



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DO
***Mycobacterium leprae* LIGANTES À IgG POR MEIO DA TECNOLOGIA DE**
PHAGE DISPLAY

MAYARA INGRID SOUSA LIMA

Salvador - Brasil
2011

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DO
***Mycobacterium leprae* LIGANTES À IgG POR MEIO DA TECNOLOGIA DE**
PHAGE DISPLAY

MAYARA INGRID SOUSA LIMA

Orientador: Dr. Jackson Mauricio Lopes Costa

Co-orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Biotecnologia
em Saúde e Medicina Investigativa
para a obtenção do grau de
Mestre

Salvador - Brasil
2011

L732s Lima, Mayara Ingrid Sousa
Seleção e caracterização de peptídeos recombinantes do *Mycobacterium leprae*
ligantes à IgG por meio da tecnologia de *phage display* [manuscrito] / por Mayara
Ingrid Sousa Lima - 2011.
82 f.: il.; cm.

Datilografado (fotocópia).
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo
Moniz, 2011.
Orientador: Dr. Jackson Mauricio Lopes Costa, Laboratório de Imunoparasitologia.

1. Hanseníase 2. *Fago M13* 3. Peptídeos I. Título.

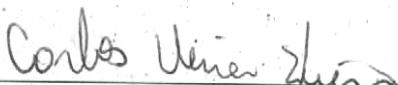
CDU 616-002.73

**“SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES MIMÉTICOS DO
MYCOBACTERIUM LEPRAE LIGANTES A IMUNOGLOBULINA G POR PHAGE DISPLAY.”**

MAYARA INGRID SOUSA LIMA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Carlos Ueira Vieira
Professor Adjunto
UFU/MG



Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
FIOCRUZ/BA

Dedico este trabalho:

- ... à minha vovó Epifania (*in memorian*), por que sempre estará ao meu lado;**
- ... ao amigo e irmão Marcelo, pois sem você com certeza não teria realizado mais essa conquista. Muito obrigada por tudo que vivemos!**
- ... minha mãe Francisca e meu pai drasto Antonio pelo amor, pelo apoio, e por serem os alicerces de minha vida.**

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e da caridade. A São Francisco de Assis pelos ensinamentos de seguir o Cristo na humildade, no amor e na fraternidade universal;

A toda a minha família por serem os alicerces da minha vida, em especial minha mãe, meu pai drasto, minha tia Marinha, meus primos Ranielha e Pedro Vinícius. À minha família espiritual, os irmãos (as) e amigos (as) da Juventude Franciscana e Ordem Franciscana Secular, em especial a fraternidade Arautos de Salvador-BA e ao Frei Zé Luís, OFMcap pelo carinho e acolhimento.

Ao Drº Jackson Maurício Lopes Costa por ter me aceitado como orientanda de forma tão acolhedora e disponível e pelo exemplo de ser um médico pesquisador tão dedicado.

Ao Profº Drº Luiz Ricardo Goulart Filho por ter confiado no meu trabalho, por todas as oportunidades concedidas e, principalmente pelo entusiasmo e dedicação que contagia todos os seus alunos.

À Profª Drª Silma Regina Pereira, minha eterna orientadora, por sua amizade, confiança, dedicação e por ter sido a grande impulsionadora desta conquista, abrindo portas muito importantes. Muito obrigada!

Ao Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária-CREDESH, em especial a Drª Isabela Maria Bernardes Goulart, pela confiança e por abrir as portas dessa grande família, onde além de aprender sobre hanseníase, encontrei valores de compromisso e amor em trabalhar com os pacientes da hanseníase e seus familiares. É por eles que persistimos no nosso trabalho com tanta dedicação.

Ao Profº Drº Carlos Ueira e Drº Lain Carvalho por terem aceitado participar da banca examinadora dessa dissertação. E ao Drº Alan McBride pelo auxílio na análise de bioinformática.

Aos amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Urbelândia/UFU pela paciência e dedicação em me ensinar todo esse “mundo” do *phage display* e aos grandes companheiros do Laboratório de Hanseníase do CREDESH/UFU, que tão gentilmente abriram as portas para mim. A todos, obrigada pelo carinho, apoio, amizade e pelas alegrias partilhadas.

Aos velhos e novos amigos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFMA, que sempre ao voltar para minha “casa” profissional estavam de braços abertos para me receberem com muito carinho. Ao Laboratório de Imunofisiologia - LIF da UFMA, na

pessoa da Profª Drª Flávia Nascimento, pela disponibilidade do local para os ensaios de ELISA.

A todos os profissionais e alunos envolvidos no projeto “*aplicações de tecnologias moleculares, imunológicas e de geoprocessamento para a caracterização epidemiológica, diagnóstico e monitoramento da hanseníase em área hiperendêmica do Maranhão*”, coordenado pela Drª Isabela Maria Bernardes Goulart, pela dedicação e empenho em executar com êxito essa proposta.

Aos amigos conquistados e a minha família adotiva em Uberlândia, na casa da Gisa, pelo companheirismo e ajuda em todas as dificuldades.

Aos colegas do mestrado por todos os momentos partilhados. E aos amigos Cida, Taíse, Bárbara, Malu (vocês quatro não só me acolheram em seus lares, como abriram seus corações para uma grande amizade. Muito obrigada!), Luís, Raysa, Zé, Humberto e Carol que foram minha família baiana.

A todos os meus eternos amigos (do Liceu, da Biologia/UFMA) pelo encorajamento, pelas orações e pela *presença quando ausentes*.

Ao CPqGM/FIOCRUZ pela realização do mestrado, em especial a toda equipe de funcionários, professores e pesquisadores da pós-graduação.

Ao CNPq, FINEP, FAPEMIG, DECIT-Ministério da Saúde pelo apoio financeiro aos projetos que financiaram essa pesquisa.

À FAPEMA pela concessão da bolsa.

“Minha vida é andar por esse país
pra ver se um dia descanso feliz
guardando as recordações
das terras onde passei
andando pelos sertões
e dos amigos que lá deixei”.

Luiz Gonzaga

LIMA, Mayara Ingrid Sousa. Seleção e caracterização de peptídeos recombinantes do *Mycobacterium leprae* ligantes à IgG por meio da tecnologia de *phage display*. 82f. il. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que apresenta manifestações clínicas variadas. Essas variações refletem em diferenças que vão de uma forte resposta imune celular com controle do crescimento do bacilo, no pólo tuberculóide, a uma anergia em resposta celular, no pólo virchoviano. A caracterização do perfil antigênico do *M. leprae* frente a esse quadro de múltiplos aspectos clínicos representa uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento de novas plataformas para um diagnóstico diferencial mais sensível e/ou desenvolvimento de unidades vacinais. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi selecionar e caracterizar peptídeos miméticos de antígenos do *M. leprae* reativos contra IgGs totais purificadas de pacientes com hanseníase. Para a seleção foi utilizada a tecnologia de *phage display*, usando bibliotecas randômicas de peptídeos expressos em fagos filamentosos. Foi realizada uma seleção com IgGs de pacientes Tuberculóides e outra com IgGs de pacientes Virchovianos. A validação dos peptídeos foi realizada utilizando o imunoenensaio ELISA, o teste de redução de colônias e análise de bioinformática. Após a pré-validação e sequenciamento foram encontradas 17 mimotopos para o pólo Virchoviano e 12 no pólo Tuberculóide. Foram validados 4 peptídeos, sendo 2 do pólo Tuberculóide (T03, T04) e 2 do pólo Virchoviano (V06 e V13). Os peptídeos TALFPWL (T03) e YSTTLSY (T04) foram imunorreativos em soros de pacientes paucibacilares, bem como em pacientes Virchovianos, além de terem alinhado com proteínas de membrana do *M. leprae* com potencial antigênico. O peptídeo V06 apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 94,74%, o que se complementa com os dados do teste de redução da pIII, o qual obteve uma taxa de redução de 82% em soros Virchovianos. O peptídeo V13 também foi reativo e apresentou similaridades com chaperonas e proteínas de membrana. Este estudo aponta perspectivas para a identificação de novos antígenos, propiciando a descoberta de novos alvos biológicos com potencial diagnóstico e/ou terapêutico.

Palavras-chave: Hanseníase, Fago filamentoso M13, peptídeos.

LIMA, Mayara Ingrid Sousa. Selection and characterization of recombinant peptides of *Mycobacterium leprae* IgG ligands by *phage display* technology. 82f. il. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, which has varied clinical manifestations. These variations reflect differences that spans from a strong cellular mediated immunity and bacili growth control the tuberculoid pole to a poor T cell immunity at the lepromatous pole. The antigenic profile characterization in both clinical forms represents a fundamental tool for the development of new platforms for a differential diagnosis more sensitive and/or development of vaccine units. Thus, the objective was to select and characterize mimetics peptides antigens of *M. leprae* reactive against total IgG purified from leprosy patients. The *phage display* technology was used for selection using random peptides libraries expressed on filamentous phages. A selection was performed with IgGs from tuberculoid patients and other IgGs of lepromatous patients. Peptides validation was performed using the ELISA immunoassay, the plaque reduction test and bioinformatics analysis. After the pre-validation and sequencing were found 17 valid sequences for the lepromatous pole and 12 tuberculoid pole. Four peptides were validated, two of tuberculoid pole (T03, T04) and two lepromatous pole (V06 and V13). The peptides TALFPWL (T03) and YSTTLSY (T04) were imunoreactives in sera from paucibacillary patients and in lepromatous patients. They had alignment with membrane proteins of *M. leprae* antigenic potential. The V06 peptide showed 100% specificity and 94.74% sensitivity, which is supplemented with the plaque reduction test, who obtained a reduction rate of 82% in lepromatous sera. The V13 peptide was also reactive and showed similarities with chaperones and membrane proteins. This study presents insights for new antigens identification, leading to discovery of new biological targets with potential diagnostic or therapeutic.

Keywords: Leprosy, Filamentous phage M13, peptides

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fago filamentoso. A) Composição do gene III, mostrando o sítio de ligação de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pXI; C) Cristalografia dos domínios D1 e D2 da proteína III. 27

Figura 2: Esquema representativo do processo de “Biopanning”: (A) a biblioteca de fagos é incubada com um alvo imobilizado; (B) fagos não ligantes são lavados; (C) os fagos ligantes são eluídos; (D) fagos eluídos são semeados em bactérias; (E) amplificados em meio líquido e submetido a novas rodadas de seleção *in vitro*; (F) sequenciamento dos fagos ligantes. Retirado de BRATKOVIC, 2010... 29

Figura 3: Delineamento experimental do estudo..... 34

Figura 4: Delineamento para realização do Biopanning com IgGs purificadas de pacientes com Hanseníase Tuberculóide e Virchoviana..... 37

Figura 5: Média das absorvâncias mostrando a reatividade dos clones contra IgG purificada de pacientes com Hanseníase Tuberculóide com pools de diferentes tipos de soros: Tuberculóides - TT, Virchovianos - VV e Controles - CT. A escala no eixo y mostra a absorvância a 492nm correspondente aos fagos ligantes. Os dados estão representados pela média \pm desvio padrão. **Valor de $p < 0,01$ pelo Teste ANOVA um critério com pós teste de Bonferroni quando se comparou diferenças estatisticamente significativas entre as reatividades dos clones com soros de Tuberculóides, Virchovianos e Controles..... 54

Figura 6: Média das absorvâncias mostrando a reatividade dos clones contra IgG purificada de pacientes com Hanseníase Virchoviana com pools de diferentes tipos de soros: Tuberculóides - TT, Virchovianos - VV e Controles - CT. A escala no eixo y mostra a absorvância a 492nm correspondente aos fagos ligantes. Os dados estão representados pela média \pm desvio padrão. **Valor de $p < 0,01$ pelo Teste ANOVA um critério com pós teste de Bonferroni quando se comparou diferenças estatisticamente significativas entre a reatividades dos clones com soros de Virchovianos, Tuberculóides e Controles..... 55

Figura 7: Reatividade de 38 soros de pacientes com Hanseníase Tuberculóide- TT, Vichorviana- VV e Controles- CT com o peptídeo V13. A linha em vermelho representa o valor do cut off. Valores acima dessa linha são considerados positivos e abaixo são negativos..... 57

Figura 8: Reatividade de 38 soros de pacientes com Hanseníase Tuberculóide- TT, Vichorviana- VV e Controles- CT com o peptídeo V06. A linha em vermelho representa o valor do cut off. Valores acima dessa linha são considerados positivos e abaixo são negativos..... 57

Figura 9: Reatividade de 27 soros de pacientes com Hanseníase Tuberculóide- TT, Vichorviana- VV e Controles- CT com o peptídeo T04. A linha em vermelho representa o valor do cut off. Valores acima dessa linha são considerados positivos e abaixo são negativos. No gráfico referente aos soros de contatos, os cinco primeiros são contatos de pacientes paucibacilares e todos os outros de multibacilares. 59

Figura 10: Reatividade de 27 soros de pacientes com Hanseníase Tuberculóide- TT, Vichorviana- VV e controles- CT com o peptídeo T03. A linha em vermelho representa o valor do cut off. Valores acima dessa linha são considerados positivos e abaixo são negativos. No gráfico referente aos soros de Contatos, os cinco primeiros são contatos de pacientes paucibacilares e todos os outros de multibacilares. **59**

Figura 11: Teste de Redução de Colônias: em A- Fago V06; a placa da esquerda está sem soro e a da direita com pool de soro de pacientes virchovianos na diluição 1:8; em B- Fago T03, a placa da esquerda está sem soro e a da direita com pool de soros de pacientes virchovianos na diluição 1:8; C- Fago T04, na esquerda placa sem soro e na direita placa com pool de soro de pacientes tuberculóides na diluição 1:8. **61**

Quadro 1: Alinhamento das sequências e dos consensos, mostrando as similaridades encontradas com as proteínas anotadas no banco de dados do GeneBank pelo BLAST, com os números de acesso no Swissprot, o respectivo alinhamento, o valor do escore e a provável região antigênica das proteínas. **51**

Quadro 2: Mapeamento dos peptídeos em estruturas protéicas catalogadas no PDB. **52**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupo de pacientes e contatos, com suas respectivas formas clínicas e os resultados para os testes ML-Flow, ELISA PGL-1, Mitsuda, Índice Baciloscópico e BCG.....	35
Tabela 2: Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a IgG purificada de pacientes com Hanseníase Tuberculóide e Virchoviana. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade. TT- Tuberculóide; VV- Virchoviano.	45
Tabela 3: ELISA com clones selecionados contra forma Tuberculóide da Hanseníase sendo testado com pool de soros de pacientes Tuberculóides.	46
Tabela 4: ELISA com clones selecionados contra forma Virchoviana da Hanseníase sendo testado com pool de soros de pacientes Virchovianos.	46
Tabela 5: Resultado do ELISA, com valores de absorvância, para os clones selecionados da forma Tuberculóide e Virchoviana submetidos a três tipos de soros diferentes.....	47
Tabela 6: Relação dos peptídeos obtidos contra IgG purificada de pacientes Tuberculóides após o sequenciamento.	48
Tabela 7: Relação dos peptídeos obtidos contra IgG purificada de pacientes Virchovianos após o sequenciamento.	49
Tabela 8: Alinhamento dos peptídeos para a forma Virchoviana pelo programa Clustal W.	50
Tabela 9: Frequência de pacientes positivos para o teste ELISA nos quatro clones sobre o valor total de pacientes diagnosticados.	56
Tabela 10: Comparação de dados estatísticos epidemiológicos entre os peptídeos V06, V13, T03, T04 e os soros de pacientes Virchovianos e Tuberculóides.	58
Tabela 11: Teste de bloqueio da PIII indicado pelo número de colônias (pfu) com pool de soros dos grupos Tuberculóide, Virchoviano e Contatos para os clones T03, T04 e V06.....	60

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cis	C
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Fen	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imodeficiência Adquirida
anti-LAM	Anti Lipoarabinomanana
anti-PGL-1	Anti Glicolípido Fenólico-1
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Soro albumina bovina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
IFNγ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
ILA	International Leprosy Association
IPTG	Isopropil α -D-tiogalactosidase
kDa	Quilodalton
LB	Luria Broth
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
OD	Densidade óptica
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PDB	Protein data bank
PEG	Polietileno glicol
Pfu	Unidades formadoras de colônias
Ph.D- C7C	Biblioteca contendo 7 peptídeos randômicos

pIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
RELIC	Receptor Ligands Contents
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBS	Tampão Tris-HCl e Sódio
TBST	Tampão Tris-HCl e Sódio com tween 20
Tris	Tri-hidroxi-metil-aminometano
WHO	Organização Mundial de Saúde
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- a-D-galactosideo

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	6
LISTA DE AMINOÁCIDOS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
SUMÁRIO	16
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Aspectos Gerais, Epidemiologia e Situação da Hanseníase no Brasil.....	19
1.2 Classificação da Hanseníase	20
1.3 Imunologia da Hanseníase	21
1.4 Diagnóstico da Hanseníase e tecnologias pós genômicas.	23
1.5 Hanseníase e <i>Phage display</i>	26
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Delineamento do estudo	34
3.2 Obtenção e seleção das amostras.....	34
3.3 Seleção dos peptídeos recombinantes	36
3.3.1 Purificação de IgG	36
3.3.2 <i>Biopanning</i> Líquido (seleção de fagos)	36
3.3.3 Titulações.....	38
3.3.4 Amplificação e Purificação de fagos.	39
3.3.5 Extração de DNA.....	39
3.4 Bioinformática	40
3.5 Pré-Validação com ELISA.....	41
3.6 Validação dos peptídeos	42
3.6.1 Validação por ELISA com soros individuais	42
3.6.2 Teste de Bloqueio da pIII (Redução de Colônias)	42
4. RESULTADOS	44
4.1 <i>Biopanning</i>	45
4.2 Pré-validação antes do sequenciamento.	45
4.3 Sequenciamento dos fagos.	48
4.4 Análise de Bioinformática	50
4.5 Pré-validação após o sequenciamento.....	54
4.6 Validação com soros individuais.....	55
4.7 Teste de bloqueio da pIII.....	60
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	68
7. REFERENCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais, Epidemiologia e Situação da Hanseníase no Brasil

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, com acometimento do tecido cutâneo e nervos periféricos, que gera lesões na pele, degeneração do nervo, anestesia e deformidades (GELUK et al, 2009). O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente, em forma de bastonete, sendo parasita intracelular obrigatório de células do sistema mononuclear fagocitário (FOSS, 1997; GOULART et al, 2002). É a única espécie de micobactéria que infecta nervos periféricos, especificamente células de Schwann, e não cresce em meios de cultura artificiais, ou seja, *in vitro* (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

O bacilo é considerado de alta infectividade por ser capaz de contaminar um grande número de indivíduos, mas de baixa patogenicidade, pois somente 10% dos infectados efetivamente chegam a apresentar sinais da doença após um período de incubação que atinge em média, de 2 a 7 anos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

De acordo com relatórios oficiais da Organização Mundial de Saúde (WHO), no primeiro trimestre de 2010, em 141 países e territórios, a prevalência mundial da hanseníase registrada foi de 211.903 casos, enquanto que o número de casos novos detectados em 2009 foi de 244.796 (excluindo o pequeno número de casos na Europa).

Importantes avanços para eliminação da hanseníase foram alcançados na década de 80, com a introdução do sistema de poliquimioterapia (rifampicina, dapsona e clofazimina), que representou a base do esforço da Organização Mundial de Saúde para eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, ou seja, atingir uma prevalência global de menos de 1 caso por 10.000 habitantes até o ano 2000 (GELUK et al, 2009). Apesar das várias campanhas realizadas, a incidência de hanseníase, que é estimada pela detecção de casos novos, permanece alta em alguns países endêmicos. (GROATHOUSE et al, 2006).

No início de 2007, o Brasil, o Nepal, a República Democrática do Congo, a Índia e Moçambique eram os únicos países que ainda não haviam atingido a meta proposta de menos de 1 caso de hanseníase/10.000 habitantes (WHO, 2007). Ainda em 2007, tanto a República Democrática do Congo quanto Moçambique atingiram a meta proposta pela Organização Mundial de Saúde, e, em 2009, o Nepal também atingiu esta fase importante. No entanto, bolsões de alta endemicidade ainda permanecem em algumas áreas em Angola, Brasil, República Centro Africano, Índia, Madagáscar, e

República Unida da Tanzânia. Estes países continuam altamente empenhados em eliminar a doença, e continuarão a intensificar suas atividades de controle da hanseníase (WHO, 2010).

O Brasil ocupa o segundo lugar no mundo em casos de hanseníase, com taxa de prevalência de 3,76 casos por 10 mil habitantes. Dos 40.474 casos novos registrados em 2009 nas Américas, 37.610 foram notificados no Brasil (WHO, 2010).

O último estudo de tendência realizado no Brasil revelou uma indicação de um período inicial de redução nas taxas de detecção (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008a). Entretanto, ainda são identificados 10 *clusters* (agrupamentos), envolvendo 14 estados brasileiros, que são responsáveis por 51% do total de casos novos de hanseníase notificados e 60% dos casos novos notificados em menores de 15 anos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008b).

As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste ainda mantêm taxas de detecção em patamares muito elevados, com 53,5% dos casos detectados em apenas 17,5% da população brasileira, residentes em extensas áreas geográficas, sede de muitas tensões, o que adiciona maior complexidade a intervenções efetivas. Somente o Nordeste apresenta três *clusters*, sendo um deles de hiperendemia, que envolve os estados do Maranhão e Piauí (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Os dados epidemiológicos demonstram que a transmissão ativa está ocorrendo, mesmo com o uso da poliquimioterapia como estratégia de eliminação da hanseníase. Esta transmissão pode ser causada pelo reservatório permanente de *M. leprae* em contatos infectados e pessoas com hanseníase subclínica (GELUK et al, 2009).

1.2 Classificação da Hanseníase

A classificação adequada da doença é de fundamental importância para o tratamento e manejo do paciente (PARKASH, 2009). Por esse motivo, ao longo dos anos, várias tentativas foram realizadas para classificar a hanseníase (DHARMENDRA, 1985), sendo que o sistema de classificação mais amplamente utilizado, e que se mantém até os dias de hoje, é o relatado por Ridley & Jopling em 1966. De acordo com a escala proposta, que considera parâmetros imunológicos, histopatológicos e de carga bacilar, os pacientes com hanseníase são agrupados em: virchovianos (VV), dimorfo-virchovianos (DV), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-tuberculóides (DT) e tuberculóides (TT) (RIDLEY & JOPLING, 1966).

Existe ainda o grupo Indeterminado (I), onde se enquadram aqueles pacientes nos quais os aspectos de diferenciação da hanseníase não se desenvolveram, podendo evoluir para cura espontânea ou desenvolver aspectos clínicos após um período de incubação (YAWALKAR, 2002; GOULART et al, 2002).

Como as instalações para exames histopatológicos da pele e/ou biópsias de nervos necessários para classificação pela escala Ridley & Jopling não estão disponíveis em todos os lugares, especialmente nos países endêmicos com poucos recursos (PARKASH, 2009), a Organização Mundial de Saúde (1982) estabeleceu uma classificação operacional, na qual os pacientes são divididos em paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB). Essa classificação é baseada no número de lesões cutâneas, de modo que, os pacientes com até cinco lesões de pele são classificados como paucibacilares, e aqueles com mais de cinco lesões, como multibacilares (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Além disso, considerando-se a apresentação clínica e, na prerrogativa de evitar ineficiência do tratamento, todos os casos com baciloscopia positiva são classificados como multibacilares, enquanto os casos com baciloscopia negativa, como paucibacilares (WHO, 1988).

1.3 Imunologia da Hanseníase

A hanseníase é uma doença considerada espectral, na qual as manifestações clínicas se correlacionam com a resposta imune do hospedeiro ao patógeno. Em um dos pólos desse espectro, encontram-se os pacientes com hanseníase tuberculóide apresentando uma resposta típica de resistência e controle do crescimento do patógeno. Em oposição, pacientes com hanseníase virchowiana representam o extremo susceptível à infecção pelo *M. leprae*. Essas apresentações clínicas correlacionam-se com o grau de imunidade mediada por células (MODLIN, 1994).

Nos pacientes tuberculóides observa-se uma forte resposta imune celular típica do padrão Th1, com a produção de interleucina 2 (IL-2) e interferon γ (IFN γ), além de IL-7, IL-12, IL-15 e IL-18 (CHER & MOSMANN, 1987; SIELING et al, 1994; MODLIN, 1994; JULLIEN et al, 1997; GARCÍA et al, 1999, MONTOYA et al, 2009). A abundância de IL-2 e IFN γ em lesões de tuberculóides devem contribuir para o estado de imunidade resistente nesses pacientes (GOULART et al, 2002), uma vez que, a IL-2 induz a expansão clonal de células T imune ativadas e aumenta a produção de IFN γ (KASAHARA et al, 1983), que por sua vez é bem conhecido por sua atividade em

umentar a produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio por macrófagos, estimulando-os a matar ou restringir a proliferação de micobactérias (NATHAN et al, 1983). Além disso, a IL-12 estimula diretamente a célula NK, induzindo a produção de IFN γ , com função de potencializar a ativação do macrófago (FOSS, 1997), levando a destruição do bacilo. Esse modelo de imunidade é refletido em granulomas que se formam em torno dos nervos e produzem dano neural sensorial periférico e lesões de pele secundárias (YAWALKAR, 2002).

Nos pacientes do pólo virchoviano predominam os linfócitos T da população Th2 que produzem IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 (SIELING et al, 1993; MENDONÇA et al, 2008), o que é uma característica da resposta humoral, a qual exhibe altos títulos de anticorpos (STEVENS et al, 1988), principalmente os anticorpos específicos da classe IgM anti-PGL-1, associado com a depressão da imunidade celular, e anti-LAM (FOSS, 1997). A IL-4 pode contribuir para o aumento de anticorpos anti-PGL-1 nesses pacientes, pelo seu papel na diferenciação das classe de imunoglobulinas de células B, bem como sua habilidade para estimular proliferação das células Th2 (SIELING et al, 1993). O *M. leprae* parece induzir a produção de IL-10, o qual inibe a proliferação de células T e a liberação de citocinas com propriedades antibacterianas (SIELING & MODLIN, 1994).

Além das imunoglobulinas do tipo IgM, o aumento de IgG sérica na hanseníase é condizente com o observado em outras infecções crônicas, nas quais o sistema imunológico se encontra sujeito a estímulo constante e por tempo prolongado (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Mesmo no pólo tuberculóide, são encontradas imunoglobulinas específicas, embora em baixas concentrações (BUHRER-SEKULA et al, 1998; MOURA et al, 2008).

Alguns autores postulam que as diferentes subpopulações de linfócitos T seriam ativadas por epítomos específicos do *M. leprae* (MEHRA et al, 1992). Dessa forma, alguns componentes desse patógeno poderiam desempenhar um importante papel no desenvolvimento de uma resposta protetora mediada por células. Recentemente, foram feitos progressos na busca de antígenos que possuem um potencial imunogênico promissor para desenvolver a imunidade protetora no hospedeiro (DUTHIE et al, 2008), podendo ser utilizado como possíveis unidades vacinais. E, ainda, aumentou-se a possibilidade de encontrar antígenos específicos do *M. leprae* que permitam um diagnóstico precoce nas formas paucibacilares (DUTHIE et al, 2007a; DUTHIE et al, 2008).

1.4 Diagnóstico da Hanseníase e Tecnologias Pós-Genômicas.

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico, realizado por meio da análise da história e condições de vida do paciente e do exame dermatoneurológico, para identificar lesões ou áreas da pele com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos: sensitivo, motor e/ou autonômico (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A baciloscopia da pele é o exame complementar mais importante na hanseníase para identificar o agente causal, permitindo a classificação dos casos em paucibacilares ou multibacilares. Dessa forma, pacientes com baciloscopia positiva são classificados como MB, independentemente do número de lesões. Entretanto, o exame baciloscópico apresenta baixa sensibilidade, especialmente nas formas paucibacilares (ILA, 2002) e para sua execução, faz-se necessária infra-estrutura laboratorial e profissionais capacitados (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Existe, portanto, a necessidade de utilizar testes complementares que permitam um diagnóstico mais acurado, com alta sensibilidade e especificidade, que possam auxiliar no diagnóstico precoce da doença. Nesse contexto, destaca-se a padronização de testes que possam revelar os casos subclínicos e permitam o acompanhamento de contatos intradomiciliares, importantes para o entendimento do perfil epidemiológico da hanseníase. Para isso, a utilização de antígenos específicos do *M. leprae*, que possam ser utilizados em testes sorológicos, tem sido alvo de pesquisas.

A elucidação da estrutura química do glicolípido PGL-1, específico do *M. leprae* (HUNTER & BRENNAN, 1981) e a comprovação da sua antigenicidade (PAYNE et al, 1982), possibilitaram grandes inovações na pesquisa em hanseníase (MOURA et al, 2008), uma vez que esse componente antigênico tem sido explorado no sorodiagnóstico por ELISA e ML-Flow (MOET et al, 2004).

O ML Flow é um teste imunocromatográfico que detecta anticorpos IgM contra PGL-1 e, por refletir a carga bacilar, auxilia na classificação operacional dos pacientes em paucibacilares ou multibacilares, para fins de tratamento. Trata-se de um teste simples, de baixo custo e fácil execução, que pode ser usado diretamente pelos profissionais de saúde, não necessitando de laboratório e equipamentos. Os reagentes

são altamente estáveis e podem ser armazenados em temperatura ambiente (BUHRER-SEKULA et al, 2003).

O uso do PGL-1 como antígeno para o teste de ELISA pode ser validado como um método para detecção de novos casos de hanseníase e para um diagnóstico precoce da infecção subclínica, uma vez que estes anticorpos refletem um sinal precoce de estimulação antigênica (STEFANI et al, 1998; ZENHA & FOSS, 2009). Além disso, existe uma correlação significativa entre os anticorpos IgM anti-PGL-1 e o índice baciloscópico (BI), indicando que o anti-PGL-1 IgM reflete o total da carga bacilar dos pacientes com hanseníase e, portanto, pode ser útil para o monitoramento da resposta do paciente à quimioterapia anti-hansênica (CHO et al, 1983; BURGESS et al, 1988).

Entretanto, ainda que anticorpos contra PGL-1 estejam presentes em mais de 90% de pacientes virchovianos não tratados, somente um pequeno número de pacientes paucibacilares são reativos, por apresentarem baixa concentração de anticorpos específicos circulantes (MOET et al, 2004). Dessa forma, os casos paucibacilares, assim como na baciloscopia, podem apresentar resultados negativos mesmo com diagnóstico clínico de hanseníase.

Vários grupos têm utilizado procedimentos pós-genômicos para a descoberta de novos antígenos que possam ser utilizados no diagnóstico da hanseníase ou como unidades vacinais (SPENCER et al, 2004; SPENCER et al, 2005; REECE et al, 2006; ARAOZ et al, 2006, DUTHIE et al, 2008). Estes estudos têm explorado sequências de genes do *M. leprae* para a identificação de proteínas ou peptídeos que possam ser adequados ao sorodiagnóstico das diferentes formas clínicas da hanseníase.

Antes da decodificação do genoma do *M. leprae*, a disponibilidade de novos antígenos era limitada, principalmente devido ao fato do bacilo não ser cultivável em cultura axênica (STEFANI, 2008). Entretanto, com a publicação da sequência completa do genoma dessa micobactéria, em 2001 (COLE et al, 2001), novas possibilidades foram sendo descobertas.

A análise da sequência completa do *M. leprae* revelou uma redução dramática de seus genes funcionais quando comparado ao genoma de *M. tuberculosis* (EIGLMEIER et al, 2001), resultando na eliminação de várias vias metabólicas importantes, o que justifica o habitat intracelular e a incapacidade do cultivo *in vitro* desse patógeno (COLE et al, 2001). A genômica e a proteômica comparativa revelaram que dos 1.614 genes presentes no *M. leprae*, 1429 são comuns ao *M. tuberculosis*, restando 165

proteínas que parecem ser específicas do *M. leprae* (STEFANI, 2008). Essas proteínas, em conjunto com antígenos não protéicos, como o PGL-1, parecem ser promissoras para o diagnóstico da hanseníase.

Diversos antígenos em potencial já foram caracterizados, como proteínas reguladoras, de membrana, chaperonas e de transporte (OLIVEIRA, 2007). Os antígenos ML0405, ML2331 e ML2055, sendo os dois primeiros de função previamente desconhecida e o último uma proteína de membrana, foram identificados, apresentando alta reatividade com anticorpos em soro de pacientes multibacilares virchovianos e dimorfo-virchovianos não tratados (REECE et al, 2006). Os mesmos antígenos ML0405 e ML2331 foram reconhecidos em soros de diversas regiões: Filipinas, Brasil e Japão (DUTHIE et al, 2007a). As proteínas ML0308 e ML2498, uma proteína hipotética conservada e uma enoil-CoA hidratase, respectivamente, revelaram uma imunogenicidade humoral e celular acentuadas, apresentando-se como fortes candidatas para diagnóstico tanto da hanseníase tuberculóide como virchoviana (ARAÓZ et al, 2006).

As ferramentas de bioinformática e análise de genômica comparativa também estão sendo utilizadas para o mapeamento *in silico* de alvos antigênicos importantes, tanto de *M. leprae* como de outras micobactérias. Esse tipo de análise foi utilizada para definir um grupo de 50 potenciais antígenos em micobactérias, sendo que alguns deles parecem ser restritos a *M. leprae*, classificados como classe I (ARAÓZ et al, 2006).

Muitos antígenos da parede de *M. leprae* pertencem à família das proteínas de choque térmico-HSP, tendo interesse especial como antígenos as proteínas de 18, 65 e 70 kDa (MISTRY et al, 1992; MUSTAFA et al, 1993). No hospedeiro em condições de estresse, os microrganismos produzem proteínas de choque térmico e, por isso, elas são com frequência o alvo antigênico dominante para a imunidade celular e humoral (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A tecnologia dos microarranjos representa uma outra estratégia para identificar novos antígenos com valor diagnóstico. Arranjos com proteínas isoladas da parede celular ou da membrana do *M. leprae* ou com proteínas recombinantes identificaram diferentes padrões de resposta imune humoral entre pacientes tuberculóides e virchovianos (GROATHOUSE et al, 2006).

Por outro lado, vem sendo desenvolvido estudos que permitam a avaliação da resposta imune celular, especialmente utilizando antígenos que tenham a capacidade de

induzir *in vitro* a produção de citocinas em células T, especialmente IFN γ , visto que os pacientes paucibacilares desenvolvem forte resposta imune celular ao *M. leprae*.

A avaliação da imunogenicidade de 17 proteínas recombinantes em células mononucleares de sangue periférico de 127 brasileiros evidenciou que cinco antígenos (ML0576, ML1989, ML1990, ML2283 e ML2567) induziram de forma significativa a produção de IFN γ em pacientes paucibacilares, pacientes com episódios reacionais e controles saudáveis, mas não houve indução da citocina na maioria dos pacientes multibacilares, em pacientes com tuberculose ou controles endêmicos (GELUK et al, 2005).

Além de proteínas recombinantes, vários peptídeos sintéticos derivados de proteínas específicas e imunogênicas do *M. leprae* também já foram testados em pacientes com hanseníase e controles (SPENCER et al, 2005; GELUK et al, 2008). As proteínas recombinantes induzem concentrações mais altas de IFN γ do que os peptídeos sintéticos, entretanto aumentam as chances de reatividade cruzada (GELUK et al, 2005).

Com o bom mapeamento dos epítomos de proteínas imunogênicas, será possível entender detalhadamente a resposta imune frente ao *M. leprae* e, principalmente, promover um adequado direcionamento no desenvolvimento de testes imunodiagnósticos e/ou vacinas.

1.5 Hanseníase e *Phage display*

A tecnologia de *phage display* (SMITH, 1985) tem apresentado um grande impacto na imunologia, biologia celular, descoberta de fármacos, vacinas e testes diagnósticos em geral, sendo uma ferramenta muito útil em caracterizações antigênicas, por permitir uma rápida identificação e caracterização de peptídeos ligantes para uma variedade de moléculas, como por exemplo, as imunoglobulinas, que estão envolvidas diretamente na resposta imune a agentes infecciosos (BLANK et al, 1999). Pode ser utilizada para revelar os diversos tipos de interações que existem entre antígeno-anticorpo, definir possíveis epítomos para anticorpos monoclonais, e selecionar substratos para enzimas (KAY et al, 1996).

Essa tecnologia é baseada no uso de um fago filamentososo (M13), um bacteriófago que infecta bactérias gram negativas, como *Escherichia coli*. A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica

constituída por cinco proteínas: pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX conforme ilustrado na figura 1 (HOUSHMAND et al, 1999).

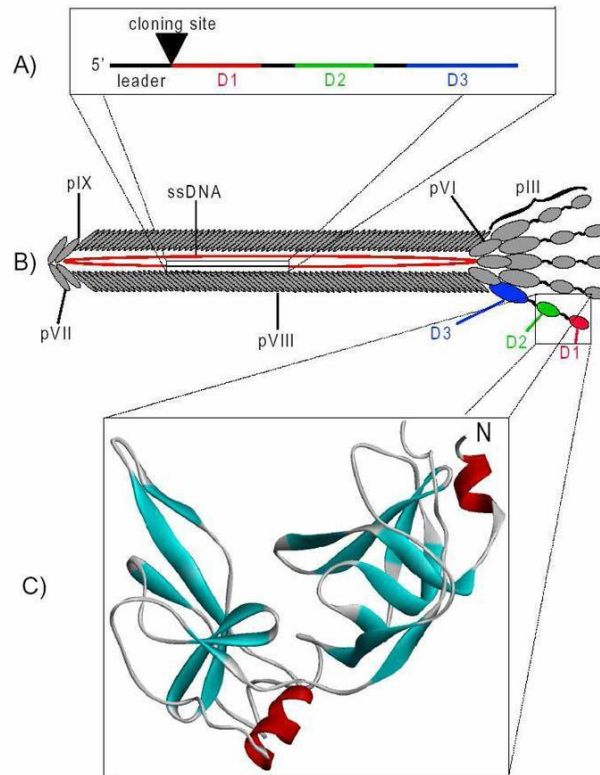


Figura 1: Fago filamentosso. A) Composição do gene III, mostrando o sítio de ligação de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX; C) Cristalografia dos domínios D1 e D2 da proteína III (HOLLIGER & WILLIAMS, 1999).

A técnica utiliza o princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície desses bacteriófagos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressado fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína endógena, pIII ou pVIII (BARBAS et al, 2001), enquanto seu material genético permanece no interior do fago (BENHAR, 2001).

A perfeita exposição de um peptídeo na superfície do fago possibilita a sua atuação como um ligante, uma enzima, um imunógeno ou desempenhando qualquer

outra atividade em processos biológicos. A inserção de oligonucleotídeos degenerados e subsequente construção de bibliotecas de peptídeos tornam possível a seleção de proteínas com atividades ou afinidades específicas (MAKOWSKI, 1994).

Esta ligação entre o genótipo e fenótipo permite o enriquecimento de fagos específicos, por exemplo, usando a seleção por um alvo imobilizado. Dessa forma, fagos que exibem um ligante que seja relevante são retidos em virtude de sua ligação com o alvo, enquanto que os fagos não-aderentes são lavados (BENHAR, 2001). Esse processo de seleção é feito artificialmente e denominado *biopanning*, no qual a molécula alvo é imobilizada em um suporte sólido, geralmente uma placa de ELISA, mas também podem ser utilizados *beads*, resinas ou membranas (Figura 2).

O fato do fago M13 ter a capacidade de infectar *E. coli*, pela ligação da pIII ao *pilus* F da célula bacteriana (AZZAZY & HIGHSMITH, 2002), é utilizado para recuperar os fagos ligados ao alvo pela amplificação em *E. coli* (BARBAS et al, 2001). As novas partículas de fago são montadas no espaço periplasmático da bactéria (BENHAR, 2001). O gene *lacZ* no bacteriófago M13 permite a distinção entre colônias bacterianas infectadas com fagos que carregam sequências exógenas, representadas pela coloração azul, e colônias não infectadas por partículas virais que permanecem brancas (MESSING, 1983).

Outra característica importante é que essa metodologia utiliza os mais rápidos protocolos de seleção já descritos, uma vez que o sobrenadante das culturas infectadas pode ser utilizado diretamente para a seleção. Esta utilização dispensa a transferência para membranas que, além de limitar o número de clones, é um processo extremamente trabalhoso (BRÍGIDO & MARANHÃO, 2002).

Muitos trabalhos foram desenvolvidos utilizando a tecnologia de *phage display* para o estudo de micobactérias. Na área da veterinária, essa tecnologia foi empregada no desenvolvimento de anticorpos de cadeia única (scFv), com especificidade contra determinantes de superfície em *M. avium* subsp. *paratuberculosis* com potencial diagnóstico na paratuberculose ou doença de Johne (BERGER et al, 2006; BERGER et al, 2007).

Um estudo demonstrou que peptídeos miméticos de antígenos conhecidos e desconhecidos, isolados por *phage display*, teriam aplicações potenciais em áreas como o diagnóstico e imunoterapia da tuberculose (SHARMA et al, 2006). Utilizando a mesma técnica foram encontrados peptídeos miméticos de glicoproteínas de superfície

celular importante na resposta imunológica contra o *M. tuberculosis* (GEVORKIAN et al, 2005).

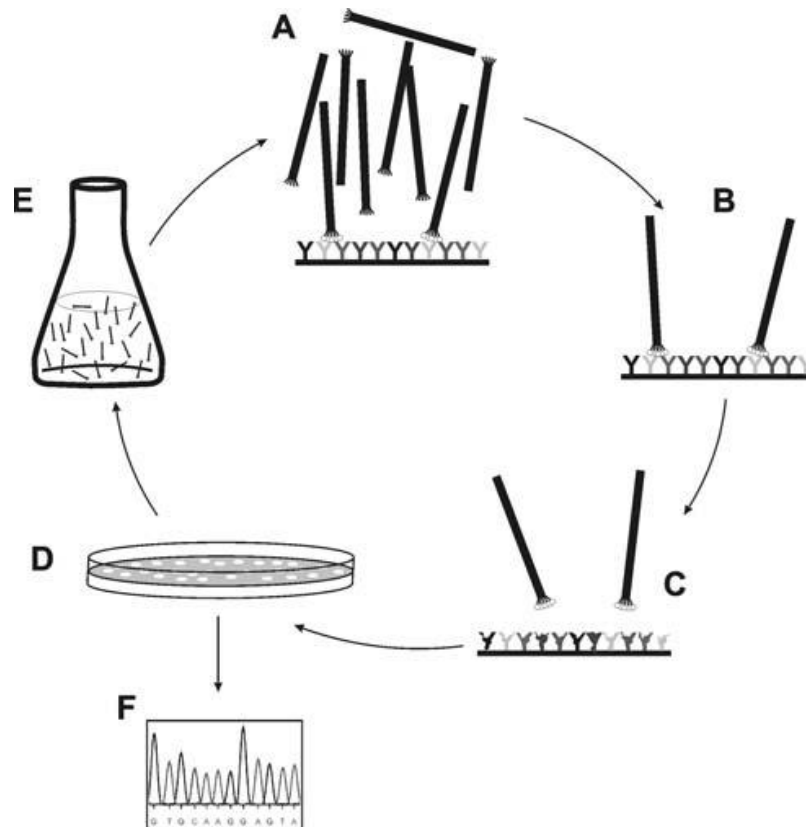


Figura 2: Esquema representativo do processo de “biopanning”: (A) a biblioteca de fagos é incubada com um alvo imobilizado; (B) fagos não ligantes são lavados; (C) os fagos ligantes são eluídos; (D) fagos eluídos são semeados em bactérias; (E) amplificados em meio líquido e submetido a novas rodadas de seleção *in vitro*; (F) sequenciamento dos fagos ligantes. Retirado de BRATKOVIC, 2010.

O trabalho de Barenholz et al (2007) descreve um peptídeo mimético do complexo lipoglicano ManLAM (lipo arabinomanana manosilada), principal componente do *M. tuberculosis*, com potencial promissor para o diagnóstico clínico da tuberculose.

O trabalho de Oliveira (2007) descreve a obtenção de quatro peptídeos específicos de *M. leprae*, sendo dois para o pólo virchoviano e dois para o tuberculóide, ambos selecionados por IgM de pacientes com hanseníase, que podem ser úteis no desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas.

A utilização de novos antígenos imunodominantes que pudessem diferenciar entre exposição e infecção precoce tornariam possível identificar comunicantes suscetíveis entre os contatos domiciliares, diferenciando os portadores saudáveis, delimitando grupos-alvo com maior risco de desenvolver a doença, o que representa uma nova estratégia de prevenção. Além disso, o aprimoramento do diagnóstico da hanseníase auxiliaria em uma classificação clínica correta e tratamento adequado, evitando recidivas e controlando os focos de infecção.

Com a caracterização antigênica do *M. leprae*, frente a um quadro com múltiplas manifestações clínicas e imunológicas, será possível entender mais detalhadamente a evolução da doença e, principalmente, promover um adequado direcionamento no desenvolvimento de um diagnóstico mais preciso e/ou desenvolvimento de unidades vacinais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Selecionar e validar peptídeos miméticos funcionais de antígenos do *Mycobacterium leprae* com IgG total purificada de pacientes com hanseníase utilizando a tecnologia de *phage display*.

2.2 Objetivos Específicos

I- Caracterizar peptídeos miméticos de antígenos do *M. leprae* reativos contra IgG total purificada de pacientes com hanseníase, tanto da forma tuberculóide quanto da forma virchoviana.

II- Verificar a reatividade dos clones obtidos contra imunoglobulinas IgG em soros individuais de pacientes com hanseníase tuberculóide e virchoviana, bem como de contatos intradomiciliares.

III- Verificar a sensibilidade e especificidade de imunoensaios com os peptídeos testados em soros individuais de pacientes com hanseníase tuberculóide e virchoviana, bem como de contatos intradomiciliares.

IV- Comparar as sequências dos peptídeos com as proteínas de *M. leprae* disponíveis em bancos protéicos *online*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

O presente trabalho faz parte de um projeto multicêntrico, financiado pelo CNPq, que envolve pesquisadores da Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal de Uberlândia e Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, e tem como finalidade utilizar tecnologias moleculares, imunológicas e de geoprocessamento para a caracterização epidemiológica, diagnóstico e monitoramento da hanseníase em área hiperendêmica do Maranhão, contemplando em um de seus objetivos a Validação de Novos Marcadores Sorológicos de Risco de Adoecimento utilizando a tecnologia de *phage display*. O mesmo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (processo nº 23.115-003005/2009-36) da Universidade Federal do Maranhão, onde se concentra as atividades principais do estudo.

A estratégia utilizada no estudo compreendeu etapas específicas: 1- Seleção e caracterização dos peptídeos miméticos no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia; 2- Pré-validação dos peptídeos, utilizando testes sorológicos, em pacientes atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase da Universidade Federal de Uberlândia; 3- Validação dos peptídeos por testes sorológicos, utilizando soros individuais de pacientes e contatos (Figura 3).

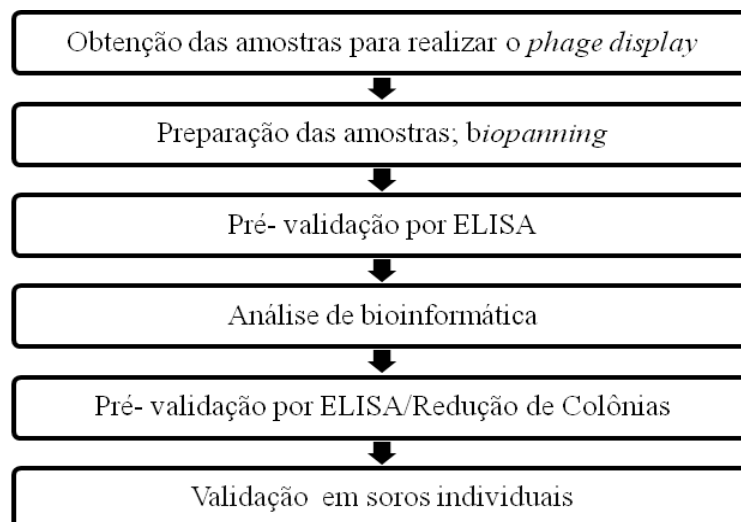


Figura 3: Delineamento experimental do estudo.

3.2 Obtenção e seleção das amostras

Para realização do *biopanning* foram utilizadas amostras de soro de 20 pacientes com hanseníase, sendo 10 tuberculóides (TT) e 10 virchovianos (VV), além de 10 contatos

intradomiciliares (CT) sadios como grupo controle. Todos foram atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU), em suas duas Unidades, Ambulatório Central e Centro de Saúde- Escola (CSE) - Jaraguá.

Tabela 1: Grupo de pacientes e contatos, com suas respectivas formas clínicas e os resultados para os testes ML-Flow, ELISA PGL-1, Mitsuda, Índice Baciloscópico e BCG.

GRUPO	FC ⁴	ÍNDICE				
		ML-FLOW	ELISA	MITSUUDA	IB ⁵	BCG ⁶
VV ¹	VV	++++	21,9	0	5,1	NA ⁷
	VV	++++	11,4	0	6	NA
	VV	++++	9	0	5,3	NA
	VV	++++	14,6	0	4,4	NA
	VV	++++	21,5	0	4,3	NA
	VV	++++	9,8	0	4,0	NA
	VV	++++	9,0	0	5,28	NA
	VV	++++	16,8	0	6,0	NA
	VV	++++	11,4	0	6,0	NA
	VV	++++	21,9	0	5,1	NA
TT ²	TT	0	0,7	12	0	NA
	TT	0	0,7	10	0	NA
	TT	0	0,6	12	0	NA
	TT	0	0,7	10	0	NA
	TT	0	0,4	8	0	NA
	TT	0	1	9	0	NA
	TT	0	1,6	12	0	NA
	TT	0	0,3	7	0	NA
	TT	0	0,5	6	0	NA
	TT	0	0,3	7	0	NA
CT ³ Sadios	Contato de TT	0	0,7	8	NA	3*
	Contato de TT	0	0,7	9	NA	1
	Contato de TT	0	0,4	9	NA	1
	Contato de TT	0	0,8	11	NA	1
	Contato de TT	0	0,6	9	NA	1
	Contato de TT	0	0,7	12	NA	0
	Contato de TT	0	0,8	17	NA	2
	Contato de TT	0	0,7	12	NA	2
	Contato de TT	0	0,2	11	NA	1

¹VV- Virchoviano; ²TT- Tuberculóide; ³CT- Controles; ⁴FC- Forma Clínica, ⁵IB- Índice Baciloscópico, ⁶BCG- Bacillus Calmette-Guérin; ⁷NA- Não Avaliado; * Número de marcas da vacina BCG.

Os pacientes foram submetidos a um protocolo clínico-laboratorial para diagnóstico e classificação da hanseníase, seguindo os critérios de Ridley & Jopling (1966) incluindo a realização dos testes: Mitsuda, ML-Flow, ELISA para PGL-1, índice baciloscópico de esfregaço cutâneo e biópsias das lesões para exame histopatológico. Os contatos também foram acompanhados, verificando-se a quantidade de marcas da vacina BCG, como recomendado pelo Ministério de Saúde do Brasil, além da realização de exames complementares como ML-FLOW, ELISA para PGL-1 e Mitsuda (Tabela 1). Foram considerados para formar o grupo controle, portanto, somente contatos que apresentassem ELISA e ML-FLOW negativos, com Mitsuda superior a oito milímetros.

3.3 Seleção dos peptídeos recombinantes

3.3.1 Purificação de IgG

A purificação de IgG total dos pacientes com hanseníase tuberculóide, virchoviana e os controles foi realizada utilizando uma suspensão salina de resina anti-IgG humana-cadeia γ específica com capacidade de ligação de 2 mg/mL. A resina foi lavada com TBS-tween 0,1% sendo “peletizada” por centrifugação. Em seguida, o *pool* de soro, diluído em TBS-tween 0,1%, foi adicionado à resina pré-lavada e incubado em temperatura ambiente por 2 horas.

A mistura (resina+soro) foi lavada com TBS-Tween 0,1 % para remoção de produtos não ligantes. As IgGs ligadas à resina foram eluídas com tampão glicina (0,1 M pH 2,2 1,0 mg/mL BSA), recuperadas e neutralizadas com tampão Tris (1,0 M pH 9,1).

Para quantificação das amostras foi utilizado espectrofotômetro com filtro para luz de 280 nm. O cálculo da concentração para cada IgG purificada foi realizado a partir da seguinte fórmula: concentração de IgG= leitura de absorbância a 280 nm / 11,8 (coeficiente de extinção para IgG a 280 nm).

3.3.2 *Biopanning* líquido (seleção de fagos)

Para seleção dos peptídeos miméticos foi utilizada uma biblioteca Ph.D.-C7C™ (NEW ENGLAND BioLabs® Inc.) de peptídeos randômicos fusionados à proteína pIII de bacteriófagos filamentosos M13. A biblioteca consiste de 7 aminoácidos randômicos entre duas sequências espaçadoras curtas fusionados à região N-terminal da proteína III (pIII) de bacteriófagos M13. Todas as cinco cópias da pIII dos fagos continham peptídeos recombinantes.

Foram realizados dois *biopanning*, sendo um com IgG de pacientes do pólo tuberculóide e outro com IgG de pacientes do pólo virchoviano, utilizando como estratégia uma subtração negativa, onde a biblioteca de fagos era exposta ao *pool* de IgGs purificadas do grupo controle, seguida de uma seleção positiva, no qual os fagos que não se ligaram nas IgGs dos controles eram expostos às IgGs de pacientes tuberculóides ou virchovianos (Figura 4).

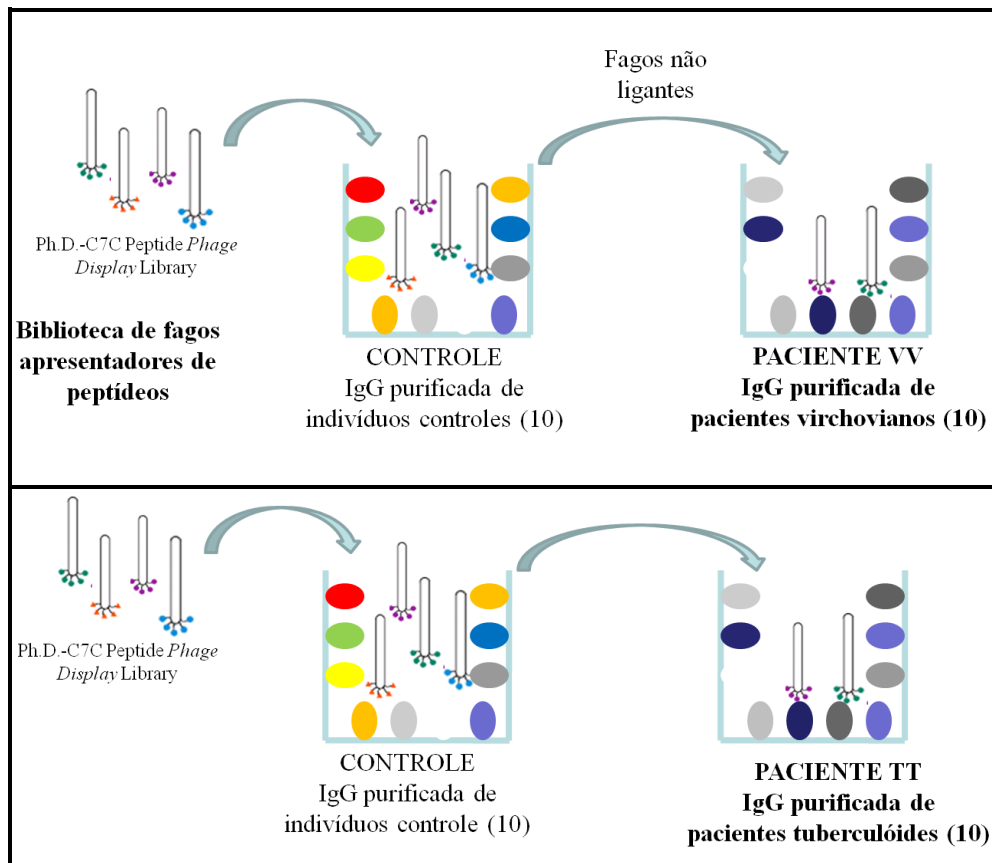


Figura 4: Delineamento para realização do *biopanning* com IgGs purificadas de pacientes com Hanseníase tuberculóide e virchoviana. OBS: Esquema ilustrativo de *biopanning* em placas.

Foram realizados cinco ciclos de seleção de fagos com anticorpos humanos (IgG total), onde a biblioteca de fagos Ph. D.-C7C foi utilizada em *biopanning* líquido com resina anti-IgG humana-cadeia γ específica, a mesma utilizada para purificação das IgGs, seguindo as instruções do fabricante e o protocolo descrito por Barbas et al (2001).

Inicialmente, a resina foi lavada 1 vez com TBS-tween 0,1% e bloqueada por 1 hora em tampão bicarbonato (0,1M NaHCO_3 pH 8,6; 5,0 mg/mL de BSA) a uma temperatura de 4°C. A resina bloqueada foi, então, lavada 4 vezes com TBS-tween 0,1%. Uma quantidade de

300 ng do anticorpo purificado de cada grupo foi incubado em TBS-tween 0,1% com $1,2 \times 10^{10}$ pfu da biblioteca de fagos Ph.D.-C7C no primeiro ciclo de seleção e nos ciclos subsequentes com partículas de fagos amplificados obtidas no ciclo anterior.

A mistura fago-anticorpo foi transferida para o tubo contendo a resina bloqueada e lavada, incubando-os por 15 minutos em temperatura ambiente. Os fagos não ligantes foram removidos por dez lavagens com TBS-tween 0,1% no primeiro ciclo de seleção e nos ciclos subsequentes com TBS-tween 0,5%. Os fagos ligantes foram eluídos com tampão glicina (0,2 M, pH 2,2; 1 mg/mL de BSA) até o 3º ciclo de seleção. A partir do 4º ciclo, os fagos foram eluídos (eluição competitiva) com Mitsudina, uma suspensão de bacilos do *M. leprae* mortos pelo calor (12×10^4 do bacilo em 500 μ L de TBS), por incubação de 1 hora, com inversões do tubo a cada 5 minutos. A resina foi precipitada e o sobrenadante recuperado foi neutralizado com Tris-HCl (1 M, pH 9,1). Algumas alíquotas do eluato de fagos recuperado foram armazenadas para serem utilizadas na titulação e o restante foi amplificado.

Os fagos recuperados em cada ciclo, não amplificados e amplificados, foram titulados em cultura de *Escherichia coli* ER2738 com o intuito de acompanhar o enriquecimento dos fagos selecionados durante os ciclos de seleção. Os clones individuais dos eluatos não amplificados do 5º ciclo foram usados para processo de amplificação, extração e sequenciamento do DNA de cada fago selecionado.

3.3.3 Titulações

Os eluatos foram submetidos a diluições seriadas exponenciais (log10) crescentes em meio LB, sendo as diluições de 10^{-1} até 10^{-4} para eluatos não amplificados e de 10^{-8} a 10^{-11} para eluatos amplificados. A cada diluição foram acrescidos 200 μ L da cultura de *E. coli* ER2738 na fase *mid-log* ($OD_{600} \sim 0,5$). Após a infecção, a cultura foi transferida para tubos contendo 3mL de Ágar-Top (10g de Bacto-Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 7g de agarose normal, 1 g de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ / litro) e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG (0,5 mM) / Xgal (40 μ g/mL) e tetraciclina (20 mg/mL). Para cada diluição foi confeccionada uma placa. As placas foram incubadas à 37°C por 16 horas. Após este período, as colônias que se apresentavam azuis e bem individualizadas foram contadas manualmente. Para estimar os valores dos títulos, multiplicou-se o número total de colônias pelo fator de diluição em cada placa.

3.3.4 Amplificação e purificação de fagos.

Para a amplificação, distribuiu-se 1 mL da cultura de *E. coli* ER2738 em fase *early-log* ($OD_{600nm} \sim 0,3$) em cada poço de uma placa *Deepwell*. Com palitos de dente esterilizados, colônias azuis foram retiradas da placa de Petri (ciclos não-amplificados) e transferidas para a *Deepwell*. A cada poço foi adicionado apenas uma colônia de fago, totalizando 96 colônias em cada *Deepwell*. A placa foi vedada e incubada por 5 horas sob agitação a 37°C.

Após a incubação, a placa foi centrifugada por 20 minutos a 2250 g, transferindo o sobrenadante para outra *Deepwell*. A esta segunda placa foi adicionado PEG/NaCl (um sexto do volume total do sobrenadante), sendo incubada por 14 horas a 4°C. Após esse tempo a placa foi centrifugada por 1 hora, o sobrenadante foi dispensado e o precipitado foi ressuspendido em PBS 1X (0,15M de salina tamponada com fosfato).

3.3.5 Extração de DNA

Na extração de DNA dos fagos, colônias azuis provenientes do 5º ciclo de seleção (eluato não-amplificado), foram transferidas para placas *Deepwell* contendo cultura de *E. coli* ER2738, sendo então incubadas. Após o tempo de incubação, seguiram-se os mesmos procedimentos da amplificação (descrito no item 3.3.4) até a última centrifugação de 1 hora, onde foi acrescentado ao precipitado tampão iodeto (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1mM de EDTA e 4 M de NaI). As placas foram agitadas vigorosamente e, em seguida, adicionou-se etanol absoluto. Após uma incubação de 10 minutos, as placas foram centrifugadas (2250 g, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado.

O precipitado de DNA foi lavado com 500 µL de etanol a 70% e recentrifugado. Finalmente, o DNA foi diluído em 20 µL de água ultrapura e sua qualidade foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8% corado com solução de brometo de etídeo (10 mg/mL).

3.3.6 Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com 500 ng de DNA molde dos fagos selecionados no *biopanning*, 5 pmol do *primer*- 96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e o *pré-mix* (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit.- Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos ocorreu em um termociclador de placas nas seguintes

condições: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 58°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 60 segundos.

Os amplicons gerados da reação de sequenciamento foram precipitados com 1 µL de acetato de amônio e 27,5 µL de etanol absoluto. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 2432 g e o sobrenadante descartado. Adicionou-se ao *pellet* 150 µL de etanol a 70%, centrifugando-o por 10 minutos, a 2432 g, descartando posteriormente o sobrenadante. A placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi centrifugada a 486 g, durante 1 minuto. Em seguida, a placa foi coberta com papel alumínio, ficando assim por cinco minutos para evaporar o etanol remanescente. O precipitado resultante foi ressuspenso no tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. - Amersham Biosciences) e a leitura foi realizada em um sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

3.4 Bioinformática

A dedução *in silico* das sequências de aminoácidos foi realizada pelo programa DNA2PRO12, que é designado para dedução de sequências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs* (Ph.D.-12TM ou Ph.D.-C7CTM) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as sequências inicial e final do vetor. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica os possíveis erros na tradução (tais como códons inesperados ou erros na sequência próxima). As sequências que não puderam ser traduzidas pelo programa foram analisadas manualmente.

As similaridades entre os peptídeos selecionados para as duas formas clínicas foram testadas utilizando o programa CLUSTAL W versão 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Os peptídeos foram alinhados com proteínas depositadas no NCBI/BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que consta de um conjunto de programas que buscam similaridades entre diferentes sequências. O alinhamento das sequências investigadas foi realizada com o bancos de dados de ácidos nucleicos e/ou proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Dentro do BLAST a busca foi realizada no “*Protein blast*” utilizando como database o “*swissprot protein sequence (swissprot)*”, algoritmo - blastp (*protein BLAST*) e a pesquisa foi restrita ao *M. leprae* (taxid: 1769). Para obter informações detalhadas sobre as proteínas que alinharam com os peptídeos selecionados foi utilizado o banco de dados UniProtKB Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/>).

Para identificar possíveis epítomos antigênicos lineares foi utilizado o programa Bepipred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/bepipred>), visando avaliar se os alinhamentos fornecidos pelo programa blast predizem com uma possível região estimuladora na produção de anticorpos. O programa usa métodos que utilizam uma escala de tendências como estrutura secundária, hidrofobicidade, acessibilidade, randomicidade, dando valores para cada aminoácido.

A estratégia de testar o alinhamento dos peptídeos com proteínas específicas do *M. leprae* também foi realizada utilizando o programa *Pepsurf* (MAYROSE et al, 2007). Este programa tem como entrada um conjunto de proteínas no formato PDB. O algoritmo procura agrupar um subconjunto dos peptídeos para identificar uma região na proteína alvo que potencialmente é mimetizada por aquele grupo de peptídeos específicos.

3.5 Pré-validação com ELISA

Nos ensaios de ELISA para a pré-validação, foram utilizados uma mistura (*pools*) com 10 soros de pacientes tuberculóides, virchovianos ou controles. A seleção dos soros para formação dos *pools* atendeu os mesmos critérios para selecionar os soros utilizados no *biopanning* (item 3.2). Todos os fagos foram testados em duplicata.

No primeiro ensaio de ELISA testaram-se os fagos selecionados com soros específicos. Assim, clones de TT foram testados com soros de pacientes tuberculóides e clones de VV com soros de virchovianos. Posteriormente, os clones mais reativos obtidos a partir do 1º ensaio foram testados com soros das duas formas clínicas: tuberculóides, virchovianos e também com os contatos, a fim de verificar a especificidade dos clones para a forma clínica ao qual foram selecionados.

No ensaio de ELISA, placas de microtitulação (Polysorp™) foram sensibilizadas com 1 µg/poço de anticorpo anti-M13 diluído em tampão carbonato (50mM; pH 9,6) sendo incubado por 16 horas a 4°C. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas três vezes com TBS-Tween 0,5% e bloqueadas por 1 hora em tampão de bloqueio (TBS suplementado com 5% de leite em pó desnatado) em temperatura de 37°C.

As placas foram lavadas por seis vezes com TBS-Tween 0,5% e incubadas por 1 hora a 37°C com 50 µL/poço de sobrenadante dos fagos. Como controles da reação, foram utilizados o fago selvagem (fago que não expressa nenhuma proteína exógena) e meio de cultura sem fago em alguns poços da placa. Posteriormente, as placas foram novamente

lavadas por seis vezes com TBS-Tween 0,5% e incubadas a 37°C por 1 hora com a mistura de soros de pacientes ou contatos na concentração de 1:100, diluídos em TBS 0,5% suplementado com 5% de leite desnatado.

Após este período, as placas foram lavadas seis vezes e incubadas com anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma/Aldrich), diluído 1:5000 em TBS suplementado com 5% de leite em pó desnatado por 1 hora a 37°C. Depois desse período de incubação, as placas foram novamente lavadas e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição do tampão orto-fenilenodiamina na concentração de 1 mg/mL. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico a 4N.

A reatividade foi medida pelos valores de absorvância obtidos em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA*) com leitura no comprimento de onda de 492 nm.

3.6 Validação dos peptídeos

3.6.1 Validação por ELISA com soros individuais

A validação com soros individuais foi realizada somente com os 4 fagos mais reativos, sendo 2 para forma tuberculóide (T03 e T04) e 2 para forma virchoviana (V06 e V13). Todos os fagos foram testados em triplicata.

Para verificar a reatividade, os clones V06 e V13 foram testados com 76 soros de pacientes não tratados, sendo 38 da forma tuberculóides e 38 virchoviana, além de 38 soros do grupo controle. Já os fagos T03 e T04 foram testados com 54 soros de pacientes, sendo 27 da forma TT e 27 pacientes VV, além de 27 controles.

O procedimento experimental foi o mesmo seguido na pré-validação (descrito no item 3.5), com exceção da adição dos fagos purificados (entrada com 10^{10} partículas de fagos/ μ L) e dos soros, onde não foi utilizado misturas de soros, e sim amostras individuais de pacientes e contatos.

3.6.2 Teste de bloqueio da pIII (redução de colônias)

O teste de redução de colônias proposto por Yang & Shiuan (2003) baseia-se na neutralização da proteína pIII presente nos fagos pela adição do soro contendo anticorpos que se ligam aos peptídeos expressos na região da pIII, impedindo assim que os bacteriófagos consigam infectar *E. coli*.

Os clones foram diluídos (1 µL de fago em 9 µL de meio de cultura LB) até o fator que correspondesse à formação de aproximadamente 500 colônias azuis, havendo uma variação de 10^{-6} a 10^{-8} entre os fagos testados (T03, T04 e V06). Um volume de 10 µL da diluição foi misturado com 8 uL dos soros (misturas de 10 soros) de pacientes e controles, nas diluições de 1:8 e 1:256 e incubados por 1 hora a uma temperatura de 37°C.

Após esse intervalo, a mistura fago-soro foi utilizada para infectar 200 µL de cultura de *E. coli* ER2738 em fase *early-log* ($OD_{600nm} \sim 0,5$), por incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. A cultura foi misturada com 3 mL de Ágar-Top, plaqueada em meio LB sólido contendo IPTG/Xgal e incubada a 37°C durante a noite.

As colônias de fagos produzidas em cada placa foram contadas e comparadas com uma placa controle, onde foi realizada uma titulação normal do fago sem a incubação com soro, de forma que a possível redução fosse demonstrada.

3.7 Análise estatística

Para verificar se houve diferenças estatisticamente significativas na reatividade dos fagos, avaliados pelo ELISA, comparando os soros de controles com os soros de pacientes tuberculóides e virchovianos, foi utilizado o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni, com intervalo de confiança de 95%.

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar diferenças entre os índices de positividade para os fagos T03, T04, V06, V13 testados com soros individuais. O mesmo teste também foi utilizado para medir a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e *odds ratio* nesses fagos.

O valor de corte, *cut off*, foi calculado a partir da equação que considera a média de absorbância do fago selvagem (bacteriófago controle que não expressa em sua superfície os polipeptídeos inseridos em proteínas endógenas), testados em triplicata, mais duas vezes o desvio padrão desses valores (*cut off* = Média + 2X Desvio padrão do fago selvagem). Os valores de absorbância que estavam acima do *cut off* foram considerados como positivos e abaixo desse valor foram considerados como negativos.

Todas as análises e gráficos foram realizados pelo software estatístico *GraphPad Prism* 4.0, assumindo-se que exista significância estatística quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Biopanning

Após os 5 ciclos de seleção, foram obtidas duas placas, a primeira contendo 96 clones selecionados contra IgG purificada de pacientes com hanseníase tuberculóide e a outra com 96 clones selecionados contra IgG de pacientes virchovianos.

A titulação dos eluatos amplificados e não amplificados, a partir do 3º ciclo de seleção, foi utilizada para estimar a quantidade de fagos selecionados nos três últimos ciclos (Tabela 2). Os títulos de entrada dos fagos durante a seleção foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade pela IgG do soro ficam ligados a estas por interação peptídeo/anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem nenhuma afinidade foram removidos durante as lavagens.

Tabela 2: Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a IgG purificada de pacientes com hanseníase tuberculóide e virchoviana. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade. TT- Tuberculóide; VV- Virchoviano.

Ciclos	Número de partículas de fago	
	Entrada	Saída
TT		
3º Ciclo	2×10^{11}	$5,6 \times 10^{10}$
4º Ciclo	2×10^{11}	$7,2 \times 10^4$
5º Ciclo	2×10^{11}	$1,18 \times 10^4$
VV		
3º Ciclo	2×10^{11}	$7,0 \times 10^{10}$
4º Ciclo	2×10^{11}	$3,8 \times 10^5$
5º Ciclo	2×10^{11}	$5,2 \times 10^5$

4.2 Pré-validação antes do sequenciamento.

Inicialmente a reatividade dos fagos foi testada pelo ensaio de ELISA, onde os clones eram expostos contra os soros específicos da forma clínica para o qual foram selecionados, apresentando os resultados expostos nas Tabelas 3 e 4. Os fagos mais reativos que tiveram valor de absorvância superior ao *cut off* (0, 112) estão destacados em cinza nas tabelas.

Tabela 3: ELISA com clones selecionados contra soros de pacientes com a forma tuberculóide da hanseníase sendo testado com pool de soros de pacientes tuberculóides.

	ABS		ABS		ABS		ABS
A1	0,413	C1	0,144	E1	0,170	G1	0,100
A2	0,485	C2	0,128	E2	0,128	G2	0,114
A3	0,405	C3	0,250	E3	0,127	G3	0,102
A4	0,183	C4	0,152	E4	0,113	G4	0,237
A5	0,285	C5	0,135	E5	0,147	G5	0,106
A6	0,179	C6	0,203	E6	0,072	G6	0,113
A7	0,186	C7	0,140	E7	0,108	G7	0,107
A8	0,172	C8	0,091	E8	0,096	G8	0,125
A9	0,092	C9	0,085	E9	0,095	G9	0,026
A10	0,138	C10	0,107	E10	0,102	G10	0,217
A11	0,277	C11	0,191	E11	0,163	G11	0,089
A12	0,189	C12	0,110	E12	0,094	G12	0,024
B1	0,167	D1	0,148	F1	0,098	H1	0,073
B2	0,207	D2	0,085	F2	0,145	H2	0,141
B3	0,395	D3	0,107	F3	0,124	H3	0,081
B4	0,178	D4	0,088	F4	0,088	H4	0,058
B5	0,180	D5	0,132	F5	0,117	H5	0,074
B6	0,148	D6	0,197	F6	0,100	H6	0,060
B7	0,163	D7	0,118	F7	0,100	H7	0,050
B8	0,254	D8	0,149	F8	0,072	H8	0,057
B9	0,113	D9	0,095	F9	0,053	H9	0,058
B10	0,276	D10	0,204	F10	0,126	H10	0,076
B11	0,137	D11	0,238	F11	0,184	H11	0,207
B12	0,141	D12	0,136	F12	0,075	H12	0,038

ABS: absorvância medida no comprimento de onda de 492 nm. Os valores de absorvância destacados em cinza foram superiores ao *cut off* = 0,112.

Tabela 4: ELISA com clones selecionados contra soros de pacientes com a forma virchoviana da hanseníase sendo testado com pool de soros de pacientes virchovianos.

	ABS		ABS		ABS		ABS
a1	0,149	c1	0,601	e1	0,552	g1	0,420
a2	0,102	c2	0,437	e2	0,255	g2	0,413
a3	0,355	c3	0,067	e3	0,362	g3	0,379
a4	0,410	c4	0,187	e4	0,592	g4	0,193
a5	0,277	c5	0,316	e5	0,068	g5	0,314
a6	0,312	c6	0,276	e6	0,193	g6	0,066
a7	0,083	c7	0,526	e7	0,109	g7	0,305
a8	0,219	c8	0,088	e8	0,151	g8	0,161
a9	0,210	c9	0,197	e9	0,029	g9	0,135
a10	0,067	c10	0,219	e10	0,076	g10	0,293
a11	0,202	c11	0,108	e11	0,164	g11	0,216
a12	0,195	c12	0,047	e12	0,045	g12	0,044
b1	0,420	d1	0,516	f1	0,127	h1	0,400
b2	0,342	d2	0,501	f2	0,185	h2	0,363
b3	0,213	d3	0,082	f3	0,353	h3	0,392
b4	0,414	d4	0,194	f4	0,304	h4	0,184
b5	0,164	d5	0,186	f5	0,474	h5	0,362
b6	0,334	d6	0,086	f6	0,187	h6	0,091
b7	0,084	d7	0,173	f7	0,271	h7	0,321
b8	0,146	d8	0,167	f8	0,145	h8	0,156
b9	0,099	d9	0,163	f9	0,296	h9	0,087
b10	0,201	d10	0,087	f10	0,082	h10	0,130
b11	0,227	d11	0,042	f11	0,123	h11	0,046
b12	0,079	d12	0,299	f12	0,038	h12	0,015

ABS: absorvância medida no comprimento de onda de 492 nm. Os valores de absorvância destacados em cinza foram superiores ao *cut off* = 0,112.

Os fagos mais reativos no primeiro teste ELISA foram então expostos aos soros de pacientes tuberculóides, virchovianos e controles. Foi observado que dos 28 clones de tuberculóides testados, apenas os fagos A3, A11, B3, B10, D11 reagiram mais com soros de pacientes tuberculóides em relação aos virchovianos e controles (Tabela 5). Todos os outros tiveram absorvâncias maiores com soros de pacientes virchovianos, não sendo,

portanto bons marcadores para diferenciação da forma clínica da doença. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado a reatividade com soro de tuberculóides e virchovianos em relação aos controles em nenhum dos clones selecionados para a forma tuberculóide.

Tabela 5: Resultado do teste ELISA, com valores de absorbância, para os clones selecionados da forma tuberculóide e virchoviana submetidos a três tipos de soros diferentes.

Clones contra IgG de pacientes tuberculóides				Clones contra IgG de pacientes virchovianos			
Clones	Soro TT ¹	Soro VV ²	Soro CT ³	Clones	Soro TT ¹	Soro VV ²	Soro CT ³
A1	0,051	0,083	0,075	a3	0,029	0,225**	0,014
A2	0,110	0,092	0,101	a4	0,065	0,254***	0,017
A3	0,092	0,079	0,050	a6	0,038	0,132	0,000
A4	0,018	0,039	0,048	b1	0,042	0,146	0,003
A5	0,022	0,041	0,036	b2	0,028	0,098	0,000
A6	0,020	0,070	0,047	b4	0,042	0,155	0,020
A7	0,033	0,075	0,062	b6	0,042	0,172	0,027
A8	0,050	0,104	0,073	c1	0,034	0,172	0,024
A11	0,087	0,065	0,067	c2	0,062	0,244**	0,036
A12	0,046	0,064	0,078	c5	0,075	0,279***	0,048
B1	0,000	0,055	0,054	c7	0,052	0,325***	0,025
B2	0,018	0,051	0,052	d1	0,036	0,243**	0,019
B3	0,081	0,053	0,056	d2	0,056	0,216*	0,024
B4	0,021	0,061	0,044	e1	0,044	0,303***	0,047
B5	0,026	0,040	0,051	e3	0,041	0,119	0,033
B10	0,118	0,080	0,068	e4	0,034	0,232**	0,033
B7	0,035	0,062	0,082	f3	0,059	0,289***	0,037
B8	0,096	0,095	0,073	f4	0,077	0,330***	0,048
C3	0,063	0,087	0,038	f5	0,056	0,231**	0,029
C6	0,028	0,043	0,053	f9	0,041	0,302***	0,020
C11	0,031	0,043	0,039	g1	0,037	0,185	0,038
D6	0,038	0,055	0,034	g2	0,031	0,194	0,084
D10	0,035	0,052	0,092	g3	0,028	0,127	0,066
D11	0,112	0,094	0,075	g5	0,022	0,194	0,051
E1	0,039	0,017	0,062	g7	0,066	0,207	0,060
F11	0,048	0,076	0,086	h1	0,049	0,212	0,065
G4	0,060	0,080	0,061	h2	0,014	0,200	0,072
H11	0,080	0,067	0,088	h3	0,006	0,171	0,040
				h5	0,003	0,212	0,087
				h7	0,012	0,187	0,049

¹ Soro TT: Soro de tuberculóide; ² Soro VV: Soro de virchoviano; ³ Soro CT: Soro de controle.
* p< 0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 pelo Teste ANOVA 2 critérios com pós teste de Bonferroni quando se comparou diferenças estatisticamente significativas entre a reatividades dos clones com pools (mistura) de soros de virchovianos e controles. Todos os outros clones também foram testados, porém não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Por outro lado, entre os clones selecionados para forma virchoviana, 100% reagiram mais com o soro específico de sua seleção, havendo diferença estatisticamente significativa quando se comparou os soros de virchovianos e controles nos fagos destacados na Tabela 5.

Com os resultados obtidos nessa pré-validação, os 48 clones mais reativos de cada forma clínica (Tabela 3, 4 e 5) foram selecionados para o sequenciamento.

4.3 Sequenciamento dos fagos.

Dos 48 clones sequenciados para cada forma clínica obteve-se 37 sequências válidas (não tiveram erros durante o sequenciamento) para os clones selecionados contra soros de pacientes vichorvianos e 40 para os clones contra soros de pacientes tuberculóide, sendo as sequências YSTTLSY, TALFPWL e GIENAIM as mais frequentes entre os clones para forma tuberculóide e KVLPVHA entre os clones para forma virchoviana (Tabela 6 e 7). Não houve nenhum peptídeo que fosse comum às duas formas clínicas.

Tabela 6: Relação dos peptídeos obtidos contra IgG purificada de pacientes tuberculóides após o sequenciamento.

Peptídeos da placa Tuberculóide		
Clone	Sequência	Frequencia*
T01	GIENAIM	8/40
T02	QLHLNFT	4/40
T03	TALFPWL	10/40
T04	YSTT LSY	9/40
T05	LPPMRVS	2/40
T06	LQRPVPA	1/40
T07	MRLVDPP	1/40
T08	SPCRVCL	1/40
T09	LRLIDWP	1/40
T10	LDRPIPT	1/40
T11	GIEHASY	1/40
T12	NPVETLL	1/40

*Frequencia: Número de clones com a sequência/ Total de sequências válidas.

Das sequências consideradas válidas, somente 17 entre os peptídeos selecionados para forma virchoviana e 12 para forma tuberculóide eram diferentes (Tabela 6 e 7). Essa redução no número final de sequências deve-se ao fato que diferentes clones apresentaram os mesmos aminoácidos, por isso os fagos foram renomeados, sendo que os de sequência idêntica foram agrupados como um único clone. Os clones A3, A11, B3, B10, D11 para forma tuberculóide, que foram os mais específicos durante a pré-validação apresentavam, por exemplo, uma mesma sequência YSTTLSY (T04).

Tabela 7: Relação dos peptídeos obtidos contra IgG purificada de pacientes virchovianos após o sequenciamento.

Peptídeos da placa Vichorviana		
Clone	Sequência	Frequencia*
V01	GVSVCMR	1/37
V02	LQVSTGR	2/37
V03	APHDPAW	2/37
V04	HPPDPAW	1/37
V05	DLPCVMR	1/37
V06	YGVSGPT	2/37
V07	KPPNPKP	1/37
V08	NLQEFLF	1/37
V09	FSWDAML	1/37
V10	KVLPVHA	10/37
V11	QSAGSCL	1/37
V12	AVSGPTL	5/37
V13	YGCLGTT	1/37
V14	SPPDPAW	5/37
V15	GVSGPTY	1/37
V16	HRYASYV	1/37
V17	GVSGPTV	1/37

*Frequencia: Número de clones com a sequência/ Total de sequências válidas.

4.4 Análise de Bioinformática

O alinhamento das sequências obtidas pelo Clustal W é apresentado na Tabela 8. Os peptídeos obtidos na seleção para a forma tuberculóide não formaram consensos, entretanto as sequências obtidas para forma virchoviana apresentaram dois consensos principais envolvendo oito do total de 17 peptídeos encontrados.

Tabela 8: Alinhamento dos peptídeos para a forma virchoviana pelo programa Clustal W.

Clones	Alinhamento pelo Clustal W
VV01	<u>GV</u> <u>S</u> VCMR 7
VV13	Y <u>G</u> <u>C</u> L <u>G</u> T <u>T</u> 7
VV06	<u>Y</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>T</u> 7
VV15	<u>G</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>Y</u> 7
VV17	<u>G</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>V</u> 7
VV12	<u>A</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>L</u> 7
1° Consenso	YGVSGPT
VV04	<u>H</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>W</u> 7
VV14	<u>S</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>W</u> 7
VV03	<u>A</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>W</u> 7
2° Consenso	*P*DPAW
Peptídeos Sem Consenso	
VV07	KPPNPKP 7
VV02	LQVSTGR 7
VV08	NLQEFLLF 7
VV11	QSAGSCL 7
VV10	KVLPVHA 7
VV05	DLPCVMR 7
VV16	HRYASYV 7
VV09	FSWDAML 7

A identificação de possíveis epítomos lineares foi realizada pelo *BLAST*, com o banco de dados de sequências de proteínas *Swissprot* restrito a *M. leprae*. Todos os peptídeos obtidos no sequenciamento foram avaliados, entretanto, apenas os principais resultados encontrados para quatro peptídeos estão sendo apresentados no Quadro 1, sendo

dois da forma tuberculóide e dois da virchoviana, além da análise feita para o consenso obtido no alinhamento pelo Clustal W.

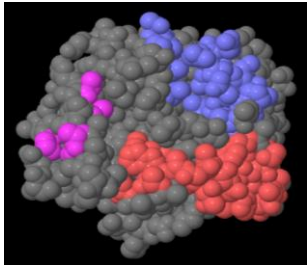
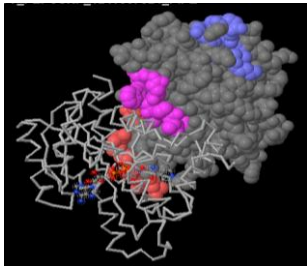
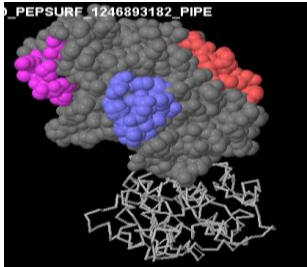
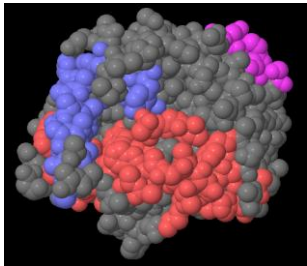
Foi observado que algumas sequências alinharam com proteínas de choque térmico, antígenos extracelulares conhecidos do *M. leprae* e proteínas de membrana. Os dados obtidos pelo programa Bepipred, demonstram que as regiões de alinhamento dos peptídeos coincidem com a predição feita por este programa para as possíveis regiões antigênicas dessas proteínas.

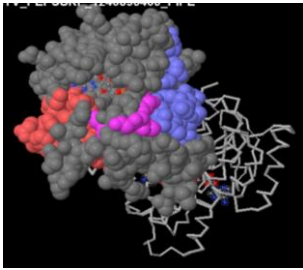
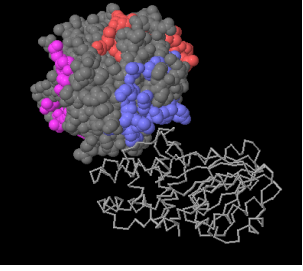
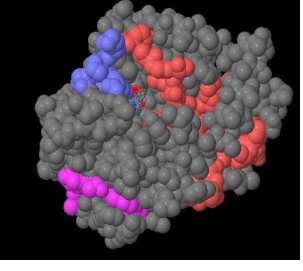
Quadro 1: Alinhamento das sequências e dos consensos, mostrando as similaridades encontradas com as proteínas anotadas no banco de dados do GeneBank pelo BLAST, com os números de acesso no Swissprot, o respectivo alinhamento, o valor do escore e a provável região antigênica das proteínas por bepipred.

Peptídeo/ Consenso	Proteína	Swissprot	Alinhamento	E- Value	Provável Região Antigênica
YGCLGTT (V13)	Proteína de choque térmico dnaK/ Antígeno HSP 70 kDa	P19993.5	Query 4 LGTT 7 Sbjct 9 LGTT 12	14.6	22 a 41
YGCLGTT (V13)	Chaperonas DNAJ 2	Q49762.1	Query 1 YGCLG 5 Sbjct 6 YGLLG 10	9.1	33 a 43
YGVSGPT (V06)	Proteína candidata de membrana mmpL11	O06079.1	Query 1 YGVS 4 Sbjct 117 YGVS 120	15.5	101 a 122
YGVSGPT (V06)	Antígeno MTB12 de baixo peso molecular	Q49771.2	Query 3 VSGP 6 Sbjct 130 VSGP 133	14.6	119 a 147
*P*DPAW	Antígeno 85-B/ Alfa- Antígeno extracelular/Ligante de Fibronectina	P31951.2	Query 2 PHDPAW 7 Sbjct 221 PNDPAW 226	21.4	210 a 226
*P*DPAW	Antígeno 85-C/ Fibronectin-binding protein C	Q05862.1	Query 4 DPAW 7 Sbjct 229 DPAW 232	18.0	213 a 239
*P*DPAW	Proteína candidata de membrana mmpL3	O06081.1	Query 4 DPAW 7 Sbjct 83 DPAW 86	18.0	77 a 93
YSTTLSY (T04)	Proteína candidata de membrana mmpL10	Q49619.1	Query 3 TTLS 6 Sbjct 809 TTLS 812	14.6	803 a 811
YSTTLSY (T04)	ATPase transportadora de Ca, com localização transmembrânica	P46839.2	Query 2 STTL 5 Sbjct 519 STTL 522	14.6	513 a 522
TALFPWL (T03)	Proteína não caracterizada ML0115	Q9CD99.1	Query 1 TALF 4 Sbjct 134 TALF 137	15.5	154 a 173

O quadro 2 mostra o alinhamento dos peptídeos com proteínas do *M. leprae* disponíveis no PDB (Protein Data Bank), ressaltando as funções das proteínas selecionadas e o mapeamento tridimensional das estruturas miméticas. As proteínas que tiveram alinhamento com os peptídeos foram algumas enzimas do *M. leprae*, especialmente transferases com localização citoplasmática.

Quadro 2: Mapeamento dos peptídeos em estruturas protéicas catalogadas no PDB.

Alinhamento dos peptídeos selecionados contra IgG de pacientes tuberculóides		
Estrutura protéica no PDB	Mapeamento tridimensional das estruturas miméticas	Peptídeos Alinhados
<p>Cód.: 2UYO- Cadeia A;</p> <p>Nome: Proteína hipotética do <i>M. leprae</i> ML2640;</p> <p>Função: Transferase;</p>		<p>Cluster 1 (em vermelho): TALFPWL; QLHLNFT; YSTTLSY; GIEHASY</p> <p>Cluster 2 (em azul): LQRPVPA; MRLVDPP LDRPIPT; NPVETLL</p> <p>Cluster 3 (em rosa): LRLIDWP</p>
<p>Cód.: 2NTV- Cadeia A;</p> <p>Nome: Enol-[ACP];</p> <p>Função: Redutase.</p>		<p>Cluster 1 (em vermelho): LPPMRVS; LQRPVPA; MRLVDPP LRLIDWP; LDRPIPT</p> <p>Cluster 2 (em azul): GIENAIM; NPVETLL</p> <p>Cluster 3 (em rosa): TALFPWL</p>
<p>Cód.: 2CKD- Cadeia A;</p> <p>Nome: Proteína hipotética do <i>M. leprae</i> ML2640;</p> <p>Função: Metiltransferase</p>		<p>Cluster 1 (em vermelho): GIENAIM; TALFPWL; LQRPVPA MRLVDPP; LRLIDWP; LDRPIPT</p> <p>Cluster 2 (em azul): QLHLNFT; YSTTLSY; GIEHASY</p> <p>Cluster 3 (em rosa): LPPMRVS; NPVETLL</p>
Alinhamento dos peptídeos selecionados contra IgG de pacientes virchovianos		
<p>Cód.: 2UYO- Cadeia A;</p> <p>Nome: Proteína hipotética do <i>M. leprae</i> ML2640;</p> <p>Função: Transferase;</p>		<p>Cluster 1 (em vermelho): GVSVCMR; LQVSTGR; KVLPVHA AVSGPTL; YGCLGTT; GVSGPTY HRYASYV</p> <p>Cluster 2 (em azul): APHDPAW; DLPCVMR; NLQEFLF; YGVSGPT</p> <p>Cluster 3 (em rosa): KPPNPKP; SPPDPAW</p>

Estrutura protéica no PDB	Mapeamento tridimensional das estruturas miméticas	Peptídeos Alinhados
<p>¹Cód.: 2NTV- Cadeia A;</p> <p>Nome: Enol-[ACP];</p> <p>Função: Redutase.</p>		<p>Cluster 1 (em vermelho): APHDPAW; YGVSGPT; FSWDAML KVLPVHA; AVSGPTL; SPPDPAW GVSNGTHY; HRYASYV; GVSNGTHV</p> <p>Cluster 2 (em azul): HPPDPAW; DLPCVMR; KPPNPKP</p> <p>Cluster 3 (em rosa): GVSVMR</p>
<p>Cód.: 2CKD- Cadeia A;</p> <p>Nome: Proteína hipotética do <i>M. leprae</i> ML2640;</p> <p>Função: Metiltransferase</p>		<p>Cluster 1 (em vermelho): GVSVMR; APHDPAW; HPPDPAW DLPCVMR; YGVSGPT; NLQEFLF FSWDAML; YGCLGTT</p> <p>Cluster 2 (em azul): LQVSTGR; QSAGSCL; GVSNGTHY HRYASYV; GVSNGTHV</p> <p>Cluster 3 (em rosa): KPPNPKP; AVSGPTL</p>
<p>Cód.: 2UYQ- Cadeia A;</p> <p>Nome: Estrutura cristalina de <i>M. leprae</i> ML2640;</p> <p>Função: Formar complexos com Adenosil metionina.</p>		<p>Cluster 1 (em vermelho): GVSVMR; LQVSTGR; APHDPAW DLPCVMR; YGVSGPT; FSWDAML AVSGPTL; YGCLGTT; HRYASYV GVSNGTHV</p> <p>Cluster 2 (em azul): HPPDPAW; KPPNPKP; SPPDPAW</p> <p>Cluster 3 (em rosa): QSAGSCL; GVSNGTHY</p>

*As sequencias destacadas em vermelho são dos peptídeos selecionados para validação com soros individuais;

¹Cód.: Código

4.5 Pré-validação após o sequenciamento

Para verificar a possibilidade de existir reação cruzada com soros de virchovianos e controles foi realizado o teste de ELISA com os 12 peptídeos da forma tuberculóide. Somente o clone T04 teve diferenças estatisticamente significativas quando se comparou a reatividade do mesmo com o *pool* de soros de tuberculóides, virchovianos e controles ($p < 0,01$) (Figura 5). É importante ressaltar que T04 tem a mesma sequência dos cinco clones mais reativos avaliados durante a pré-validação feita antes do sequenciamento (Tabela 5).

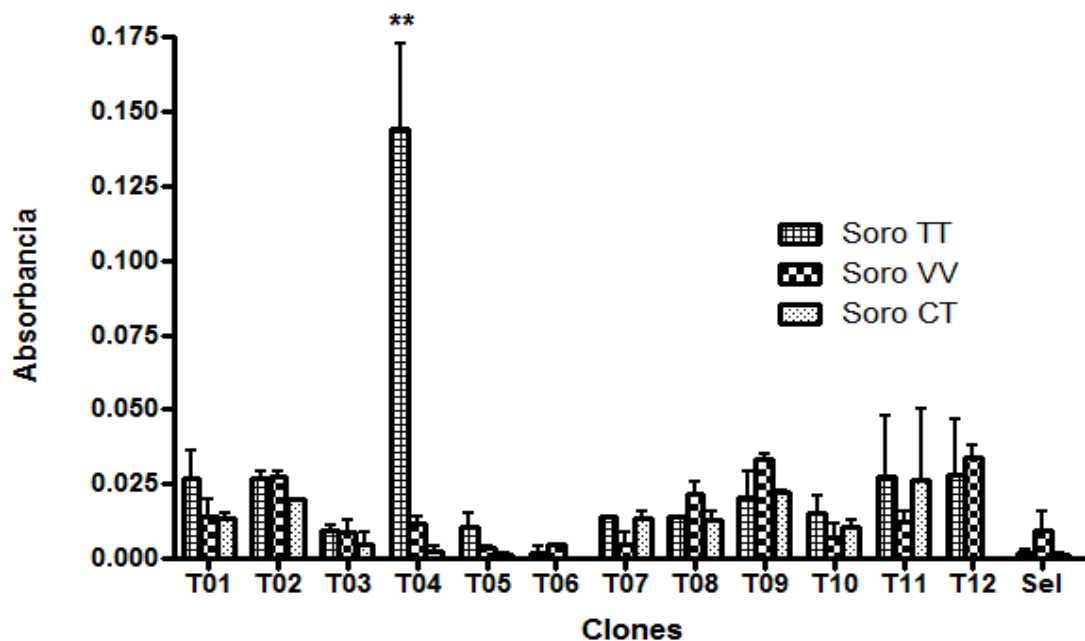


Figura 5: Média das absorvâncias mostrando a reatividade dos clones contra IgG purificada de pacientes com hanseníase Tuberculóide com *pools* de diferentes tipos de soros: tuberculóides - TT, virchovianos - VV e controles - CT. A escala no eixo y mostra a absorvância a 492 nm correspondente aos fagos ligantes. Os dados estão representados pela média \pm desvio padrão. ** significa valor de $p < 0,01$ avaliado pelo teste ANOVA com pós teste de Bonferroni, quando se comparou diferenças estatisticamente significativas entre as reatividades dos clones com soros de tuberculóides, virchovianos e controles.

Os peptídeos selecionados contra soros de pacientes da forma virchoviana foram mais reativos com *pool* de soros de pacientes com a mesma forma clínica para o qual foram selecionados. A figura 6 demonstra que dos 17 peptídeos selecionados, 16 apresentam absorvâncias superiores no *pool* (mistura) de soros virchovianos, quando comparados aos pacientes tuberculóides e controles.

Os clones V01, V06, V08, V09, V11, V12, V13, V14 apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando se comparou a reatividades desses peptídeos com

soros de virchovianos e controles. Dentre esses, os clones V06 e V13, além de terem sido os mais reativos, foram os que tiveram o menor desvio padrão entre as repetições das leituras de absorbância realizadas.

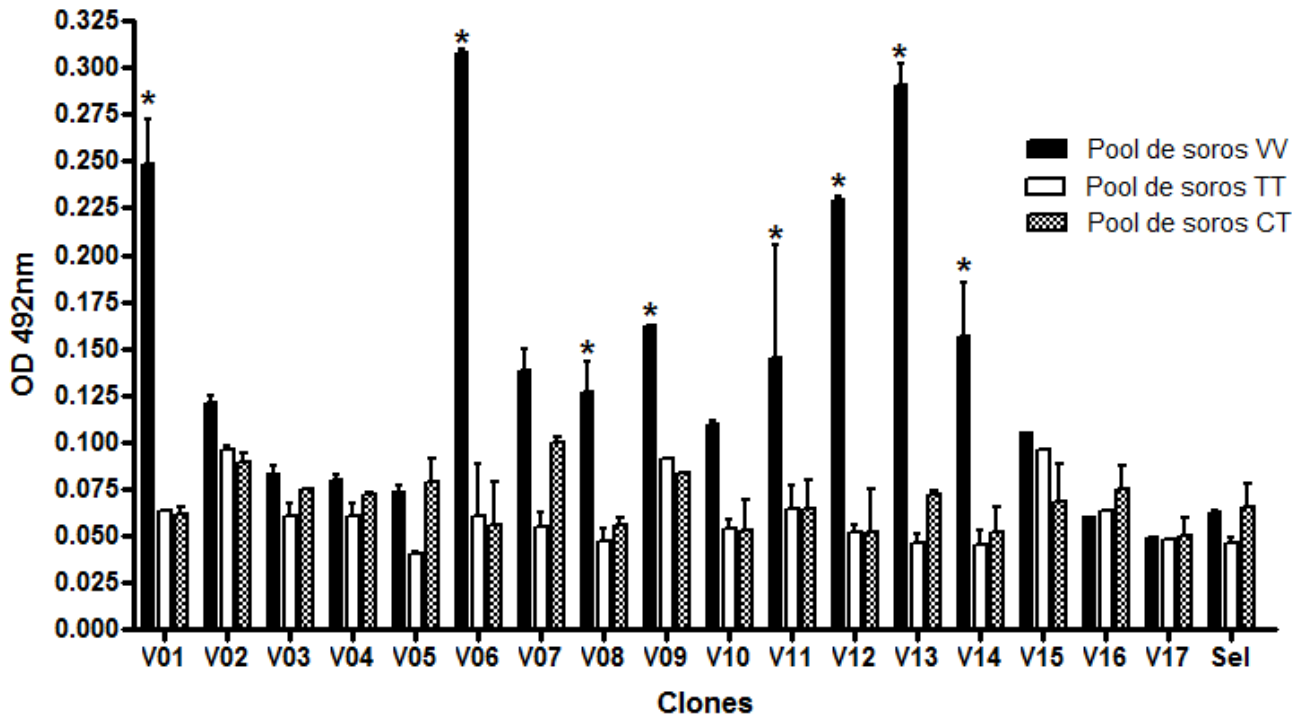


Figura 6: Média das absorbâncias mostrando a reatividade dos clones contra IgG purificada de pacientes com hanseníase virchoviana utilizando diferentes tipos de soros: tuberculóides - TT, virchovianos - VV e controles - CT. A escala no eixo y mostra a absorbância a 492 nm correspondente aos fagos ligantes. Os dados estão representados pela média das triplicadas \pm desvio padrão. **Valor de $p < 0,01$ pelo teste ANOVA com pós teste de Bonferroni quando se comparou diferenças estatisticamente significativas entre as reatividades dos clones com soros de virchovianos, tuberculóides e controles.

4.6 Validação com soros individuais

A partir da pré-validação foram selecionados dois clones de cada forma clínica. Entre os peptídeos da forma virchoviana foram escolhidos os clones V06 e V13 por terem sido os mais reativos. Entre os peptídeos da forma tuberculóide utilizou-se dois critérios, o clone T04 foi escolhido por ter sido o mais reativo e o clone T03 por ter sido o mais frequente.

Os peptídeos V06 e V13 foram reativos com soros de pacientes virchovianos, apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) ao compararmos aos soros de pacientes tuberculóides e controles. A média da absorbância foi de 0,26 e 0,31

com soros virchovianos, 0,09 e 0,093 com soros tuberculóides e de 0, 094 e 0, 083 em controles, respectivamente (Figura 7 e 8).

Em relação ao peptídeo V06, foi observado que, dos 38 soros de pacientes virchovianos testados, 36 foram positivos para o teste ELISA, enquanto que ao testar o mesmo clone com os soros de tuberculóides e contatos observou-se que apenas 1 soro foi positivo para o tuberculóide e nenhum entre os contatos (Tabela 9), isso representa uma sensibilidade de 94,7% e especificidade de 100,0% (Tabela 10).

Para o peptídeo V13, a positividade com os soros de virchovianos foi de 33 dos 38 soros testados. Entre os soros de controles não foi observado nenhuma positividade. A sensibilidade e especificidade desse clone foi de 86,8% e 100,0%, respectivamente para os soros de virchovianos (Tabela 9 e 10).

Tabela 9: Frequência de pacientes positivos para o teste ELISA nos quatro clones sobre o valor total de pacientes diagnosticados.

	T03* (Positivo/ total)	T04 (Positivo/ total)	V13* (Positivo/ total)	V06** (Positivo/ total)
Virchoviano	12/25	11/27	33/38	36/38
Tuberculóide	16/26	7/26	8/38	1/36
Controle	3/26	5/27	0/38	0/38

* valor de $p < 0,01$ pelo teste exato de Fisher para os clones com diferenças estatisticamente significativas entre a positividade tanto para os soros de virchovianos quanto tuberculóides em relação aos Controles; ** valor de $p < 0,01$ pelo teste exato de Fisher para os clones com diferenças estatisticamente significativas entre a positividade para os soros de virchovianos em relação aos controles.

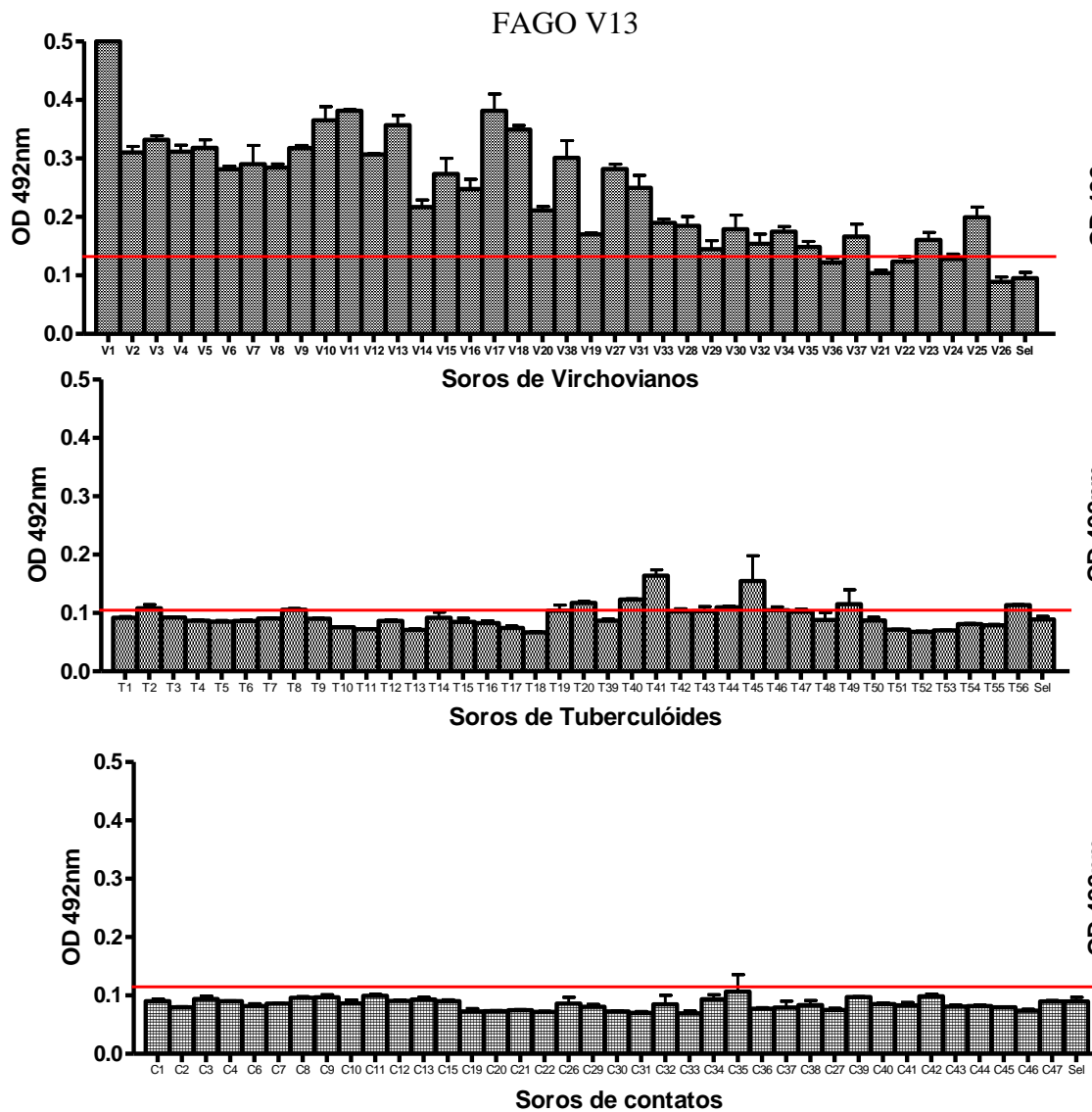


Figura 8: Reatividade de 38 soros de pacientes com hanseníase tuberculóide- TT, vichorviana- VV e controles- CT com o peptídeo V13. A linha em vermelho representa o valor do *cut off*. Valores acima dessa linha são considerados positivos e abaixo são negativos.

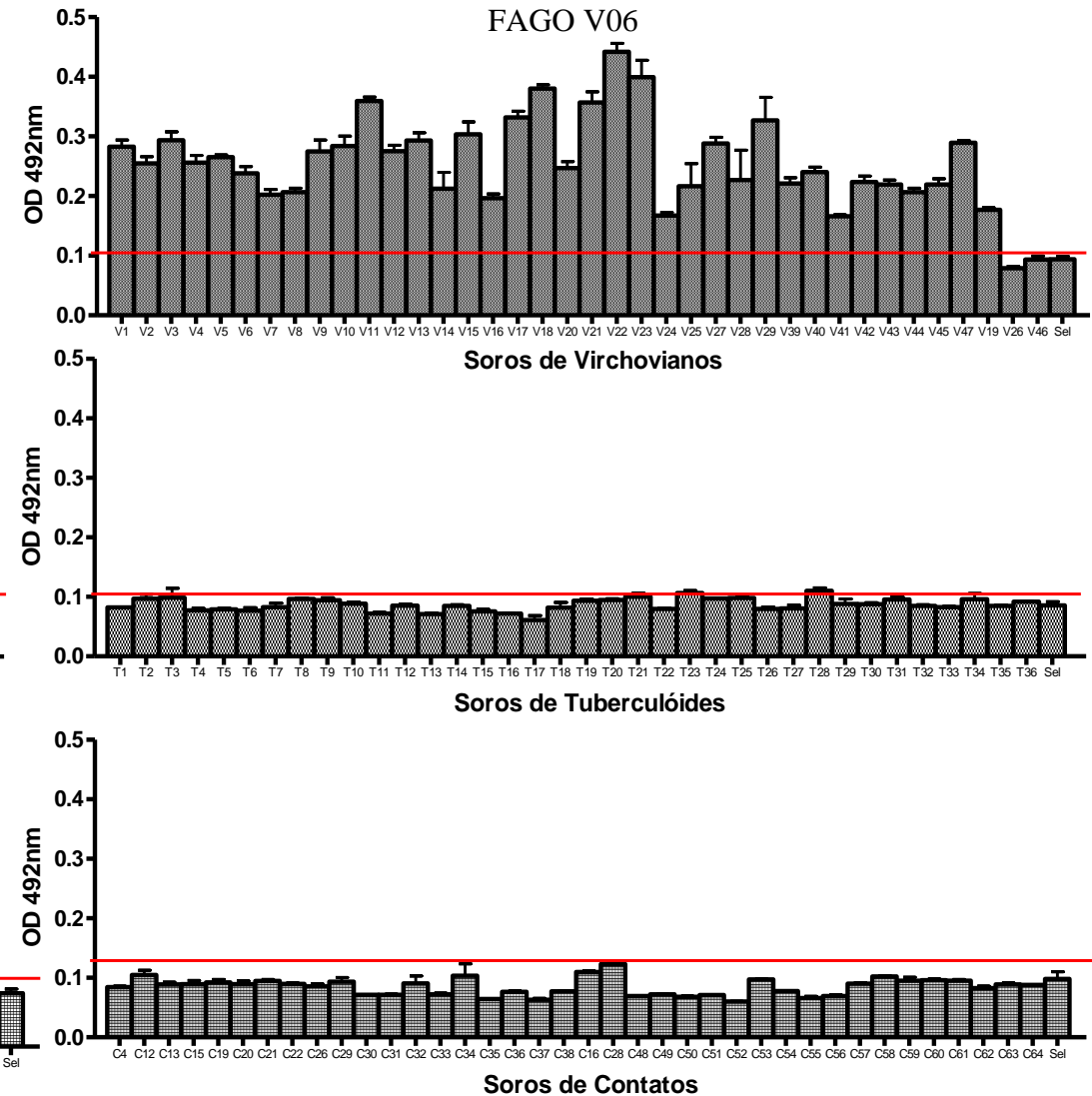


Figura 7: Reatividade de 38 soros de pacientes com hanseníase tuberculóide- TT, vichorviana- VV e controles- CT com o peptídeo V06. A linha em vermelho representa o valor do *cut off*. Valores acima dessa linha são considerados positivos e abaixo são negativos.

As figuras 9 e 10 apresentam a reatividade de 27 soros de pacientes tuberculóides, virchovianos e controles para os peptídeos T04 e T03. Entre os peptídeos da forma tuberculóide foi observado que com o clone T03 houve diferença estatisticamente significativa na positividade quando comparados tanto com os soros de tuberculóides quanto de virchovianos em relação ao controle. Por outro lado, para o peptídeo T04 essa diferença estatística não foi observada. Entretanto, é importante destacar que para esse clone a reatividade, medida pelo valor da absorbância, em alguns pacientes tuberculóides foi superior a 0,15 sendo, portanto superior que a média dos controles.

Dos 26 soros de pacientes tuberculóides testados com o peptídeo T03, 16 foram positivos. Com os soros de virchovianos e controles a positividade foi de 12/25 e 3/26 respectivamente. Dessa forma, a sensibilidade e especificidade desse clone com soros de tuberculóides foi 61,5% e 88,4%, respectivamente (Tabela 9 e 10).

O peptídeo T04 apresentou os menores valores de sensibilidade e especificidade, para os soros de tuberculóides a sensibilidade foi de 26,9% e especificidade de 81,5%, enquanto com os soros de virchovianos a sensibilidade foi de 40,7% (Tabela 10), isso se deve ao fato de que somente 7 dos 26 soros testados foram positivos entre os tuberculóides e 11 de 27 entre os virchovianos. Nos controles, 5 soros foram positivos, sendo estes contatos intradomiciliares de casos índices multibacilares (Tabela 9).

Tabela 10: Comparação de dados estatísticos epidemiológicos entre os peptídeos V06, V13, T03, T04 e os soros de pacientes virchovianos e tuberculóides.

	T03*	T04	V13*	V06**
	Virchov./ Tuberc. ¹	Virchov./ Tuberc. ¹	Virchov./ Tuberc. ¹	Virchov./ Tuberc. ¹
Risco Relativo	2,2/ 2,8	1,6/ 1,2	8,6/ 17,0	20,0/ 2,1
Odds Ratio	7,1/ 12,3	3,0/ 1,6	469,0/ 17,0	1124,0/ 3,2
Sensibilidade	48,0%/ 61,5%	40,7%/ 26,9%	86,8%/ 17,4%	94,7%/ 2,8%
Especificidade	88,5%/ 88,5%	81,5%/ 81,5%	100,0%/ 100,0%	100,0%/ 100,0%
VPP²	80,0%/ 84,2%	68,7%/ 58,3%	100,0%/ 100,0%	90,2%/ 100,0%
VPN³	63,9%/ 69,7%	57,9%/ 53,6%	88,4%/ 50,0%	95,0%/ 52, 0%

¹ Virchoviano/ Tuberculóide; ² VPP- Valor preditivo positivo; ³ VPN- Valor preditivo negativo; * valor de p< 0,01 pelo teste exato de Fisher para os clones com diferenças estatisticamente significativas entre a positividade tanto para os soros de virchovianos quanto tuberculóides em relação aos controles; ** valor de p< 0,01 pelo teste exato de Fisher para os clones com diferenças estatisticamente significativas entre a positividade para os soros de virchovianos em relação aos controles.

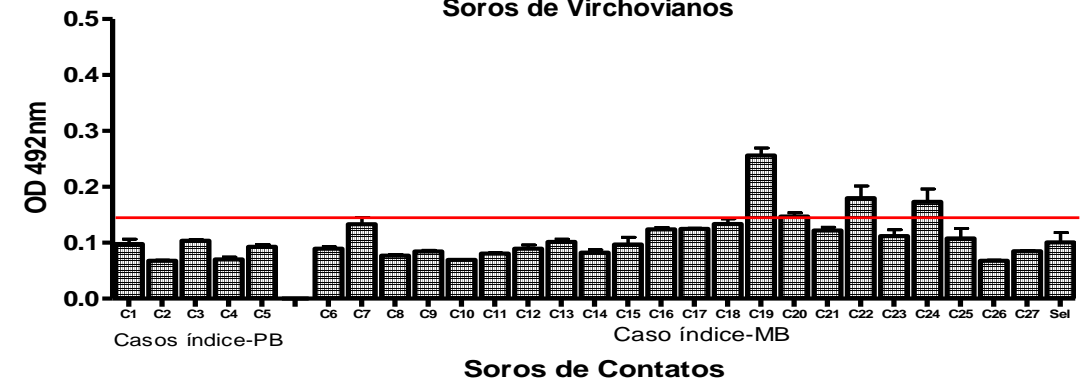
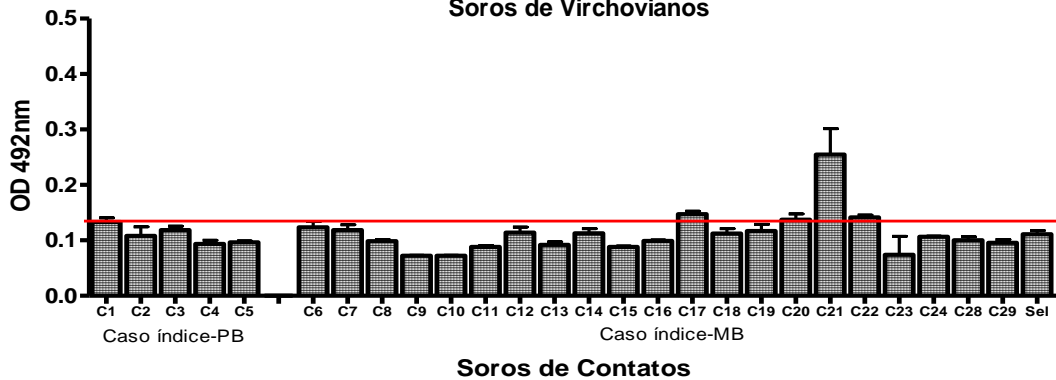
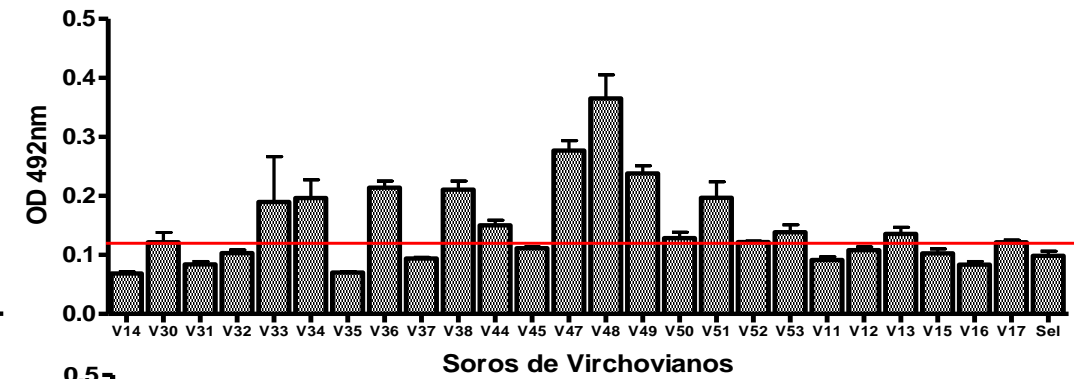
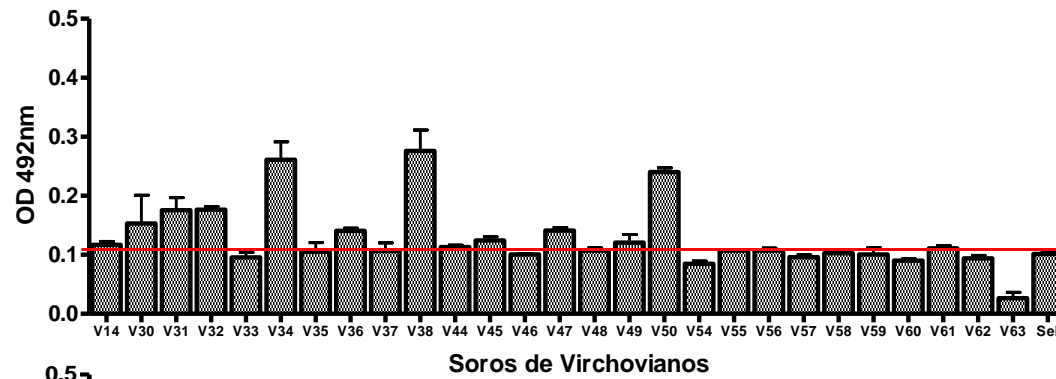
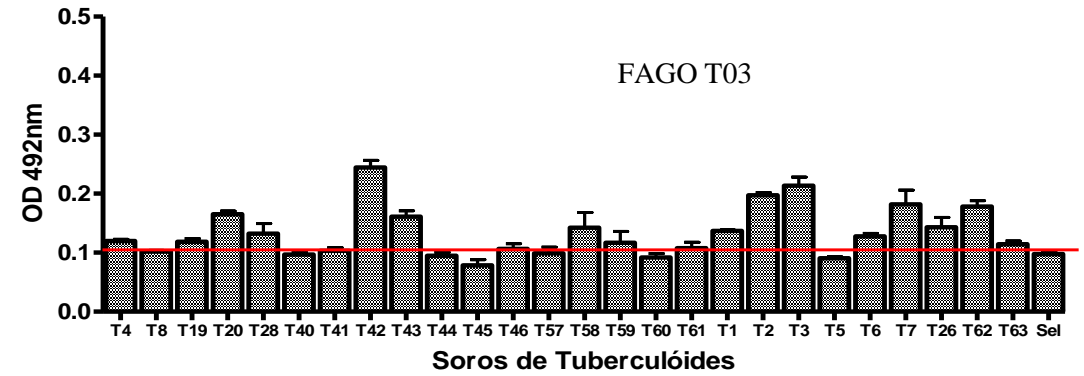
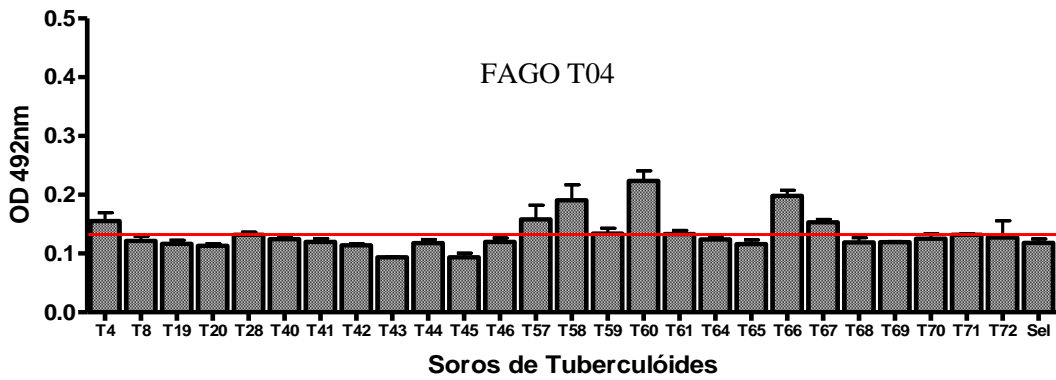


Figura 9: Reatividade de 27 soros de pacientes com hanseníase tuberculóide- TT, vichorviana- VV e controles- CT com o peptídeo T04. A linha em vermelho representa o valor do *cut off*. Valores acima dessa linha são considerados positivos e abaixo são negativos. No gráfico referente aos soros de contatos, os cinco primeiros são contatos de pacientes paucibacilares e todos os outros de multibacilares.

Figura 10: Reatividade de 27 soros de pacientes com hanseníase tuberculóide- TT, vichorviana- VV e controles- CT com o peptídeo T03. A linha em vermelho representa o valor do *cut off*. Valores acima dessa linha são considerados positivos e abaixo são negativos. No gráfico referente aos soros de contatos, os cinco primeiros são contatos de pacientes paucibacilares e todos os outros de multibacilares.

4.7 Teste de bloqueio da pIII

Esse teste foi realizado com os clones T03 e T04. O primeiro por ter sido o mais frequente no sequenciamento e o segundo por ter sido o mais reativo nos ensaios do ELISA contra soros de pacientes tuberculóides. O clone V06 também foi testado por ter apresentado alta reatividade e sensibilidade com os soros de pacientes virchovianos no ELISA.

O clone T04 não apresentou redução no número de colônias com nenhum dos tipos de soros testados. Entretanto, com o clone T03 houve redução no número de colônias nos soros de tuberculóides e virchovianos em ambas as diluições, sendo que à medida que o soro apresenta-se mais diluído essa redução diminui. Nos soros de controles na diluição de 1:256 a redução foi nula (Tabela 11 e Figura 11).

O clone V06 novamente demonstrou grande sensibilidade, pois a taxa de redução no número de colônias foi de 82% no *pool* de soros de pacientes virchovianos para 8% e 10% nos grupos tuberculóides e controles, respectivamente, sendo que essa taxa de redução atinge a nulidade na diluição de 1:256 (Tabela 11 e Figura 11).

Tabela 11: Teste de bloqueio da PIII indicado pelo número de colônias (pfu) com pool de soros dos grupos tuberculóide, virchoviano e contatos para os clones T03, T04 e V06.

Clone	Fator de diluição dos soros						
	Soro de TT		Soro de VV		Soro de CT		Sem soro
	1:8	1: 256	1:8	1: 256	1: 8	1: 256	
T03 (TALFPWL)	105(64%)*	248 (15%)	111 (62%)	181 (38%)	148 (49%)	315 (0%)	292 (0%)
T04 (YSTT LSY)	670 (0%)	720 (0%)	624 (0%)	640 (0%)	523 (0%)	615 (0%)	510 (0%)
V06 (YGVSGPT)	265 (8%)	383 (0%)	51 (82%)	192 (34%)	261 (10%)	298 (0%)	290 (0%)

*A porcentagem de redução de placas está indicada entre parênteses. O valor foi determinado pela equação $[(\text{pfu sem soro} - \text{pfu com soro adicionado}) / (\text{pfu sem soro})] \times 100$.

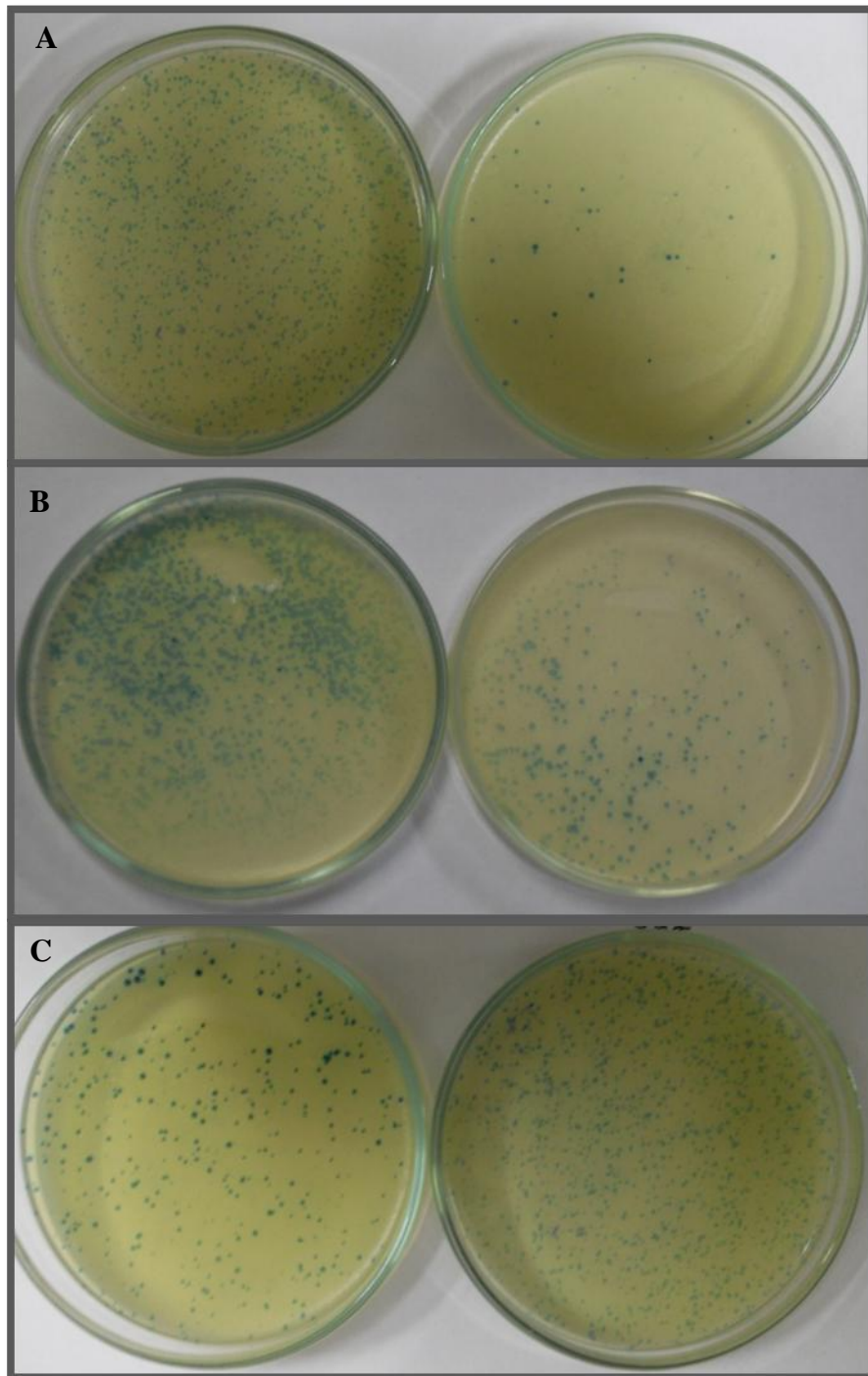


Figura 11: Teste de Redução de Colônias: em A- Fago V06; a placa da esquerda está sem soro e a da direita com pool de soro de pacientes virchovianos na diluição 1:8; em B- Fago T03, a placa da esquerda está sem soro e a da direita com pool de soros de pacientes virchovianos na diluição 1:8; C-Fago T04, na esquerda placa sem soro e na direita placa com pool de soro de pacientes tuberculóides na diluição 1:8

5. DISCUSSÃO

Apesar da diminuição da prevalência de hanseníase no mundo pelo uso da poliquimioterapia, a detecção de casos novos permanece alta, demonstrando que o ciclo de transmissão ativa da doença continua ocorrendo (GELUK et al, 2009). Dessa forma, existe a real necessidade do desenvolvimento de novas plataformas que possam ser utilizadas como biomarcadores de risco de adoecimento, no diagnóstico precoce, ou até mesmo no desenvolvimento de uma vacina eficaz para ser aplicada, especialmente nos países de alta endemia e hiperendemia. Nesse sentido, muitos estudos visam encontrar proteínas e/ou peptídeos do *M. leprae* que possam funcionar como unidades antigênicas específicas e que tenham aplicações na abordagem diagnóstica e/ou terapêutica (DOCKRELL et al, 2000; REECE et al, 2006; DUTHIE et al, 2007a; DUTHIE et al 2007b; DUTHIE et al, 2008; GELUK et al, 2009).

A obtenção da sequência completa do genoma do *M. leprae* permitiu a utilização de ferramentas pós-genômicas para o mapeamento, identificação e caracterização de possíveis antígenos específicos dessa micobactéria. Nesse sentido, o uso de bibliotecas randômicas de peptídeos apresentados em fagos representa uma ferramenta para os estudos de interações existentes entre antígeno e anticorpo, tornando possível a caracterização de mimetótipos com potencial antigênico e auxiliando na elucidação de mecanismos básicos da regulação da resposta imune para diversas doenças (OLIVEIRA, 2007), como meningite (GROTHAUS et al, 2000), câncer (MINTZ et al, 2003), AIDS (MARCHIÓ et al, 2005), pneumonia (YANG et al, 2005), tuberculose (GEVORKIAN et al, 2005), doença de Parkinson (EMADI et al, 2007), dengue (GOULART et al, 2010) e neurocisticercose (RIBEIRO et al, 2010), dentre outras doenças.

No presente estudo, a tecnologia de *phage display* foi empregada adequadamente, uma vez que o enriquecimento dos fagos foi observado a cada ciclo de seleção, comprovando o sucesso do *biopanning*. A utilização de antígenos de mitsudina no dois últimos ciclos de seleção permitiu uma eluição antígeno específica, que naturalmente reduz o número de clones obtidos, como observado por Oliveira (2007), mas que aumenta a probabilidade dos clones serem mais específicos ao alvo selecionado e, por, consequência, mais reativos.

A opção de utilizar uma biblioteca de peptídeos conformacionais composta de sete aminoácidos flanqueados por dois resíduos de cisteínas (New England Biolabs, Ph.D.-C7C) gera uma estrutura secundária devido à formação de pontes dissulfeto entre as cisteínas das extremidades. Alguns estudos tem demonstrado que a reação de IgGs com peptídeos que

incorporam características conformacionais seria melhor que a dos peptídeos lineares (SUNDARAM et al, 2004; DAKAPPAGARI et al, 2005). Os trabalhos de Bukawa et al (1995) e Cabezas et al (2000) descreveram o uso de epítomos conformacionais do vírus de imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) para estudar as respostas dos anticorpos específicos ao vírus e demonstraram que a conformação do peptídeo V3 e V5 da glicoproteína gp120 foi capaz de provocar uma resposta imune, diferentemente do epítomo linear.

A abordagem utilizada neste trabalho de realizar imunoenaios de ELISA como um pré-screening antes do sequenciamento, no qual todos os fagos obtidos previamente no *biopanning* foram expostos aos soros de pacientes da forma clínica específica para o qual foram selecionados, representou uma estratégia de seleção. Dessa forma, fagos que tivessem sido selecionados de forma inespecífica poderiam ser eliminados e somente os fagos mais reativos foram sequenciados, o que representa uma economia de recursos e tempo, além de ser mais uma garantia da especificidade dos fagos.

Os resultados encontrados para os 12 peptídeos obtidos no pólo tuberculóide reforçam dados da literatura que demonstram uma anergia de resposta humoral nesse espectro clínico da doença (MODLIN, 1994; GOULART et al, 2002), apresentando imunoglobulinas específicas em baixa concentração (BUHRER et al, 1998; MOURA et al, 2008), o que explica a pouca reatividade da maioria dos soros de pacientes tuberculóides.

Muitos trabalhos que testaram a reatividade de outros peptídeos e/ou proteínas nessas formas paucibacilares também tiveram resultados semelhantes, como o que ocorre com o antígeno PGL-1, que é pouco reativo em pacientes tuberculóides, por apresentarem baixa quantidade de anticorpos específicos circulantes (MOET et al, 2004). Os antígenos ML0405 e ML2331 também foram testados em pacientes tuberculóides, não ocorrendo atividade sorológica significativa (REECE et al, 2006). Esses mesmos antígenos foram testados em pacientes brasileiros das cidades de Goiânia e Salvador, onde pouquíssimos pacientes PB das duas cidades puderam ser diagnosticados pela reatividade com a proteína ML0405, e somente alguns pacientes PB da cidade de Salvador foram reativos para o antígeno ML2331. O antígeno ML1556c somente foi reconhecido em poucos pacientes tuberculóides (DUTHIE et al, 2007).

Esses trabalhos ratificam a dificuldade que existe em encontrar antígenos e/ou outros marcadores que apresentem alta sensibilidade para as formas paucibacilares da hanseníase. Apesar disso os resultados obtidos neste estudo, com os peptídeos TALFPWL (T03) e

YSTTLSY (T04), demonstram que os mesmos conseguem ser reconhecidos por anticorpos de alguns pacientes paucibacilares, bem como por anticorpos de pacientes virchovianos. O peptídeo T04, quando avaliado com *pool* de soros, foi bastante reativo, apresentando inclusive diferenças estatisticamente significativa entre tuberculóides e controles, enquanto que em soros individuais foi reconhecido por aproximadamente 27% dos pacientes tuberculóides. As diferenças encontradas, quando se utilizou o *pool* ou soros individuais, podem ser explicadas por um possível efeito de imunodominância de alguns soros presentes no *pool* durante essa primeira fase de pré-validação.

O peptídeo T03 reagiu de maneira semelhante, tanto nos ensaios de ELISA quanto no teste de bloqueio da pIII, reforçando que as duas estratégias podem ser utilizadas para validação de fagos obtidos por *phage display*, além de corroborar com a hipótese de que esse peptídeo parece ser um mimético de um antígeno para o *M. leprae*. Esses fatos são demonstrados ao verificarmos que os valores de sensibilidade desse peptídeo para pacientes tuberculóides foram praticamente os mesmos, sendo 61,5% e 64,0% nos testes de ELISA e bloqueio da pIII, respectivamente. Mesmo em pacientes virchovianos o peptídeo T03, conseguiu ser reconhecido em 48% dos pacientes. A descoberta de antígenos que estimulem resposta imune nos dois pólos é interessante quando se pensa em desenho de vacinas, pois uma subunidade vacinal deve disparar resposta imune celular no indivíduo para que a imunização seja efetiva contra todos os espectros clínicos da doença, apresentando, dessa forma, viabilidade imunoproliférica (OLIVEIRA, 2007).

A Índia realizou os estudos pioneiros com a abordagem do desenvolvimento de vacinas para hanseníase. Diversos tipos de vacinas já foram testadas e duas são adotadas, obtidas a partir de *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium w*, sendo utilizadas como coadjuvantes no tratamento poliquimioterápico. Os resultados dessa utilização demonstram avanços no sentido de acelerar a regressão clínica, diminuir o tempo de tratamento e promover a positividade no teste de Mitsuda (MOSCHELLA, 2004).

Outros estudos tem utilizado *M. bovis*, modificados geneticamente, no BCG (WALIA et al, 1993; CHO et al, 1999; GORMUS et al, 2000; OHARA et al, 2001; SHARMA et al, 2005).), pois o efeito protetor oferecido dessa vacina para hanseníase precisa ser reforçado (SETIA et al, 2006; ZODPEY, 2007). O trabalho de Maeda et al (2009) demonstrou a capacidade de uma cepa recombinante de *M. bovis* que secreta a maior proteína de membrana (MMP-II) do *M. leprae* (BCG-SM) em inibir a multiplicação do patógeno na pata de camundongos C57BL/6J.

A utilização do antígeno ML0276, como subunidade vacinal, conseguiu estimular a produção de interferon gama ($IFN\gamma$) durante a infecção experimental pelo *M. leprae*, apresentando-se como adjuvante potente para estimular uma resposta Th1 (RAMAN et al, 2009). A avaliação da imunogenicidade de 17 proteínas recombinantes em células mononucleares de 127 brasileiros mostrou que cinco antígenos (ML0576, ML1989, ML2283 ML1990 e ML2567) induziram aumento nas quantidades de interferon gama em pacientes paucibacilares, pacientes com hanseníase reacional e em contatos saudáveis, mas não tiveram efeito para maioria dos pacientes com hanseníase multibacilar (GELUK et al, 2005). Esse tipo de abordagem representa uma perspectiva para o nosso trabalho, onde os peptídeos validados podem ser avaliados quanto a sua capacidade em estimular células mononucleares de sangue periférico de pacientes com hanseníase e seus contatos domiciliares na produção de citocinas importantes dentro da resposta imunológica da hanseníase.

Os dados de bioinformática demonstraram associações interessantes dos peptídeos T03 e T04 com proteínas do *M. leprae*, como por exemplo, a proteína de membrana Mmpl10 (grandes proteínas da membrana micobacteriana) que já foi descrita com potencial antigênico (COLE et al, 2001), sendo que a região de alinhamento do peptídeo T04 coincide justamente com uma provável região antigênica dessa proteína. A família Mmpl pertence a uma classe de proteínas denominadas RND (resistência, nodulação e divisão celular) permeases. Estas proteínas representam uma família de bombas de resistência a múltiplas drogas, que reconhecem e mediam o transporte de uma grande diversidade de cátions, compostos aniônicos, incluindo várias drogas e metais pesados (PAULSEN et al, 1996; PUTMAN et al, 2000). Vale ressaltar também que a proteína não caracterizada do *M. leprae* ML0115 apresentou um alinhamento com o peptídeo T03, também em uma região onde provavelmente existe atividade antigênica.

Para os peptídeos selecionados contra soros de pacientes virchovianos, observou-se uma reatividade elevada com os soros de pacientes VV, e pouca ou nenhuma reatividade com soros de tuberculóides e controles. Esses resultados são particularmente interessantes, pois encontrar mimetopos com boa reatividade na hanseníase virchoviana pode fornecer uma ferramenta de diagnóstico para esse espectro clínico da doença.

A utilização de antígenos que detectem anticorpos circulantes do tipo IgM na hanseníase virchoviana, especialmente, o PGL-1, é bem reconhecida na literatura (CHO et al, 1983; YOUNG et al, 1984; CHO et al, 2001; YOUNG et al, 2004; CARDONA-CASTRO et al,

2005), entretanto esse trabalho identificou antígenos reativos capazes de detectar anticorpos do tipo IgG. O aumento de IgG, IgE e linfócitos B no sangue periférico são relatados na resposta humoral em pacientes virchovianos (GOULART et al, 2002).

O estudo de Duthie et al (2009) comparou três novos antígenos recombinantes: ML0405, ML2331 e LID1 (compreendendo as regiões críticas do ML0405 e ML2331), que reconhecem imunoglobulinas G, em comparação e em combinação ao PGL-I, demonstrando um índice de positividade de 67%, 62%, 65% e 76% para LID1, ML0405, ML2331 e PGL-I, respectivamente, enquanto a combinação LID1 e antígenos PGL-1 apresentou uma positividade de 80%.

Os 17 peptídeos selecionados no pólo virchoviano apresentaram potencial para serem validados em soros individuais de pacientes pelo imunoensaio de ELISA, entretanto por questões operacionais optou-se por selecionar somente os dois peptídeos mais reativos durante a pré-validação, YGVSGPT (V06) e YGCLGTT (V13). Ressalta-se a importância da realização de trabalhos posteriores que possam validar todos os outros peptídeos que também se revelaram com alta reatividade, tendo papel promissor no diagnóstico da hanseníase. Os peptídeos V06 e V13 mantiveram o mesmo comportamento encontrado durante a pré-validação, ou seja, uma maior reatividade com anticorpos dos soros virchovianos. Araújo et al (2006) ao analisarem as respostas das células B em pacientes com hanseníase e controles para MLP (proteínas com potencial antigênico) descobriram que cinco dessas proteínas (ML0678, ML0757, ML2177, ML2244 e a ML2498) eram fortemente reconhecidas por anticorpos circulantes em pacientes com hanseníase multibacilar.

Os resultados encontrados no teste de ELISA, com especificidade de 100,0% e sensibilidade de 94,7% para o peptídeo V06, complementam os dados do teste de redução da pIII, no qual foi obtida uma taxa de redução de 82%, reforçando a validação desse peptídeo como mimético de uma molécula do *M. leprae*. A utilização do método de redução em placas é um critério para se estimar a especificidade da resposta ao anticorpo, pela determinação das titulações em laboratório (YANG & SHIUAN, 2003).

A alta taxa de redução de colônias verificada no soro de pacientes virchovianos, bem como a elevada reatividade avaliada tanto em *pools* de soros quanto em soros individuais para o peptídeo YGVSGPT (V06), pode ser explicada pelo fato deste mimetopo apresentar identidade com uma proteína de membrana Mmpl11, que contém regiões antigênicas (COLE et al, 2001), o que possibilita o envolvimento na resposta imunológica ao *M. leprae*.

O peptídeo V13 também apresenta similaridades importantes com proteínas de choque térmico, dnaK de 70 kDa e DNAJ 2. As proteínas de choque térmico (hsp) são antígenos imunodominantes de vários microorganismos, inclusive micobactérias, sendo alvos comuns de reconhecimento de células T. As hsp microbianas têm sido associadas com a geração e indução de resposta imune tipo Th1 (RHA et al, 2002). As proteínas hsp de especial interesse como antígenos são as de 18, 65 e 70 kDa (MISTRY et al, 1992; MUSTAFA et al, 1993). Outro fator importante é que as prováveis regiões antigênicas dessas proteínas alinharam-se com os peptídeos, VO6 e V13, reforçando que os peptídeos provavelmente mimetizam proteínas de interesse imunogênico.

Os resultados promissores encontrados com os peptídeos V06 e V13 reforçam a hipótese de que a utilização de um peptídeo sintético que apresente as duas sequências validadas nesse trabalho possam acentuar ainda mais a reatividade dos mesmos, abrindo a possibilidade da utilização simultânea desses possíveis antígenos. É importante, portanto, que todos os peptídeos validados nesse estudo sejam posteriormente sintetizados quimicamente para que sejam utilizados em outros testes confirmatórios.

A utilização de peptídeos que sejam epítomos de proteínas com potencial diagnóstico e/ou terapêutico responde a muitas críticas que tem sido levantadas contra o uso de extratos bacterianos ou conjunto de proteínas recombinantes. Ao focar em um único epítomo, evita-se a possibilidade de utilizar regiões antigênicas e não-antigênicas em uma mesma proteína. Eles também são produzidos de forma mais barata e com alta qualidade, além de serem facilmente controlados quimicamente para o uso no teste de ELISA ou outras reações sorológicas.

É possível observar com este estudo que a caracterização e validação de peptídeos recombinantes que mimetizam os antígenos de *M. leprae* podem fornecer pistas importantes para um melhor entendimento da interação patógeno e hospedeiro na hanseníase, bem como a descoberta de novos alvos biológicos que sirvam como estratégias diagnósticas e/ou terapêuticas.

6. CONCLUSÃO

- ✓ Por meio da tecnologia de *phage display* foi possível selecionar peptídeos imunorreativos contra os anticorpos circulantes do tipo IgG em pacientes com hanseníase, apresentando baixa reação cruzada com controles saudáveis;
- ✓ Foi possível encontrar peptídeos especificamente selecionados contra soros de pacientes das formas clínicas tuberculóide e virchoviana da hanseníase, sendo validados os dois peptídeos para cada: T03, T04 e V06, V13 respectivamente;
- ✓ Os peptídeos V06 e V13 apresentaram elevada sensibilidade e especificidade para diagnosticar pacientes com hanseníase virchoviana;
- ✓ O alinhamento dos peptídeos com proteínas de membrana do *M. leprae*, que apresentam regiões potencialmente antigênicas e algumas proteínas de choque térmico, reforçam a possibilidade dos peptídeos selecionados mimetizarem epítomos antigênicos importantes do *M. leprae*.

7. REFERENCIAS

ARAOZ, R., HONORE N., CHO S., KIM J.P., CHO S.N., MONOT M., DEMANGEL C., BRENNAN P.J., COLE S.T. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infect Immun**, v. 74, p. 175-182, 2006.

AZZAZY, H. M., HIGHSMITH, W. E. J. R.. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin Biochem**, v. 35, p. 425-45, 2002.

BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOT, J. K.; SILVERMAN G. J. **Phage Display: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001.

BARENHOLZ, A., HOVAV, A., FISHMAN, Y., RAHAV, G., GERSHONI, J. M., BERCOVIER, H. A peptide mimetic of the mycobacterial mannosylated lipoarabinomannan: characterization and potential applications. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 579-586, 2007.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol Adv** v.19, p.1-33, 2001.

BERGER, S., BANNANTINE, J. P., GRIFFIN, J. F. T. Autoreactive antibodies are present in sheep with Johne's disease and cross-react with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis antigens. **Microbes and Infection**, n. 9, p. 963-970, 2007.

BERGER, S., HINZ, D., BANNANTINE, J. P., GRIFFIN, J. F. Isolation of high-affinity single-chain antibodies against Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis surface proteins from sheep with Johne's disease. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, p. 1022-1029, 2006.

BLANK, M., SHOENFELD, Y., CABILLY, S., HELDMAN, Y., FRIDKIN, M., KATCHALSKIKATZIR, E. Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by synthetic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 5164-5168, 1999.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Hanseníase. **Agregação de casos de hanseníase no Brasil, 2003-2005**. Brasília, 2008b.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da Hanseníase: Cadernos de atenção básica**. Brasília, 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Hanseníase. **Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**. Brasília, 2008a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Hanseníase. **Hanseníase no Brasil: dados e indicadores selecionados**. Brasília, 2009.

BRATKOVIC, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, p. 749-767, 2010.

BRÍGIDO, M. M., MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, v. 26, p. 44-51, 2002.

BUHRER-SEKULA, S., SMITS, H. L., GUSSENHOVEN, G. C., VAN-INGEN, C. W., KLATSER, P. R. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p. 133-136, 1998.

BUHRER-SEKULA, S., SMITS, H. L., GUSSENHOVEN, G. C., VAN LEEUWEN, J., AMADOR, S., FUJIWARA, T., KLATSER, P. R., OSKAM, L. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1991-1995, 2003.

BUKAWA, H.; FUKUSHIMA, J.; HAMAJIMA, K.; KIMURA, M.; TSUJI, T.; XIN, K. Q.; OKUDA, K. Antibody responses raised against a conformational V3 loop peptide of HIV-1. **Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 8, p. 607-614, 1995.

BURGESS, P. J., FINE, P. E., PONNIGHAUS, J. M., DRAPER, C. Serological tests in leprosy. The sensitivity, specificity and predictive value of ELISA tests based on phenolic glycolipid antigens, and the implications for their use in epidemiological studies. **Epidemiol Infect**, v. 101, p. 159-171, 1988.

CABEZAS, E.; WANG, M.; PARREN, P. W.; STANFIELD, R. L.; SATTERTHWAIT, A. C. A structure-based approach to a synthetic vaccine for HIV-1. **Biochemistry**, v. 39, n. 47, p. 14377-14391, 2000.

CARDONA-CASTRO, N., RESTREPO-JARAMILLO, S., GIL DE LA OSSA, M., BRENNAN, P. Infection by *Mycobacterium leprae* of household contacts of lepromatous leprosy patients from a post-elimination leprosy region of Colombia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 703-707, 2005.

CHER, D. J., MOSMANN T. R. Two types of murine helper T cell clone. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **J Immunol**, v. 138, p. 3688-3694, 1987.

CHO, S. N., BRENNAN, P. J. New biological tools for leprosy surveillance. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 67, p. 59-62, 1999.

CHO, S. N., CELLONA, R. V., VILLAHERMOSA, L. G., FAJARDO, T. T. Jr., BALAGON, M. V., ABALOS, R. M., TAN, E. V., WALSH, G. P., KIM, J. D., BRENNAN, P. J. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 138-142, 2001.

CHO, S. N., YANAGIHARA, D. L., HUNTER, S. W., GELBER, R. H., BRENNAN, P. J. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. **Infect Immun**, v. 41, p. 1077-1083, 1983.

COLE, S. T., EIGLMEIER, K., PARKHILL, J. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007-1011, 2001.

DAKAPPAGARI, N. K.; LUTE, K. D.; RAWALE, S.; STEELE, J. T.; ALLEN, S. D.; PHILLIPS, G.; REILLY, R. T.; KAUMAYA, P. T. P. Conformational HER-2/neu B-cell Epitope Peptide Vaccine Designed to Incorporate Two Native Disulfide Bonds Enhances Tumor Cell Binding and Antitumor. **Activities J Biol Chem**, v. 280, p. 54- 63, 2005.

DHARMENDRA. Classification of leprosy. In: HASTINGS, R. C., CONVIT, J. (Org.). **Leprosy**. Churchill Livingstone: Edinburgh, 1985. p. 88-99.

DOCKRELL, H. M., BRAHMBHATT, S., ROBERTSON, B. D., BRITTON, S., FRUTH, U., GEBRE, N., HUNEGNAW, M., HUSSAIN, R., MANANDHAR, R., MURILLO, L., PESSOLANI, M. C. V., ROCHE, P., SALGADO, J. L., SAMPAIO, E., SHAHID, F., THOLE, J. E. R., YOUNG, D. B. A Postgenomic Approach to Identification of *Mycobacterium leprae*-Specific Peptides as T-Cell Reagents. **Infect Immun**, v. 68, n. 10, p. 5846-5855, 2000.

DUTHIE, M. S., GOTO, W., IRETON, G. C., REECE, S. T., CARDOSO, L. P. V., MARTELLI, C. M. T., STEFANI, M. A., NAKATANI, M., JESUS, R. C., NETTO, E. M., BALAGON, M. V. F., TAN, E., GELBER, R. H., MAEDA, Y., MAKINO, M., HOFT, D., REED, S. G. Use of Protein Antigens for Early Serological Diagnosis of Leprosy. **Clinical and vaccine immunology**, v. 14, n. 11, p. 1400-1408, 2007a.

DUTHIE, M. S., GOTO, W., IRETON, G. C., REECE, S. T., SAMPAIO, L. H., GRASSI, A. B., SOUSA, A. L. M. S., MARTELLI, C. M. T., STEFANI, M. A., REED, S. G. Antigen-Specific T-Cell Responses of Leprosy Patients. **Clinical and vaccine immunology**, v. 15, n. 11, p. 1659-1665, 2008.

DUTHIE, M. S., REECE, S. T., LAHIRI, R., GOTO, W., RAMAN, V. S., KAPLAN, J., IRETON, G. C., BERTHOLET, S., GILLIS, T. P., KRAHENBUHL, J. L., REED, S. G. Antigen-Specific Cellular and Humoral Responses are Induced by Intradermal *Mycobacterium leprae* Infection of the Mouse Ear. **Infect Immun**, v. 75, n. 11, p. 5290-5297, 2007b.

EIGLMEIER, K., PARKHILL, J., JAMES, K. D., THOMSON, N. R., WHEELER, P. R. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007-1011, 2001.

EMADI, S., BARKHORDARIAN, H., WANG, M. S., SCHULZ, P., SIERKS, M. R. Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity. **J Mol Biol**, v. 368, p. 1132-1144, 2007.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, n.3, p. 335-339, 1997.

GARCÍA, V. E., UYEMURA, K., SIELING, P. A., OCHOA, M. T., MORITA, C. T., OKAMURA, H., KURIMOTO, M., REA, T. H., MODLIN, R. L. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. **J Immunol**, v. 162, p. 6114-6121, 1999.

GELUK, A., KLEIN, M. R., FRANKEN, K. L. M. C., MEIJGAARDEN, K. E. V., WIELES, B., PEREIRA, K. C., BUHRER-SEKULA, S., KLATSER, P. R., BRENNAN, P. J., SPENCER, J. S., WILLIAMS, D. L., PESSOLANI, M. C. V., SAMPAIO, E. P., OTTENHOFF, T. H. M. Postgenomic Approach to identify novel *Mycobacterium leprae* Antigens with Potential to improve immunodiagnosis of Infection. **Infect Immun**, v. 73, n. 9, p. 5636-5644, 2005.

GELUK, A., PLOEG, J. V. D., TELES, R. O. B., FRANKEN, K. L. M. C., PRINS, C., DRIJFHOUT, J. W., SARNO, E. N., SAMPAIO, E. P., OTTENHOFF, T. H. M. Rational Combination of Peptides Derived from Different *Mycobacterium leprae* Proteins Improves Sensitivity for Immunodiagnosis of *M. leprae* Infection. **Clinical and vaccine immunology**, v. 15, n. 3, p. 522-533, 2008.

GELUK, A., SPENCER J. S., BOBOSHA, K., PESSOLANI, M. C. V., PEREIRA, G. M. B., BANU, S., HONORÉ, N., REECE, S. T., MACDONALD, M., SAPKOTA, B. R.; RANJIT, C., FRANKEN, K. L. M. C., ZEWDIE, M., ASEFFA, A., HUSSAIN, R., STEFANI, M. M., CHO, S., OSKAM, L., BRENNAN, P. J., DOCKRELL, H. M. From Genome-Based In Silico Predictions to Ex Vivo Verification of Leprosy Diagnosis. **Clinical and vaccine immunology**, v. 16, n. 3, p. 352-359, 2009.

GEVORKIAN, G., SEGURA, E., ACERO, G., PALMA, J. P., ESPITIA, C., MANOUTCHARIAN, K., OPEZ-MARIN, L. M. L. Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. **Biochemical Journal**, v. 387, p. 411-417, 2005.

GORMUS, B. J., BASKIN, G. B., XU, K., RATTERREE, M. S., MARTIN, L. N., MACK, P. A., BOHM, R. P. Jr., MEYERS, W. M., WALSH, G. P. Antileprosy protective vaccination of sooty mangabey monkeys with BCG or BCG plus heat-killed *Mycobacterium leprae*: immunologic observations. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 68, p. 434-443, 2000.

GOULART, I. M., PENNA, G. O., CUNHA, G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p.365-75, 2002.

GOULART, L. R., VIEIRA, C. U., FRESCHI, A.P., CAPPARELLI, F. E., FUJIMURA, P. T., ALMEIDA, J. F., FERREIRA, L. F., GOULART, M., BRITO-MADURO, A. G., MADURRO, J. M. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. **Crit Rev Immunol**, v. 30, n. 2, p. 201-222, 2010.

GROATHOUSE, N. A., AMIN, A., MARQUES, M. A., SPENCER, J. S., GELBER, R., KNUDSON, D. L., BELISLE, J. T., BRENNAN, P. J., SLAYDEN, R. A. Use of protein microarrays to define the humoral immune response in leprosy patients and identification of disease-state-specific antigenic profiles. **Infect Immun**, v. 74, p. 6458-6466, 2006.

GROTHAUS, M. C., SRIVASTAVA N., SMITHSON S. L., KIEBER-EMMONS T., WILLIAMS D.B., CARLONE G.M., WESTERINK M.A. Selection of an immunogenic peptide mimic of the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup a using a peptide display library. **Vaccine**, v. 18, p. 1253-63, 2000.

HOUSHMAND, H., G. FROMAN, et al. Use of bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction. **Anal Biochem**, v. 268, p. 363-370, 1999.

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

INTERNATIONAL LEPROSY ASSOCIATION. The diagnosis and classification of leprosy. **Leprosy Review**, v. 70, p. 23-31, 2002.

JULLIEN, D., SIELING, P. A., UYEMURA, K., MAR, N. D., REA, T. H., MODLIN, R. L. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. **J Immunol**, v. 158, p. 800-806, 1997.

KASAHARA, T., HOOKS, J. J., DOUGHERTY, S. F., OPPENHEIM, J. J. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. **J Immunol**, v. 130, p. 1784-1789, 1983.

KAY, B. K., WINTER, J., MCCAFFERTY, J. (Org.) **Phage Display of Peptides and Proteins**. Academic Press: New York, 1996.

MAEDA, Y., TAMURA, T., MATSUOKA, M., MAKINO, M. Inhibition of the Multiplication of *Mycobacterium leprae* by Vaccination with a Recombinant M. bovis BCG Strain That Secretes Major Membrane Protein II in Mice. **Clinical and vaccine immunology**, v. 16, n. 10, p. 1399-1404, 2009.

MAKOWSKI, L. Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. **Curr Opin Struct Biol**, v. 4, p. 225-230, 1994.

MARCHIÓ, S., MALFANO, M., PRIMO, L., GRAMAGLIA, D., BUTINI, L., GENNERO, L., DE VIVO, E., ARAP, W., GIACCA, M., PASUQALINI, R., BUSSOLINO, F. Cell surface-associated Tat modulates HIV-1 infection and spreading through a specific interaction with gp120 viral envelope protein. **Immunobiology**, v. 105, p. 2802-2811, 2005.

MAYROSE, I., SHLOMI, T. et al. A graph-based algorithm for epitope mapping using combinatorial phage-display libraries. **Nucleic Acid Research**, v. 35, n. 1, p. 69-78, 2007.

- MEHRA, V., BLOOM, B. R., BAJARDI, A. C., GRISSO, C. L., SIELING, P. A., ALLAND, D., CONVIT, J., FAN, X., HUNTER, S. W., BRENNAN, P. J., PEA, T. H., MODLIN, R. L. A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10-kD heat-shock cognate protein. **J Exp Med**, v. 175, p. 275-284, 1992.
- MENDONÇA, V. A., DIAS-COSTA R. D., MELO G. E. B. A., ANTUNES C. M., TEIXEIRA, A. L. Immunology of Leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 4, p. 343-50, 2008.
- MESSING, J. New M13 vectors for cloning. **Methods Enzymol**, v. 101, p. 20-78, 1983.
- MINTZ, P. J., KIM, J., DO, D., WANG, X., ZINNER, R. G., CRISTOFANILLI, M., ARAP, M. A., HONG, W. K., TRONCOSO, P., LOGOTHETIS, C. J., PASQUALINI, R., ARAP, W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 57-63, 2002.
- MISTRY, Y., YOUNG D. B., MUKHERJEE R. Hsp70 synthesis in Schwann cells in response to heat shock and infection with *Mycobacterium leprae*. **Infect Immun**, v. 60, n. 8, p. 3105-3110, 1992.
- MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: Insights from Leprosy. **J Invest Dermatol**, v.102, n. 6, p. 828-832, 1994.
- MOET, F. J., OSKAM, L., FABER, R., PAHAN, D., RICHARDUS, J. H. A study on transmission and a trial of chemoprophylaxis in contacts of leprosy patients: design, methodology and recruitment findings of COLEP. **Leprosy Review**, v. 75, p. 376-388, 2004.
- MONTOYA, D., CRUZ, D., TELES, R. M. B., LEE, D. J., OCHOA, M. T., KRUTZIK, S.R., CHUN, R., SCHENK, M., ZHANG, X., FERGUSON, B. G., BURDICK, A. E., SARNO, E. N., REA, T. H., HEWISON, M., ADAMS, J. S., CHENG, G., MODLIN, R. L. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host Microbe**, v. 6, n. 4, p. 343-353, 2009.
- MOSCHELLA, S. I. An update on diagnosis and treatment of leprosy. **J Am Acad Dermatol**, v. 51, n. 3, p. 417-426, 2004.

MOURA, R. S., CALADO, K. L., OLIVEIRA, M. L. W., BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41(Suplemento II), p. 11-18, 2008.

MUSTAFA, A. S., LUNDIN, K. E., OFTUNG, F. Human T cells recognize mycobacterial heat shock proteins in the context of multiple HLA-DR molecules: studies with healthy subjects vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium leprae*. **Infect Immun**, v. 61, n. 12, p. 5294-301, 1993.

NATHAN, C. F., MURRAY, H. W., WIEBE, M. E., RUBIN, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J Exp Med**, v. 172, p. 670-689, 1983.

OHARA, N., MATSUOKA, M., NOMAGUCHI, H., NAITO, M., YAMADA, T. Protective responses against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice induced by recombinant bacillus Calmette-Guérin over-producing three putative protective antigen candidates. **Vaccine**, v. 19, p. 1906-1910, 2001.

OLIVEIRA, J. D. D. Identificação e caracterização de peptídeos miméticos dos antígenos de *Mycobacterium Leprae* por *phage display*. 2001. 104f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2007.

PARKASH, O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 55, p. 1-5, 2009.

PAULSEN, I. T., BROWN, M. H., SKURRAY, R. A. Proton-dependent multidrug efflux systems. **Microbiol Rev**, v. 60, p. 575-608, 1996.

PAYNE, S. N., DRAPER, P., REES, R. J. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 50, p. 220-221, 1982.

PUTMAN, M., VAN VEEN, H. W., KONINGS, W. N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, p. 672-693, 2000.

RAMAN, V. S., O'DONNELL, J., BAILOR, H. R., GOTO, W., LAHIRI, R., GILLIS, T. P., REED, S. G., DUTHIE, M. S. Vaccination with the ML0276 Antigen Reduces Local Inflammation but not Bacterial Burden during Experimental *Mycobacterium leprae* Infection. **Infect Immun**, v. 77, n. 12, p. 5623-5630, 2009.

REECE, S. T., IRETON, G., MOHAMATH, R., GUDERIAN J., GOTO, GELBER W., GROATHOUSE, N., SPENCER, J., BRENNAN, P., REED S.G. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, p. 333-340, 2006.

RHA, Y. H., TAUBE, C., HACZKU, A., JOETHAM, A., TAKEDA, K., DUEZ, C., SIEGEL, M., AYDINTUG, M. K., BORN, W. K., DAKHAMA, A., GELFAND, E.W. Effect of microbial heat shock proteins on airway inflammation and hyperresponsiveness. **J Immunol**, v. 169, n. 9, p. 5300-5307, 2002.

RIBEIRO, V. S., MANHANI, M. N., CARDOSO, R., VIEIRA, C. U., GOULART, L. R., COSTA-CRUZ, J. M. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. **Immunology Letters**, v. 129, p. 94-99, 2010.

RIDLEY, D. S., JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. **International Journal of Leprosy**, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.

SETIA, M. S., STEINMAUS, C., HO, C. S., RUTHERFORD, G. W. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 6, p. 162-170, 2006.

SHARMA, A., SAHA, A., BHATTACHARJEE, S., MAJUMDAR, S., GUPTA, S. K. Specific and Randomly Derived Immunoactive Peptide Mimotopes of Mycobacterial Antigens. **Clinical and vaccine immunology**, v. 13, n. 10, p. 1143-1154, 2006.

SIELING, P. A., ABRAMS, J. S., YAMAMURA, M., SALGAME, P., BLOOM, B. R., REA, T. H., MODLIN, R. L. Immunosuppressive roles for interleukin-10 and interleukin-4 in human infection: in vitro modulation of T cell responses in leprosy. **J Immunol**, v. 150, p. 5501-5510, 1993.

SIELING, P. A., MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology**, v. 191, p.378-387, 1994.

SIELING, P. A., WANG, X-H., GATELY, M. K, OLIVEROS, J. L., MCHUGH, T., BARNES, P. F., WOLF, S. F., GOLKAR, L., YAMAMURA, M., YOGI, Y., UYEMURA, K., REA, T. H., MODLIN, R. L. IL-12 regulates T helper type cytokine responses in human infectious disease. **J Immunol**, v. 153, p. 3639-3647, 1994.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-137, 1985.

SPENCER, J. S., DOCKRELL, H. M., KIM, H. J. et al. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 7930-7938, 2005.

SPENCER, J. S., KIM, H. J., MARQUES, A. M., GONZALEZ-JUARERRO, M., LIMA, M. C., VISSA, V. D., TRUMAN, R. W., GENNARO, M. L., CHO, S. N., COLE, S. T., BRENNAN, P. J. Comparative analysis of B- and T-cell epitopes of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate protein 10. **Infect Immun**, v. 72, p. 3161-3170, 2004.

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

STEVENS, T. L., BOSSIE, A., SANDERS, V. M., FERNANDEZ-BOTRAN, R., COFFMAN, R. L., MOSMANN, T. R., VITETTA, E. S. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v. 334, p. 255-258, 1988.

SUNDARAM, R.; LYNCH, M. P.; RAWALE, S. V.; SUN, Y.; KAZANJI, M.; KAUMAYA, P. T. P. De Novo Design of Peptide Immunogens That Mimic the Coiled Coil Region of Human T-cell Leukemia Virus Type-1 Glycoprotein 21 Transmembrane Subunit for Induction of Native Protein Reactive Neutralizing Antibodies. **J Biol Chem**, v. 279, n. 23, p. 24141-24151, 2004.

WALIA, R., SARATHCHANDRA, K. G., PANDEY, R. M., PARIDA, S. K., ZAHEER, S. A., KAR, H. K., MUKHERJEE, A., MUKHERJEE, R., TALWAR, G. P. Field trials on the use of *Mycobacterium w* vaccine in conjunction with multidrug therapy in leprosy patients for immunotherapeutic and immunoprophylactic purposes. **Lepr Rev**, v. 64, p. 302-311, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report Series. **Chemotherapy of leprosy for control programmes: reports of a WHO study group**. Geneva, 1982. 675 n.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report Series. **Expert Committee on Leprosy**. Geneva, 1988. 768 n.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record. **Global Leprosy Situation, 2007**. Geneva, 2007. 25 n. 225-232 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological Record. **Global leprosy situation, 2010**. Geneva, 2010. 35 n. 337-348 p.

YANG, W. J., LAI, J. F., PENG, K. C., CHIANG, H. J., WENG, C. N., SHIUAN, D. Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. **Journal of Immunological Methods**, v. 304, p. 15-29, 2005.

YANG, W. J., SHIUAN, D. Plaque reduction test: an alternative method to assess specific antibody response to pIII-displayed peptide of filamentous phage M13. **Journal of Immunological Methods**, v.276, p.175-183, 2003.

YAWALKAR, S. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers**. 7th edition. Basle: Novartis Foundation for Sustainable Development. 2002.

YOUN, J. H., MYUNG, H. J., LIAN, A., CHATTERJEE, D., BRENNAN, P. J., CHOI, I. H., CHO, S. N., SHIN, J. S. Production and characterization of peptide mimotopes of phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 41, p. 51-57, 2004.

YOUNG, D. B., DISSANAYAKE, S., MILLER, R. A., KHANOLKAR, S. R., BUCHANAN, T. M. Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species-specific glycolipid of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 149, p. 870-873, 1984.

ZENHA, E. M. R., FERREIRA, M. A. N., FOSS, N. T. Use of anti-PGL-1 antibodies to monitor therapy regimes in leprosy patients. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 10, 968-972, 2009.

ZODPEY, S. P. Protective effect of bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccine in the prevention of leprosy: a meta-analysis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 73, p. 86-93, 2007.