados subcutaneamente com uma dose de peptídeo carregado, a qual foi 50 µg/animal dissolvido em 50 mM de tampão fosfato salino, pH 7,4 (PBS) e emulsificado com adjuvante incompleto de Freund (1:1, taxa de volume) em um volume total de 100 µL/animal. Os dois animais do controle negativo foram imunizados apenas com KLH (5 µg/animal) dissolvido em PBS e também emulsificado com adjuvante incompleto de Freund. As imunizações seguintes foram realizadas nas mesmas condições nos dias 21, 35 e 42. Uma semana após a última imunização, foram coletados aproximadamente 100µL de sangue por meio de uma sangria retro-orbital do camundongo para se medir a reatividade dos anticorpos através de ELISA. Deve-se enfatizar, que pelo fato do adjuvante completo de Freund ter em sua constituição o *Mycobacterium tuberculosis* ou *M. butyricum*, utilizou-se apenas o adjuvante incompleto.

- *Elisa Indireto*

Para se conhecer a reatividade dos anticorpos obtidos através da sangria total dos camundongos imunizados, realizou-se um ELISA indireto.

Sensibilizou-se uma placa de 96 poços durante 16 horas a 4°C com 2 µg/mL do peptídeo conformacional (não acoplado com KLH) dissolvido em tampão 0,02 M de bicarbonato de sódio (pH 9,6). No dia seguinte, bloqueou-se a placa com solução de caseína 2% por 1 hora a 37°C, com o objetivo de impedir que ligações não específicas ocorressem.

Após o bloqueio, o soro dos camundongos foi diluído 1:100 em tampão de incubação (Tween 20, 0,25% (m/v) de caseína) e incubado por 1 hora a 37°C. A ligação do anticorpo foi quantificada utilizando o conjugado anti-mouse IgG (toda molécula)-horseradish peroxidase (Sigma #A4416) diluído 1:4000 também em tampão de incubação. Sendo que entre cada

incubação, os poços foram lavados três vezes com solução de lavagem (0,15M NaCl, 0,05% Tween 20).

Ao final de todas as incubações, adicionou-se a solução de substrato (orto-fenilenediamina e H₂O₂) 100 µL/poço durante 20 minutos. Parou-se a reação com 20µL/poço de H₂SO₄ 1:20 (v/v). Por fim, avaliou-se a absorbância em um leitor de placas de ELISA (Microplate Reader 550, BIORAD) no comprimento de onda igual a 490 nm. Realizaram-se triplicatas em todos os ensaios.

- Spot Synthesis com soros dos camundongos

Em relação aos soros dos camundongos, realizaram-se as mesmas etapas descritas no tópico 5.3.3. Porém, como não foi preciso realizar a precipitação de IgGs do soro, utilizou-se uma diluição do soro dos camundongos em PBS-Tween 0,1% bloqueado com BSA 1% (m/v) e não foi necessário realizar a dosagem de proteínas.

Nessa etapa, foram testados o soro dos camundongos pré-imunizados (1:1000), soro dos camundongos imunizados com peptídeo carregado com KLH (1:1000) pré tratados para diminuir a reatividade cruzada, soro dos camundongos imunizados apenas com KLH (1:1000) e como controle, apenas o anti-mouse peroxidase. Sendo que o anti-mouse peroxidase foi utilizado em uma concentração igual a 1:50.000 em todos os ensaios desta etapa.

- Dot Blot com soros de camundongos

Ao testar o soro dos animais imunizados com peptídeo e KLH na membrana de Spot Synthesis com o antígeno 85B, observou-se alta reatividade cruzada de anticorpos anti-KLH nos peptídeos sintetizados sobre ela. Então, para tentar diminuir as ligações inespecíficas de anticorpos anti-KLH na membrana, realizou-se um Dot Blot de forma a recuperar outros anticorpos, possivelmente anti-peptídeo, e eliminar os anti-KLH.

Primeiro ativou-se uma membrana de fluoreto polivinidileno (PVDF) com metanol sob agitação durante 10 minutos. Após secagem, pipetaram-se 3 μL de KLH (10mg/mL) em vários pontos. Em seguida, adicionou-se Ponceau por 10 minutos para confirmar que o KLH realmente estava presente nos dots. Realizaram-se 3 lavagens com água destilada e então, bloqueou-se a membrana durante 2 horas a 37°C sob agitação com 5% (m/v) leite desnatado 0,3% (v/v) Tween diluídos em PBS.

Após o bloqueio, realizaram-se 3 lavagens de 10 minutos com PBS-Tween 0,05% e incubaram-se os soros dos camundongos imunizados com peptídeo + KLH diluídos em PBS-Tween 0,1% (1:500) por 2 horas a 37°C sob agitação.

Após a incubação, retirou-se o sobrenadante da membrana do Dot Blot, neste momento sem os anticorpos anti-KLH que ficaram retidos na membrana. Posteriormente, adicionou-se 0,1% (m/v) de BSA à solução que foi incubada sobre a membrana de SPOT Synthesis contendo os peptídeos sobrepostos do antígeno 85B.

5.4 ANÁLISE IN SILICO POR BIOINFORMÁTICA

Depois que os ensaios de SPOT-Synthesis foram finalizados, utilizaram-se programas de Bioinformática para analisar os peptídeos reativos das proteínas das membranas. Para análise das características dos peptídeos, utilizaram-se os seguintes programas: AAP Predictions, BCPred Predictions, Epitopia, Genscript, Peptide 2.0 e SVM Trip, os quais basicamente informaram massa molecular, ponto isoelétrico e se os mesmos seriam caracterizados como hidrofóbicos ou hidrofílicos, ácidos ou básicos, dentre outros.

Após estas análises, escolheram-se os peptídeos com as características mais adequadas para serem sintetizados e utilizados em futuros ensaios de ELISA para se diagnosticar a hanseníase.

Utilizaram-se ferramentas de bioinformática também para se tentar prever as estruturas tridimensionais das proteínas estudadas neste trabalho, por meio de homologia. Porém, dentre as

proteínas do *M. leprae* a única que possuía alta identidade com outra já conhecida, era a do Antígeno 85B. Como modelo, portanto, utilizou-se o Antígeno 85B do *Mycobacterium tuberculosis* (PDB 1F0N) com 85,21% de identidade com a proteína homóloga de *M. leprae*.

Para que o modelo da proteína do Antígeno 85B fosse montado, primeiro utilizou-se um programa chamado SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), no qual foi inserida a sequência completa desta proteína para se encontrar outras proteínas similares.

Depois de se obter a estrutura 3D desta proteína, o objetivo foi identificar os peptídeos potencialmente reativos ao soro dos pacientes positivos com hanseníase e também localizar o peptídeo linear reagente frente aos soros dos camundongos imunizados com o peptídeo conformacional (mimotopo).

Com esse objetivo, outra ferramenta foi utilizada chamada de Swiss-Pdb Viewer. Neste programa, colocou-se o arquivo da proteína do Antígeno 85B em formato “Pdb”, para que as regiões de interesse fossem encontradas e analisadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DOSAGEM DE PROTEÍNAS POR BRADFORD

Após a precipitação das IgGs dos soros dos pacientes com hanseníase e dos pacientes saudáveis, realizou-se a dosagem de proteínas pelo método de Bradford para se conhecer as concentrações das amostras obtidas.

Em um primeiro momento, precipitaram-se 10 mL do pool dos soros dos pacientes com hanseníase de titulação alta e seguindo o protocolo de precipitação, recuperaram-se 5mL. Com essa quantidade, foi possível realizar alguns ensaios. Porém, para dar continuidade aos experimentos, foi necessário precipitar maior quantidade de IgGs desses mesmos soros. Logo, precipitaram-se 20mL dos soros e recuperaram-se 10mL.

Na primeira precipitação, a concentração obtida pelo método de Bradford foi igual a 44,42 mg/mL e na segunda, obtiveram-se 39,125 mg/mL. Ambas as concentrações foram consideradas bastante altas e adequadas para se dar continuidade aos experimentos. Comparando-se aos resultados de Liu X et. al. (1999), o método de precipitação foi eficiente, se considerarmos que os autores conseguiram uma concentração de IgGs precipitadas de 4,5 mg/mL a 5,5 mg/mL. O rendimento, neste seu caso, foi considerado aproximadamente igual a 39% a 45%, apesar do volume inicial utilizado pelo autor não ser mencionado.

Precipitaram-se também as IgGs dos soros dos pacientes saudáveis, como não foram necessários muitos ensaios com estas amostras, realizou-se a precipitação apenas uma vez, na qual utilizaram-se 10mL de soro recuperando-se 5mL de amostra. Pelo método de Bradford, a concentração obtida foi igual a 43,18 mg/mL. Esta também foi considerada adequada para os ensaios seguintes. Para melhor visualização, todas as concentrações são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Concentrações obtidas na dosagem por Bradford após a precipitação das IgGs.

Concentração no método de Bradford	Pacientes com hanseníase	Voluntários
1ª Precipitação de IgGs	44,42 mg/mL	43,18 mg/mL
2ª Precipitação de IgGs	39,125 mg/mL	-
Média	41,77 mg/mL	43,18 mg/mL

Como é possível observar no quadro 1 acima, tanto os pacientes com hanseníase, como os voluntários, possuem quantidades bem parecidas de anticorpos circulantes, visto a concentração obtida de IgGs precipitadas. Mesmo em pacientes com hanseníase classificados clinicamente como paucibacilares (41,6% do total), a maior resposta celular Th1 e menor resposta humoral de linfócitos B a antígenos do *M. leprae* (LEGENDRE, 2012; NATH, 2015), parece não ter influenciado na concentração total de imunoglobulinas; essa tendência existe

somente contra antígenos da micobactéria. Isso indica que, muito provavelmente, a estratégia de precipitar as imunoglobulinas possa ser um passo a ser incluído nas análises de pacientes paucibacilares por técnicas sorológicas incluindo, por exemplo, a técnica de Spot Synthesis.

6.2 ELISA INDIRETO

Após as imunizações dos camundongos, realizaram-se testes de ELISA para se conhecer a concentração de anticorpos obtida na sangria de cada animal. O resultado deste teste é apresentado na Figura 9. Sendo que os camundongos com números de 1 a 6 foram imunizados com o peptídeo APDDPAWQNIFNLRR carregado com KLH e aqueles identificados como 7 e 8 foram imunizados apenas com KLH.

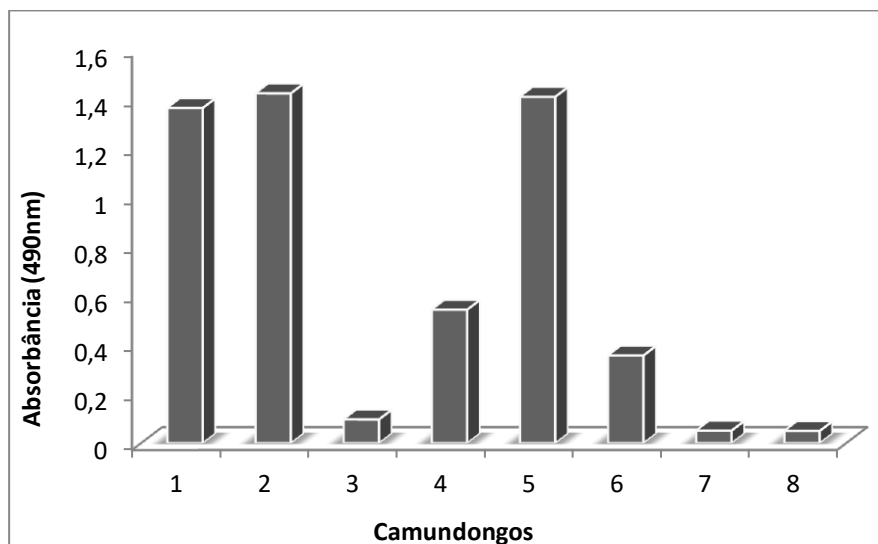


Figura 9 - ELISA: Reatividade dos soros dos camundongos com imunização frente ao peptídeo APDDPAWQNIFNLRR carregado com KLH ou apenas KLH (1:100) e revelados com o conjugado anti-mouse peroxidase (1:4000) . Sendo 1 ao 6; imunizados com peptídeo – KLH e animais 7 e 8: imunizados apenas com KLH

Como é possível observar no gráfico acima, a reatividade obtida no sangue dos animais 1, 2 e 5 foi bastante satisfatória. Realizou-se um pool destas amostras para serem utilizadas nos ensaios com as membranas de Spot Synthesis. Enquanto que as amostras obtidas dos animais 7 e 8 foram utilizadas como controle.

6.3 TÉCNICA “SPOT SYNTHESIS”

6.3.1 Spot Synthesis com soros humanos

Levando-se em consideração a dificuldade de obter anticorpos específicos contra antígenos de *M. leprae*, nos primeiros experimentos realizados com as membranas de Spot Synthesis contendo as proteínas do *M. leprae*, tentou-se utilizar diretamente os soros dos pacientes com hanseníase e de voluntários saudáveis. Contudo, a reatividade sobre membrana foi inexistente ou, muitas vezes, bastante inespecífica e inconclusiva (dados não mostrados). Por isso, na tentativa de se obter resultados mais confiáveis, precipitaram-se as IgGs dos soros de interesse, de forma a se concentrar as imunoglobulinas específicas anti proteínas de *M. leprae*.

Paralelamente à precipitação das imunoglobulinas, realizaram-se vários ensaios para se definir a concentração ideal que deveria ser utilizada do conjugado anti-IgG humana (y-chain specific) conjugada à peroxidase. Concentração esta em que o conjugado não deveria se mostrar reativo nas membranas, mas em quantidade suficiente para detectar as IgGs dos pacientes, ligados aos peptídeos sintetizados na membrana.

Depois dos ensaios, concluiu-se que a melhor diluição do anticorpo secundário seria 1:120.000, diluído em tampão de bloqueio do Spot Synthesis e que, na etapa de revelação, o tempo de exposição da membrana ao filme poderia ser de até 30 minutos. Nesta diluição, apenas um “spot” da proteína ML2055 mostrou-se reativo (Figura 10). Então, nos experimentos com os soros, este “spot” não foi levado em consideração quando os resultados foram avaliados. Apesar de, como mostrado na Figura 13, em que se testou o soro pré-imune, este “spot” não foi reagente, sugerindo que esta reatividade seja apenas um artefato.

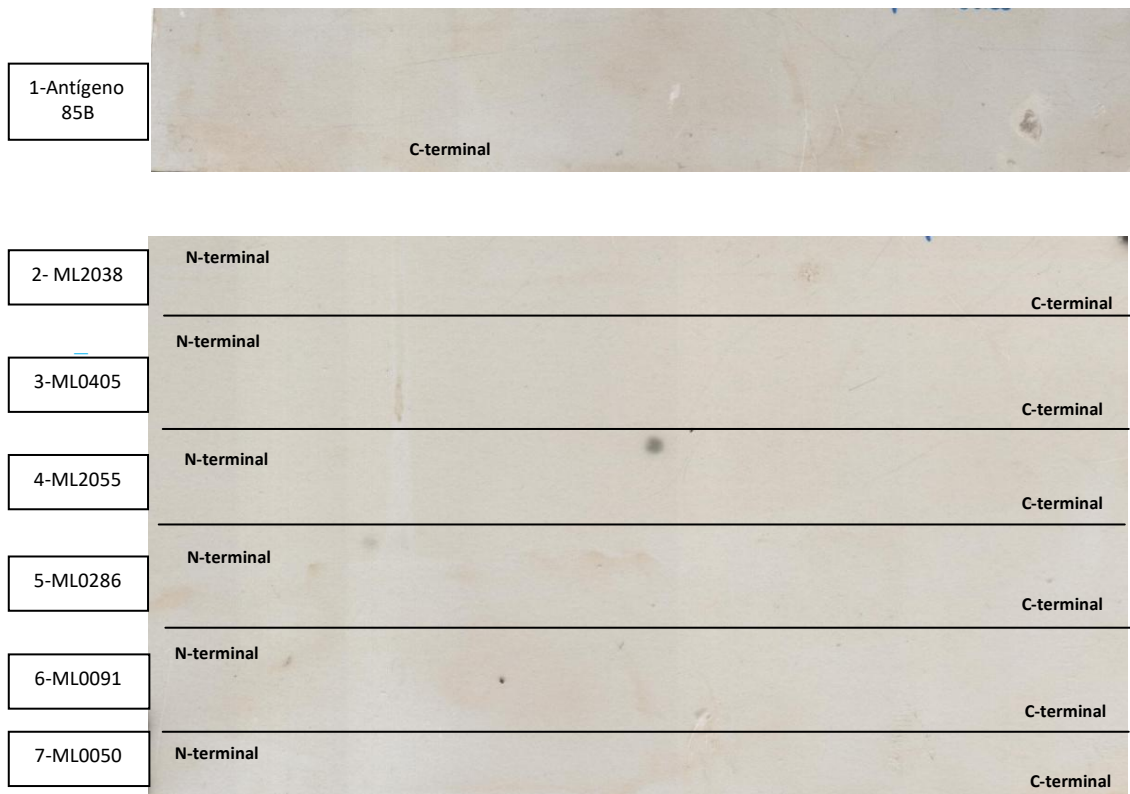


Figura 10 –Reatividade dos peptídeos referentes aos antígenos de *M. leprae* frente ao anticorpo anti IgG humana-HRP. As membranas foram bloqueadas e testadas exclusivamente com o anticorpo anti-IgG humana conjugada à peroxidase (1:120.000). De acordo com a padronização, o tempo de exposição do filme para a revelação foi igual a 30 minutos. Em ordem as proteínas testadas foram: antígeno 85B, ML2038, ML0405, ML2055, ML0286, ML0091 e ML0050.

Com a diluição do conjugado anti-humano definida, começaram-se os testes com as IgGs precipitadas do pool dos soros de alta titulação dos pacientes com hanseníase. Estes ensaios foram realizados de acordo com a quantidade e concentração de IgGs precipitadas obtidas.

Nos primeiros experimentos, utilizaram-se 2 mg/mL de IgGs precipitadas dos soros de alta positividade. Porém, observou-se que a concentração estava bastante baixa, uma vez que a reatividade foi muito sutil (resultados não apresentados). Então, nos experimentos seguintes, aumentou-se a concentração de IgGs para 5,8 mg/mL em tampão de bloqueio do Spot Synthesis. Nestes ensaios, o tempo de revelação à que a membrana foi exposta foi de 30

minutos e os resultados dos peptídeos reativos são mostrados na Figura 11. As proteínas do antígeno 85B, ML0405 e ML2055 apresentaram peptídeos reativos.

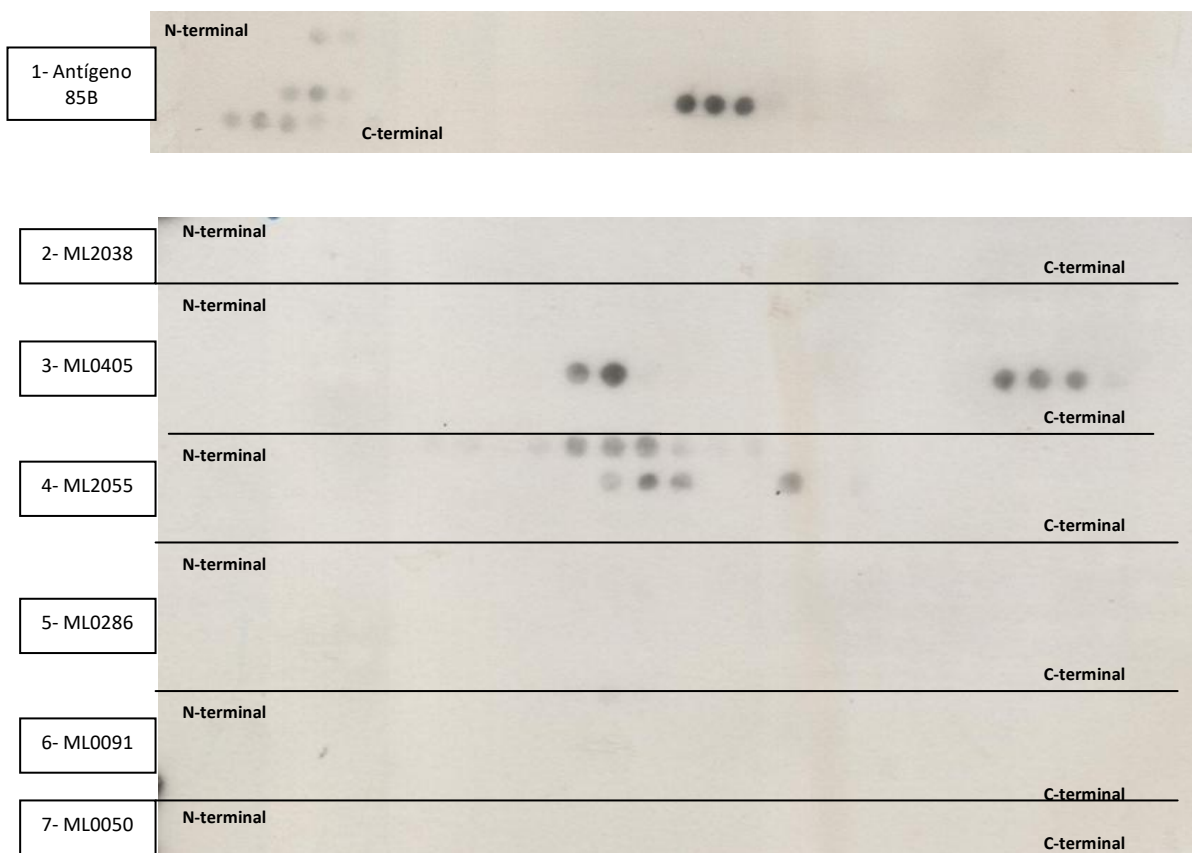


Figura 11 – Reatividade dos peptídeos referentes às proteínas de *M. leprae* frente a 5,8 mg/mL de IgG de pacientes hansenianos. As membranas foram bloqueadas e testadas com os anticorpos dos pacientes detectados por anti-IgG humana conjugada à peroxidase (1:120.000). De acordo com a padronização, o tempo de exposição do filme para a revelação foi igual a 30 minutos. Em ordem, as proteínas testadas foram: antígeno 85B, ML2038, ML0405, ML2055, ML0286, ML0091 e ML0050.

Com o objetivo de se confirmar os resultados obtidos, repetiram-se os ensaios utilizando maior concentração de IgGs precipitadas positivas (10,25 mg/mL). Os resultados são mostrados na Figura 12. Todos os experimentos foram realizados sob as mesmas condições de incubação, modificando-se somente as concentrações.

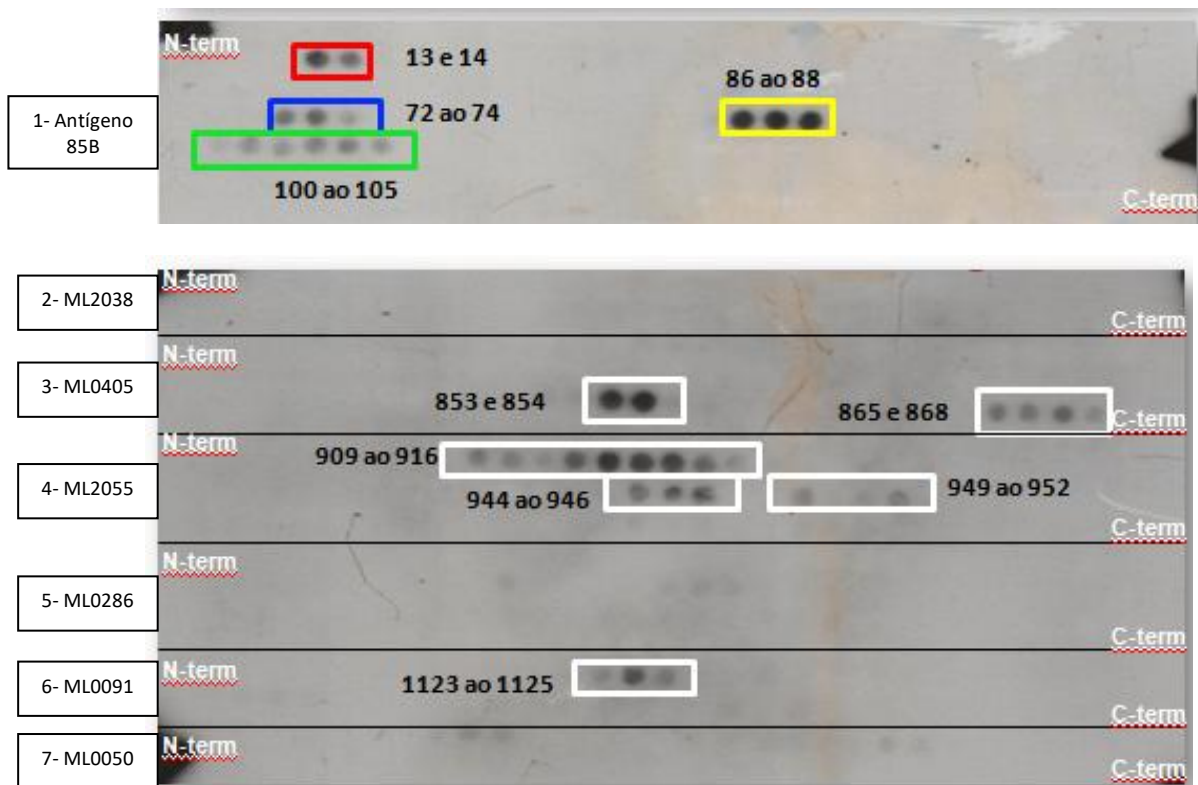


Figura 12 - Reatividade dos peptídeos referentes às proteínas de *M. leprae* frente a 10,25 mg/mL de IgG de pacientes hansenianos. As membranas foram bloqueadas e testadas com os anticorpos dos pacientes detectados por anti-IgG humana conjugada à peroxidase (1:120.000). De acordo com a padronização, o tempo de exposição do filme para a revelação foi igual a 30 minutos. Em ordem, as proteínas testadas foram: antígeno 85B, ML2038, ML0405, ML2055, ML0286, ML0091 e ML0050.

Na Figura 12, é possível observar a localização exata dos peptídeos imunorreagentes das proteínas sintetizados sobre as membranas, as regiões N-terminal e C-terminal e a identificação de todos “spots” reativos. Sendo que a primeira proteína é o Antígeno 85B e os peptídeos reativos na membrana de celulose estão destacados em quadros coloridos para corresponder à localização destes na estrutura tridimensional (Figura 19).

De acordo com estes experimentos, observa-se que os “spots” com os peptídeos reativos foram os mesmos em ambas as concentrações utilizadas de IgGs precipitadas, concluindo que os resultados são confiáveis e se reproduzem. Os peptídeos encontrados nestes “spots” possivelmente, se tornarão bons candidatos antigênicos para se diagnosticar a hanseníase.

Curiosamente, as proteínas 2 (ML2038), 5 (ML0286) e 7 (ML0050) não apresentaram peptídeos com grande reatividade mesmo tendo sido consideradas como bons antígenos pelo grupo de Spencer et. al. (2012). Uma das possibilidades é o fato destas proteínas possuírem epítomos imunodominantes dependentes da conformação da proteína (epítomos conformacionais) e por isso, possivelmente, seriam bons candidatos para a seleção de anticorpos para busca de mimotopos por Phage Display (Alban et al., 2013; 2014). Um outro cenário, é que alguns antígenos podem ser bons marcadores sorológicos para alguns pacientes e não para outros oriundos de outras regiões, pois os soros dos pacientes testados por Spencer et al. (2012) eram de Cebu, ilha situada nas Filipinas. Porém, com o antígeno 85B isso não aconteceu, pois o mimotopo APDDPAWQNIFNLRR foi selecionado utilizando-se soros de pacientes hansenianos paranaenses e mostrou-se altamente antigênico quando testado com soros de pacientes hansenianos residentes no Mato Grosso do Sul.

Contudo, a proteína 3 (ML0405), em que se conseguiu “spots” bastante reativos neste trabalho, foi indicada por Spencer et. al. (2012) e Sampaio et. al. (2011) como uma das proteínas do *M. leprae* mais promissoras por conter muitos epítomos reconhecidos tanto por células B, como por células T.

Por fim, para se confirmar que os “spots” com os peptídeos positivos eram realmente reativos devido ao reconhecimento por anticorpos presentes nos soros dos pacientes com hanseníase, ou seja, para verificar se esta reação era específica, testaram-se nas membranas de Spot Synthesis, as IgGs precipitadas dos soros de voluntários saudáveis.

Nestes ensaios, foram utilizadas as mesmas condições e inclusive mesma concentração (10 mg/mL) do último experimento realizado com as IgGs dos soros de pacientes hansenianos. De acordo com o esperado, não se observou reatividade nas membranas, como mostra a Figura 13.

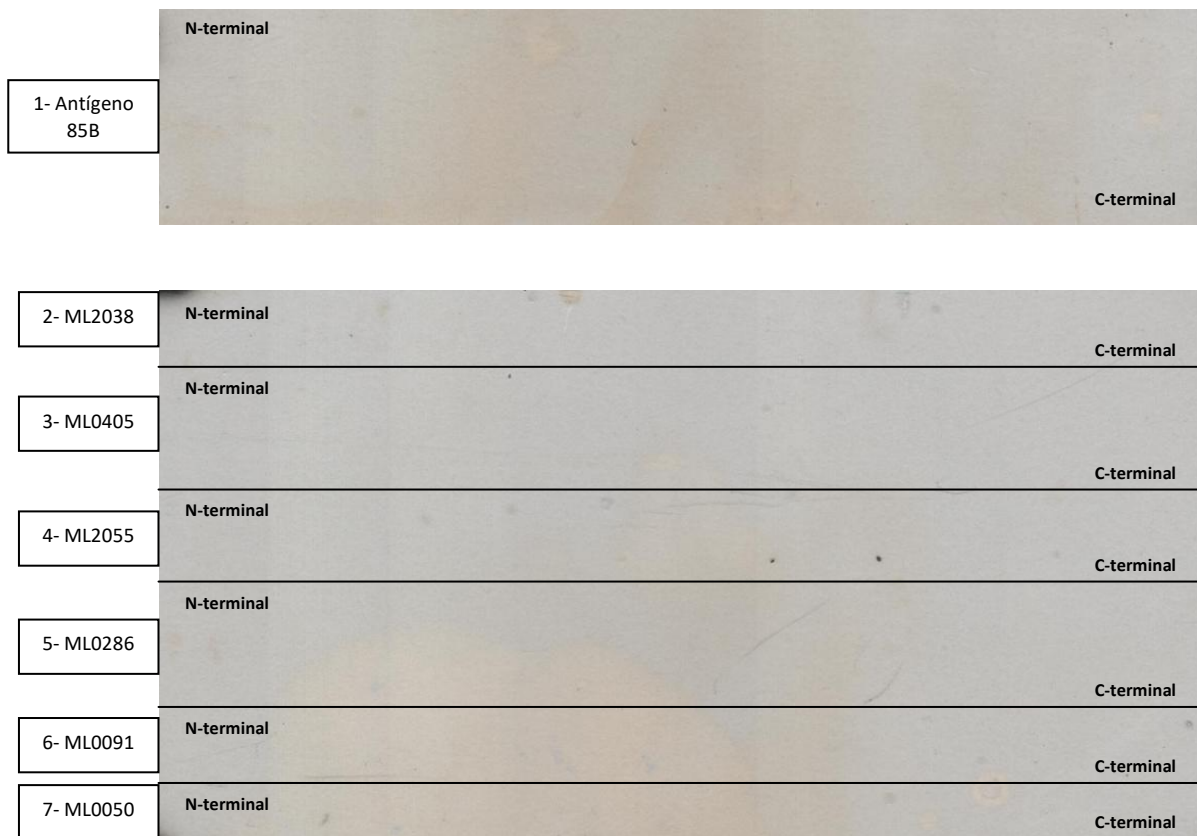


Figura 13 – Reatividade dos peptídeos referentes às proteínas de *M. leprae* frente a 10 mg/mL de IgG de voluntários saudáveis. As membranas foram bloqueadas e testadas com os anticorpos dos pacientes detectados por anti-IgG humana conjugada à peroxidase (1:120.000). De acordo com a padronização, o tempo de exposição do filme para a revelação foi igual a 30 minutos. Em ordem, as proteínas testadas foram: antígeno 85B, ML2038, ML0405, ML2055, ML0286, ML0091 e ML0050.

Estudos adicionais necessitam ser realizados, como por exemplo, testar essas proteínas frente a soros de pacientes infectados por *M. tuberculosis*. Porém, a vacina BCG (bacilo de Calmette & Guérin), constituída por bacilos atenuados da cepa de *Mycobacterium bovis* foi utilizada pela primeira vez em humanos em 1921 (STEFAN, 2013) e é obrigatória no Brasil desde 1976. Embora não se tenha informação sobre os voluntários sadios, supõem-se que, pela obrigatoriedade, eles sejam vacinados. Tendo em vista que *M. leprae*, *M. tuberculosis* e *M. bovis* sejam bacilos filogeneticamente próximos e com proteínas com alta porcentagem de identidade, era esperado que pelo menos alguns “spots” apresentassem reatividade cruzada mas, de fato, não houve. Este resultado nos encoraja a prosseguir os estudos para validar esses

epítomos imunodominantes no que se refere à antigenicidade por testes tradicionais e, então, possibilitar a utilização em um ensaio sensível e específico.

6.3.2 Soros de camundongos imunizados

Camundongos foram imunizados com o peptídeo conformacional APDDPAWQNIFNLRR (ALBAN, et. al, 2014) carregado com KLH. Depois da sangria total, o soro destes foi testado nas membranas de Spot Synthesis para se verificar se este peptídeo tratase mesmo de um mimotopo.

Embora Alban et. al. (2013) tenham verificado que anticorpos anti APDDPAWQNIFNLRR reconhecem uma proteína com a mesma massa do antígeno 85B de *M. leprae* por Western blotting, análises que comprovassem as características miméticas do peptídeo APDDPAWQNIFNLRR não foram realizadas. Portanto, questionou-se se o peptídeo citado seria mesmo um mimotopo do antígeno 85B, ou seja, anticorpos feitos contra ele seriam capazes de identificar o peptídeo linear sintetizado na membrana de SPOT?

De maneira similar ao já reportado, para se responder a essa questão, também foi necessário encontrar a diluição ideal do conjugado anti-mouse a ser utilizada. Depois de se testar diversas condições, observou que a diluição ideal do anti-mouse peroxidase seria igual a 1:50.000. Como mostrado na Figura 14, apenas um “spot” aparentemente foi reativo. O mesmo resultado foi obtido quando o soro pré-imunizado fora testado (Figura 15), portanto, essa reatividade foi desconsiderada nas análises subsequentes.



Figura 14 – Reatividade dos peptídeos referentes aos antígeno 85B frente ao anticorpo anti IgG mouse-HRP. As membranas foram bloqueadas e testadas exclusivamente com o anticorpo anti-IgG murina conjugada à peroxidase (1:50.000). De acordo com a padronização, o tempo de exposição do filme para a revelação foi igual a 30 minutos.



Figura 15 – Reatividade dos peptídeos referentes à proteína do antígeno 85B frente ao soro pré imunização dos camundongos. As membranas foram bloqueadas e testadas com o soro dos camundongos (1:1.000) com detecção através da adição de anticorpo anti-mouse peroxidase (1:50.000). De acordo com a padronização, o tempo de exposição do filme para a revelação foi igual a 30 minutos.

Para se verificar se anticorpos anti-proteína carreadora teriam influência sobre a reatividade dos soros dos camundongos sobre os peptídeos, tendo em vista a alta imunogenicidade da proteína KLH, testou-se na membrana os soros dos camundongos imunizados apenas com KLH. Como mostra a Figura 16 (a), a reatividade inespecífica de anticorpos anti-KLH foi bastante alta. Ao se testar o soro de camundongos imunizados com peptídeo carreado com KLH, verificou-se reatividade similar (Figura 16b).

Para diminuir a reatividade cruzada, decidiu-se incubar previamente os soros de camundongos imunizados com o peptídeo carreado com proteína KLH na forma de um Dot Blot (descrito no tópico 5.3.4.) e testar o sobrenadante sobre a membrana de Spot Synthesis.

A prévia incubação diminuiu a reatividade cruzada e evidenciou uma sequência peptídica cuja reatividade ocorreu somente quando soros de camundongos imunizados com o peptídeo, teoricamente mimético, foram testados (Figuras 16b e 16c). A sequência peptídica em questão é composta por PPNDPAWQRNDPILQ, um epítipo linear que foi mimetizado pelo peptídeo conformacional APDDPAWQNIFNLRR-C obtido por Alban et al. (2013).

Questionou-se o motivo de apenas uma única sequência de peptídeo ter se mostrado reativa na membrana de Spot Synthesis. Provavelmente, a sequência no epítipo linear encontrada possui aminoácidos imprescindíveis para a reatividade, que não estão presentes nos peptídeos anteriores ou posteriores a ele. Fato mostrado por Alban et. al. (2014), no qual se

realizou “Alanine Scanning”, ou seja, a substituição de aminoácidos de uma sequência de peptídeos por uma alanina para se encontrar os resíduos realmente importantes em determinadas sequências.

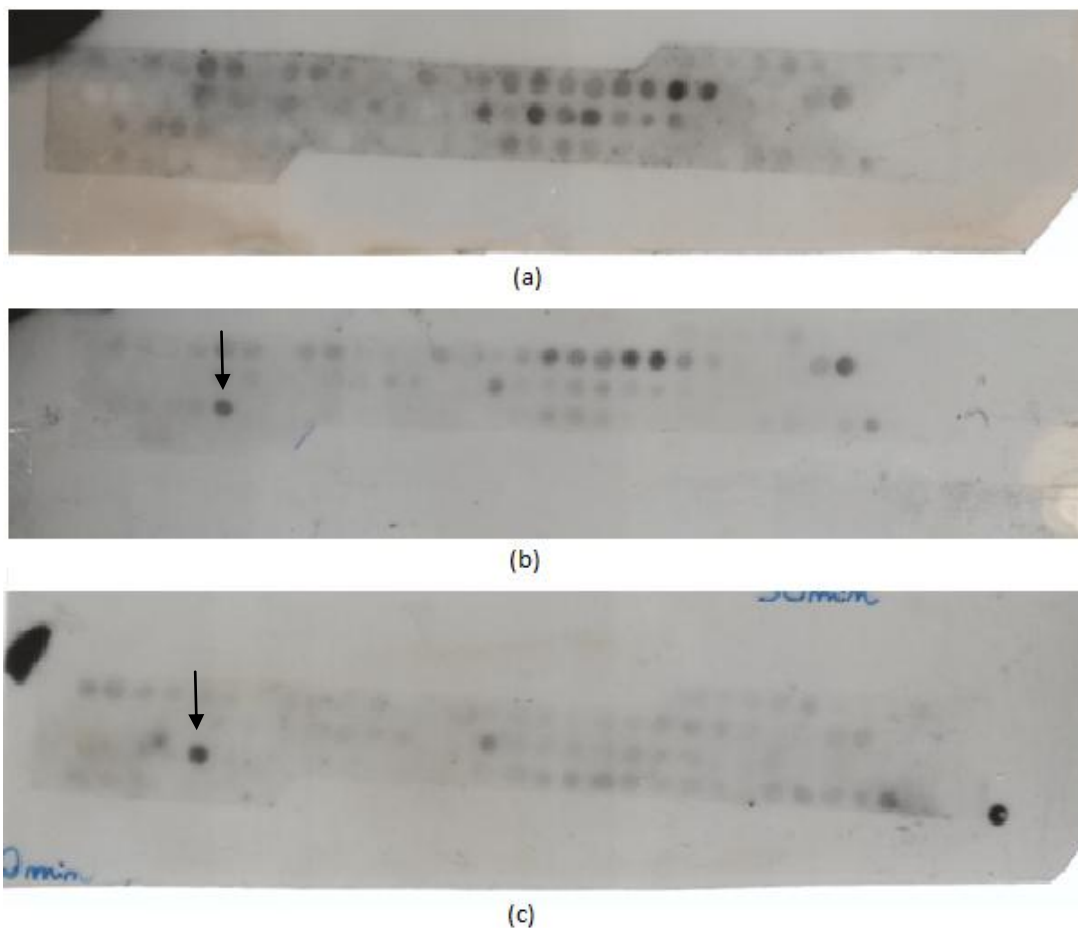


Figura 16 – Reatividade dos peptídeos referentes ao antígeno 85B frente ao soros de animais imunizados com o peptídeo APDDPAWQNIFNLRR. (a) Reconhecimento dos peptídeos pelo pool de soros dos camundongos imunizado apenas com KLH (1:1000); Reconhecimento dos peptídeos pelo pool de soros dos camundongos imunizados com peptídeo + KLH (1:1000) antes (b) e após (c) a pré incubação com KLH por Dot-Blot. De acordo com a padronização prévia, a detecção ocorreu com a adição de anticorpo anti-camundongo conjugado à peroxidase em diluição 1:50.000 e posterior revelação por ECL e exposição do filme para a revelação por 30 minutos.

6.4 ANÁLISE *IN SILICO* POR BIOINFORMÁTICA

As análises *in silico* foram divididas em duas etapas. Na primeira delas, analisaram-se os peptídeos, oriundos das sete proteínas de *M. leprae*, imunorreativos aos soros de pacientes com hanseníase. Já na segunda etapa, a análise foi realizada a partir da reatividade do peptídeo linear PPNDPAWQRNDPILQ, definido como o peptídeo mimetizado nos testes com os soros dos camundongos imunizados com o mimotopo descrito por Alban et al. (2013, 2014).

Primeiramente, todos os peptídeos que mostraram reatividade contra os soros dos pacientes com hanseníase foram analisados. Características como massa molecular, ponto isoelétrico, carga, hidrofobicidade, acidez, basicidade e neutralidade, como é mostrado nos Quadros 2 e 3.

Quadro 2 - Peptídeos reativos pertencentes ao Antígeno 85B

Peptídeo	Massa Molecular (g/mol)	Ponto Isoelétrico	Carga	Hidrofobicidade (%)
SAFSRPGLPVEYLQV	1662,89	6,34	0	53,33
SRPGLPVEYLQVPSE	1670,87	4,26	-1	46,67
AADMWGPNDPAWQR	1711,86	4,11	-1	60
<u>MWGPNDPAWQRNDP</u>	1780,92	4,11	-1	53,33
PPNDPAWQRNDPILQ	1760,91	4,11	-1	53,33
ELGGTNVPAEFLENF	1636,76	3,48	-3	46,67
<u>GTNVPAEFLENFVHG</u>	1630,76	4,25	-1	46,67
VPAEFLENFVHGSNL	1672,84	4,25	-1	53,33
GTHSWEYWGAQLNAM	1750,90	5,37	0	40
<u>SWEYWGAQLNAMKPD</u>	1795,98	4,19	-1	46,67
YWGAQLNAMKPDQLN	1748,96	6,23	0	46,67
AQLNAMKPDQLNTLM	1687,99	6,23	0	53,33

NAMKPDLQNTLMAVP	1642,95	6,23	0	60
<u>KPDLQNTLMAVPRSG</u>	1626,88	9,71	1	46,67

Quadro 3 – Peptídeos reativos nos ensaios com as membranas de Spot Synthesis pertencentes às proteínas ML0405, ML2055 e ML0091. Sendo que os peptídeos na cor cinza pertencem à proteína ML0405, na cor azul à ML2055 e na cor rosa à ML0091.

Peptídeo	Massa Molecular (g/mol)	Ponto Isoelétrico	Carga	Hidrofóbico (%)
<u>GATSGLSQVTGLFGV</u>	1393,55	6,02	0	40
<u>SGLSQVTGLFGVPGL</u>	1431,64	6,02	0	46,67
<u>PSLAGVGAGLGLGSL</u>	1268,47	6,02	0	53,33
<u>AGVGAGLGLGSLPQL</u>	1309,52	6,02	0	53,33
<u>GAGLGLGSLPQLAQL</u>	1394,62	6,02	0	53,33
<u>LGLGSLPQLAQLHAA</u>	1488,74	7,55	1	60
<u>PGAPVSSEAQPGDPN</u>	1422,46	3,55	-2	46,67
<u>PVSSEAQPGDPNAPS</u>	1452,49	3,55	-2	46,67
<u>SEAQPGDPNAPSLDP</u>	1494,52	3,38	-3	46,67
<u>QPGDPNAPSLDPNAP</u>	1489,55	3,49	-2	53,33
<u>DPNAPSLDPNAPYPL</u>	1580,70	3,49	-2	60
<u>SAEADNIKAAVRLGS</u>	1501,65	6,51	0	46,67
<u>ADNIKAAVRLGSDMG</u>	1517,71	6,34	0	46,67
<u>LTSPDLTNQELGTPV</u>	1584,73	3,55	-2	40
<u>PDLTNQELGTPVLTATA</u>	1568,73	3,55	-2	46,67

Depois de todas estas análises serem concluídas, escolheram-se os peptídeos para serem sintetizados (destacados em negrito) e utilizados em ELISA em um estudo futuro posterior a

este. A escolha dos peptídeos baseou-se primeiro nos que se mostraram mais reativos nos ensaios com os soros positivos e dentre estes, escolheram-se aqueles que eram menos hidrofóbicos, pois quanto mais hidrofílico o peptídeo, mais exposto à resposta imunológica na estrutura da proteína. Ainda, devido a essa característica, mais simples se tornaria sua síntese química e sua utilização como antígeno em ensaios sorológicos. Como é possível observar na Figura 12, por exemplo, alguns “spots” tem reatividade em sequência. Nesses casos, os peptídeos foram selecionados de acordo com sua representatividade frente aos demais, geralmente peptídeos localizados no meio da sequência.

Infelizmente, as proteínas que foram alvo de trabalho nas membranas de Spot Synthesis ainda não possuem suas estruturas tridimensionais definidas. Então, para contornar o problema, tentou-se obter o modelo destas proteínas através de homologia, ou seja, utilizando outra proteína com estrutura já definida e com alta porcentagem de identidade. Porém, essa estratégia foi possível somente com a sequência primária do Antígeno 85B, pois verificou-se que as demais proteínas do *M. leprae* não possuíam taxa de identidade suficiente para a proposição das suas estruturas.

O programa Swiss Model apresentou 27 estruturas de proteínas que seriam compatíveis para realizar a modelagem da proteína do Antígeno 85B. Dentre estas, escolheu-se aquela que apresentava maior taxa de identidade. A estrutura tridimensional do Antígeno 85B do *M. leprae* foi construída por homologia com a estrutura do Antígeno 85B do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, a taxa de identidade entre as duas proteínas é igual a 85,21% e o alinhamento entre as duas proteínas é mostrado na Figura 17 abaixo.



Figura 17 – Alinhamento entre as sequências das proteínas do Antígeno 85B do *M. leprae* (Model_01) e a proteína Antígeno 85B do bacilo *M. tuberculosis* (1sfr.1.A).

De acordo com o alinhamento, a estrutura do Antígeno 85B é apresentada na Figura 18. Como pode se observar a estrutura da proteína é composta por 6 regiões alfa-hélices e 11 regiões folha-beta.

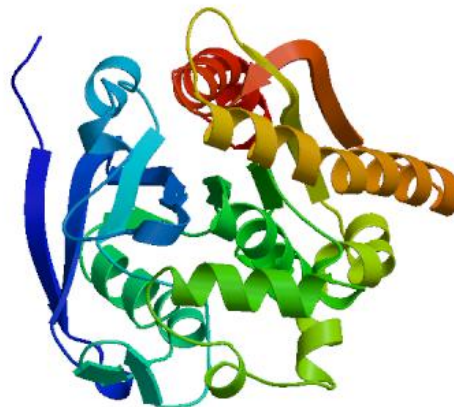


Figura 18 – Modelo do antígeno 85B do *M. leprae*. Análise realizada utilizando-se o programa Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) a partir de características bioquímicas da proteína antígeno 85B do bacilo *M. tuberculosis* (acesso PDB: 1SFR).

Depois da construção por homologia do modelo da estrutura da proteína do Antígeno 85B, utilizou-se o programa Swiss-Pdb Viewer para localizar os peptídeos na estrutura. Todas

as regiões que se mostraram reativas nos ensaios dos soros positivos humanos nas membranas foram destacadas na Figura 19.

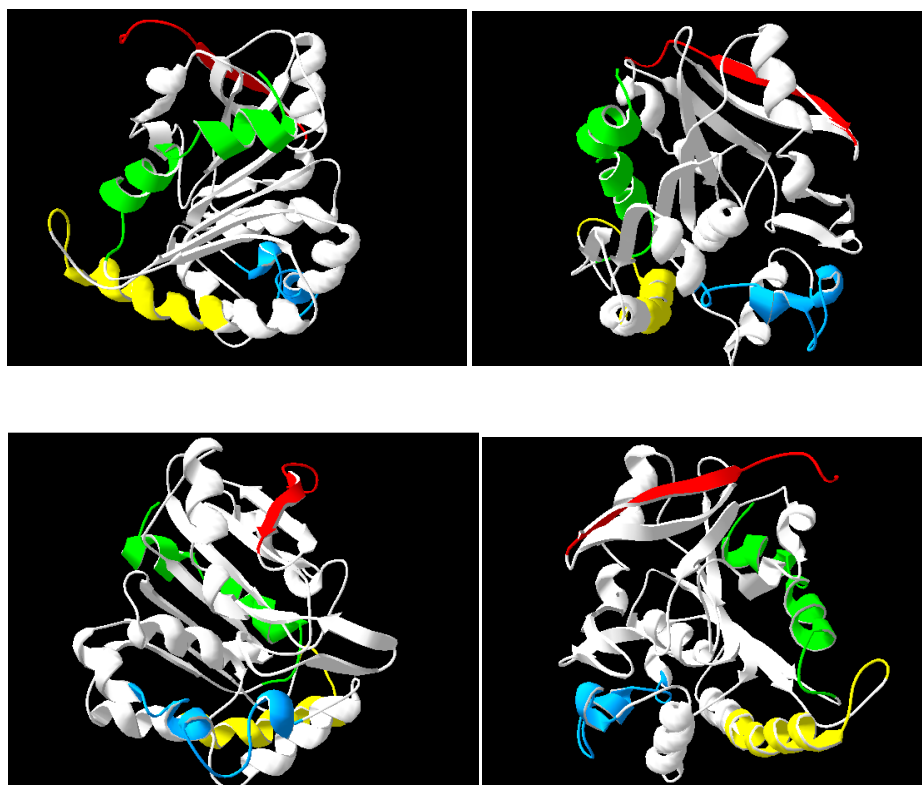


Figura 19 – Modelo da proteína do Antígeno 85B e o posicionamento de seus peptídeos imunodominantes. Nas diferentes cores estão representadas as regiões epitópicas das proteínas sintetizadas na membrana de Spot Synthesis frente a soros de pacientes hansenianos. Em vermelho: representou-se o peptídeo SAFSRPGLPVEYLQVPSE, em azul: AADMWGPPNDPAWQRNDPILQ, em amarelo: ELGGTNVPAEFLNFVHGSNL e em verde: GTHSWEYWGAQLNAMKPDQLQNTLMAVPRSG.

Como é possível observar na Figura 19 acima, os peptídeos reativos estão localizados na parte externa da proteína, o que facilita o reconhecimento destas regiões por anticorpos, ou seja, como há quatro regiões epitópicas importantes nessa proteína, é possível inferir que a molécula como um todo é um bom alvo antigênico para a detecção da hanseníase.

O antígeno 85B já foi alvo de estudos para o diagnóstico da hanseníase. Martinez et. al. (2006) extraíram DNA de *M. leprae* obtido de amostras de pacientes e amplificado utilizando-se

iniciadores específicos para o antígeno 85B e para região intergênica 85 A-C. A amplificação do gene 85B apresentou maior sensibilidade na detecção dos pacientes.

Serafín-López (2011) encontraram dois antígenos que reagiam especificamente com soro dos pacientes hanseniano, sendo: coenzima-enoil A hidratase e o antígeno 85B. Estes autores verificaram por Western blotting a antigenicidade de ambos frente a soros de pacientes hansenianos. Os resultados obtidos foram bastante promissores, sendo que os antígenos foram capazes de identificar 83% dos pacientes lepromatosos; 36,3% dos pacientes tuberculoides e 41% daqueles que não possuíam classificação. A especificidade deste teste foi considerada 100%, já que as amostras dos pacientes com tuberculose e controle não mostraram reatividade contra os antígenos. Neste trabalho, confirmou-se que o antígeno 85B é um ótimo candidato ao diagnóstico sorológico, por ser reconhecido por todas as formas da doença, independente da classificação clínica.

Tendo em vista os resultados obtidos por Alban et al. (2013, 2014), em que foi possível identificar 64% dos pacientes hansenianos utilizando-se o mimotopo como marcador e ainda as características peculiares de pacientes paucibacilares, é possível que a utilização de um conjunto de epítomos imunodominantes torne o método de detecção mais sensível.

Embora a imunogenicidade na indução da resposta humoral não melhore o quadro clínico de pacientes, estudos poderiam ser feitos para avaliar esses peptídeos quanto à indução da resposta mediada por células, pois o principal objetivo de vacinas tanto contra a tuberculose, como contra a hanseníase, é induzir tal resposta de forma a aumentar a diferenciação de células de memória T citotóxicas CD8⁺ (TAMURA, 2009). Essas características auxiliariam não somente no diagnóstico para a determinação do prognóstico desse paciente em substituição à Mitsudina/lepromina, mas também na procura de candidatos vacinais, atuando na prevenção da doença.

Em estudos anteriores, já houveram resultados promissores utilizando peptídeos como vacinas. Em 2011, Geluk et. al. mostraram que a imunização em camundongos utilizando

peptídeos de uma proteína específica do *M. leprae* (ML1419) foi capaz de induzir uma forte resposta de células T CD8⁺, citolítica e também de atividade funcional de células B. A conclusão mais importante deste trabalho foi que tais respostas inibiram o crescimento do *M. leprae*.

Tamura et. al. (2009) também utilizaram um peptídeo como vacina contra a tuberculose. Foi utilizado o peptídeo-25, um epítipo do Antígeno 85B do *M. tuberculosis*, que induziu o desenvolvimento de resposta Th1, a qual por consequência, ativou células T citotóxicas CD8⁺. Estes trabalhos mostram que é possível que tais peptídeos, encontrados neste trabalho, possam ser utilizados no futuro, como possíveis candidatos vacinais.

Como foi apresentado, na segunda etapa do trabalho de análises *in silico*, após as etapas do Spot Synthesis que foram realizadas para a identificação do peptídeo linear mimetizado pelo peptídeo conformacional, utilizou-se o mesmo programa (Swiss-Pdb Viewer) para a localização deste peptídeo pertencente também à proteína do Antígeno 85B, apresentada na Figura 20.

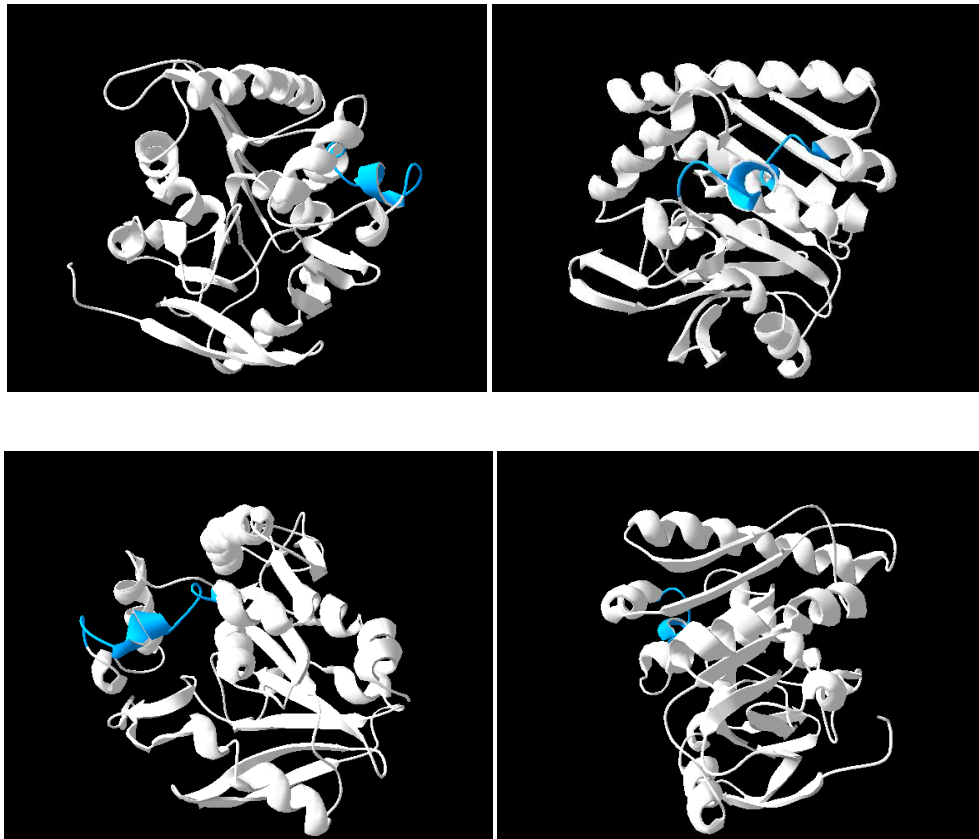


Figura 20 – Posicionamento do peptídeo linear mimetizado pelo peptídeo APDDPAWQNIFNLRR no modelo do antígeno 85B de *M. leprae*.

O peptídeo linear reativo encontrado nos experimentos com os soros dos camundongos imunizados também foi encontrado nos experimentos com os soros dos pacientes humanos com hanseníase, confirmando seu alto potencial para o diagnóstico.

7. CONCLUSÕES

- Após não ter sido possível detectar peptídeos reativos utilizando-se os soros humanos dos pacientes hansenianos diretamente nas membranas de Spot Synthesis, a estratégia de precipitação das IgGs dos mesmos para os ensaios foi eficiente;
- Os ensaios de Spot Synthesis foram bastante conclusivos e capazes de identificar os peptídeos lineares (pertencentes a quatro proteínas do *M. leprae*) que poderão ser utilizados em futuros testes de ELISA para identificar a hanseníase;
- A imunização dos camundongos com peptídeo conformacional (Alban et. al, 2013, 2014) carregado com KLH foi eficiente de forma a se obter anticorpos policlonais com satisfatória reatividade;
- Através do Spot Synthesis e do soro dos camundongos imunizados, confirmou-se que o peptídeo conformacional realmente era um mimotopo da proteína do Antígeno 85B;
- Por homologia, foi possível obter a estrutura do Antígeno 85B, identificar as regiões antigênicas frente a soros humanos bem como a localização do peptídeo linear reativo;
- Os peptídeos antigênicos estão expostos na estrutura do Antígeno 85B, ou seja, corroborou-se que esta proteína realmente é um bom marcador para identificar a hanseníase;
- Por meio das análises *in silico*, foi possível caracterizar as propriedades dos peptídeos lineares encontrados nos ensaios de Spot Synthesis e dessa forma, escolher aqueles que irão se adequar melhor aos testes de ELISA.

8. PERSPECTIVAS

- Sintetizar os peptídeos selecionados através da técnica de Spot Synthesis para serem utilizados em testes de ELISA;
- Padronizar os testes de ELISA com os peptídeos para que sejam capazes de identificar os pacientes hansenianos em estágio inicial da doença, independente da classificação da mesma;
- Montar um teste de diagnóstico sorológico que possa auxiliar o diagnóstico clínico e que seja acessível a grupos populacionais longe dos grandes centros urbanos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAN, S. M. et al. Phage Display and Synthetic Peptides as Promising Biotechnological Tools for the Serological Diagnosis of Leprosy. **Plos One**, v. 9, n. 8, e106222. Aug 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25170947> >.

AZEVEDO, M. C. et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **Braz J Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 71-78, 2017 Jan - Feb 2017. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27888674> >.

BOTTINO, C. G. et al. Chagas disease-specific antigens: characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 568, Dec 2013. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24299278> >.

CAPELLI-PEIXOTO, J. et al. Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis. **Vaccine**, v. 29, p. 9473–9479, n. 51. 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22027483> >.

CARDOSO, L. P. V. et al. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 497, 2013. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24152601> >.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007-11, Feb 2001a. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234002>>.

CUNHA, A. Z. S. Hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico, tratamento e controle. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 7, n. 2, p. 235-242, 2002. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232002000200004>>.

DEGANG, Y. et al. Leprosy as a model of immunity. **Future Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 43-54, 2014. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24328380>>.

DUTHIE, M. S. et al. Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 2, p. 613-9, Feb 2014. ISSN 1098-660X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24478496>>.

EICHELMANN, K. et al. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. **Actas Dermosifiliogr**, v. 104, n. 7, p. 554-63, Sep 2013a. ISSN 1578-2190. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870850>>.

EIDT, L.M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade*, 2004; 13(2): 76-88

FREITAS, A. A. et al. Alterations to antigen-specific immune responses before and after multidrug therapy of leprosy. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 83, n. 2, p. 154-61, Oct 2015. ISSN 1879-0070. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26233487>>.

FREITAS, L. R.; DUARTE, E. C.; GARCIA, L. P. Trends of main indicators of leprosy in Brazilian municipalities with high risk of leprosy transmission, 2001-2012. **BMC Infect Dis**, v. 16, p. 472, 2016. ISSN 1471-2334. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27595751>>.

GAUNA, A. et al. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of hepatitis A virus infection. **J Immunol Methods**, v. 427, p. 1-5, Dec 2015. ISSN 1872-7905. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26321053>>.

GELUK, A. et al. ML1419c peptide immunization induces Mycobacterium leprae-specific HLA-A*0201-restricted CTL in vivo with potential to kill live mycobacteria. **J Immunol**, v. 187, n. 3, p. 1393-402, Aug 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21705623>>.

HAN, X. Y. et al. A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. **Am J Clin Pathol**, v. 130, n. 6, p. 856-64, Dec 2008a. ISSN 1943-7722. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019760>>.

KATZ, C. et al. Studying protein-protein interactions using peptide arrays. **Chem Soc Rev**, v. 40, n. 5, p. 2131-45, May 2011. ISSN 1460-4744. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243154>>.

KAUFMANN, S. H. Tuberculosis vaccines: time to think about the next generation. **Semin Immunol**, v. 25, n. 2, p. 172-81, Apr 2013. ISSN 1096-3618. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706597>>.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects--part 2. **An Bras Dermatol**, v. 89, n. 3, p. 389-401, 2014 May-Jun 2014. ISSN 1806-4841. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24937811>>.

LEGENDRE, D. P.; MUZNY, C. A.; SWIATLO, E. Hansen's disease (Leprosy): current and future pharmacotherapy and treatment of disease-related immunologic reactions. **Pharmacotherapy**, v. 32, n. 1, p. 27-37, Jan 2012. ISSN 1875-9114. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392826>>.

LIMA-JUNIOR, J. C. et al. B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the Plasmodium vivax merozoite surface protein-3 α (PvMSP-3 α) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. **Vaccine**, v. 29, n. 9, p. 1801-11, Feb 2011. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215342> >.

LIU, X.; CAI, M.; WANG, X.; LI, X. One simple and efficient method for purification of IgG McAb from mice ascites: caprylic acid/ammonium sulfate precipitation. **Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 30, n. 4, p. 455-6. Dec 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11387969> >

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. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3154-9, Sep 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954241> >.

NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 90-8, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1879-1131. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432814> >

PARK, A. J. et al. Leprosy as a model to understand cancer immunosurveillance and T cell anergy. **J Leukoc Biol**, Apr 2016. ISSN 1938-3673. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27106673>>.

PASHOVA, S. et al. Antibody repertoire profiling with mimotope arrays. **Hum Vaccin Immunother**, p. 1-9, Dec 2016. ISSN 2164-554X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27929733> >.

REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Med Mal Infect**, v. 45, n. 9, p. 383-93, Sep 2015. ISSN 1769-6690. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26428602> >

SALIPANTE, S. J.; HALL, B. G. Towards the molecular epidemiology of *Mycobacterium leprae*: strategies, successes, and shortcomings. **Infect Genet Evol**, v. 11, n. 7, p. 1505-13, Oct 2011. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708290> >.

SAMPAIO, L. H. et al. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC Infect Dis**, v. 11, p. 26, Jan 2011. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269435> >.

SANTOS, S. D. et al. Leprosy in children and adolescents under 15 years old in an urban centre in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 6, p. 359-64, May 2016a. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27223655> >.

SERAFÍN-LÓPEZ, J. et al. Enoyl-coenzyme A hydratase and antigen 85B of *Mycobacterium habana* are specifically recognized by antibodies in sera from leprosy patients. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 7, p. 1097-103, Jul 2011. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613461> >.

SILVA, E. A. et al. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment and reactions. **Trop Med Int Health**, v. 12, n. 12, p. 1450-8, Dec 2007. ISSN 1365-3156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18076551> >.

SPENCER, J. S. et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 79-89, Dec 2012. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283458> >.

TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 26-37, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1879-1131. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432808> >.

TAMURA, T.; FUKUTOMI, Y.; MAKINO, M. [Forefront of vaccine development: tuberculosis and leprosy]. **Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi**, v. 78, n. 3, p. 271-6, Sep 2009. ISSN 1342-3681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19803378> >.

VIRMOND, M.; GRZYBOWSKI, A. Leprosy--an intriguing disease. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 1-2, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432804> >.

VIRMOND, M.; GRZYBOWSKI, A.; VIRMOND, L. Leprosy: a glossary. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 8-18, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1879-1131. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432806> >.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of Mycobacterium leprae: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biol**, v. 2, n. 8, p. REVIEWS1023, 2001a. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532219> >.

WHO - World Health Organization. Weekly epidemiological record; WHO [Internet] 2016, nº 35, 91th year, 405-420. Acessado em 06 de setembro de 2016. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2016/wer9135/en/>

10. ANEXOS

- Sequências das proteínas do *M. leprae*

ML2038

>gi|499211143|ref|WP_010908683.1| bacterioferritin [Mycobacterium leprae]
MQGDPDVLRLLENEQLTSELTAIQYFLHSMQENWGFTELAERTRVESFDEMRHAEAI
TDRILLDGLPNYQRIGSLRVGQTLREQFEADLAIEYEVMSRLKPGIIMCREKQDSTSAV
LLEKIVADEEEHIDYLETQLALMGQLGEELYSACVSRPPS

ML0405

>gi|499210171|ref|WP_010907711.1| secretion protein EspA [Mycobacterium leprae]
MSGAFIIDPTLKAIEAWHALLGIGVPNDGGVLYSSLSFFEKALEHLAAAFPGDGWLGSA
ADKYAGQNRKRVDIFQELAEKELIELHNQANSVQTTRGILDGAKKALLFVRPVAID
LNYIPLVGSVMSASIQACAAAMAASVSGGLAYLLVQTAIHTAKFVALLARLAHLLAS
AVADVSDGVAIKGIVDHLWHFIAGALTGLKDIVEKIIHWFFGLFSHWWSRLHSFFGGI
PGLSGATSGLSQVTGLFGVPGLAGSSGLSGESLLSTENLPSLAGVGAGLGLGSLPQLQL
HAASTRQGTRSQAGVSAELSTEQFGGQQEPVSAQGSQGMGGSSQGMGGMTPASTKSKK
DERKKKKYSEGAAAGTDDAERAPEVQSGGGKRALAQHVV

ML 2055 (taxonomic identifier 272631)

>gi|499211152|ref|WP_010908692.1| alanine and proline-rich secreted protein Apa
[Mycobacterium leprae]
MNQVDLDSTHRKGLWAILAIAVVASASAFTMPLPAAANADPAPLPPSTATAAPSPAQEI
ITPLPGAPVSSEAQPGDPNAPSLDPNAPYPLAVDPNAGRITNAVGGFSFVLPAGWVESE
ASHLDYGSVLLSKAIEQPPVLGQPTVVATDTRIVLGRDLQKLYASAEADNIKAAVRLGS
DMGEFYLPYPGTRINQETIPLHANGIAGSASYEYVKFSDPNKPIGQICTSVVGSPAASTP
DVGPSQRWFVWVWLGTSNNPVDKGAAKELAESIRSEMAPIPASVSAPAPVG

ML0286

>gi|499210110|ref|WP_010907650.1| class II fructose-bisphosphate aldolase [Mycobacterium
leprae]
MPIATPEIYAEMLRRAKENSYAFPAINCTSSETVNAAIKGFADAGSDGIIQFSTGGAEFAS
GLGVKDMVTGAVALAKFTHTIAAKYPINVALHTDHCPCDKLDSYVRPLLAISARRVAT
GKDPLFGSHMWDGSAIPIDENLAIQDLLKDAAAAKIILEVEIGVVGGEEDGVAGEINE
KLYTTPKDFVKTIDALGAGEHGKYLAAATFGNVHGVYKPGNVKLRPDILAEGQKVAA
AKLSQSEGSKPFDVVFHGGSGSEKSEIEEALRYGVVKMNVDTDTQYAFTRPVSGHMFT
NYDGVLKVDGDVGNKKVYDPRSYLKKAEASMTERVLEACNDLRCAGKSVAAS

ML0091

>gi|499209974|ref|WP_010907514.1| hypothetical protein [Mycobacterium leprae]
MPNRRRCKLSTAISTVATLAIASPCAYFLVYEPTASAKPAAKHVEFKQAASIADLPGEV
LDAISQGLSQFGINLPPVPSLTGTDDPGNGLRTPGLTSPDLTNQELGTPVLTAPGTGLTTP

VTGSPIC TAPDLNLGGTC PSEVPITTPISLD PGT DGTYPILGDPSTLGGTSP ISTSSGELVND
LLKVANQLGASQVMDLIKGVVMPAVMQGVQNGNVAGDLSGSVTPAAISLIPVT
ML0050

>gi|499209948|ref|WP_010907488.1| ESAT-6-like protein EsxB [Mycobacterium leprae]
MAEMITEAAILTQQAAQFDQIASGLSQERNFVDSIGQSFQNTWEGQAASAALGALGRF
DEAMQDQIRQLESIVDKLNRSGGNYTKTDDEANQLLSSKMNF

Antígeno 85-B

MIDVSGKIRAWGRWLLVGAAATLPSLISLAGGAATASAFSRPGLPVEYLQVPSEAMGR
TIKVQFQNGGNGSPAVYLLDGLRAQDDYNGWDINTSAFEWYYQSGLSVVMPVGGQSS
FYSDWYSPACGKAGCTTYKWETFLTSELPKWLSANRSVKSTGSAVVGLSMAGSSALIL
AAYHPDQFIYAGSLSALMDSSQGIEPQLIGLAMGDAGGYKAADMWGPNDPAWQRN
DPILQAGKLVANNTHLWVYCGNGTPSELGGTNVPAEFLENFVHGSNLKFQDAYNGAG
GHNAVFNLNADGTHSWEYWGAQLNAMKPDQLQNTLMAVPRSG