

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MEYDSON BENJAMIM CARVALHO CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE GENES DO *Mycobacterium leprae*

RIO DE JANEIRO – RJ

2022



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MEYDSON BENJAMIM CARVALHO CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE GENES DO *Mycobacterium leprae*

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz, para obtenção do título de mestre em ciência.

Orientadores: Dr Milton Ozório Moraes e Dr^a Leila Mendonça Lima

RIO DE JANEIRO – RJ

2022



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MEYDSON BENJAMIM CARVALHO CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE GENES DO *Mycobacterium leprae*

Orientadores: Dr^o Milton Ozório Moraes e Dr^a Leila Mendonça Lima

Aprovada em: 24 / 11 / 2021.

EXAMINADORES:

Dr^a Maria Cristina Vidal Pessolani / Instituto Oswaldo Cruz – RJ

Dr^o Luis Caetano Martha Antunes / Instituto Oswaldo Cruz – RJ

Dr^o Jesus Pais Ramos / Centro de Referência Professor Hélio Fraga – RJ;

SUPLENTE:

Dr^a Ida Maria Foschiani / Instituto Lauro de Souza Lima – SP;

Dr^o Philip Noel Suffys / Instituto Oswaldo Cruz – RJ

REVISOR:

Dr^a Maria Cristina Vidal Pessolani / Instituto Oswaldo Cruz – RJ

RIO DE JANEIRO – RJ

2022

Corrêa, Meydson Benjamim Carvalho.

CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE GENES DO *Mycobacterium leprae* / Meydson Benjamim Carvalho Corrêa. - Rio de Janeiro, 2021.
83 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Milton Ozório Moraes.
Co-orientadora: Leila Mendonça Lima.

Bibliografia: f. 61-83

1. hanseníase. 2. SNPs. 3. Indels. 4. *Mycobacterium leprae*. 5. genótipo.
I. Título.

*Dedico este trabalho ao meu alicerce e refúgio:
minha família.
Obrigado por sempre acreditar em mim!*

*“Medo não me alcança,
no deserto me acho
Faço cobra morder o rabo,
escorpião virar pirilampo”.*

(Carta de Amor – Maria Bethânia)

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo ânimo, sabedoria e bênçãos.

Ao meu pai José Mario Aguiar Corrêa pela incansável dedicação para criar meus irmãos e eu. Obrigado por todo esforço e amor em nos proporcionar o melhor. O senhor é minha maior referência de caráter e luta, te amo muito.

Aos meus irmãos Jeymson, Keytson e Emanuelle e minha cunhada Mary Anne por me apoiarem e comprar meus barulhos, especialmente na minha mudança para o Rio de Janeiro. Vocês são meu alicerce e sou muito grato por tudo isso. Às minhas sobrinhas Maitê e Marina, por me mostrarem um amor novo que me encheu de ânimo e alegria para dar continuidade no mestrado. À minha avó Adelina (Deca) e minha mãe Iracely (Célia) por serem exemplos de luta nas maiores dificuldades. Amo todos vocês.

À Warmiston por ser o melhor companheiro desse mundo. Obrigado por sempre me animar nos momentos difíceis e me ensinar diariamente sobre amor, dedicação, responsabilidade e esforço. Te admiro muito e espero me tornar um profissional tão bom quanto tu és. Te amo de janeiro a janeiro.

Ao meu orientador Dr^o Milton Ozório Moraes, meu considerado. Você acreditou em mim desde 2018, quando me recebeu de braços abertos para um estágio ainda na minha graduação. Sou grato pela confiança, troca de saber, disponibilidade e dedicação durante esse mestrado. Muito obrigado de coração.

À minha orientadora Dr^a Leila Mendonça Lima, que se fez presente todos os dias dessa batalha. Obrigado pela orientação e preocupação com o meu bem-estar especialmente durante a pandemia da Covid-19. Gratidão pelas conversas e ajuda que permitiu imensuráveis aprendizados durante o mestrado. Muitíssimo obrigado.

Às agências de fomento Capes e Faperj pelas bolsas ofertadas, fundamentais para a permanência no programa, na cidade do Rio de Janeiro e desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por proporcionar o um ambiente de crescimento pessoal, acadêmico e profissional ao logo do mestrado. Sou grato por cada disciplina, palestra, curso e pesquisador que contribuiu para essa trajetória de aprendizado. Um destaque à Julimar, secretária acadêmica de atuação exemplar, sempre disposta a ajudar os alunos, solícita e um amor de pessoa. Obrigado de coração.

Ao grande amigo e companheiro de laboratório e pós-graduação, Thyago Leal Calvo, que me ajuda desde o estágio no Lahan em 2018. Esteve presente em todas as etapas da elaboração do projeto e execução dele, sempre disposto a ajudar e colaborar. Sou grato pela amizade, conversas, desabafos, colaboração, por tudo. Obrigado, Thyaguinho.

Aos amigos do Laboratório de Hanseníase – LAHAN, especialmente da sala 19, Ohanna, Isabela, Laís, Thadeu, Fê Manta, Ferdy, Paulo Thiago, Mayara, Thyago e Alexandre. Tirei a sorte grande por compartilhar o ambiente de trabalho de vocês. Muito obrigado pela amizade e companheirismo. Amo vocês.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Genômica Funcional de Micobactérias – GFMycos, liderado pela Dr^a Leila, por me receberem maravilhosamente bem. Agradeço especialmente ao Marcos Schawrz e Paloma Resende pela paciência e segurarem a minha mão durante o processo de aprendizagem das técnicas e realização dos experimentos de clonagem e expressão heteróloga. Gratidão.

À família que ganhei no Rio de Janeiro, Carlos Mata (Pura Vida!), Maykon, Rodrigo, Victor Hugo, Brendo, Nathália, Luã, Renata, Anthony e Joana. Um destaque especial à Rosemere Valério (Tia Mere) e José Marinho (Tio China) por me acolherem como um filho, membro da família, cheios de amor e preocupação, me mostrando um alicerce que hoje chamo de família. Amo muito vocês.

Ao meu amigo Victor Hugo, cuja amizade resplandeceu no Rio, por quem sou grato pelo companheirismo, troca de vivências, confidências e rolês, tornando minha caminhada no Rio agradável e cheia de surpresas. Minha

admiração cresce cada vez mais e sou muito sortudo em ter te encontrado. Te amo, amigo.

À Dr^a Mayara Ingrid Sousa Lima, minha ex-orientadora que posso chamar de amiga. Grande parte do biólogo/pós-graduando/pesquisador que me tornei é graças a você. Obrigado por ter acreditado e investido no meu potencial. Gratidão pela amizade que cultivamos além da Academia. És uma referência de profissional, professora e pesquisadora.

Aos amigos de graduação: Emilly, Mairla, Nathália, Ítalo, Gustavo, Hugo, Robson, Carlos, Isla, Maycon, Ilmar Junior, membros do Labgem, Biogen e da turma de Biologia 2014.1. Obrigado pela amizade, companheirismo e momentos agradáveis.

À Mathias, Camilla e Andressa (Vênus) pela amizade de anos, pela torcida, pelos momentos marcantes, por cada conversa enriquecedora, pelos rôles inesquecíveis e ajuda nos momentos difíceis. Amo muito vocês.

Aos amigos que a vida me deu, especialmente, Caique, Jeff, Elba, Marcus Elicius, Jhonny, Rayssa, João Lucas Jojota, Ueider, Matheus Silva, Thiago, Ricardo, Frank, Sara, Laelia, Lanjos, Luana, Linda, Marlon, Henrique, Jura, Diego e Fábio. Vocês são muito importantes na minha vida e o apoio de cada têm sido importantes durante minha caminhada. Muito obrigado por tudo.

Por fim, mas não menos importante, aos meus eternos professores Cid Roberto, Jislene, Lucilene Duarte, Francisca Santiago, Francisca Belfort, Lina e os demais educadores que me incentivam há anos. Obrigado por tudo. Amo vocês e carrego comigo cada ensinamento.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Hanseníase: aspectos gerais e epidemiológicos.....	1
1.2 Classificação e tratamento.....	3
1.3 Transmissão.....	5
1.4 Resposta imune na hanseníase.....	5
1.5 Reações hansênicas.....	7
1.6 Diagnóstico.....	8
1.7 <i>Background</i> genético do hospedeiro.....	10
1.8 Gênero <i>Mycobacterium</i>	12
1.9 <i>Mycobacterium leprae</i>	13
1.9 Aspectos genéticos do <i>M. leprae</i>	15
1.10 Outras micobactérias.....	18
1.10 Estudos de proteínas do <i>M. leprae</i>	19
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Reanálise de dados.....	24
4.2 Considerações sobre aspectos éticos e biossegurança.....	24
4.3 Amostras Biológicas.....	24
4.4 Análises <i>in silico</i>	25
4.5 Caracterização dos genótipos em amostras brasileiras.....	26

4.6	Expressão heteróloga	28
4.7	Análises de dados.....	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1	Reanálise de dados de WGS	30
5.2	Alinhamento da proteína ML1334 com proteínas homólogas de outras micobactérias.....	33
5.3	Predição de topologia e domínio transmembranar das variantes da proteína ML1334.....	33
5.4	Predição estrutural das variantes da proteína ML1334.....	35
5.5	Predição de Epítomos nas variantes da proteína ML1334	36
5.6	Genotipagem do gene <i>ML1334</i> em amostras brasileiras	39
5.7	Clonagem e expressão das variantes da proteína ML1334 em <i>E. coli</i>	42
6.	CONCLUSÕES.....	43
	REFERÊNCIAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BB – *Borderline-borderline*

BL – *Borderline-lepromatoso*

BT – *Borderline-tuberculoide*

° C – Graus Celsius

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

ENH – Eritema Nodoso Hansênico

HC – Contatos domiciliares

HLA – Antígeno leucocitário humano

HSP – Proteína de choque térmico

IL – Interleucina

InDels – Inserção/Deleção

LAM – Lipoarabinomanana

LL – Lepromatoso-lepromatoso

MB – Multibacilar

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

NOS – Espécie reativa de nitrogênio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – Paucibacilar

PBMCs – Células mononucleadas do sangue periférico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PE – Prolina-Ácido Glutâmico

PGL-1 – Glicolípido Fenólico 1

PIMs – fosfatidilinositol manosídeo

PPE – Prolina-Prolina-Ácido Glutâmico

PQT – Poliquimioterapia

ROS – Espécie reativa de oxigênio

RR – Reação Reversa

SASPs – Proteínas secretadas e associadas à superfície

SNPs – Polimorfismo de base única

STRs – Microssatélites

TMM – Monomicolatos de trealose

TT – Tuberculoide-Tuberculoide

VNTRs – Regiões de repetições sequenciais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição mundial de novos casos da hanseníase	1
Figura 2. Taxa de detecção de novos casos da hanseníase no Brasil	2
Figura 3. Esquema sobre a infecção por <i>Mycobacterium leprae</i>	4
Figura 4. Modelo de regulação da resposta adaptativa na hanseníase	7
Figura 5. Esquema das principais moléculas da superfície do <i>M. leprae</i>	13
Figura 6. Hipótese de dispersão do <i>M. leprae</i> ao redor do mundo	16
Figura 7. Componentes do genoma de <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i>	17
Figura 8. Alinhamento da proteína ML1334 de <i>M. leprae</i> com homólogas	32
Figura 9. Topologia e domínio transmembrana das variantes de ML1334	34
Figura 10. Modelagem tridimensional das variantes de ML1334	35
Figura 11. Resultado de eletroforese em gel com os três diferentes genótipos encontrados para o gene <i>ML 1334</i>	40
Figura 12. Exemplos de eletroferogramas resultantes do sequenciamento dos três diferentes genótipos encontrados para o gene <i>ML 1334</i>	41
Figura 13. <i>Western blot</i> das proteínas recombinantes	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>) usados na detecção das mutações no gene <i>ML1334</i>	25
Tabela 2. Detalhamento dos ciclos PCR para detecção das mutações no gene <i>ML1334</i> em amostras brasileiras	25
Tabela 3. Detalhamento dos ciclos da reação de sequenciamento para detecção das mutações no gene <i>ML1334</i> em amostras brasileiras.	26
Tabela 4. Sequências dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>) com os sítios de restrição usados para expressão heteróloga	27
Tabela 5. Sequências dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados para o PCR de colônia e sequenciamento	28
Tabela 6. Principais genes com mutações não sinônimas em CDS, com suas respectivas mudanças de aminoácidos e funções	29
Tabela 7. Predição funcional das mutações em genes no <i>M. leprae</i> em amostras brasileiras	31
Tabela 8. Resultado da predição de epítomos de células B	36
Tabela 9. Resultado da predição de epítomos maior afinidade em serem reconhecidos pelo MHC de classe I.	38
Tabela 10. Resultado da predição de epítomos maior afinidade em serem reconhecidos pelo MHC de classe II.	39
Tabela 11. Resultado de genotipagem das amostras analisadas	40



CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE GENES DO *Mycobacterium leprae*

RESUMO

Apesar dos primeiros estudos envolvendo o agente etiológico *Mycobacterium leprae* revelarem uma baixa diversidade genética, trabalhos mais recentes utilizando sequenciamento completo de nova geração (WGS) revelaram uma diversidade genética maior do que reportada anteriormente, inclusive entre isolados de um mesmo país, como do Brasil. Algumas variações genéticas, em sua maioria SNPs e InDels, foram encontradas em genes codificantes de proteínas de *M. leprae* com possível papel na imunopatogênese da hanseníase, como no gene *ML1334* que codifica uma proteína de membrana não caracterizada. Nesse sentido, este trabalho buscou caracterizar as variantes da proteína ML1334. Primeiramente, ortólogos de outras micobactérias e cepas de *M. leprae* foram buscados. Análises *in silico* foram feitas para compreensão do impacto funcional e estrutural da região variável da proteína. Em seguida, foi realizada a genotipagem do gene *ML1334* em amostras brasileiras. Por fim, os diferentes genótipos encontrados foram clonados e expressos em *E. coli*. As investigações *in silico* demonstraram alto impacto funcional e estrutural das variações observadas. Adicionalmente, diferenças na imunogenicidade também foram vistas por predições computacionais. A genotipagem de 88 amostras de pacientes com hanseníase MB resultou na detecção de três diferentes genótipos do gene *ML1334*, sendo um deles, denominado “intermediário”, um achado inédito em amostras brasileiras. A clonagem e expressão das três variantes da proteína foi bem-sucedida, com a fidelidade dos insertos confirmada por sequenciamento. Em conclusão, nossos resultados demonstram que diferenças observadas na proteína ML1334 podem ter impactar no reconhecimento do *M. leprae* pelo sistema imune, assim como na própria fisiologia bacteriana. O genótipo intermediário encontrado em amostras brasileiras evidencia a necessidade de compreensão do genoma das cepas circulantes no país. As proteínas recombinantes deverão ser usadas em ensaios futuros para caracterização funcional dessas variantes.

Palavras-chave: hanseníase, SNPs, Indels, *Mycobacterium leprae*, genótipo.



CHARACTERIZATION OF GENE VARIANTS OF *Mycobacterium leprae*

ABSTRACT

Although the first studies involving the etiological agent *Mycobacterium leprae* revealed a low genetic diversity, more recent works using complete next generation sequencing (WGS) revealed a greater genetic diversity than previously reported, including among isolates from the same country, such as Brazil. Some genetic variations, mostly SNPs and InDels, were found in genes encoding *M. leprae* proteins with a possible role in the immunopathogenesis of leprosy, such as in the *ML1334* gene, which encodes an uncharacterized membrane protein. In this sense, this work characterized the variants of the *ML1334* protein. First, orthologs of other mycobacteria and *M. leprae* strains were searched. *In silico* analyzes were performed to understand the functional and structural impact of the variable region of the protein. Then, the *ML1334* gene was genotyped in Brazilian samples. Finally, the different genotypes found were cloned and expressed in *E. coli*. *In silico* investigations demonstrated a high functional and structural impact of the observed variations. Additionally, differences in immunogenicity were also seen by computational predictions. Genotyping resulted in the detection of three different genotypes of the *ML1334* gene, one of them being called “intermediate”, an unprecedented finding in Brazilian samples. Cloning and expression of protein variants was successful, with insert fidelity confirmed by sequencing. In conclusion, our results demonstrate that differences observed in the *ML1334* protein may have an impact on the recognition of *M. leprae* by the immune system, as well as on the bacterial physiology itself. The intermediate genotype found in Brazilian samples highlights the need to understand the genome of strains circulating in the country. Recombinant proteins should be used in future assays for functional characterization of these variants.

Key words: leprosy, SNPs, Indels, *Mycobacterium leprae*, genotype

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase: aspectos gerais e epidemiológicos

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica de evolução lenta causada principalmente pelo *Mycobacterium leprae*, uma bactéria intracelular com predileção para os macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos. Por isso, a hanseníase é considerada uma doença dermatológica e neurológica, cuja principais manifestações clínicas são lesões cutâneas despigmentadas e com perda de sensibilidade (1,2). A doença é milenar, descrita em relatos de antigas civilizações, como textos de mais de três mil anos no Egito, China e Índia. Trata-se de uma doença tropical negligenciada com grande estigma social capaz de provocar deformidades físicas debilitantes, tornando-a um grave problema de saúde pública, especialmente em países subdesenvolvidos (3–5).

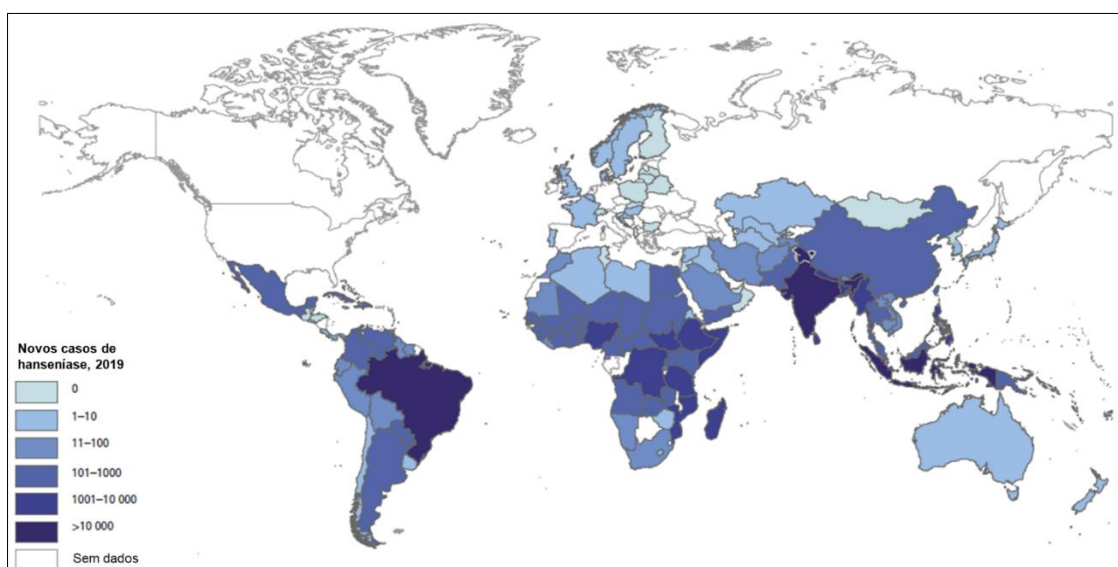


Figura 1. Mapa da distribuição mundial de novos casos da hanseníase em 2019. As cores indicam, em ordem crescente de intensidade, o número de casos. Adaptado da OMS (6).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde divulgados em 2020, o número de casos em tratamento foi de 177.175 no final de 2019 em mais de 120 países, que corresponde a uma prevalência de 22,7 por milhão de habitante. Em comparação com o ano de 2018, esse número representa uma diminuição de 7.063 casos em todo o mundo. Todavia, esse decréscimo na prevalência não foi observado nas Américas, onde aumentou de 34.358 casos em 2018 para 35.231 em 2019. Quando observado o número de novos casos ao redor do

globo, foram detectados 202.185 casos, representando uma redução de 6.506 casos. A figura 1 apresenta a distribuição dos novos casos em 2019 no mundo, com destaque no Sudeste Asiático (71,3%) e nas Américas (14,9%). Dentre os novos casos diagnosticados em 2019, aproximadamente 90% foram notificados na Índia, Brasil, Indonésia e Bangladesh (6)

O Brasil apresenta o segundo maior número de novos casos do mundo (27.863), ficando atrás da Índia e à frente da Indonésia. Além disso, o Brasil teve mais de 93% dos novos casos diagnosticados nas Américas em 2019. Embora esse índice tenha reduzido ao longo dos anos, o Brasil ainda não atingiu a meta proposta pela OMS para o ano 2000 de menos de 1 caso para cada 10.000 habitantes ou 10 casos por 100.000 habitantes (6,7).

Entre 2010 e 2019, foram diagnosticados 301.638 novos casos de hanseníase no Brasil. Embora tenha ocorrido uma redução na taxa de detecção de 18,22 em 2010 para 13,23 por 100 mil habitantes em 2019, o país se mantém com alta endemicidade da doença. Como mostra a figura 2, dentre os estados com maior taxa de detecção geral, destaca-se Mato Grosso com 129,38 casos novos por 100 mil habitantes, Tocantins com 94,44 casos novos por 100 mil habitantes e o Maranhão com 45,02 casos novos por 100 mil habitantes (8).

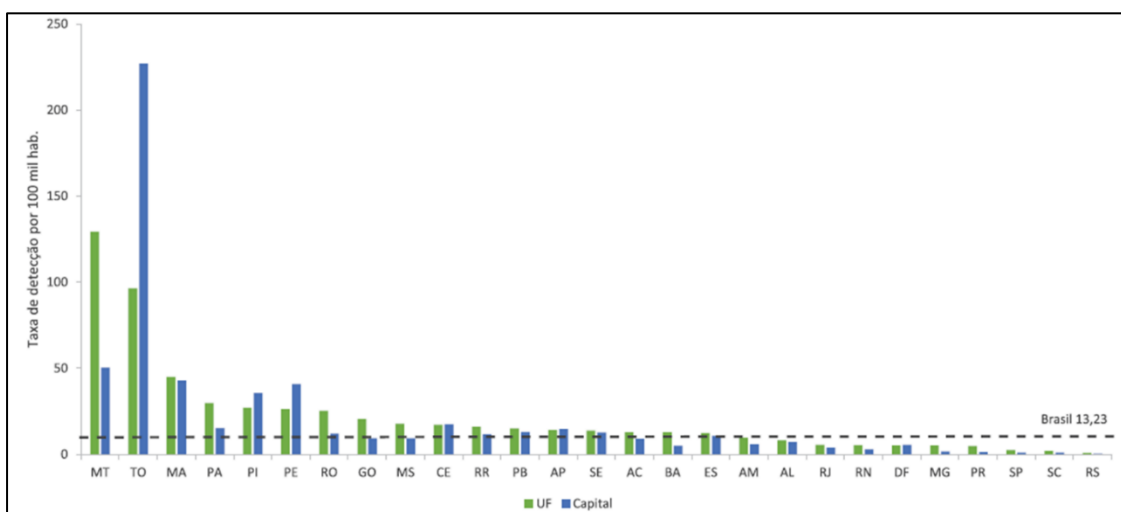


Figura 2. Taxa de detecção de novos casos da hanseníase nos estados do Brasil e suas respectivas capitais no ano de 2019. A linha pontilhada indica a taxa de detecção nacional. Fonte: SINAN/SVS/MS 2021 (8)

1.2 Classificação e tratamento

Uma vez que o indivíduo desenvolve a doença, uma classificação adequada é de fundamental importância para o tratamento e cuidado do paciente. Em 1966, Ridley & Jopling propuseram uma classificação com subdivisões baseada em critérios imunológicos e histológicos. Assim, eles consideraram as formas clínicas como um espectro em que os extremos eram constituídos pelos tipos polares: tuberculóide (TT) e lepromatoso (LL) (9),

Nesse espectro, a forma tuberculóide é caracterizada por uma baixa carga bacilar, além de poucas lesões cutâneas com bordas delimitadas. Geralmente, as lesões não ultrapassam 10 cm de diâmetro e apresentam hipossensibilidade. Já o dano neural é geralmente observado em torno de lesões cutâneas e está associado a um comprometimento sensorial e/ou motor, principalmente nas mãos e nos pés (10).

Na forma lepromatosa, há uma disseminação da doença em decorrência da multiplicação bacilar, a qual envolve a difusão das lesões em extensas áreas do tegumento, múltiplos troncos nervosos, resultando em acentuação do eritema e infiltração bacteriana. De início insidioso e progressão lenta, esta forma clínica pode acometer outros órgãos (11).

Há ainda as formas *borderlines*, ou dimorfas, as quais são caracterizadas por instabilidade imunológica e oscilam entre os pólos tuberculóide e lepromatoso. Os pacientes que apresentam estas formas clínicas podem ser subdivididos por critérios imunológicos e histológicos de acordo com a proximidade às formas polares, em *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB), e *borderline-lepromatoso* (BL) (10,12).

Todavia, devido à necessidade de expansão da campanha de eliminação da hanseníase e afim de auxiliar no diagnóstico e tomada de estratégia terapêutica, a OMS propôs uma classificação operacional baseada na contagem do número de lesões de pele. Dessa forma, os pacientes são classificados em paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB) se apresentam de uma a cinco lesões ou mais de cinco lesões, respectivamente (13). O esquema mostrado na figura 3 resume essas informações.

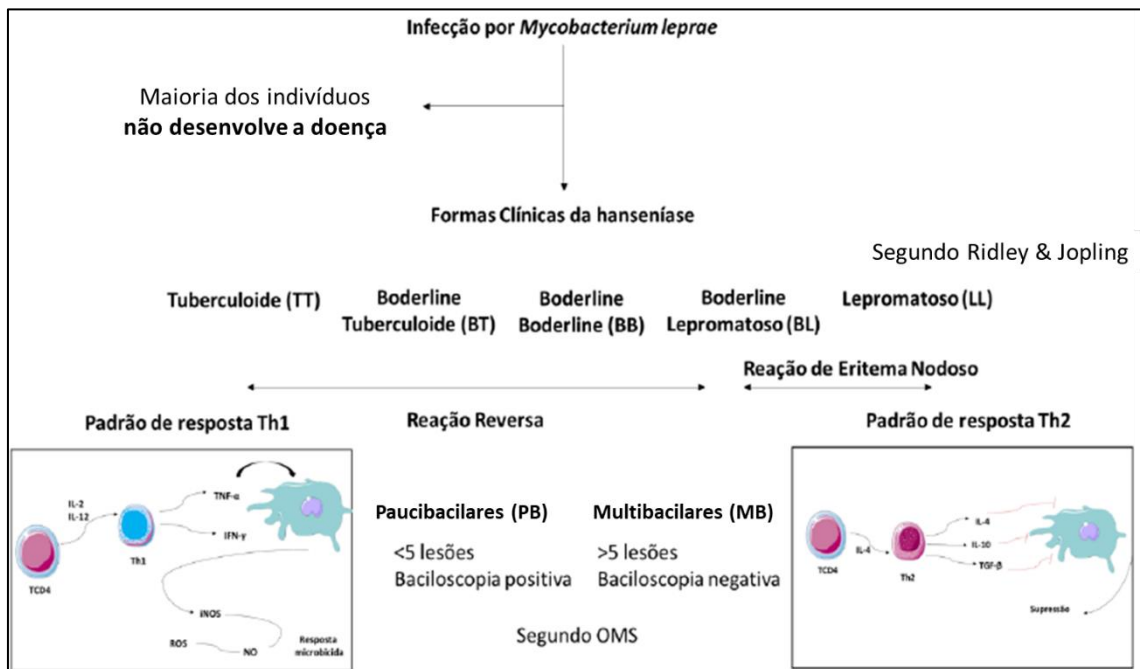


Figura 3. Esquema geral sobre a infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Apresentação das formas clínicas segundo Ridley e Jopling (TT, BT, BB, BL, LL) e OMS (PB e MB); os padrões imunológicos envolvidos na hanseníase: predomínio da resposta Th1 no polo TT e da resposta Th2 no polo LL. Observa-se os episódios reacionais: Reação Reversa e Eritema Nodoso Hansênico. Moraes, 2020 (14)

O tratamento dos indivíduos com hanseníase consiste na maior estratégia de controle e eliminação da doença como problema de saúde pública no mundo todo. Em 1982, a OMS preconizou a utilização da poliquimioterapia (PQT) como tratamento específico para a hanseníase. A PQT é constituída pela administração associada dos seguintes medicamentos: rifampicina, dapsona e clofazimina (15). A utilização combinada dessas drogas diminui o risco de resistência microbiana, a qual ocorre com maior frequência quando se utiliza apenas um medicamento. É importante ressaltar que já no início do tratamento o paciente a transmissão diminui, rompendo a cadeia de transmissão da doença (16).

Além disso, o uso correto da PQT é capaz de evitar a progressão da doença prevenindo deformidades físicas irreversíveis e atenuando o estigma associado à doença. A classificação operacional dos pacientes, em PB ou MB, é fundamental para a escolha do esquema-padrão de administração do tratamento. Em pacientes classificados como PB, a combinação de rifampicina, dapsona e clofazimina é utilizada por 6 meses. Já nos pacientes classificados como MB, o tratamento é realizado através da combinação de rifampicina, dapsona e clofazimina durante 12 meses (17).

1.3 Transmissão

A compreensão dos mecanismos de transmissão da hanseníase permanece em constante investigação. Acredita-se que a principal forma de propagação da doença ocorra por contato próximo e prolongado de um indivíduo doente, sem tratamento, que dissemina o bacilo através das vias aéreas superiores, infectando outros indivíduos suscetíveis (18). Estudos demonstraram que a maior porta de saída do *M. leprae* é a mucosa nasal, pela qual pacientes com alta carga bacilar expõem aproximadamente 1 milhão de bacilos viáveis por dia. Nesse sentido, indivíduos com a doença ativa, em especial multibacilares, são considerados a principal fonte de transmissão da doença. Todavia, devido ao longo período de incubação da hanseníase, de 2 a 10 anos, é difícil determinar a fonte de infecção exata. Sendo assim, indivíduos doentes que não foram devidamente diagnosticados apresentam um papel relevante na dinâmica de transmissão do *M. leprae* (19–22).

Por muito tempo o ser humano foi considerado como única fonte de infecção pelo *M. leprae*, todavia estudos envolvendo animais silvestres identificaram novos reservatórios. Kirchheimer em 1972 e Storrs em 1974 relataram infecção experimental no tatu *Dasypus novemcinctus*, apontando-o como um modelo de infecção e compreensão da patogênese da hanseníase (23,24). Posteriormente, diversos outros estudos demonstraram *D. novemcinctus* como reservatório natural do *M. leprae*, além de inúmeros casos de hanseníase nos indivíduos com contato direto na criação e consumo desses animais infectados (25–29). Recentemente, Silva e colaboradores (2018) investigando tatus em Belterra, Pará, identificaram 62% casos de infecção pelo *M. leprae*, indicando elevada taxa de infectividade. Paralelamente, observaram também maiores níveis sorológicos de anticorpos anti-PGL-1 nos indivíduos da região que consumiam tatu, reforçando o papel desses animais como reservatórios do bacilo e o perigo no consumo deles (30).

1.4 Resposta imune na hanseníase

A resposta imune é de importância fundamental para a defesa do organismo contra o patógeno. Nos indivíduos doentes, mudanças na resposta imune estão relacionadas com o desenvolvimento de formas clínicas distintas. A

primeira interação entre as micobactérias e o hospedeiro humano acontece pelo reconhecimento de padrões moleculares por meio de receptores tipo Toll 1 e 2 (*Toll-like; TLR*) presentes nos macrófagos e células dendríticas (31,32). Após a ativação desses receptores por padrões moleculares presentes no *M. leprae*, ocorre também a diferenciação dos macrófagos, células dendríticas, e a secreção de citocinas, principalmente interleucina-12 (IL-12). Juntamente com a secreção dessas citocinas, os macrófagos e células dendríticas apresentam os antígenos aos linfócitos T virgens, ativando-os (33).

Os tipos de citocinas secretadas estão envolvidos com a capacidade desses linfócitos T (CD4⁺) em induzir resposta celular ou humoral, proporcionando o desenvolvimento das respostas Th₁ ou Th₂. O primeiro tipo de resposta está relacionada com a produção de interferon-gama (IFN- γ), o qual induz a resposta imune celular responsável pela eliminação do bacilo, controlando parcialmente a disseminação do patógeno. Por outro lado, o perfil de resposta Th₂ está relacionado com o predomínio da resposta humoral, que é ineficiente no controle do patógeno (34). A predominância de uma resposta celular ou humoral frente à infecção influencia diretamente a evolução da doença, estando também relacionada com as características clínicas observadas nos pacientes hansênicos (35). A figura 4 esquematiza resumidamente os perfis de resposta imune predominantes em cada polo da doença.

Os pacientes com a forma clínica TT apresentam lesões com resposta imune celular predominante, limitando a doença a um menor número de lesões de pele bem definidas. As citocinas IFN- γ , interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são secretadas nas lesões, resultando no aumento da atividade fagocítica de macrófagos. Adicionalmente, sob influência dessas citocinas e juntamente com os linfócitos, os macrófagos formam o granuloma (36,37).

Os pacientes com hanseníase LL apresentam ausência da resposta imune celular específica (anergia) contra a micobactéria, ocorrendo proliferação do *M. leprae*, com a presença de muitas lesões e infiltrações extensas na pele e nos nervos. Essa forma clínica é caracterizada por granulomas escassos e

desorganizados. Já as citocinas mais abundantes são IL-4, IL-5, e IL-10. Estudos demonstram que a secreção de IL-4 diminui a expressão dos TLR2 nos monócitos e que a IL-10 suprime a produção de IL-12, facilitando a disseminação do bacilo (35,37–39).

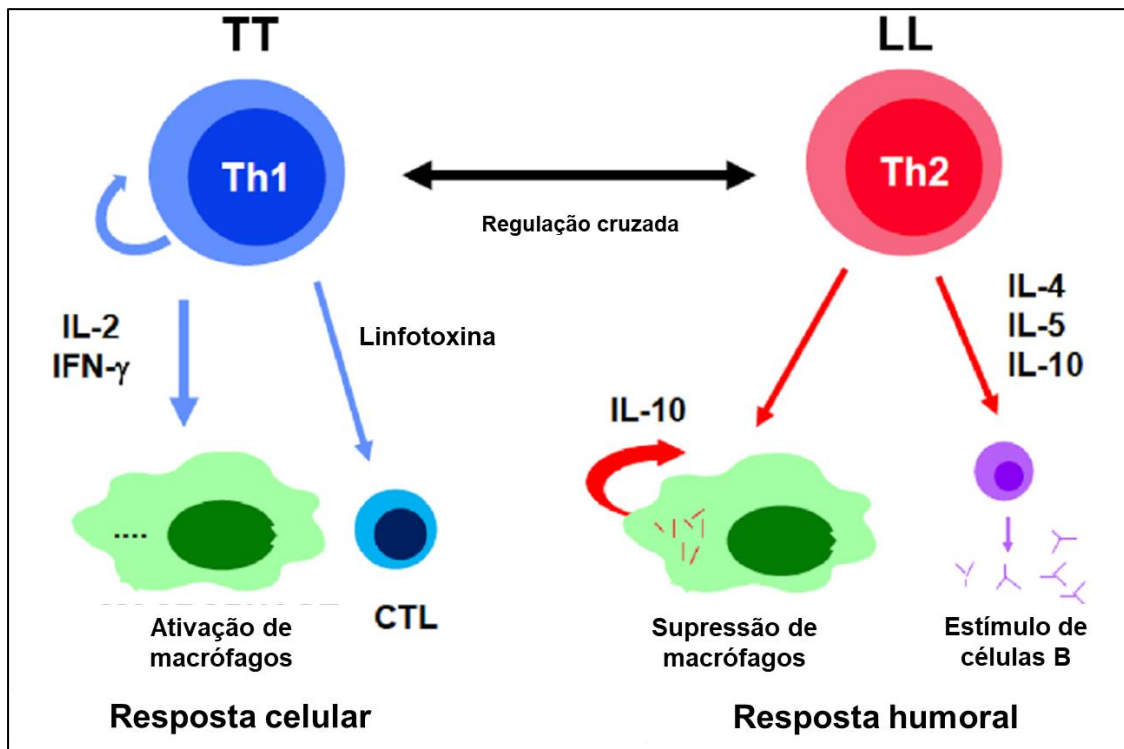


Figura 4. Modelo de regulação da resposta adaptativa na hanseníase. Os pacientes TT apresentam um predomínio da resposta imune mediada por células (Th₁) via IL-2, IFN-γ e linfotóxina que ativam macrófagos e linfócitos T citotóxicos (CTL) para eliminar patógenos intracelulares. Em contraste, os pacientes LL têm uma resposta humoral proeminente (Th₂) via IL-4, IL-5 e IL-10, as quais inibem a resposta imunológica celular através da supressão de macrófagos. Fonte: Adaptado de [Weiss, 2017](#).

1.5 Reações hansênicas

Durante a progressão da doença ou muitas vezes no início, durante ou após o tratamento, alguns pacientes podem apresentar as chamadas reações hansênicas ou episódios reacionais. Esses eventos são processos inflamatórios agudos secundários à liberação de antígenos e reações de hipersensibilidade. Os tipos de reações mais importantes são a reação tipo 1 ou Reação Reversa (RR) e a reação de tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH) (40).

Sendo a principal causa de leões neurais, a Reação Reversa ocorre com maior frequência no início do tratamento, desencadeada pela reativação da resposta inflamatória contra antígenos do *M. leprae*. Ela manifesta-se clinicamente por surgimento de novas lesões ou exacerbação das lesões pré-

existentes com eritema, infiltração, calor local e dor, podendo resultar em a necrose, ulceração ou inflamação aguda dos nervos (12). Nesse episódio reacional há uma exacerbada resposta mediada por células. Através da análise de expressão gênica e dosagem de citocinas, foi demonstrado um aumento abrupto da resposta Th₁, em que IL-1 β , TNF- α , IL-2 e IFN- γ apresentam-se elevadas nas lesões. Já outras citocinas do padrão Th₂, como IL-4, IL-5 e IL-10, estão diminuídas (41,42).

O Eritema Nodoso Hansênico ocorre principalmente em pacientes multibacilares (BL e LL), os quais possuem pouca resposta celular e altos títulos de anticorpos circulantes. Esse tipo de reação caracteriza-se pelo aparecimento de nódulos eritematosos dolorosos disseminados e acompanhados de sintomas sistêmicos como: febre, inchaço dos linfonodos e até hepatoesplenomegalia (43). Embora as citocinas do perfil Th₁ também estejam elevadas, assim como na RR, o ENH se difere pelos níveis significativamente mais elevados de IL-4, IL-5, IL10, IL-6, IL-7 e TNF quando comparado com RR (42,44–46).

Os quadros reacionais são de difíceis de se prever, uma vez que o paciente pode desenvolver reação a qualquer momento durante o tratamento ou mesmo anos depois da cura (47). Embora muitos estudos com foco no *background* genético do hospedeiro tenham abordado a resposta imunológica durante a infecção pelo *M. leprae* e episódios reacionais da hanseníase, os mecanismos do patógeno envolvidos no desencadeamento desses fenômenos ainda são desconhecidos. Por isso, a identificação de biomarcadores reacionais é fundamental, como por exemplo, a produção diferencial de anticorpos em resposta a antígenos específicos do *M. leprae*.

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico precoce da hanseníase consiste em um importante mecanismo de controle e interrupção da transmissão da doença. A anamnese do paciente é essencial para reconhecimentos dos sinais clínicos da doença. Ademais, testes dermatoneurológicos podem auxiliar na identificação das lesões na epiderme, áreas com modificações na sensibilidade e comprometimento motor (48).

Adicionalmente, o diagnóstico laboratorial consiste em ferramentas complementares para auxiliar na confirmação do desfecho clínico da doença. Dentre os exames realizados, destaca-se a análise dos índices de baciloscopia de raspado dérmico de lesões, lóbulos auriculares e cotovelos, o qual consiste na contagem de bacilos em microscópio ótico após a coloração do esfregaço pelo método de Ziehl-Nielsen. O resultado desse exame expressa o número de bacilos em uma escala logarítmica de 0 a 6+ (índice baciloscópico) (49). Porém, a baciloscopia requer pelo menos 10 mil bacilos por grama de tecido para uma detecção confiável, o que resulta em um teste de baixa sensibilidade, especialmente para o polo tuberculóide da doença, no qual os bacilos são raros ou ausentes (50).

Antigamente a reação de Mitsuda era utilizada no diagnóstico da hanseníase no Brasil, o qual utilizava uma suspensão de bacilos mortos por calor (lepromina) inoculados intradermicamente para avaliar a resposta celular tardia dos pacientes (51). Nesse teste, pacientes com a forma clínica MB apresentavam anergia de células T e, por conseguinte, eram negativos no teste. Enquanto nos pacientes PB, o teste de Mitsuda era comumente positivo (52). Do ponto de vista clínico, esse teste era um importante indicador da eficiência da imunidade celular ao *M. leprae*, sendo considerado de alto valor prognóstico à resistência quando positivo ou à suscetibilidade se negativo, e em indivíduos normais estava associado a um risco menor de desenvolver a doença (48,52).

Os testes sorológicos têm ganhado destaque como ferramenta auxiliar no diagnóstico precoce de infecção pelo *M. leprae*. O Glicolípido Fenólico 1 (PGL-1), um antígeno específico e mais abundante do bacilo, é o mais usado em imunoenaios de ELISA e ML-FLOW (imunocromatografia), os quais são capazes de detectar anticorpos anti-PGL1 no soro dos pacientes multibacilares. Os títulos elevados desses anticorpos são indicativos de alta carga bacilar, enquanto títulos baixos, ou mesmo ausentes, são encontrados em pacientes com baixa carga bacilar. Diante disso, esse tipo de ensaio pode auxiliar no acompanhamento dos pacientes e na avaliação da exposição de contatos intradomiciliares (53–58).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do DNA de *M. leprae* melhorou a detecção de bacilos eventualmente presentes em amostras de esfregaço dérmico, biópsias de pele e nervo. Dessa forma, um diagnóstico mais sensível da hanseníase pode ser alcançado acelerando a detecção de novos casos e, conseqüentemente, o tratamento. Na tentativa de aperfeiçoar esse método, várias combinações de ensaios com diferentes combinações de iniciadores (*primers*), condições enzimáticas e tecnologia têm sido testados e reportados na literatura, resultando em diferentes graus de positividade (59–62)

Recentemente, novas proteínas e peptídeos de *M. leprae* e antígenos recombinantes obtidos por expressão heteróloga têm sido promissores na aplicação em diferentes plataformas de imunodiagnóstico. No que diz respeito às proteínas recombinantes, a fácil obtenção, especificidade, sensibilidade e capacidade de se realizar modificações estruturais têm sido as maiores vantagens quando comparadas com antígenos naturais (63–68). Todavia, a necessidade de se conhecer novos alvos antigênicos capazes de auxiliar no diagnóstico diferencial de formas clínicas, episódios reacionais e recidiva é de grande interesse.

1.7 Background genético do hospedeiro

Os estudos envolvendo o genoma do *M. leprae* por muito tempo foram limitados. As abordagens de genômica focaram inicialmente em microrganismos de interesse global, sendo a hanseníase uma doença negligenciada, o esforço para compreensão do patógeno foi tardio. Outra dificuldade encontrada foi a impossibilidade de cultivo em meio axênico do bacilo, que retardou e impossibilitou diversos experimentos. Adicionalmente, as primeiras abordagens genômicas demonstraram o genoma reduzido do *M. leprae* em relação a outras micobactérias e baixa variabilidade genética. Diante disso, os pesquisadores investigaram principalmente o *background* genético do hospedeiro, inclusive atribuindo-o como principal determinante no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença (69).

Uma das maneiras de investigar contribuintes genéticos humanos na hanseníase são os estudos de associação, os quais investigam a frequência de

marcadores genéticos com determinados desfechos, como: adoecimento, episódio reacional, entre outros. Dentre os marcadores que são frequentemente avaliados nesses estudos, destacam-se os polimorfismos de base única (SNPs), sequências repetitivas em tandem (VNTRs), microssatélites (STRs) e inserções/deleções (InDels) (70).

Um exemplo disso é o gene *PRKN* que codifica a parquína a qual desempenha papel central na ubiquitinação de proteínas influenciando a autofagia. Mutações em *PRKN* têm ganhado destaque em investigações com doenças infecciosas, incluindo a hanseníase. Estudos demonstraram associação entre genótipos desse gene com susceptibilidade à hanseníase *per se* em populações do Vietnã, Índia e Brasil (71–74)

SNPs no gene *VDR* codificante para o receptor da vitamina D têm sido alvo de investigação. Isto porque ele desempenha papel importante também como fator de transcrição, modulando genes envolvidos no balanceamento entre a resposta celular (Th_1) e humoral (Th_2). A análise de SNPs no *VDR* em diferentes populações, incluindo na brasileira, demonstraram que variantes no intron 8 e éxon 9 estão associadas com hanseníase multibacilar (75–80).

O receptor NOD2, envolvido em vias de modulação de resposta imune da hanseníase, também tem sido estudado. Estudos com o gene *NOD2* encontraram associação de dois SNPs (rs9302752 e rs7194886) com susceptibilidade a hanseníase em um estudo na população da China (81). A associação de SNPs do gene *NOD2* com a hanseníase também foi observada em populações do Vietnã e da Índia (73,82). No Brasil, estudo conduzido por Leturiondo e colaboradores (2020) descreveu a associação do SNP rs8057341 do gene *NOD2* com a susceptibilidade à hanseníase (83).

Outros SNPs nos genes *TLR1*, *TNF*, *IL10*, *LRRK2* e *IFNG* demonstraram associação com a suscetibilidade e/ou proteção à hanseníase em diferentes populações (73,84–87). Todavia, a não-replicação dos mesmos achados de associação em determinadas populações e as diversas manifestações clínicas da hanseníase demonstram a necessidade de buscar novos marcadores genéticos capazes de auxiliar na compreensão dos diferentes fenótipos encontrados na doença. Além disso, não há estudos de associação de

componentes genéticos do *M. leprae* com as variáveis clínicas encontradas na doença, reforçando a importância de investigações com foco no patógeno.

1.8 Gênero *Mycobacterium*

As micobactérias pertencem a ordem Actinomycetales e a família Mycobacteriaceae, que possui um único gênero, denominado *Mycobacterium*. São bactérias principalmente aeróbicas, não esporuladas, imóveis, em formato bastonete reto ou levemente curvado, medindo de 0,2 a 0,6 μm de largura por 1,0 a 10 μm de comprimento (88).

Os parede celular das micobactérias contém ácido meso-diaminopimélico, alanina, ácido glutâmico, glucosamina, ácido murâmico, arabinose e galactose. Adicionalmente, a rica presença de ácidos micólicos, juntamente com lipídeos complexos, fornece uma barreira de permeabilidade hidrofóbica. Devido essa composição da parede celular, que impede o acesso de corantes comuns, as micobactérias não são facilmente coradas pelo método de Gram, sendo, portanto, necessário procedimentos especiais (por exemplo, coloração de Ziehl-Neelsen). Os bacilos não são facilmente descoloridos, mesmo com álcool-ácido, e são, portanto, ácido-resistentes (49,89,90)

Quando comparadas a outras bactérias, o crescimento da maioria das micobactérias é bastante lento, com tempos de duplicação que variam entre as espécies. Embora haja espécies que cresçam em cultura axênica utilizando substratos relativamente simples, usando amônia ou aminoácidos como fontes de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono na presença de sais minerais, algumas espécies (por exemplo, *M. haemophilum* e *M. genavense*) são exigentes e requerem suplementos mais complexos como micobactina, hemina ou outros compostos. As temperaturas ideais para o crescimento variam amplamente entre as espécies (de <30 a 45°C) (90)

Com o crescente uso de técnicas moleculares para identificação de bactérias, cerca de 200 espécies de micobactérias já foram descritas. Adicionalmente, a utilização de novas abordagens genômicas têm possibilitado o aumento no número identificações, além da caracterização detalhada das mesmas (91–94).

1.9 *Mycobacterium leprae*

M. leprae foi identificado em 1873 por Gerhard Henrik Armauer Hansen, de quem recebe o nome de bacilo de Hansen. Com essa descoberta, o microrganismo foi o primeiro patógeno bacteriano associado com uma doença humana. Embora tenha sido identificado há quase 150 anos, os mecanismos de patogenicidade e fisiologia do patógeno ainda não estão totalmente elucidados, assim como a sua interação com o hospedeiro (95).

O *M. leprae* é um parasito intracelular obrigatório que infecta principalmente os macrófagos e as células Schwann do sistema nervoso periférico (88). O bacilo apresenta um formato de bastão ou levemente curvado com as extremidades arredondas, medindo de 1,5 a 8 µm de comprimento por 0,2-0,5 µm de diâmetro, classificado como gram-positivo e podendo ser observado como bacilo álcool-ácido resistente através da coloração de Ziehl-Nellsen (ZN) (48,89,90). Nos tecidos infectados, as células microbianas frequentemente agrupam-se formando aglomerados que podem conter centenas de bactérias, também chamado de *globia* (96–98).

Uma característica marcante do *M. leprae* é a sua alta transmissibilidade e baixa patogenicidade. Seu crescimento em modelos animais é extremamente lento, podendo levar 14 dias entre cada fissão, o que dificulta a obtenção de uma quantidade de bacilo suficiente para estudo. A lentidão no crescimento bacilar pode explicar a extensa duração entre o tempo de infecção até a manifestação dos sintomas da doença, assim como a natureza crônica da infecção. A partir de ensaios utilizando camundongos, demonstrou-se que a temperatura ótima de crescimento do *M. leprae* é em torno de 30 °C, o que pode explicar a sua predileção por áreas superficiais do corpo como a pele, mucosa nasal e extremidade dos membros (95,99,100).

Estruturalmente, alguns estudos demonstram que a parede celular do *M. leprae*, assim como de outras micobactérias, possui uma composição complexa. Esquemática na figura 5, a parede é composta, em sua maioria, por glicolipídeos, sendo o PGL-1 o mais abundante, Lipoarabinomanana (LAM), fosfatidilinositol manosídeo (PIMs) e monomicolatos de trealose (TMM). A presença de proteínas de choque térmico (HSP) e proteínas com motivos conservados de prolina-prolina-ácido glutâmico (PE/PPE) na parede celular também tem sido comumente investigado. Diante disso, uma característica marcante do *M. leprae* é a presença de uma variedade de moléculas antigênicas capazes de modular o reconhecimento por células do hospedeiro e, conseqüentemente, a resposta imunológica (101–105).

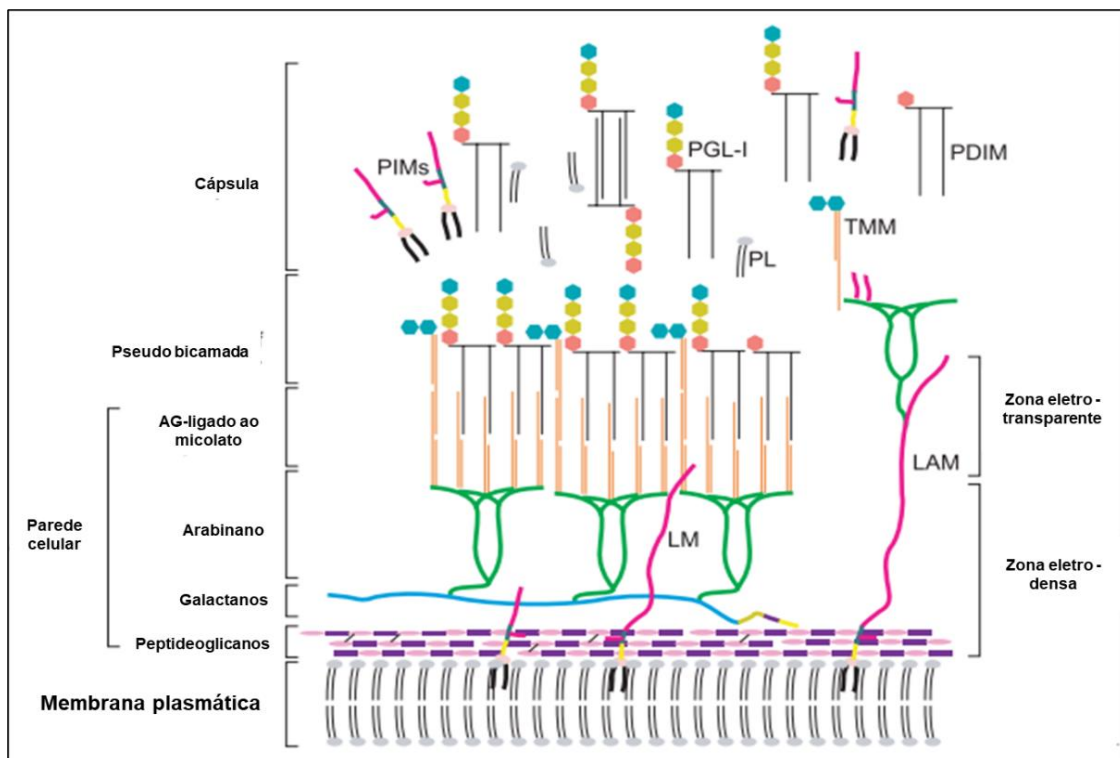


Figura 5. Modelo esquemático das principais moléculas do envelope celular do *M. leprae*. Observa-se na porção mais externa a abundante presença de glicolipídeos, como glicolipídeo fenólico 1 (PGL-1), Lipoarabinomanana (LAM), Lipomanana (LM), fosfatidilinositol manosídeo (PIMs), ftiocerol dimicocerosato (PDIM) e monomicolatos de trealose (TMM). A subdivisão da parede de acordo com a composição, sendo formada por uma região eletrodensa composta por peptidoglicanos (próxima à membrana plasmática) e arabinogalactanos (AG) e uma região eletro-transparente formada pelos ácidos micólicos ligados à AG que compõem a pseudo bicamada com glicolipídeos. Fonte: adaptado de VISSA & BRENNAN, 2001 (96).

A neuropatia hansênica é causada pelo tropismo da micobactéria pelas células de Schwann. O bacilo se liga ao domínio G da cadeia de laminina- α 2 expressa na lâmina basal dos nervos periféricos, sendo essa uma autapomorfia

do *M. leprae* (96,106,107). A infecção na célula de Schwann garante uma maior chance de sobrevivência desse patógeno por ser uma região mais protegida dos mecanismos de defesa do hospedeiro (108). Assim, a infecção de longo prazo pelo *M. leprae* no sistema nervoso periférico pode afetar a função dos nervos antes mesmo de uma resposta imune ser estimulada (109).

1.9 Aspectos genéticos do *M. leprae*

Apesar da dificuldade no desenvolvimento de estudos mais avançados envolvendo a biologia do microrganismo, visto que o bacilo não é cultivável *in vitro* (110), com a conclusão do sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* por Cole e colaboradores (2001), um avanço significativo na elucidação da biologia única do microrganismo foi alcançado (111).

A utilização de marcadores genéticos do *M. leprae* podem auxiliar no entendimento da transmissão e epidemiologia da hanseníase (112). Nesse sentido, a tipagem molecular baseada em VNTRs foi aplicada nos primeiros estudos epidemiológicos, por avaliar sequências curtas que variam em número de cópias entre diferentes cepas bacterianas. Antes da elucidação do genoma, estudo conduzido por Shin e colaboradores (2000) descreveu a diferenciação de 34 isolados clínicos do *M. leprae* nas Filipinas a partir da variação de 10 a 37 repetições TTC em região não-codificante do genoma do bacilo (113). Matsuoka e colaboradores (2000) investigaram 51 amostras de regiões geograficamente distintas do mundo, onde os isolados foram classificados em dois grupos com base no número de repetições em tandem composta por 6 pares de bases no gene *rpoT*. No primeiro grupo encontraram-se os isolados derivados do Japão (exceto Okinawa) e Coréia do Sul, enquanto os isolados do sudeste asiático, Brasil, Haiti e Okinawa no Japão pertencem ao segundo grupo (114).

Posteriormente, a disponibilidade do genoma completo do *M. leprae* permitiu a identificação de 44 *loci* contendo repetições, a partir dos quais um painel de apenas 9 *loci* foi caracterizado como discriminatório (115). Todavia, utilizando esse painel, Gillis e colaboradores (2009) mostraram que os *loci* (AT)₁₅ e (TA)₁₈ não eram reprodutíveis e que (GAA)₂₁ era instável durante passagens do *M. leprae* em camundongos (116). A instabilidade destes *loci* também foi observada por Hall e Salipante (2010) analisando 475 cepas do *M.*

leprae de 6 países (117). Adicionalmente, investigações na Índia e Benin mostraram variação no número de VNTRs de um mesmo paciente, questionando novamente a confiabilidade de tais marcadores (118,119).

A comparação de genomas de cepas de *M. leprae* obtidas de pacientes dos EUA, Tailândia, Índia e Brasil demonstrou a presença de 215 sítios polimórficos, em sua maioria SNPs. A análise desses polimorfismos em 400 cepas de 28 países definiu 84 marcadores informativos (78 SNPs e 6 InDels) usados para classificação de 4 tipos (1-4) e 16 subtipos (1A-D, 2E-H, 3I- M e 4N-P) de *M. leprae*. A tipagem utilizando o painel de SNPs é um método mais robusto e menos instável que os VNTRs que pode ser aplicado em estudos da dinâmica de disseminação do bacilo; todavia, nenhum estudo correlacionou as diferentes cepas com manifestações da hanseníase (120,121).

No Brasil, o estudo conduzido por Fontes e colaboradores (2009) utilizando as tipagens por VNTRs e SNPs em São Paulo e Rio de Janeiro demonstrou padrões de VNTRs altamente variáveis nas cepas e uma predominância do SNP 3 em ambos os estados (122). Em seguida, outro estudo de Fontes e colaboradores (2012) revelou a prevalência do SNP 3 no Rio de Janeiro e do SNP 4 no Nordeste, sugerindo uma introdução diferencial nessa região do país, provavelmente por meio do tráfico de escravos da África (123). Mais recentemente, Benjak e colaboradores (2018) demonstraram a prevalência do SNP 3I no Sudeste, enquanto no Norte e Nordeste há predomínio do SNP 4N, 4P e a presença esporádica do SNP 1D (124).

As análises iniciais de genômica comparativa do *M. leprae* indicam que a hanseníase pode ter se originado na África Oriental (SNP 2). Com sucessivas migrações humanas, o bacilo espalhou-se para o leste e então para a Ásia dando origem ao SNP tipo 1, enquanto uma disseminação para o oeste para o Oriente Médio e Europa deu origem ao SNP tipo 3. Processos de colonização, migração e comércio de escravos introduziram *M. leprae* do tipo SNP 3 para as Américas, enquanto o SNP tipo 4 surgiu na África Ocidental, mas foi então transportado para as Américas por escravos infectados (125). A figura 6 resume essa hipótese.

Todavia, estudos mais recentes avaliando genomas do *M. leprae* a partir de ossadas com mais de 1000 anos, incluindo o mais antigo genoma conhecido do *M. leprae* (415-545 D.C.), indica a presença de outros genótipos na Europa que não podem ser explicados pelo modelo sugerido em 2005, sugerindo um possível surgimento do *M. leprae* na Europa Ocidental (126–128).

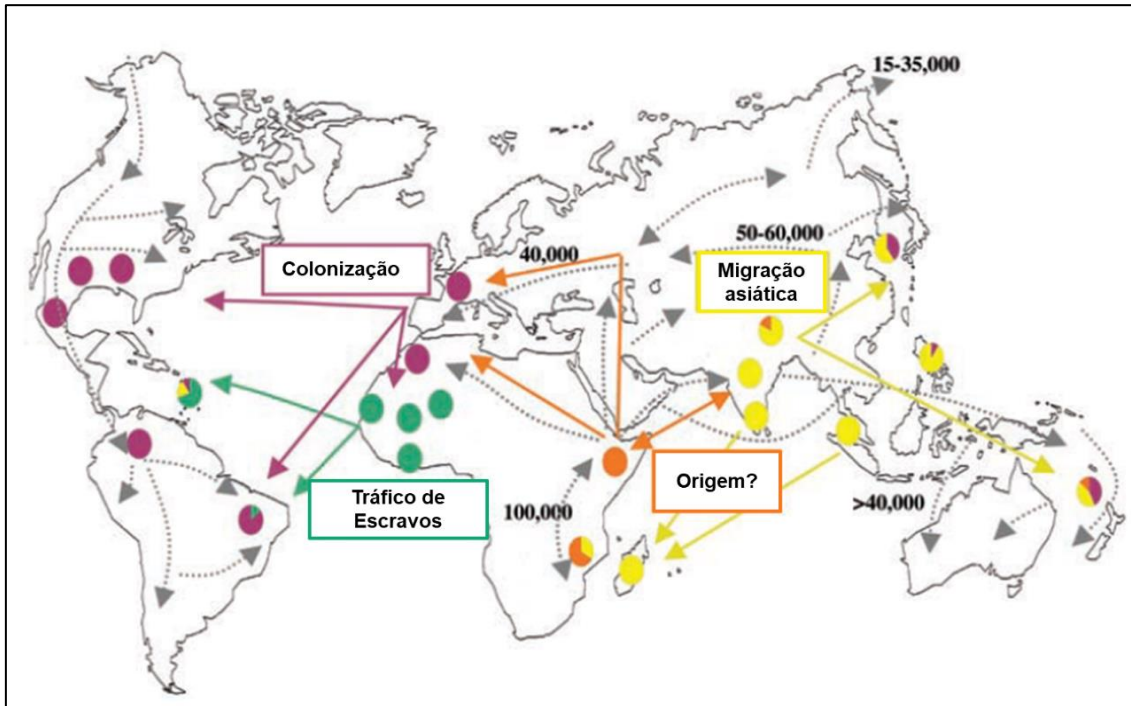


Figura 6. Hipótese de dispersão do *M. leprae* ao redor do mundo. Acredita-se que a bactéria tenha surgido na África Oriental (laranja – SNP2) e seguiu o fluxo migrações para Ásia (amarelo – SNP1). As rotas comerciais entre Europa e Ásia proporcionaram dispersão do bacilo no continente europeu (roxo – SNP3). Com a expansão da colonização, ocorreu a introdução do patógeno nas Américas e norte da África. O tráfico de escravos inseriu a cepa do Oeste da África (verde – SNP4) nas Américas, especialmente no caribe e Brasil. Fonte: Adaptado de Monot e colaboradores (2005) (125).

A sequência do genoma da cepa TN do *M. leprae* revelou 3.268.210 pb com aproximadamente 57,8% de conteúdo G+C, o menor genoma dentre as micobactérias. O arranjo do genoma do *M. leprae* reflete múltiplos eventos de recombinação e inserção de sequências repetitivas. Além disso, somente 49,5% do genoma contém genes codificantes. O restante do genoma possui uma grande quantidade pseudogenes (27%) e regiões que aparentam não serem codificantes (23,5%) ou possuem funções regulatórias ainda desconhecidas. Inicialmente, 1116 pseudogenes foram identificados, todavia, esse número aumentou para 1293 após análises comparativas com outras cepas. A obtenção do genoma de diferentes isolados clínicos possibilitou um melhor entendimento

da biologia do *M. leprae*, o que tem auxiliado na descoberta de novos antígenos, alvos terapêuticos e levantamentos epidemiológicos (129–131) (124–126)

Quando comparado com *Mycobacterium tuberculosis*, o *M. leprae* possui uma significativa redução genômica, em que aproximadamente metade dos genes funcionais de *M. tuberculosis* estão ausentes ou foram substituídos por pseudogenes (Figura 7). Essa redução removeu vias metabólicas inteiras e genes reguladores que estão envolvidos principalmente no catabolismo, resultando no lento crescimento bacteriano e na inviabilidade de cultivo em meio axênico (101,111,132).

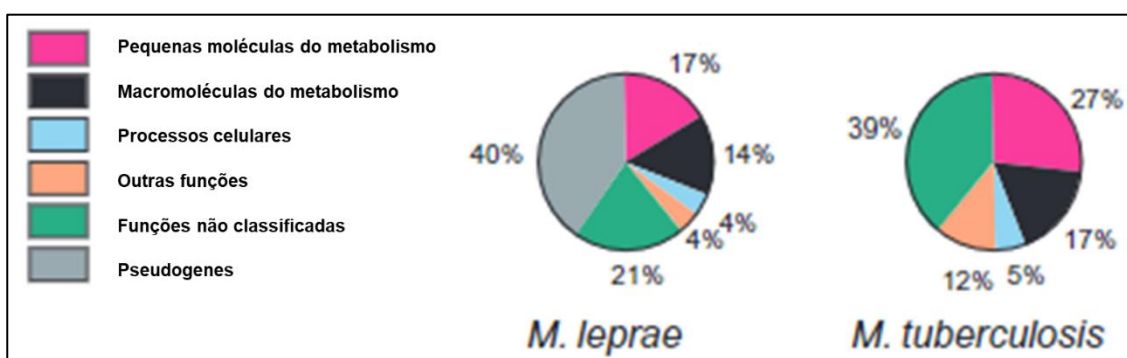


Figura 7. Esquema de categorias funcionais de componentes do genoma de *M. leprae* e *M. tuberculosis*. Observa-se a perda de componentes em todas as categorias funcionais (cores) e aumento considerável de pseudogenes em *M. leprae* quando comparado com *M. tuberculosis*. Fonte: Adaptado de Vissa e Brennan (2001) (101).

1.10 Outras micobactérias

Em 2008, o *Mycobacterium lepromatosis*, uma bactéria semelhante ao *M. leprae*, foi identificado e associado ao desenvolvimento de manifestações clínicas disseminadas da hanseníase, sendo considerado assim um novo agente etiológico da doença. Inicialmente considerou-se o novo organismo como uma cepa de *M. leprae*. Entretanto, as análises do genoma do *M. lepromatosis* revelaram uma diferença de 9% quando comparado com o genoma do *M. leprae*, definindo assim uma nova espécie de micobactéria. Relatos de casos demonstraram que esse organismo é encontrado principalmente em pacientes no México e em outras regiões da América Central (133–136).

Posteriormente foi identificado em vacas que apresentam lesões granulomatosas em suas tetas, o *Mycobacterium uberis* que não é cultivável *in vitro* e a análise genômica sugere que essa micobactéria é também

filogeneticamente próxima ao *M. leprae* (137). Ainda, o isolamento de uma outra micobactéria cultivável, mas decrescimento muito lento, *Mycobacterium haemophilum* indicam que também uma proximidade ao *M. leprae* sugerindo talvez a formação de um complexo (138,139) Esses dados indicam também que estudos genômicos podem ainda contribuir na identificação de novas micobactérias não cultiváveis.

1.10 Estudos de proteínas do *M. leprae*

Além das abordagens genômicas, diversos estudos de caracterização proteicas do *M. leprae* vêm sendo conduzidos nos últimos anos, em especial com proteínas associadas a superfície e secretadas (SASPs). Devido a capacidade de desempenhar papéis significativos durante a infecção, as SASPs são comumente direcionadas para a geração de novas plataformas de diagnóstico, agentes antibacterianos, ensaios vacinais e investigações da interação patógeno-hospedeiro (140).

A expressão heteróloga das proteínas ML0405, ML2331, ML0411, ML2028, ML2038, ML2055 e ML0286 de *M. leprae* e sua posterior aplicação em imunoenaios mostrou a capacidade delas de serem reconhecidas por anticorpos em soro de pacientes com hanseníase. A comparação entre os antígenos naturais e sintéticos do *M. leprae* demonstraram a possibilidade do uso dessas proteínas no diagnóstico e monitoramento da hanseníase (64,141).

Utilizando design *in silico* de proteínas recombinantes e posterior expressão heteróloga, Barbosa e colaboradores (2019) desenvolveram o polipeptídeo rMLP15 composto por 15 peptídeos de seis proteínas diferentes do *M. leprae*: ML1358, ML2055, ML0885, ML1811c, ML1812 e ML1214. Os ensaios sorológicos confirmaram que a proteína recombinante foi capaz de identificar pacientes MB e PB na mesma proporção, apontando para uma possível aplicação na rotina de diagnóstico da hanseníase (142).

Outro estudo conduzido por Bobosha e colaboradores (2012), identificou, por meio de uma abordagem *in silico*, 21 peptídeos com alta afinidade de ligação ao MHC de classe I e II em proteínas de superfície do *M. leprae*. A imunogenicidade desses epítomos foi testada usando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) isoladas de pacientes e controles endêmicos

saudáveis (HCs) do Brasil, Etiópia e Nepal. Observou-se a indução de altos níveis de IFN γ em células de pacientes PB estimuladas com o epítipo p35 da proteína ML2055. Além disso, células de indivíduos saudáveis de áreas hiperendêmicas também apresentaram altos níveis de IFN γ após estímulo com os epítipo p35 (ML2055), p20 e p24 (ML1358) (143).

Ensaio com a proteína recombinante ML2028, Ag85B de *M. leprae*, demonstrou a capacidade desse antígeno de estimular forte resposta Th $_1$ em células de pacientes PB e indivíduos saudáveis. A citometria de fluxo identificou maior população de células T CD4 $^+$ secretoras de IFN- γ , IL-2 e TNF, e CD8 $^+$ secretoras de IFN γ e IL-2 em indivíduos saudáveis estimulados com o antígeno recombinante, demonstrando resposta protetora à infecção por *M. leprae* (144).

Investigações envolvendo a proteína ML0314c do *M. leprae*, uma esterase secretada, demonstraram que ela foi capaz de induzir uma forte resposta imune humoral no caso de novos pacientes com hanseníase quando comparados aos casos tratados e com recidivas. Adicionalmente, sua expressão em *M. smegmatis* foi capaz de alterar a morfologia da colônia e aumentar a taxa de crescimento dessa micobactéria (145). Outra esterase secretada, ML1899, apresentou-se capaz de afetar a sobrevivência, modular a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e NOS), e regular a resposta imune em macrófagos THP-1 (146).

Adicionalmente, as abordagens de proteômica associadas as análises computacionais revelaram uma diversidade de antígenos do *M. leprae*. Como por exemplo, nas proteínas ML1632, ML1339, ML0018c e ML2192c foram identificados epítipos com alta afinidade de ligação com o MHC de Classe II de células T (147).

Outro estudo examinou um painel de proteínas recombinantes do *M. leprae* para as respostas de células T de memória, medido através da produção de IFN γ em indivíduos doentes. Vários antígenos do *M. leprae* (ML0276, ML0840, ML1623, ML2044) induziram fortemente a produção de IFN γ , sendo essas proteínas classificadas como imunogênicas e específicas para hanseníase. Nesse mesmo estudo também foi demonstrado que 82% dos

pacientes paucibacilares respondiam fortemente a, pelo menos, uma dessas proteínas (147).

Embora as investigações envolvendo genômica e proteômica do *M. leprae* estejam progredindo, além da caracterização de moléculas por meio de ensaios *in silico*, expressão heteróloga em outras bactérias e ensaios de infecção, até o momento nenhum estudo comprovou a associação de componentes do patógeno às distintas manifestações da hanseníase.

2. JUSTIFICATIVA

Por muito tempo, devido ao seu genoma reduzido com perdas de vias metabólicas e grande acúmulo de pseudogenes, o *M. leprae* foi associado a uma baixa diversidade genética. Somente a partir do trabalho de Monot e colaboradores, publicado em 2009, foi possível observar diferenças significativas entre cepas clínicas do *M. leprae* obtidas de pacientes de quatro países (120).

Benjak, juntamente com o Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, empregaram WGS (*Whole Genome Sequencing*) em 154 amostras de *M. leprae* (34 amostras brasileiras) derivadas de isolados clínicos de indivíduos multibacilares com recidiva e resistência medicamentosa. Com esse trabalho, foi possível descrever uma diversidade genética maior do que a observada em estudos anteriores, incluindo diferenças em isolados de um mesmo país. O estudo identificou mutações não-sinônimas em regiões codificantes com possíveis papéis na fisiologia bacteriana e patogênese da hanseníase. Dentre os achados, destaca-se uma deleção em fase de 90 nucleotídeos no gene codificante da proteína ML1334, ainda não caracterizada, de *M. leprae*. Essa deleção estava presente em alta frequência nas amostras brasileiras (59%), todas pertencentes ao genótipo 4 do *M. leprae*(124).

Mais recentemente, análises *in silico* envolvendo diferentes cepas do *M. leprae* demonstraram que a proteína ML1334 apresenta alta afinidade com anticorpos e MHC de classe I e II, podendo ser aplicada em ensaios vacinais. Todavia, é necessária a caracterização funcional *in vitro* dessa proteína (148).

Diante do pouco conhecimento dos componentes do *M. leprae* diretamente envolvidos na patogênese da hanseníase e do impacto funcional das mutações recém-descobertas pela genômica, escolhemos como foco deste trabalho a caracterização da proteína ML1334 e de sua respectiva deleção em fase, predominante nas cepas brasileiras.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o genótipo de variantes em genes do *Mycobacterium leprae*.

3.2 Objetivos específicos

✓ Analisar variantes polimórficas de genes do *M. leprae* a partir de estudos anteriores;

✓ Caracterizar *in silico* a proteína ML1334 de *M. leprae* e suas respectivas variantes;

✓ Avaliar a frequência das variantes do gene *ML1334* de *M. leprae* provenientes de amostras brasileiras;

✓ Obter as proteínas recombinantes das variantes do gene *ML1334* por meio de expressão heteróloga em *E. coli*.

4. METODOLOGIA

4.1 Reanálise de dados

Inicialmente, os resultados da colaboração Brasil-Suíça com WGS do *M. leprae* isolados de 385 amostras de diferentes partes do mundo, foram reanalisados buscando por mutações não-sinônimas (SNPs e InDels) em regiões codificantes (CDS). Posteriormente, a análise focou em mutações com frequência maior que 10% nas amostras brasileiras (n=82, sendo 34 amostras já descritas no trabalho de Benjak e colaboradores (2018) mais 48 novas amostras da colaboração Brasil-Suíça). Em seguida, a predição do impacto dessas variantes foi realizada com ferramentas de bioinformática para seleção de alvos candidatos (conforme descrito no item 4.4 abaixo).

4.2 Considerações sobre aspectos éticos e biossegurança

Neste projeto, todos os experimentos e procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz, sob registro nº 1.538.467. Os experimentos de expressão heteróloga em bactérias foram realizados em nível de biossegurança 2 (NB2) no Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática do Instituto Oswaldo Cruz.

4.3 Amostras Biológicas

No presente trabalho, um total de 88 novas amostras de DNA derivadas biópsias de pele de pacientes foram incluídas neste estudo (amostras diferentes das citadas no item 4.1), sendo 41 amostras de pacientes recrutados no Ambulatório Souza Araújo (ASA), e 47 amostras de demandas externas do serviço de triagem de Recidiva/Resistência do Laboratório de Hanseníase. Todas as amostras são oriundas de pacientes com hanseníase MB e possuem resultado positivo no teste molecular de PCR em tempo real confirmando presença do *M. leprae* a partir do alvo 16S rRNA (61).

Das 41 amostras derivadas do Ambulatório Souza Araújo (ASA), 9 pacientes apresentavam episódios reacionais (6 RR e 3 ENH) e 2 eram de casos com recidiva. Quanto as 47 amostras de demandas externas do serviço de triagem de Recidiva/Resistência, 14 eram de pacientes com recidivas e 3 de

falência terapêutica. A extração do DNA foi realizada com DNeasy Blood & Tissue Kit, seguindo recomendações do fabricante.

4.4 Análises *in silico*

O impacto das mutações não-sinônimas (SNPs e InDels) na função e estrutura das proteínas foi avaliado utilizando-se as ferramentas on-line SIFT[®] (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) (149) e Provean[®] (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) (150) com parâmetros padrão.

A ferramenta BLASTp[®] (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (151) foi utilizada para alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ML1334 com ortólogos em outras micobactérias. Para predição de domínios transmembrana e topologia da proteína ML1334 e suas variantes, assim como dos ortólogos, a ferramenta TMHMM 2.0 foi utilizada no site <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, com os parâmetros padrão (152).

Para compreender o impacto das mutações na conformação tridimensional da proteína ML1334, foi realizada a modelagem estrutural no servidor *on-line* Robetta utilizando o algoritmo RoseTTAFold como parâmetro (<https://rosetta.bakerlab.org/>) (153). As estruturas moleculares resultantes foram visualizadas e editadas no software PyMOL 2.5[®] (Schrodinger[®]).

Adicionalmente, as variantes de ML1334 foram avaliadas quanto a predição de afinidade de epítomos lineares de células B no servidor *on-line* ABCpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html>) utilizando *threshold* de afinidade >0,6 (valor de 0 à 1) com busca de peptídeos no banco de dados BCIPEP (154). A interação com MHC de classe I e II foi investigada utilizando a ferramenta T Cell Epitopes - MHC Binding Prediction (<http://tools.iedb.org/main/tcell/>) (155,156). Para o MHC de classe I, foram investigados os alelos representativos: HLA*A:02, HLA*A:03, HLA*A:24, HLA-B:15, HLA*B:35 e HLA-B*44, enquanto para o MHC de classe II, selecionou-se os alelos representativos: DRB1*13; DRB1*07; DRB1*04. Os alelos escolhidos apresentam-se mais frequentes na população brasileira, segundo resultados conduzido por Torres e colaboradores (2017) (157) e depositados no banco *Allele Frequencies* (<http://www.allelefrequencies.net/>).

4.5 Caracterização dos genótipos em amostras brasileiras

Para detecção de genótipos do gene *ML1334*, os *primers* descritos na tabela 1 foram desenhados utilizando a sequência genômica da cepa *M. leprae* TN (RefSeq NC_002677.1) através da ferramenta *NCBI PrimerBlast* (158). A especificidade e qualidade dos *primers* foram avaliadas *in silico* com as ferramentas BLAST, MFEPimer e OligoAnalyzer (IDT Inc.).

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos (*primers*) usados na detecção das mutações no gene *ML1334*.

	Sequência (5'-3')
<i>Forward</i>	GCTGACTGAGCCCGTCTATC
<i>Reverse</i>	AGCGTCAGCCTATTGTGGTC

Para aumentar a especificidade da reação de PCR, o alvo foi amplificado por meio de PCR *touchdown* utilizando *HotStart MasterMix* (QIAGEN, Alemanha) no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 da RPT09B - Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz. Os detalhes dos ciclos utilizados na PCR estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Detalhamento dos ciclos PCR utilizando *HotStart MasterMix* (Quiagen) para detecção das mutações no gene *ML1334* em amostras brasileiras.

Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
95	15 minutos	1
94	30 segundos	
62	45 segundos	15
72	1 minuto	
94	30 segundos	
58	45 segundos	25
72	1 minuto	
72	10 minutos	1
4	∞	1

Os resultados foram primeiramente analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE 0,5X e coloração de DNA com SYBR™ *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen™, EUA). Para identificar os tamanhos dos *amplicons*, o marcador *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen™, EUA) foi utilizado como referência.

Os géis foram submetidos à eletroforese a 90 V por 1 h 30 min e a captura das imagens foi obtida em fotodocumentador.

Após identificação do tamanho e integridade das bandas, os produtos foram purificados utilizando o kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA) seguindo instruções do fabricante. Posteriormente, a concentração de DNA nas amostras purificadas foi obtida através da leitura de absorbância à 260 nm em equipamento NanoDrop 1000 (ThermoFisher, EUA). Em seguida, as amostras foram diluídas e distribuídas em placas de 96 poços (20 ng/poço), juntamente com os *primers* (3,2 µM), água ultra-pura e BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Catálogo: 4337454) (ThermoFisher, EUA).

A reação de sequenciamento nas placas foi realizada no termociclador GeneAmp® PCR System 9700, de acordo com a programação descrita na tabela 3. Após o término da reação, a precipitação dos produtos foi realizada utilizando Isoprapanol 75% (MERCK, Alemanha), seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 45 minutos. Logo depois as placas eram vertidas em papel toalha para descarte dos sobrenadantes. Posteriormente, etanol 75% (MERCK, Alemanha) era adicionado em cada poço seguido de outra centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, descartava-se o sobrenadante e as placas eram aquecidas à 60 °C por 10 minutos para secagem total do etanol. Por fim, as placas foram submetidas a eletroforese capilar no Sequenciador ABI3770xl – 96 capilares da RPT01A Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz.

Tabela 3. Detalhamento dos ciclos da reação de sequenciamento utilizando BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Catálogo: 4337454) (ThermoFisher Scientific, EUA).

Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
94	10 segundos	
50	5 segundos	40
60	4 minutos	

4.6 Expressão heteróloga

Para clonagem das variantes encontradas para o gene *ML1334* após detecção dos genótipos em amostras brasileiras, as sequências inteiras do gene foram amplificadas utilizando *Taq DNA Polymerase High Fidelity* (ThermoFisher, EUA). Para essa reação de amplificação, os *primers* descritos na tabela 4 foram desenhados contendo sítios para enzimas de restrição visando posterior clonagem no plasmídeo pET28a.

Tabela 4. Sequências dos oligonucleotídeos (*primers*) com os sítios de restrição usados para expressão heteróloga das variantes de *ML1334* em *E. coli*.

Direção	Sequência (5'-3')	Enzima
<i>Forward</i>	ATACCATGGGCGAACCGCAGGGATCG	<i>NcoI</i>
<i>Reverse</i>	GAGGTCGGTTCGACCACAACCTCGAGATAC	<i>XhoI</i>

Após a purificação dos produtos de PCR pelo kit já descrito, digeriu-se o plasmídeo pET28a e os insertos com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* (New England BioLabs®, EUA), por 2 h a 37 °C. Após purificação e dosagem, cada inserto (correspondente às 3 variantes do gene *ML1334*) foi ligado no plasmídeo digerido utilizando T4 DNA Ligase (5 U/μL) (Invitrogen™, EUA) de acordo com orientações do fabricante.

A reação de ligação foi utilizada para transformação de *E. coli* DH5α. Para isso, o DNA e as bactérias foram juntamente submetidos a eletroporação no equipamento GenePulser, usando as seguintes condições elétricas: 25 μF, 2,5 kV e 200 Ω. Após o pulso, adicionou-se 1 mL de meio LB e as bactérias foram incubadas a 37 °C sob leve agitação (100 rpm) por 1 h.

Em seguida, bactérias foram então inoculadas em placas de Petri contendo meio LB com ágar e antibiótico Canamicina (25 μg/mL) e incubadas a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Após obtenção das colônias selecionadas por resistência ao antibiótico, a presença e fidelidade dos insertos foram avaliadas. Para isso, o DNA plasmidial das bactérias portadoras das construções desejadas (selecionadas após PCR de colônia utilizando os *primers* descritos na tabela 5) foi extraído utilizando PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega,

EUA); a identidade dos insertos foi confirmada por sequenciamento de DNA (conforme descrito no item 4.6).

Tabela 5. Sequências dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para o PCR de colônia e posterior sequenciamento para confirmação da identidade das sequências plasmidiais das colônias.

	Sequência
<i>T7 promoter</i>	TAATACGACTCACTATAGGG
<i>T7 terminator</i>	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Após confirmação da fidelidade das sequências, os construtos foram transformados em *E. coli* BL21(DE3) para expressão seguindo protocolo já descrito para DH5 α . Após a seleção em meio LB contendo Canamicina, procedeu-se para à indução da expressão das proteínas recombinantes. Para isso, partindo de um inóculo saturado (cerca de 16 h de cultivo a 37 °C), preparou-se uma diluição de 1:100 em meio LB com antibiótico.

Após atingir a DO_{600nm} ~ 0,4-0,6, separou-se uma alíquota para o controle da cultura não induzida (NI) e, ao restante do cultivo, adicionou-se o indutor IPTG na concentração final de 1 mM (IND). As culturas foram incubadas por 3 h nas condições acima, mediu-se a absorbância a 600 nm e depois coletou-se as células por centrifugação. Após suspensão em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 0,5% [v/v] Triton X-100), as células foram lisadas em equipamento *Bead Beater* com 3 pulsos de 1 minuto cada, com intervalos de 1 minuto para evitar o aquecimento excessivo da amostra. O lisado total foi recuperado e centrifugado, sendo analisadas as frações solúveis e insolúveis através de SDS-PAGE e *Western Blot* com anticorpo anti-6His.

4.7 Análises de dados

As análises dos eletroferogramas dos dados de sequenciamento foram realizadas utilizando os *softwares* UGENE v.40, BioEdit v.7.2 para correção de artefatos do sequenciamento e o servidor GEAR – *Genome Analysis Server* (<https://www.gear-genomics.com/>) para alinhamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reanálise de dados de WGS

A partir de análise comparativa, considerando a cepa TN como referência, o mapeamento dos dados de WGS obtidos em colaboração revelaram 4698 mutações do tipo SNP e InDel ao longo de todo o genoma do *M. leprae* (n= 385) (Dados publicados parcialmente por Benjak e colaboradores (2018) (124). Destas, 1347 foram encontradas em região codificante (CDS), o que corresponde a 28,7% de todas as mutações observadas. Dentre essas mutações, apenas 125 estavam presentes em mais de 10% das amostras. Alguns genes apresentaram várias mutações não sinônimas nas amostras investigadas (tabela 6).

Tabela 6. Principais genes com mutações não sinônimas em CDS, com suas respectivas mudanças de aminoácidos e funções. Dados obtidos de colaboração (N= 385).

Gene	Alteração	Função ¹
ML0411	H191D, D78N, D142N, G366V, S224L, D219E, E45Q, V90A, G104D, V52A, G79S, I282M, S296P, V307A, D48A, G85R, G85E, E167K, P171S, D185A, S189L, S218L, S222Y, S224P, S275N, T278I, A287V, G303D, V307M	Proteína PPE
ML1040c	G429C, S427L, S427A, A347T, I280L, W256L, L255S, V243M, G239V, K202R, S194L, L171V, G162S, M148I, L145F, C117Y, A111T, A66T, R61H, T54I, A40T	Proteína conservada - rica em alanina
fadD9	I1114T, E1113A, W1108*, W1108R, D1106A, A973T, Y927D, A919E, W878*, G796S, A594T, D466N, S411Y, R314C, P175T, Q107*, Y105*	Acetil-CoA sintetase
gyrA	L379P, S1063F, S307L, A91V, I851T, G1115R, E185K, G362E, W485S, V731I	Subunidade A da DNA girase
rpoB	S456T, R791Q, G681S, G448D, T433I, G432S, H200Y, T171N, G52E	Cadeia beta da RNA polimerase
ML0283	L153P, K166E, A174T, T68P, C3Y, G16R, V209L	Transporte de cátions
ctpC	V173A, G667R, A491V, M679I, H403Y, A82V	Transporte de cátions
ML0410	V52A, Q47P, A15T, A45T, K50Q, H93Y, E99K	Proteína PE/PPE
Isr2	R77P, G73E, A74E, A110T, A81V, T96I	Antígeno 15 kDa
ML0049	R55Q, M90T, A87T, S51W	L-ESAT 6
ML1334	G264A, K197N, V210A, Ser108_Gly137del	Proteína de membrana

¹Funções anotadas no banco de dados Mycobrowser (<https://mycobrowser.epfl.ch/>).

O gene mais polimórfico encontrado foi o *ML0411* que codifica um antígeno rico em serina, membro da família de proteínas PPE (prolina-prolina-ácido glutâmico) da parede celular. O gene *ML0410*, que também codifica uma proteína da família PPE, apresentou-se polimórfico. A busca por ortólogos demonstrou similaridade dessas proteínas com diversas PPE de *M. tuberculosis*.

Vários estudos investigando as famílias PE e PPE apontaram para diferentes funções nas micobactérias, como proteína de transporte de nutrientes, papel na interação patógeno-hospedeiro e evasão do sistema imune (159–161). Foi demonstrado que variações na proteína PPE18 de *M. tuberculosis* geram impactos na resposta imune celular do hospedeiro, apontando para a importância na interação e evasão do sistema imune(162).

O gene *ML1040c*, que codifica uma proteína de membrana rica em alanina, também apresentou alta taxa de polimorfismos, com 21 variações observadas nas amostras. Resultados semelhantes foram observados em estudo com a proteína rica em alanina Rv3878 de *M. tuberculosis*, que demonstrou a presença de região polimórfica em 162 isolados clínicos com provável impacto no reconhecimento de epítopos pelos linfócitos T (163).

Mutações em genes associados com resistência a drogas também foram encontradas. Mutações no gene *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, estão relacionados com a resistência a rifampicina (164) Resistência à ofloxacina está relacionada com mutações no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da DNA girasse (165). Adicionalmente, as mutações no gene *fadD9* também foram encontradas em cepas resistentes às drogas, todavia, os mecanismos de resistência envolvendo mutações nesse gene não estão elucidados na literatura (124).

A mutações nos genes *ML0283* e *ctpC*, que codificam proteínas envolvidas no efluxo e transporte de cátions do *M. leprae*, apresentam-se como candidatos a investigações. Mutações não-sinônimas em genes codificantes para proteínas de transporte, incluindo no gene *ctpC*, foram identificadas na cepa Japonesa Airaku-3 com multirresistência, especialmente a rifampicina embora mutações no gene *rpoB* não explicassem a resistência (166). Adicionalmente, as mutações nos genes *Isr2*, *ML0049* e *ML1334*, que codificam antígenos do *M. leprae*, identificadas nos isolados clínicos podem desempenhar papel importante na interação com células do hospedeiro.

Quanto às amostras brasileiras (n=82), das 645 mutações encontradas, 193 estavam situadas em CDS, sendo apenas 44 mutações observadas em mais de 10% das amostras. A tabela 7 apresenta as principais mutações observadas

em amostras brasileiras, sua frequência e o resultado das análises *in silico* de predição do impacto funcional das respectivas variantes na proteína.

Tabela 7. Predição funcional *in silico* das mutações identificadas em genes do *M. leprae* em amostras brasileiras (N=82).

Gene	Alteração	Freq. (%)	SIFT	Provean	Gene	Alteração	Freq. (%)	SIFT	Provean
ML0049	Arg55Gln	100	TOL	TOL	ML0116	Val328Ile	65,9	TOL	TOL
ML0411	His191Asp	100	TOL	TOL	pepR	Glu387Lys	65,9	P.A.F	P.A.F
gyrA	Leu379Pro	98,8	P.A.F	P.A.F	ML1334	Gly264Ala	65,9	P.A.F	P.A.F
ML0042	Trp287Arg	98,8	TOL	TOL	ML1463	Ala566Val	65,9	TOL	P.A.F
metS	Leu154Pro	98,8	TOL	TOL	ML0283	Lys166Glu	64,6	P.A.F	P.A.F
ML0397	Glu358Asp	98,8	TOL	TOL	ML2140	Ser35Leu	64,6	P.A.F	P.A.F
ML0410	Val52Ala	98,8	TOL	TOL	ML2518	Gly78Asp	63,4	TOL	TOL
ML0569	Thr113Ala	98,8	TOL	TOL	ML1484	Gly159Asp	61	TOL	TOL
rho	Gln227Glu	98,8	TOL	TOL	ML1334	S108_G137del	59	N.A¹	P.A.F
ctpC	Val173Ala	97,6	TOL	TOL	ML0049	Met90Thr	56,1	TOL	TOL
choD	Leu563Pro	96,3	TOL	TOL	argF	Gly11Glu	29,3	TOL	TOL
ML1740	Ala133Pro	92,7	TOL	TOL	truB	Pro293Ser	29,3	TOL	TOL
dnaA	Ser25Gly	91,5	TOL	TOL	pknA	Thr428Ile	24,4	TOL	TOL
recG	Asp545Glu	90,2	TOL	TOL	ML0411	Asp78Asn	24,4	TOL	TOL
glcB	Lys591Glu	90,2	TOL	TOL	mraY	Ile255Val	24,4	TOL	TOL
ML2597	Tyr151Ser	90,2	TOL	TOL	htpG	Ala633Thr	24,4	TOL	P.A.F
mfd	Ala687Thr	89	TOL	TOL	ML0283	Leu153Pro	23,2	P.A.F	P.A.F
dnaA	Gly295Ser	67,1	TOL	P.A.F	ML1119	Met144Val	23,2	TOL	TOL
pbpA	Pro394Ser	67,1	TOL	TOL	murE	Asp397Gly	23,2	TOL	TOL
helY	Thr436Ala	67,1	TOL	TOL	rpsC	Glu257Gln	22	TOL	TOL
gyrA	Ser1063Phe	65,9	P.A.F	P.A.F	ML2356	Val198Leu	22	TOL	TOL
leuS	Arg628Trp	65,9	TOL	P.A.F	lsr2	Arg77Pro	14,6	P.A.F	P.A.F

Abreviação: P.A.F. – Possível Alteração Funcional; TOL. – Tolerante. N.A – Não avaliado. 1 O servidor SIFT apenas realiza predição de impactos causados por SNPs, não sendo possível analisar a deleção no gene ML1334.

Dentre as mutações analisadas, destaca-se a deleção encontrada no gene *ML1334*, presente apenas em amostras com o genótipo tipo 4 do *M. leprae*, que demonstrou ser altamente deletéria, com um *score* de -44,567 (deletéria quando *score* < -2.5) por se tratar de uma perda de 90 nucleotídeos que resultam na ausência de 30 aminoácidos da proteína.

Diante dos achados: i) deleção em fase, ii) predição de impacto funcional *in silico*, iii) da frequência significativa dessa mutação e iv) por se tratar de uma proteína de membrana não caracterizada, as investigações posteriores realizadas neste trabalho focam nessa proteína e suas variantes para compreender o seu papel.

proteína ML1334 do *M. leprae* encontradas impactam na ancoragem dessa proteína na membrana. A figura 9 apresenta os resultados de predição de domínio transmembrana (AGVIGVLIFAAILVTGFLWPAWL) nas respectivas variantes, onde foi possível predizer que a perda dos aminoácidos observados nas cepas 7935681 e Br4923 não afeta a ancoragem da proteína na membrana. Além disso, pode-se observar que as diferenças entre as variantes estão localizadas na porção extracelular da proteína, reforçando a hipótese de haver diferença no reconhecimento pelo sistema imunológico de pacientes.

A presença do domínio transmembrana nos ortólogos de outras micobactérias também foi confirmada (dados não mostrados). Além disso, diversas análises do proteoma de *M. tuberculosis* demonstraram a presença da proteína Rv2091c na fração de membrana da micobactéria utilizando abordagens de gel 2D, cromatografia líquida (LC), espectrometria de massas (MS) e *tag* de afinidade por isótopo (168–170). Outro estudo, utilizando abordagens proteômicas, identificou a presença da proteína Rv2091c em vesícula extracelular secretada pelo *M. tuberculosis* (171). A presença da proteína ortóloga Mb2118 do *M. bovis* na membrana também foi confirmada utilizando extração de proteínas lipofílicas com Triton X-114 seguido de identificação com LC-MS (172).

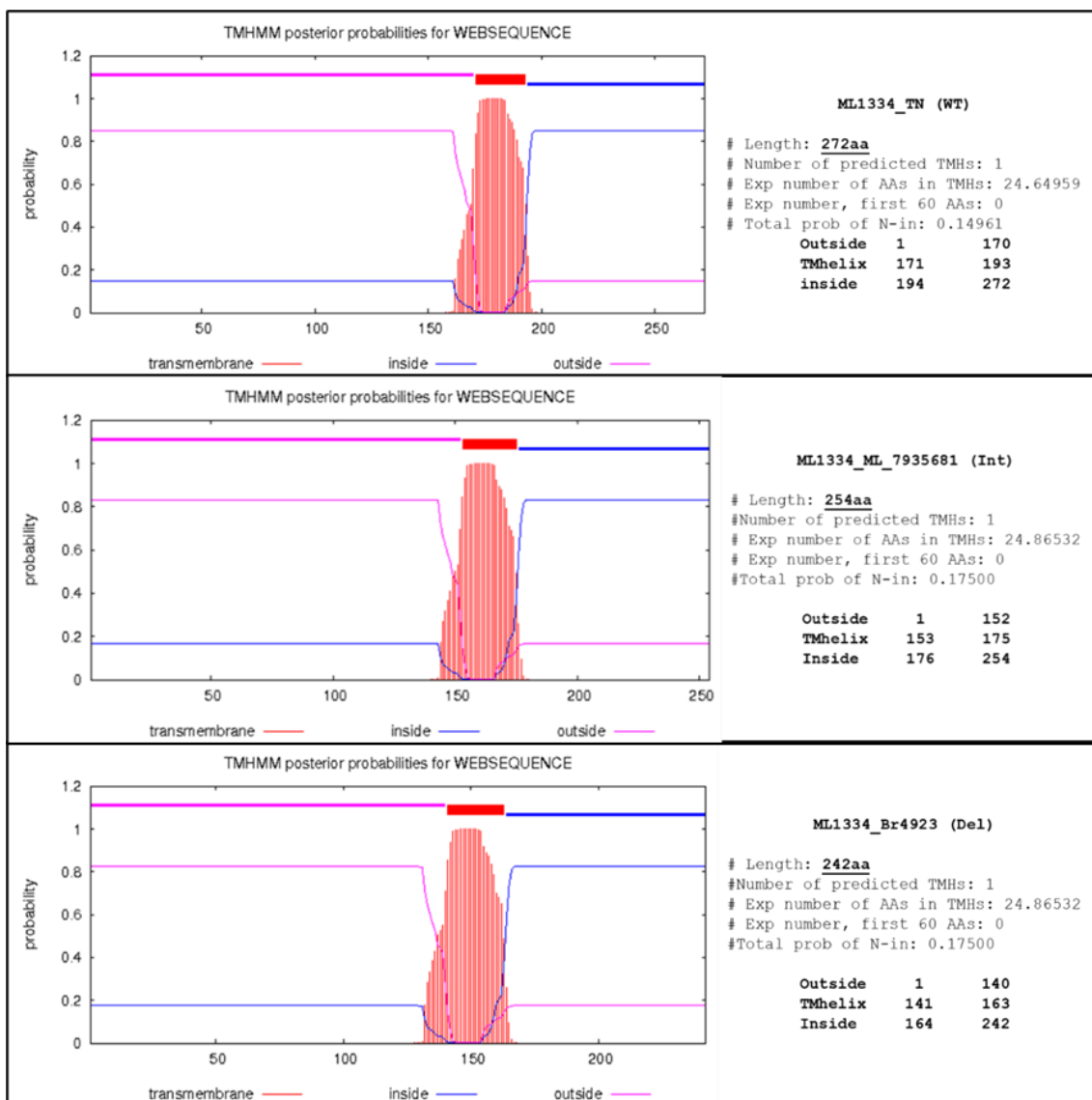


Figura 9. Resultado da predição de topologia e domínio transmembrana da proteína ML1334 e suas respectivas variantes obtidas no servidor TMHMM. Observa-se no eixo y a probabilidade dos resíduos de aminoácidos do eixo x interagirem com a bicamada lipídica. Em **rosa** é demonstrado a porção extracelular (*outside*), em **vermelho** o domínio transmembrana e em **azul** a porção intracelular (*inside*). Ao lado está indicado o a posição das sequências no domínio transmembrana (TMhelix), extracelular e intracelular.

5.4 Predição estrutural das variantes da proteína ML1334

Em concordância como resultado observado da predição do impacto das mutações na função da proteína pela ferramenta Provean a modelagem tridimensional das variantes da proteína executada no servidor Robetta resultou em estruturas diferentes, havendo uma perda expressiva da conformação nativa (considerando a cepa TN como referência) nas proteínas variantes (Figura 10).

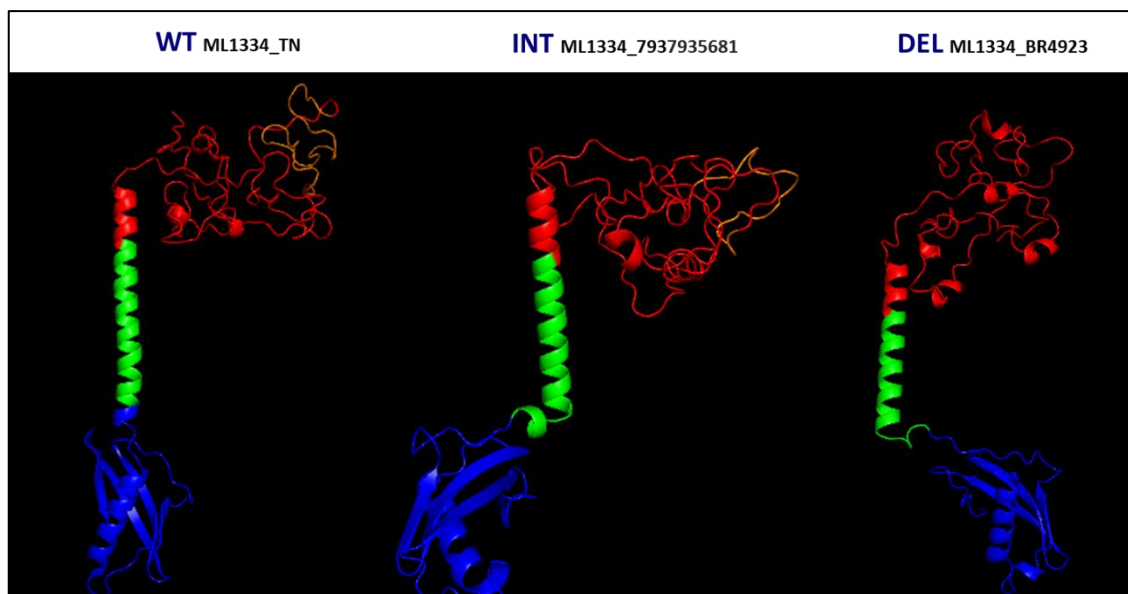


Figura 10. Resultado da predição das estruturas tridimensionais das variantes da proteína ML1334 obtidas no servidor Robetta. Em **vermelho** é demonstrado a porção extracelular, em **verde** o domínio transmembrana, em **azul** a porção intracelular (inside) e em **laranja** a porção variável da proteína.

Análises *in silico* de estruturas tridimensionais de proteínas de micobactérias têm auxiliado na compreensão de sítios catalíticos, *docking* molecular e na predição do impacto de mutações— especialmente em estudos de resistência às drogas. Mutações no gene *gidB* de *M. tuberculosis*, responsável pela resistência à estreptomicina foi caracterizado por modelagem, identificando não apenas mudanças no sítio ativo, como também modificações em toda a estrutura da proteína (173).

Beg e colaboradores (2019), utilizando abordagens computacionais, caracterizaram a proteína Rv3728, uma PE de *M. tuberculosis*, conseguindo identificar estruturalmente os sítios ligação com íons de cálcio e magnésio, além da interação com o sistema de secreção SecE2 (174).

5.5 Predição de Epítomos nas variantes da proteína ML1334

O conhecimento dos epítomos imunodominantes de células B é essencial para projetar estratégias diagnósticas de detecção de anticorpos (175). A busca de epítomos de células B nas variantes estudadas demonstrou que todos os resultados encontrados para ML1334_TN e ML1334_7935681, levando em consideração o limiar (*threshold*) de afinidade $>0,6$, estão localizados na porção extracelular de acordo com a predição de topologia mencionada anteriormente. Para a variante ML1334_Br4923, apenas dois epítomos foram encontrados com

resíduos de aminoácidos do domínio transmembrana (Rank 7 e 19) (tabela 8). Essa observação é um indicativo que as porções extracelulares das variantes da proteína ML1334 previstas nas análises de topologia possuem maior imunogenicidade.

Os diferentes epítomos identificados entre as variantes corrobora com a hipótese de serem reconhecidas de maneira distinta. Isso pode ser explicado pela presença do motivo PGQY na maioria dos epítomos encontrados, uma vez que o número de repetição dessa sequência encontra-se na região variável da proteína ML1334. Diante disso, acredita-se que o desenvolvimento de testes sorológicos utilizando a proteína ML1334 podem ser ajustados às variantes encontradas. Adicionalmente, reforça-se a necessidade de ensaios *in vitro* complementares para melhor compreender o impacto dessas diferenças de reconhecimento.

Tabela 8. Resultado da predição de epítomos imunodominantes de células B nas variantes da proteína ML1334 com maior afinidade em serem reconhecidas.

Rank	ML1334_TN				ML1334_7935681				ML1334_Br4923			
	Peptídeo	Start	End	Score	Peptídeo	Start	End	Score	Peptídeo	Start	End	Score
1	QAASPWQQQP	30	39	0.84	QAASPWQQQP	30	39	0.84	QAASPWQQQP	30	39	0.84
2	PPAYASPECY	48	57	0.77	FGAQFSQCGI	84	93	0.79	PPAYASPECY	48	57	0.77
3	ATPGYGQPGY	74	83	0.76	PPAYASPECY	48	57	0.77	SSDQPTQAAS	24	33	0.76
4	PVYPHQYPSA	65	74	0.76	ATPGYGQPGY	74	83	0.76	PVYPHQYPSA	65	74	0.75
5	SSDQPTQAAS	24	33	0.76	PVYPHQYPSA	65	74	0.76	YPQLTEPVYP	59	68	0.75
6	PPGQYGPPGQ	132	141	0.76	SSDQPTQAAS	24	33	0.76	QDSTWHPPAY	42	51	0.74
7	QPGYFGAQFS	80	89	0.75	YPQLTEPVYP	59	68	0.75	LIGSIAGVIG	136	145	0.74
8	YPQLTEPVYP	59	68	0.75	QDSTWHPPAY	42	51	0.74	QPYEQPGTKG	123	132	0.74
9	QDSTWHPPAY	42	51	0.74	MSEPQGSDPG	1	10	0.73	MSEPQGSDPG	1	10	0.73
10	PGQYSQQFQP	145	154	0.73	GEGVENHSSD	17	26	0.72	GEGVENHSSD	17	26	0.72
11	PGQYGPPGQY	109	118	0.73	GTKGFVALIG	141	150	0.72	QYSQQFQPYE	117	126	0.72
12	MSEPQGSDPG	1	10	0.73	WQSPGEGVEN	13	22	0.70	YPSATPGYGQ	71	80	0.70
13	QYPQSGSPGQ	96	105	0.72	PGQYGPPGQY	115	124	0.67	WQSPGEGVEN	13	22	0.70
14	AQFSQCGIPG	86	95	0.72	QQQPSTQDST	36	45	0.66	TPGYGQPGYF	75	84	0.68
15	GEGVENHSSD	17	26	0.72	QYGPPGQYGP	111	120	0.65	QYGPPGQYGP	105	114	0.68
16	QYGPPGQYSQ	141	150	0.72	PPGQYSQQFQ	126	135	0.64	QYGPPGQYSQ	111	120	0.67
17	WQSPGEGVEN	13	22	0.70	SDPGKQWQSP	7	16	0.61	QQQPSTQDST	36	45	0.66
18	KGFVALIGSI	161	170	0.68	QQFQPYEQPG	132	141	0.61	PGYFGAQFSQ	81	90	0.65
19	QQQPSTQDST	36	45	0.66	SGSPGQYGSP	100	109	0.60	GVLIFAILV	145	154	0.65
20	QQFQPYEQPG	150	159	0.65	IPGQYPQSGS	93	102	0.60	TKGFVALIGS	130	139	0.65

Outro achado importante é referente ao epítopo QAASPWQQQP (nas posições 30 a 39) que apresentou maior afinidade à anticorpos nas três variantes, com score de 0,84, demonstrando potencial aplicação em imunoenaios para detecção de anticorpos.

Ferramentas *in silico* para o mapeamento de epítomos de células B tem sido amplamente utilizada para identificação de sequências imunodominantes (175). Recentemente, estudo conduzido por Soares e colaboradores (2021) realizou o mapeamento de epítomos lineares dos antígenos ML2028 (Ag85B) e ML2055 do *M. leprae*. As sequências com maior score identificadas nos servidores *on line* ABCpred e SVMTrip foram selecionadas, sintetizadas e aplicadas em imunoensaio, possibilitando a distinção de indivíduos com hanseníase, tuberculose e saudáveis (176). Adicionalmente, a aplicação de peptídeos no diagnóstico e monitoramento de pacientes com hanseníase tem ganhado destaque para possível substituição de antígenos naturais do *M. leprae*, por serem obtidos facilmente, e apresentarem melhor custo-efetividade e especificidade (65,66,144).

Quanto aos dados de predição do reconhecimento das variantes da proteína ML1334 pelo MHC de classe I, resumidos na tabela 9, diferentes epítomos foram encontrados para as três formas da proteína. Assim como nos achados de afinidade às células B, a maioria dos epítomos encontrados estão situados na porção extracelular e apresentam a sequência repetitiva PGQY, reforçando a imunogenicidade dessa região variável da proteína ML1334.

Os resultados do reconhecimento das variantes pelo MHC de classe II demonstraram que os peptídeos de maior afinidade são reconhecidos pelo alelo HLA-DRB1*13 e estão localizados na região conservada da proteína; sendo assim, não houve diferença nas sequências e afinidade dos epítomos. Esse achado corrobora com o estudo recente de Jaiswal e colaboradores (2021), que investigaram alvos terapêuticos e vacinas em diferentes cepas do *M. leprae* e *M. lepromatosis*, onde a proteína ML1334 é apontada com afinidade ao MHC de classe II (148). Sendo assim, essa proteína apresenta-se como um bom candidato ao desenvolvimento de vacinas, uma vez que o reconhecimento pelo MHC de classe II independente das variantes encontradas.

Tabela 9. Resultado da predição de epítomos das variantes da proteína ML1334 com maior afinidade em serem reconhecidos pelos diferentes alelos do **MHC de classe I**. A medida de afinidade é dada pelo *score* de 0 à 1, onde valores próximos a 1 são indicativos de maior afinidade.

ML1334_TN						ML1334_793						ML1334_Br4923					
ALELO	start	end	TAM.	PEPTÍDEO	score	ALELO	start	end	TAM.	PEPTÍDEO	score	ALELO	start	end	TAM.	PEPTÍDEO	score
HLA-B*35	59	67	9	YPQLTEPVY	0,994	HLA-B*15	233	241	9	MQKRVTVTF	0,987	HLA-B*35	59	67	9	YPQLTEPVY	0,994
HLA-B*15	251	259	9	MQKRVTVTF	0,987	HLA-B*44	2	13	12	SEPQGSDPGKQW	0,985	HLA-B*15	221	229	9	MQKRVTVTF	0,987
HLA-B*44	2	13	12	SEPQGSDPGKQW	0,985	HLA-B*15	122	130	9	GQYGPPGQY	0,979	HLA-B*44	2	13	12	SEPQGSDPGKQW	0,985
HLA-B*15	140	148	9	GQYGPPGQY	0,979	HLA-B*15	116	124	9	GQYGPPGQY	0,979	HLA-B*15	110	118	9	GQYGPPGQY	0,979
HLA-B*15	134	142	9	GQYGPPGQY	0,979	HLA-B*15	110	118	9	GQYGPPGQY	0,979	HLA-B*15	104	112	9	GQYGPPGQY	0,979
HLA-B*15	128	136	9	GQYGPPGQY	0,979	HLA-B*15	69	78	10	HQYPSATPGY	0,974	HLA-B*15	69	78	10	HQYPSATPGY	0,974
HLA-B*15	122	130	9	GQYGPPGQY	0,979	HLA-B*15	104	112	9	GQYGSPPGQY	0,969	HLA-B*35	97	106	10	YPQSGSPGQY	0,969
HLA-B*15	116	124	9	GQYGPPGQY	0,979	HLA-A*02	147	155	9	ALIGSIAGV	0,947	HLA-A*02	135	143	9	ALIGSIAGV	0,947
HLA-B*15	110	118	9	GQYGPPGQY	0,979	HLA-B*44	137	145	9	YEQPGTKGF	0,941	HLA-B*44	125	133	9	YEQPGTKGF	0,941
HLA-B*15	69	78	10	HQYPSATPGY	0,974	HLA-B*15	108	118	11	SPGQYGPPGQY	0,932	HLA-B*15	102	112	11	SPGQYGPPGQY	0,932
HLA-B*15	104	112	9	GQYGSPPGQY	0,969	HLA-B*15	128	137	10	GQYSQQFQPY	0,930	HLA-B*35	51	59	9	YASPECYNY	0,931
HLA-B*35	97	106	10	YPQSGSPGQY	0,969	HLA-B*15	89	97	9	SQCGIPGQY	0,900	HLA-B*15	116	125	10	GQYSQQFQPY	0,930
HLA-A*02	165	173	9	ALIGSIAGV	0,947	HLA-B*44	135	145	11	QPYEQPGTKGF	0,896	HLA-B*15	89	97	9	SQCGIPGQY	0,900
HLA-B*44	155	163	9	YEQPGTKGF	0,941	HLA-B*15	102	112	11	SPGQYGSPPGQY	0,891	HLA-B*44	123	133	11	QPYEQPGTKGF	0,896
HLA-B*15	108	118	11	SPGQYGPPGQY	0,932	HLA-B*15	95	106	12	GQYPQSGSPGQY	0,881	HLA-B*15	95	106	12	GQYPQSGSPGQY	0,881
HLA-B*35	51	59	9	YASPECYNY	0,931	HLA-A*24	123	134	12	QYGPPGQYSQQF	0,865	HLA-A*24	111	122	12	QYGPPGQYSQQF	0,865
HLA-B*15	146	155	10	GQYSQQFQPY	0,930	HLA-B*44	63	71	9	TEPVYPHQY	0,857	HLA-B*44	63	71	9	TEPVYPHQY	0,857
HLA-B*15	89	97	9	SQCGIPGQY	0,900	HLA-B*15	185	193	9	AQASVQQVL	0,843	HLA-B*15	173	181	9	AQASVQQVL	0,843
HLA-B*44	153	163	11	QPYEQPGTKGF	0,896	HLA-B*15	232	241	10	GMQKRVTVTF	0,794	HLA-B*35	71	78	8	YPSATPGY	0,826
HLA-B*15	102	112	11	SPGQYGSPPGQY	0,891	HLA-B*15	107	118	12	GSPGQYGPPGQY	0,750	HLA-B*35	57	67	11	YNYPQLTEPVY	0,804
HLA-B*15	95	106	12	GQYPQSGSPGQY	0,881	HLA-B*15	119	130	12	GPPGQYGPPGQY	0,749	HLA-B*35	75	83	9	TPGYGQPGY	0,802
HLA-A*24	141	152	12	QYGPPGQYSQQF	0,865	HLA-B*15	113	124	12	GPPGQYGPPGQY	0,749	HLA-B*15	220	229	10	GMQKRVTVTF	0,794
HLA-B*44	63	71	9	TEPVYPHQY	0,857	HLA-B*15	97	106	10	YPQSGSPGQY	0,737	HLA-B*35	67	78	12	YPHQYPSATPGY	0,758
HLA-B*15	203	211	9	AQASVQQVL	0,843	HLA-B*15	122	134	13	GQYGPPGQYSQQF	0,737	HLA-B*35	47	57	11	HPPAYASPECY	0,753
HLA-B*35	71	78	8	YPSATPGY	0,826	HLA-B*15	86	97	12	AQFSQCGIPGQY	0,731	HLA-B*15	101	112	12	GSPGQYGPPGQY	0,750
HLA-B*35	57	67	11	YNYPQLTEPVY	0,804	HLA-B*15	118	130	13	YGPPGQYGPPGQY	0,723	HLA-B*15	107	118	12	GPPGQYGPPGQY	0,749
HLA-B*35	75	83	9	TPGYGQPGY	0,802	HLA-B*15	112	124	13	YGPPGQYGPPGQY	0,723	HLA-B*15	97	106	10	YPQSGSPGQY	0,737

Tabela 10. Resultado da predição de epítomos das variantes da proteína ML1334 com maior probabilidade em serem reconhecidos pelos diferentes alelos do **MHC de classe II**. A medida de afinidade é dada pelo *score* de 1 a 100, onde valores próximos à 1 são indicativos de maior afinidade.

ALELO	PEPTÍDEO	TAM.	SCORE (1-100)
HLA-DRB1*13:02	VALIGSIAGVIGVL	14	1.29
	FVALIGSIAGVIGV	14	1.40
	GFVALIGSIAGVIG	14	1.40
	KGFVALIGSIAGVI	14	1.40
	FVALIGSIAGVIGVL	15	1.50
HLA-DRB1*07:01	IGVLIFAAILVTGF	14	3.55
	VIGVLIFAAILVTGF	15	3.70
	AGVIGVLIFAAILV	14	3.77
	GVIGVLIFAAILVT	14	3.77
	IGVLIFAAILVTGFL	15	3.80
HLA-DRB1*04:01	QQVLTDETNGYGAK	14	5.71
	VQQVLTDETNGYGAK	15	6.30
	QQVLTDETNGYGAKN	15	6.40
	KGFVALIGSIAGV	13	6.71
	QVLTDETNGYGAKN	14	7.00

O painel de alelos representativos de HLA-A, -B e -DRB1 investigados nos experimentos *in silico* foi descrito por Torres e colaboradores (2017) como os mais frequentes no Brasil, utilizando amostras do banco de doadores de medula óssea (REDOME) (157). Embora o grupo de indivíduos nesse estudo não seja representativo da população mais afetada pela hanseníase, visto que a doença atinge predominantemente pessoas com vulnerabilidades socioeconômicas (47), a escolha desse painel foi devida ao grande número amostral do estudo.

5.6 Genotipagem do gene *ML1334* em amostras brasileiras

Quanto aos ensaios de genotipagem, os resultados das 88 amostras de pacientes multibacilares (MB) analisadas até o momento estão resumidos na tabela 8. Pode-se observar a presença do genótipo semelhante a cepa 7935681, com a ausência de 57 nucleotídeos quando comparado com a sequência da cepa de referência - TN, sendo esse um achado inédito em amostras brasileiras (variante INT). A figura 11 exemplifica o resultado obtido de três amostras em gel de eletroforese, onde observa-se a diferença no tamanho dos *amplicons*. A confirmação dos diferentes genótipos foi obtida após análise do sequenciamento realizado (figura 12).

Tabela 8. Resultado de genotipagem das 88 amostras analisadas

GENÓTIPO	N _{TOTAL}	N _{ASA}	N _{EXTERNAS}	% TOTAL
WT	31	24	7	35,2%
INT	11	6	5	12,5%
DEL	42	8	34	47,8%
N.D	4	3	1	4,5%

Abreviações: WT: selvagem; INT: intermediário; DEL: deleção

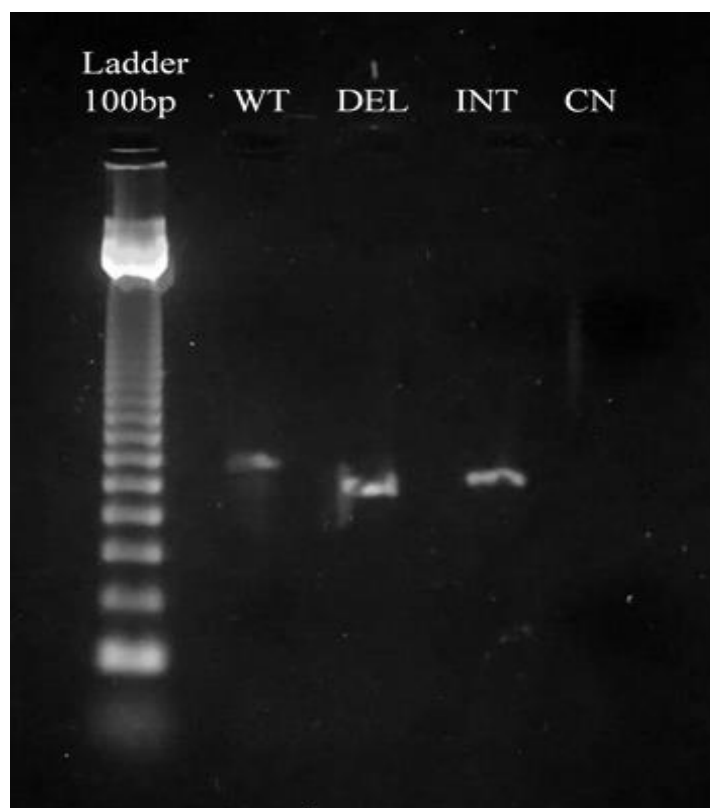


Figura 11. Resultado de eletroforese em gel de Agarose 2% com os três diferentes genótipos encontrados para o gene *ML1334* de *M. leprae* em amostras de DNA de biópsia de pele de pacientes.

Pacientes PB tem uma positividade para o PCR menor que pacientes MB. Portanto, nesse estudo fizemos análises apenas de pacientes MB. E, não foi possível realizar análises de associação dos diferentes genótipos do gene *ML1334* com as variáveis clínicas dos pacientes.

5.7 Clonagem e expressão das variantes da proteína ML1334 em *E. coli*

Os ensaios de expressão heteróloga resultaram na construção de 3 clones com a sequência WT (272 aa), 3 clones com a sequência DEL (242 aa) e apenas 1 clone para a variante INT (254 aa). O sequenciamento dos clones confirmou a fidelidade das sequências alvos, com exceção do clone DEL3.

A figura 13 demonstra o resultado do ensaio de *western blot* para confirmação da expressão das proteínas utilizando o sistema de indução por IPTG. Em concordância com o observado no sequenciamento, não houve expressão da proteína no clone DEL3. Foi utilizada uma asparaginase recombinante como controle positivo de aproximadamente 32 kDa. A posição das proteínas recombinantes no gel condiz com a predição *in silico* do peso molecular, sendo 29 kDa para WT, 27,3 kDa para INT e 26 kDa para DEL.

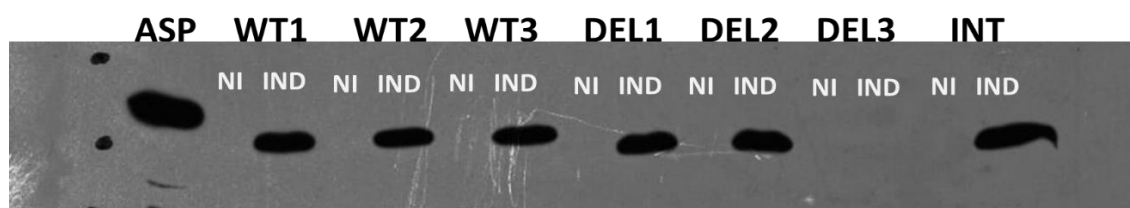


Figura 13. Resultado do ensaio de *western blot* das proteínas recombinantes. Abreviações: ASP = asparaginase recombinante; NI = não induzidas por IPTG; IND = clones induzidos por IPTG.

A expressão heteróloga é uma estratégia utilizada para caracterização funcional de proteínas do *M. leprae*. Kaur e colaboradores (2018), utilizando o sistema de expressão em *E. coli* BL21, descreveram a temperatura e pH ótimo da enzima LipU (ML0314c) – 45 °C e pH 8.0. Além disso, a atividade da enzima foi inibida com E-serina, DEPC e Tetrahidrolipstatina (THL). Adicionalmente, essa proteína induziu uma forte resposta humoral em pacientes com hanseníase (145).

Mais recentemente, a expressão recombinante de HSP18 (ML1795), uma proteína de choque térmico (HSP) do *M. leprae*, possibilitou a descrição da estrutura, função e estabilidade dessa proteína, além da sua interação com nanopartículas. Os resultados demonstraram que essa chaperona é um importante alvo terapêutico na hanseníase e sua função pode desempenhar um papel importante no crescimento e sobrevivência do *M. leprae* em indivíduos infectados (177).

6. CONCLUSÕES

Com base nas investigações realizadas no presente trabalho, pode-se obter avanços na compreensão da diversidade genética do *M. leprae*, especialmente em isolados dos Brasil, onde foram demonstradas várias mutações em regiões codificantes com possível impacto funcional.

Dentre as mutações estudadas, o enfoque nas deleções em fase no gene *ML1334* demonstrou por análises *in silico* que as mutações ocorrem em VNTRs e afetam a porção extracelular da proteína ML1334, possivelmente impactando na função e estrutura tridimensional dessa proteína. Adicionalmente, os resultados de predição de epítomos imunodominantes das variantes estudadas demonstraram diferenças no reconhecimento por anticorpos e MHC de classe I. Todavia, nenhuma diferença foi observada para o MHC de classe II.

A genotipagem do gene *ML1334* em amostras brasileiras permitiu a identificação do genótipo intermediário, sendo esse um achado inédito desse trabalho. Por fim, a expressão heteróloga bem-sucedida das variantes da proteína ML1334 permitirá a utilização das proteínas recombinantes em ensaios futuros para melhor caracterização dessas variantes.

REFERÊNCIAS

1. Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Leprosy. An update: Definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas Dermo-Sifiliograficas*. 2013;104(7):554–63.
2. Cruz RC da S, Penna MLF, Talhari S, Bühner-Sékula S, Penna GO. Leprosy: Current situation, clinical and laboratory aspects, treatment history and perspective of the uniform multidrug therapy for all patients. *Anais Brasileiros de Dermatologia* [Internet]. 2017;92(6):761–73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5786388/>
3. Trautman JR. A brief history of Hansen's disease. *Bulletin of the New York Academy of Medicine: Journal of Urban Health* [Internet]. 1984 [cited 2021 Oct 1];60(7):689–95. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1911721/>
4. Jacob JT, Franco-Paredes C. The stigmatization of leprosy in India and its impact on future approaches to elimination and control. *PLoS Neglected Tropical Diseases* [Internet]. 2008 Jan [cited 2021 Sep 27];2(1):e113. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000113>
5. Heijnders ML. The dynamics of stigma in leprosy. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*. 2004;72(4):437–47.
6. WHO. Global leprosy (Hansen disease) update, 2020. *World Health Organization* [Internet]. 2021;96(36):421–44. Available from: <http://www.who.int/wer%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2910704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. BRASIL.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico Hanseníase 2020. *Boletim Epidemiológico de Hanseníase* [Internet]. 2020;Jan:52. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/31/Boletim-hanseníase-2020-web.pdf>
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico - Hanseníase. 2021;

9. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*. 1966;34(3):255–73.
10. Maymone MBC, Laughter M, Venkatesh S, Dacso MM, Rao PN, Stryjewska BM, et al. Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2020 Jul 1;83(1):1–14.
11. Shrivastava DS. Comparison of two systems of classification of leprosy based on clinicopathological correlation. *Journal of Medical Science And clinical Research [Internet]*. 2021 [cited 2021 Oct 21];09(07). Available from: <http://jmscr.igmpublication.org/home/>
12. Lastória JC, de Abreu MAMM. Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2014;89(2):205–18.
13. WHO. Guide to eliminating leprosy as a public health problem. World Health Organization. 1995;72(1):106–7.
14. Ciências C de, Caroline E, Santos DOS. Caracterização de marcadores salivares e desenvolvimento de biossensor para o diagnóstico da hanseníase. 2020;
15. WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes. [Internet]. Vol. 675, World Health Organization - Technical Report Series. Geneva; 1982 Aug [cited 2021 Oct 2]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38984/WHO_TRS_675.pdf?sequence=1&isAllowed=y
16. Noordeen SK. Multidrug therapy (MDT) and leprosy control. *Indian Journal of Leprosy*. 1990;62(4):448–58.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica N° 4/2020-CGDE/.DCCI/SVS/MS. Ampliação do uso da Clofazimina para hanseníase PB no SUS. 2020;3–5.

18. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: A study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;78(3):518–21.
19. Davey TF, Barton RP. Multiple nasal smears in early lepromatous leprosy. *Leprosy review* [Internet]. 1974 [cited 2021 Oct 2];45(2):158–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4608404/>
20. SHEPARD CC. The nasal excretion of *Mycobacterium leprae* in leprosy. *International journal of Leprosy* [Internet]. 1962 Jan [cited 2021 Oct 2];30:10–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13911662/>
21. Barreto JG, Bisanzio D, de Guimarães LS, Spencer JS, Vazquez-Prokopec GM, Kitron U, et al. Spatial Analysis Spotlighting Early Childhood Leprosy Transmission in a Hyperendemic Municipality of the Brazilian Amazon Region. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(2):e2665.
22. Salgado CG, Barreto JG. Leprosy transmission: Still a challenge [Internet]. Vol. 92, *Acta Dermato-Venereologica*. *Acta Derm Venereol*; 2012 [cited 2021 Oct 2]. p. 335. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22278209/>
23. Kirchheimer WF. Animal models for research in leprosy. [Internet]. Vol. 55, *Journal of the Medical Association of Thailand*. *J Med Assoc Thai*; 1972 [cited 2021 Oct 2]. p. 605–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4563001/>
24. Storrs EE, Walsh GP, Burchfield HP, Binford CH. Leprosy in the armadillo: New model for biomedical research. *Science* [Internet]. 1974 [cited 2021 Oct 2];183(4127):851–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4589901/>
25. Kirchheimer WF. Experimental leprosy in the nine banded armadillo. *Public Health Reports* [Internet]. 1975 [cited 2021 Oct 2];90(6):483–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/813256/>
26. Filice GA, Greenberg RN, Fraser DW. Lack of observed association between armadillo contact and leprosy in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 1977 [cited 2021 Oct 2];26(1):137–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/557294/>

27. West BC, Todd JR, Lary CH, Blake LA, Fowler MER, King JW. Leprosy in six isolated residents of northern Louisiana. Time-clustered cases in an essentially nonendemic area. *Archives of Internal Medicine* [Internet]. 1988 [cited 2021 Oct 2];148(9):1987–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3046539/>
28. Bruce S, Schroeder TL, Ellner K, Rubin H, Williams T, Wolf JE. Armadillo exposure and Hansen's disease: An epidemiologic survey in southern Texas. *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. 2000 [cited 2021 Oct 2];43(2 1):223–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10906642/>
29. Truman R. Leprosy in wild armadillos. *Leprosy Review*. 2005;76(3):198–208.
30. da Silva MB, Portela JM, Li W, Jackson M, Gonzalez-Juarrero M, Hidalgo AS, et al. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2018 Jun 1;12(6).
31. Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ. The Toll of Innate Immunity on Microbial Pathogens. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 1999 Jun 10 [cited 2021 Oct 2];340(23):1834–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10362831/>
32. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* [Internet]. 1999 Jul 30 [cited 2021 Oct 2];285(5428):732–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10426995/>
33. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature Medicine* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2021 Oct 2];9(5):525–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12692544/>
34. Fonseca AB de L, Simon M do V, Cazzaniga RA, de Moura TR, de Almeida RP, Duthie MS, et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infectious Diseases of Poverty*. 2017;6(1):1–8.
35. Bernardes Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: The complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium*

- leprae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35(4):365–75.
36. Spellberg B, Edwards JE. Type 1/type 2 immunity in infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2021 Oct 2];32(1):76–102. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/32/1/76/311106>
 37. Roach DR, Bean AGD, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2002 May 1 [cited 2021 Oct 2];168(9):4620–7. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/168/9/4620>
 38. Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *British Medical Bulletin*. 2006;77–78(1):103–21.
 39. Röltgen K, Pluschke G, Spencer JS, Brennan PJ, Avanzi C. The immunology of other mycobacteria: *M. ulcerans*, *M. leprae*. *Seminars in Immunopathology*. 2020;42(3):333–53.
 40. Kaimal S, Thappa D. Relapse in leprosy. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* [Internet]. 2009;75(2):126–35. Available from: <http://www.ijdv.com/text.asp?2009/75/2/126/48656>
 41. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β during leprosy reactional states. *Clinical & Experimental Immunology* [Internet]. 1991 [cited 2021 Oct 2];84(1):103–8. Available from: </pmc/articles/PMC1535359/?report=abstract>
 42. Antunes DE, Goulart IMB, Lima MIS, Alves PT, Tavares PCB, Goulart LR. Differential Expression of IFN- γ , IL-10, TLR1, and TLR2 and Their Potential Effects on Downgrading Leprosy Reaction and Erythema Nodosum Leprosum. *Journal of Immunology Research*. 2019;2019.
 43. Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clinics in Dermatology* [Internet]. 2015;33(1):26–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.07.002>

44. Kahawita IP, Lockwood DNJ. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2021 Oct 3];102(4):329–37. Available from: <https://academic.oup.com/trstmh/article/102/4/329/1930435>
45. Jadhav R, Suneetha L, Kamble R, Shinde V, Devi K, Chaduvula MV, et al. Analysis of antibody and cytokine markers for leprosy nerve damage and reactions in the INFIR cohort in India. *PLoS Neglected Tropical Diseases* [Internet]. 2011 Mar [cited 2021 Sep 21];5(3):e977. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000977>
46. Sarno EN, Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JAC, Miguel CP, et al. The Influence of Thalidomide on the Clinical and Immunologic Manifestation of Erythema Nodosum Leprosum. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 1993 Aug 1 [cited 2021 Oct 3];168(2):408–14. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/168/2/408/921758>
47. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública [Internet]. 2016. 58p. Available from: <https://pt.scribd.com/document/323388710/Diretrizes-para-vigilancia-atencao-e-eliminacao-da-hansenia-se-come-problema-de-saude-publica-2016>
48. Goulart IMB, Goulart LR. Leprosy: Diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Archives of Dermatological Research*. 2008;300(6):269–90.
49. Shepard CC, McRae DH. A method for counting acid-fast bacteria. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association* [Internet]. 1968 [cited 2021 Oct 3];36(1):78–82. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19692900361>
50. Barbieri RR, Sales AM, Illarramendi X, Moraes MO, Nery J da AC, Moreira SJM, et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014 Nov 1;109(7):944–7.
51. Mitsuda K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* [Internet]. 1953;21(3):347–58. Available from:

[http://lepr.allenpress.com/lepronline/?request=get-abstract&doi=10.1489/1544-581X\(2003\)71%3C190:MLSPRO%3E2.0.CO;2](http://lepr.allenpress.com/lepronline/?request=get-abstract&doi=10.1489/1544-581X(2003)71%3C190:MLSPRO%3E2.0.CO;2)

52. Saad MH, Medeiros MA, Gallo ME, Fonseca LS. Use of the anti-PGL-I antibody ELISA and the Mitsuda reaction in early diagnosis of leprosy. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica* . [et al] [Internet]. 1991 Jan 1 [cited 2021 Oct 3];24(8):801–5. Available from: <https://europepmc.org/article/med/1797269>
53. Bobosha K, Tjon Kon Fat EM, van den Eeden SJF, Bekele Y, van der Ploeg-van Schip JJ, de Dood CJ, et al. Field-Evaluation of a New Lateral Flow Assay for Detection of Cellular and Humoral Immunity against *Mycobacterium leprae*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(5).
54. Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(5):1991–5.
55. de Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: Revisão sistemática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41(SUPPL. 2):11–8.
56. Silvestre M do PSA, Araújo AB de, Barreto GF. Sensibilidade do teste ELISA anti-PGL-1 com dois antígenos sintéticos derivados do PGL-1 do *Mycobacterium leprae*. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* [Internet]. 2012;3(4):9–16. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232012000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en
57. Jardim MR, Antunes SLG, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JAC, Illarramendi X, et al. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Leprosy Review*. 2005;76(3):232–40.
58. Brito M de F de M, Ximenes RAA, Gallo MEN, Bühner-Sékula S. Associação entre reação hansênica após alta e a carga bacilar avaliada utilizando sorologia anti PGL-I e baciloscopia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*

[Internet]. 2008;41(suppl 2):67–72. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000700014%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000700014&lng=en&nrm=iso&tlng=en

59. Almeida EC de, Martinez AN, Maniero VC, Sales AM, Duppre NC, Sarno EN, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(5):509–11.
60. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(4):1–8.
61. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(7):2124–30.
62. Manta FSN, Barbieri RR, Moreira SJM, Santos PTS, Nery JAC, Duppre NC, et al. Quantitative PCR for leprosy diagnosis and monitoring in household contacts: A follow-up study, 2011–2018. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1–8.
63. Spencer JS, Duthie MS, Geluk A, Balagon MF, Kim HJ, Wheat WH, et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(SUPPL.1):79–89.
64. Geluk A, Spencer JS, Bobosha K, Pessolani MCV, Pereira GMB, Banu S, et al. From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009 Mar;16(3):352–9.
65. Lima MIS, Capparelli FE, Dias Oliveira J das D, Fujimura PT, Moraes EC dos S, Araujo ECB, et al. Biotechnological and Immunological Platforms Based on PGL-I Carbohydrate-Like Peptide of *Mycobacterium leprae* for Antibodies Detection Among Leprosy Clinical Forms. *Frontiers in Microbiology*. 2020 Mar 17;11:429.
66. Yotsumoto Neto S, Sousa Lima MI, Ferreira Pereira SR, Goulart LR, de Cássia Silva Luz R, Damos FS. Immunodiagnostic of leprosy exploiting a photoelectrochemical platform based on a recombinant peptide mimetic of a

- Mycobacterium leprae antigen. Biosensors and Bioelectronics [Internet]. 2019;143(June):111625. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111625>
67. Duthie MS, Balagon MF, Maghanoy A, Orcullo FM, Cang M, Dias RF, et al. Rapid quantitative serological test for detection of infection with Mycobacterium leprae, the causative agent of leprosy. Journal of Clinical Microbiology [Internet]. 2014 Feb [cited 2021 Sep 21];52(2):613–9. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
68. Lobato J, Costa MP, Reis É de M, Gonçalves MA, Spencer JS, Brennan PJ, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. Leprosy Review. 2011 Dec 1;82(4):389–401.
69. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: Genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. Future Microbiology. 2011 May;6(5):533–49.
70. Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies [Internet]. Vol. 27, Disease Markers. 2009 [cited 2021 Oct 3]. p. 173–86. Available from: <http://snp.cshl.org/>
71. Mira MT, Alcaïs A, van Thuc H, Moraes MO, di Flumeri C, Thai VI, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. Nature [Internet]. 2004 Jan 25 [cited 2021 Oct 3];427(6975):636–40. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature02326>
72. Chopra R, Ali S, Srivastava AK, Aggarwal S, Kumar B, Manvati S, et al. Mapping of PARK2 and PACRG Overlapping Regulatory Region Reveals LD Structure and Functional Variants in Association with Leprosy in Unrelated Indian Population Groups. PLoS Genetics [Internet]. 2013 Jul [cited 2021 Oct 4];9(7):e1003578. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1003578>
73. Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, Sun L-D, Liu H, Li Y, et al. Genomewide Association Study of Leprosy. New England Journal of Medicine [Internet]. 2009 Jan 28 [cited 2021 Oct 4];361(27):2609–18. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0903753>

74. Malhotra D, Darvishi K, Lohra M, Kumar H, Grover C, Sood S, et al. Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. *European Journal of Human Genetics* [Internet]. 2006 Dec 14 [cited 2021 Oct 4];14(4):438–42. Available from: <https://www.nature.com/articles/5201563>
75. Singh I, Lavania M, Pathak VK, Ahuja M, Turankar RP, Singh V, et al. VDR polymorphism, gene expression and vitamin D levels in leprosy patients from North Indian population. *PLoS Neglected Tropical Diseases* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Oct 4];12(11):e0006823. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006823>
76. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, van Leeuwen H, Pols HAP. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2004;89–90:187–93.
77. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CGN, Hill AVS. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 1999 Jan 1 [cited 2021 Oct 4];179(1):187–91. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/179/1/187/878768>
78. Pepineli AC, Alves HV, Tiyo BT, Macedo LC, Visentainer L, de Lima Neto QA, et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated With Leprosy in Southern Brazil. *Frontiers in Immunology*. 2019 Oct 4;10:2157.
79. Neela VSK, Suryadevara NC, Shinde VG, Pydi SS, Jain S, Jonnalagada S, et al. Association of Taq I, Fok I and Apa I polymorphisms in Vitamin D Receptor (VDR) gene with leprosy. *Human Immunology*. 2015 Jun 1;76(6):402–5.
80. Pinto Paz JL, do Perpétuo Socorro Corrêa Amador Silvestre M, Moura LS, Furlaneto IP, Rodrigues YC, Batista Lima KV, et al. Association of the polymorphism of the vitamin D receptor gene (VDR) with the risk of leprosy in the Brazilian Amazon. *Bioscience Reports* [Internet]. 2021 Jul 30 [cited 2021 Oct 4];41(7):1–9. Available from: [/bioscierep/article/41/7/BSR20204102/229063/Association-of-the-polymorphism-of-the-vitamin-D](https://www.biosciencereports.com/article/41/7/BSR20204102/229063/Association-of-the-polymorphism-of-the-vitamin-D)

81. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2021 Oct 4];201(9):1422–35. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/201/9/1422/877770>
82. Grant A v., Alter A, Huong NT, Orlova M, van Thuc N, Ba NN, et al. Crohn's disease susceptibility genes are associated with leprosy in the vietnamese population. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2021 Oct 21];206(11):1763–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22984114/>
83. Leturiondo AL, Noronha AB, do Nascimento MOO, Ferreira C de O, Rodrigues F da C, Moraes MO, et al. Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in Brazil 11 *Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences*. *BMC Infectious Diseases* [Internet]. 2019 Jan 7 [cited 2021 Oct 21];19(1):1–6. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3653-0>
84. Alvarado-Arnez LE, Amaral EP, Sales-Marques C, Durães SMB, Cardoso CC, Sarno EN, et al. Association of IL10 polymorphisms and leprosy: A meta-analysis. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 Sep 4 [cited 2021 Oct 4];10(9):e0136282. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0136282>
85. Franceschi DSA, Mazini PS, Rudnick CCC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. 2009 Jul 1;13(4):493–8.
86. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SMB, Ribeiro-Alves M, Nery JAC, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: A genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2011 Oct 15 [cited 2021 Oct 4];204(8):1256–63. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/204/8/1256/818040>

87. de Sales Marques C, Brito-De-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248s single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2021 Oct 4];208(1):120–9. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/208/1/120/795509>
88. Pfyffer GE. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. *Manual of Clinical Microbiology* [Internet]. 2015 May 26 [cited 2022 Feb 2];536–69. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1128/9781555817381.ch30>
89. Ghosh J, Larsson P, Singh B, Pettersson BMF, Islam NM, Sarkar SN, et al. Sporulation in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2009 Jun 30 [cited 2022 Feb 2];106(26):10781. Available from: [/pmc/articles/PMC2705590/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19111111/)
90. Simner PJ, Stenger S, Richter E, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Wengenack NL. Mycobacterium: Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria. *Manual of Clinical Microbiology* [Internet]. 2015 May 26 [cited 2022 Feb 2];570–94. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1128/9781555817381.ch31>
91. Tortoli E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2022 Feb 2];16(2):319. Available from: [/pmc/articles/PMC153139/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12711111/)
92. Arora VK. Molecular Genetics of Mycobacteria. *Indian Journal of Tuberculosis*. 2015;62(2):128.
93. Dávalos AF, Garcia PK, Montoya-Pachongo C, Rengifo A, Guerrero D, Díaz-Ordoñez L, et al. Identification of Nontuberculous Mycobacteria in Drinking Water in Cali, Colombia. *J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021;18. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph18168451>
94. Dovriki E, Gerogianni I, Petinaki E, Hadjichristodoulou C, Papaioannou A, Gourgoulialis K. Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from hospitalized patients and drinking water samples--examination of their

correlation by chemometrics. Environmental monitoring and assessment [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2022 Feb 2];188(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27021690/>

95. Brennan PJ, Spencer JS. The Physiology of Mycobacterium leprae Morphology and Cell Wall. The International Textbook of leprosy. 2019;(6):1–51.
96. Itty BM, Mukherjee R, Antia NH. Adherence of Mycobacterium leprae to Schwann cells in vitro. Journal of Medical Microbiology [Internet]. 1986 Nov 1 [cited 2021 Oct 4];22(3):277–82. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-22-3-277>
97. GOHAR MA. A note on fluorescence microscopy in the diagnosis of leprosy. The Journal of tropical medicine and hygiene [Internet]. 1952 [cited 2021 Oct 4];55(7):156–7. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19522902033>
98. Brieger EM, Glauert AM. Electron microscopy of the leprosy bacillus: A study of submicroscopical structure. Tubercle. 1956 Jun 1;37(3):195–206.
99. Shepard CC. Temperature optimum of Mycobacterium leprae in mice. Journal of bacteriology [Internet]. 1965 [cited 2021 Oct 4];90(5):1271–5. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>
100. Sharma R, Singh P, Pena M, Subramanian R, Chouljenko V, Kim J, et al. Differential growth of Mycobacterium leprae strains (SNP genotypes) in armadillos. Infection, Genetics and Evolution. 2018 Aug 1;62:20–6.
101. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of Mycobacterium leprae: A minimal mycobacterial gene set [Internet]. Vol. 2, Genome Biology. 2001. Available from: <http://genomebiology.com/2001/2/8/reviews/1023>.1<http://genomebiology.com/2001/2/8/reviews/1023>
102. Marques MAM, Espinosa BJ, Xavier Da Silveira EK, Pessolani MC v., Chapeaurouge A, Perales J, et al. Continued proteomic analysis of Mycobacterium leprae subcellular fractions. Proteomics. 2004 Oct;4(10):2942–53.

103. Parkash O, Singh BP. Advances in Proteomics of Mycobacterium leprae [Internet]. Vol. 75, Scandinavian Journal of Immunology. John Wiley & Sons, Ltd; 2012 [cited 2021 Oct 4]. p. 369–78. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3083.2012.02677.x>
104. Wiker HG, Tomazella GG, de Souza GA. A quantitative view on Mycobacterium leprae antigens by proteomics. Journal of Proteomics [Internet]. 2011;74(9):1711–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.004>
105. Ates LS. New insights into the mycobacterial PE and PPE proteins provide a framework for future research. Molecular Microbiology [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Oct 5];113(1):4–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.14409>
106. Shimoji Y, Rambukkana A. Identification and characterization of a novel surface protein of M. leprae that binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases. 1999;67(4 SUPPL.):494.
107. Shimoji Y, Vincent NG, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of Mycobacterium leprae binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet]. 1999;96(17):9857–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC22300/pdf/pq009857.pdf>
108. Stoner GL. Importance of the Neural Predilection of Mycobacterium Lepræ in Leprosy. The Lancet. 1979;314(8150):994–6.
109. Madigan CA, Cambier CJ, Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Cheng TY, Zailaa J, et al. A Macrophage Response to Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. Cell. 2017;170(5):973-985.e10.
110. Lahiri R, Adams LB. Part II, Section 5, Chapter 5.3: Cultivation and viability determination of Mycobacterium leprae. The International Textbook of Leprosy. 2016;1–22.
111. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature. 2001;409(6823):1007–11.

112. Avanzi C, Singh P, Truman RW, Suffys PN. Molecular epidemiology of leprosy: An update. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020 Dec 1;86.
113. Shin YC, Lee H, Lee H, Walsh GP, Kim JD, Cho SN. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2000 [cited 2021 Nov 8];38(12):4535–8. Available from: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JCM.38.12.4535-4538.2000>
114. Matsuoka M, Maeda S, Kai M, Nakata N, Chae G-T, Gillis TP, et al. *Mycobacterium leprae* Typing by Genomic Diversity and Global Distribution of Genotypes . *JOURNAL OF LEPROSY*. 2000;68(2).
115. Groathouse NA, Rivoire B, Kim H, Lee H, Cho SN, Brennan PJ, et al. Multiple Polymorphic Loci for Molecular Typing of Strains of *Mycobacterium leprae*. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2004 Apr [cited 2021 Oct 3];42(4):1666–72. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
116. Gillis T, Vissa V, Matsuoka M, Young S, Richardus JH, Truman R, et al. Characterisation of short tandem repeats for genotyping *Mycobacterium leprae*. *Leprosy Review*. 2009;80(3):250–60.
117. Hall BG, Salipante SJ. Molecular epidemiology of *Mycobacterium leprae* as determined by structure-neighbor clustering. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2010 Jun [cited 2021 Sep 27];48(6):1997–2008. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
118. Young SK, Ponnighaus JM, Jain S, Lucas S, Suneetha S, Lockwood DNJ, et al. Use of short tandem repeat sequences to study *Mycobacterium leprae* in leprosy patients in Malawi and India. *PLoS Neglected Tropical Diseases* [Internet]. 2008 Apr [cited 2021 Sep 27];2(4):e214. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000214>
119. Monot M, Honoré N, Balière C, Ji B, Sow S, Brennan PJ, et al. Are variable-number tandem repeats appropriate for genotyping *Mycobacterium leprae*? *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2008 Jul [cited 2021 Sep 27];46(7):2291–7. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>

120. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature Genetics*. 2009 Dec;41(12):1282–9.
121. Tió-Coma M, Avanzi C, Verhard EM, Pierneef L, van Hooij A, Benjak A, et al. Genomic Characterization of *Mycobacterium leprae* to Explore Transmission Patterns Identifies New Subtype in Bangladesh. *Frontiers in Microbiology*. 2020 Jun 16;11.
122. Fontes ANB, Sakamuri RM, Baptista IMFD, Ura S, Moraes MO, Martínez AN, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients. Vol. 80, *Leprosy Review*. 2009.
123. Fontes ANB, Gomes HM, de Araujo MI, de Albuquerque ECA, Baptista IMFD, Moura MM da F, et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2021 Nov 9];107(SUPPL.1):143–9. Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=3e21ce55-dee7-45bd-9350-20cef2d28126>
124. Benjak A, Avanzi C, Singh P, Loiseau C, Girma S, Busso P, et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature Communications*. 2018;9(1).
125. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005 May 13;308(5724):1040–2.
126. Schuenemann VJ, Singh P, Mendum TA, Krause-Kyora B, Jäger G, Bos KI, et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science*. 2013;341(6142):179–83.
127. Schuenemann VJ, Avanzi C, Krause-Kyora B, Seitz A, Herbig A, Inskip S, et al. Ancient genomes reveal a high diversity of *Mycobacterium leprae* in medieval Europe. *PLoS Pathogens*. 2018 May 1;14(5).
128. Pfrengle S, Neukamm J, Guellil M, Keller M, Molak M, Avanzi C, et al. *Mycobacterium leprae* diversity and population dynamics in medieval Europe from novel ancient genomes. *BMC Biology* 2021 19:1 [Internet]. 2021 Oct 5

[cited 2021 Oct 22];19(1):1–18. Available from: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-021-01120-2>

129. Gómez-Valero L, Rocha EPC, Latorre A, Silva FJ. Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: The dynamics of gene loss and genome reduction. *Genome Research*. 2007;17(8):1178–85.
130. Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: Genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiology*. 2011 Jan;6(1):57–71.
131. Avni E, Montoya D, Lopez D, Modlin R, Pellegrini M, Snir S. A phylogenomic study quantifies competing mechanisms for pseudogenization in prokaryotes—The *Mycobacterium leprae* case. *PLoS ONE*. 2018;13(11):e0204322.
132. Williams DL, Slayden RA, Amin A, Martinez AN, Pittman TL, Mira A, et al. Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. *BMC Genomics*. 2009 Aug 25;10:397.
133. Han XY, Aung FM, Choon SE, Werner B. Analysis of the leprosy agents *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* in four countries. *American Journal of Clinical Pathology* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2021 Oct 4];142(4):524–32. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article/142/4/524/1767163>
134. Han XY, Sizer KC, Thompson EJ, Kabanja J, Li J, Hu P, et al. Comparative sequence analysis of *Mycobacterium leprae* and the new leprosy-causing *Mycobacterium lepromatosis*. *Journal of Bacteriology*. 2009;191(19):6067–74.
135. Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015 Apr 7;112(14):4459–64.
136. Sotiriou MC, Stryjewska BM, Hill C. Case report: Two cases of leprosy in siblings caused by *Mycobacterium lepromatosis* and review of the literature [Internet]. Vol. 95, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2016 [cited 2021 Oct 4]. p. 522–7. Available from: [/pmc/articles/PMC5014252/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2714252/)

137. Benjak A, Avanzi C, Benito Y, Breyse F, Chartier C, Boschiroli M-L, et al. Highly Reduced Genome of the New Species *Mycobacterium uberis*, the Causative Agent of Nodular Thelitis and Tuberculoid Scrotoitis in Livestock and a Close Relative of the Leprosy Bacilli. *mSphere*. 2018 Oct 31;3(5).
138. Tufariello JAM, Kerantzas CA, Vilchèze C, Calder RB, Nordberg EK, Fischer JA, et al. The complete genome sequence of the emerging pathogen *Mycobacterium haemophilum* explains its unique culture requirements. *mBio*. 2015;6(6):5–11.
139. Kitaoka N, Fukano H, Yoshida M, Miyamoto Y, Mori S, Ishii N, et al. Discrimination of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium haemophilum* in clinical isolates and specimens by multiplex PCR assay and prediction of drug susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019;57(2):1–3.
140. Rana A, Thakur S, Bhardwaj N, Kumar D, Akhter Y. Excavating the surface-associated and secretory proteome of *Mycobacterium leprae* for identifying vaccines and diagnostic markers relevant immunodominant epitopes. *Pathogens and Disease* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2021 Oct 4];74(9):110. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article/74/9/ftw110/2731850>
141. Reece ST, Ireton G, Mohamath R, Guderian J, Goto W, Gelber R, et al. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006 Mar;13(3):333–40.
142. Barbosa M dos S, de Sousa IBA, Simionatto S, Borsuk S, Marchioro SB. Recombinant polypeptide of *Mycobacterium leprae* as a potential tool for serological detection of leprosy. *AMB Express*. 2019;9(1).
143. Bobosha K, Tang ST, van der Ploeg-van schip JJ, Bekele Y, Martins MVSB, Lund O, et al. *Mycobacterium leprae* virulence-associated peptides are indicators of exposure to *M. leprae* in Brazil, Ethiopia and Nepal. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(SUPPL.1):112–23.
144. Bezerra-Santos M, do Vale-Simon M, Barreto AS, Cazzaniga RA, de Oliveira DT, Barrios MR, et al. *Mycobacterium leprae* Recombinant Antigen Induces High Expression of Multifunction T Lymphocytes and Is Promising as a Specific Vaccine for Leprosy. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2920.

145. Kaur G, Sharma A, Narang T, Dogra S, Kaur J. Characterization of ML0314c of *Mycobacterium leprae* and deciphering its role in the immune response in leprosy patients. *Gene* [Internet]. 2018;643:26–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.001>
146. Rastogi R, Kaur G, Maan P, Bhatnagar A, Narang T, Dogra S, et al. Molecular characterization and immunogenic function of ML1899 (LipG) of *Mycobacterium leprae*. *Journal of Medical Microbiology* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Oct 4];68(11):1629–40. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001080>
147. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Sampaio LH, Grassi AB, et al. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. *Clinical and vaccine immunology : CVI* [Internet]. 2008 Nov [cited 2021 Nov 9];15(11):1659–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18784342/>
148. Jaiswal AK, Tiwari S, Jamal SB, de Castro Oliveira L, Sales-Campos H, Andrade-Silva LE, et al. Reverse vaccinology and subtractive genomics approaches for identifying common therapeutics against *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2021;27(March 2020).
149. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2021 Oct 5];31(13):3812–4. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/31/13/3812/2904131>
150. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* [Internet]. 2015 Aug 15 [cited 2021 Oct 5];31(16):2745–7. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/16/2745/320965>
151. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990 Oct 5;215(3):403–10.

152. Kahsay RY, Gao G, Liao L. An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes. *Bioinformatics*. 2005 May 1;21(9):1853–8.
153. Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, Dauparas J, Ovchinnikov S, Lee GR, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*. 2021 Aug 20;373(6557):871–6.
154. Saha S, Bhasin M, Raghava GPS. Bcipep: A database of B-cell epitopes. *BMC Genomics* [Internet]. 2005 May 29 [cited 2021 Oct 5];6(1):1–7. Available from: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-6-79>
155. Karosiene E, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. NetMHCcons: A consensus method for the major histocompatibility complex class I predictions. *Immunogenetics* [Internet]. 2012 Mar [cited 2021 Oct 22];64(3):177–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22009319/>
156. Wang P, Sidney J, Dow C, Mothé B, Sette A, Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Computational Biology* [Internet]. 2008 Apr [cited 2021 Oct 5];4(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18389056/>
157. Torres L, da Silva Bouzas LF, Almada A, de Sobrino Porto LCM, Abdelhay E. Distribution of HLA-A, -B and -DRB1 antigenic groups and haplotypes from the Brazilian bone marrow donor registry (REDOME). *Human Immunology*. 2017;78(10):602–9.
158. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* [Internet]. 2012 [cited 2021 Oct 3];13:134. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22708584/>
159. Fishbein S, van Wyk N, Warren RM, Sampson SL. Phylogeny to function: PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Molecular Microbiology* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2021 Oct 5];96(5):901–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.12981>

160. Mitra A, Speer A, Lin K, Ehrt S, Niederweis M. PPE surface proteins are required for heme utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio*. 2017 Jan 1;8(1).
161. Sampson SL. Mycobacterial PE/PPE proteins at the host-pathogen interface. Vol. 2011, *Clinical and Developmental Immunology*. 2011.
162. Homolka S, Ubben T, Niemann S. High sequence variability of the PPE18 gene of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains potentially impacts effectivity of vaccine candidate M72/AS01E. *PLoS ONE* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2021 Oct 5];11(3):e0152200. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0152200>
163. Jiang Y, Wan L, Zhang Z, Liu H, Pang H, Zhang W, et al. Conserved alanine rich protein Rv3878 in *Mycobacterium tuberculosis* contains sequence polymorphisms. *Tuberculosis* [Internet]. 2014 [cited 2021 Oct 3];94(3):245–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2014.02.002>
164. Nakata N, Kai M, Makino M. Mutation analysis of mycobacterial *rpoB* genes and rifampin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 2012 Apr [cited 2021 Oct 5];56(4):2008–13. Available from: <http://aac.asm.org/>.
165. Sekar B, Arunagiri K, Kumar BN, Narayanan S, Menaka K, Oommen PK. Detection of mutations in *folp1*, *rpoB* and *gyrA* genes of *M. leprae* by PCR- direct sequencing - A rapid tool for screening drug resistance in leprosy. *Leprosy Review*. 2011;82(1):36–45.
166. Singh P, Benjak A, Carat S, Kai M, Busso P, Avanzi C, et al. Genome-wide re-sequencing of multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* Airaku-3. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Oct 1;20(10):O619–22.
167. Sasseti CM, Rubin EJ. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2003 Oct 28 [cited 2021 Oct 3];100(22):12989–94. Available from: <https://www.pnas.org/content/100/22/12989>
168. Schmidt F, Donahoe S, Hagens K, Mattow J, Schaible UE, Kaufmann SHE, et al. Complementary analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* proteome by two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tag technology.

- Molecular and Cellular Proteomics [Internet]. 2004 Jan [cited 2021 Oct 3];3(1):24–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14557599/>
169. Xiong Y, Chalmers MJ, Gao FP, Cross TA, Marshall AG. Identification of Mycobacterium tuberculosis H37Rv integral membrane proteins by one-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Proteome Research [Internet]. 2005 May [cited 2021 Oct 3];4(3):855–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15952732/>
170. Gu S, Chen J, Dobos KM, Bradbury EM, Belisle JT, Chen X. Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a Mycobacterium tuberculosis strain. Molecular & cellular proteomics : MCP [Internet]. 2003 [cited 2021 Oct 3];2(12):1284–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14532352/>
171. Lee J, Kim SH, Choi DS, Lee JS, Kim DK, Go G, et al. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from Mycobacterium tuberculosis. Proteomics [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Oct 5];15(19):3331–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pmic.201500037>
172. Målen H, Berven FS, Søfteland T, Arntzen MØ, D'Santos CS, de Souza GA, et al. Membrane and membrane-associated proteins in Triton X-114 extracts of Mycobacterium bovis BCG identified using a combination of gel-based and gel-free fractionation strategies. Proteomics [Internet]. 2008 May 1 [cited 2021 Oct 3];8(9):1859–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pmic.200700528>
173. Verma JS, Gupta Y, Nair D, Manzoor N, Rautela RS, Rai A, et al. Evaluation of gidB alterations responsible for streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2021 Oct 5];69(11):2935–41. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/69/11/2935/707947>
174. MA B, F A, LS M. Significant Aspect of Rv0378 Gene of Mycobacterium tuberculosis H37Rv Reveals the PE_PGRS like Properties by Computational

Approaches. *Journal of Biotechnology and Biomedicine* [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 5];02(01):24–039. Available from: <http://www.uniprot.org>

175. Potocnakova L, Bhide M, Pulzova LB. An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and in Silico Epitope Prediction. Vol. 2016, *Journal of Immunology Research*. Hindawi Limited; 2016.
176. Soares BA, Teixeira KN, de Santana JF, de Assis BLM, Zocatelli-Ribeiro C, Scandelari JPS, et al. Epitope mapping from *Mycobacterium leprae* proteins: Convergent data from in silico and in vitro approaches for serodiagnosis of leprosy. *Molecular Immunology*. 2021;138(July):48–57.
177. Chakraborty A, Biswas A. Structure, stability and chaperone function of *Mycobacterium leprae* Heat Shock Protein 18 are differentially affected upon interaction with gold and silver nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020 Jun 1;152:250–60.