



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Antígenos naturais, recombinantes e sintéticos de *Mycobacterium leprae* e  
implicações diagnósticas na hanseníase**

**Aluna: Janaina Lobato**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Antígenos naturais, recombinantes e sintéticos do *Mycobacterium leprae* e  
implicações diagnósticas na hanseníase**

**Aluna: Janaina Lobato**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart**

**Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (área de Genética).**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L796a Lobato, Janaina, 1981-  
2011 Antígenos naturais, recombinantes e sintéticos de *Mycobacterium leprae* e implicações diagnósticas na hanseníase / Janaina Lobato. -- 2011.  
137 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.  
Co-orientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Hanseníase - Diagnóstico - Teses.  
2. *Mycobacterium leprae* - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- . II. Goulart, Isabela Maria Bernardes. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Antígenos naturais, recombinantes e sintéticos de *Mycobacterium leprae* e  
implicações diagnósticas na hanseníase**

**ALUNA: Janaina Lobato**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**Examinadores:**

**Prof. Dra. Norma Tirabosch Foss**

**Prof. Dr. Milton Ozório Moraes**

**Profa. Dra. Deise Aparecida Oliveira Silva**

**Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior**

**Data da Defesa: 25/07/2011**

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da  
Dissertação/Tese foram contempladas

---

Luiz Ricardo Goulart Filho

*Dedico esta tese a minha querida mãe, Vanda Maria Lobato, mulher forte, guerreira e grande sábia. Mesmo sendo uma eterna lutadora, nunca deixou de ser amável com os seus.*

*Com você eu aprendi a viver, aprendi a trabalhar e batalhar para alcançar meus sonhos e me espelhei em você para amar a todos. Você deixou em mim uma lembrança eterna, que nesta vida só o amor compensa ...*

*Te amo!!!*

## Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ser luz na minha vida, pela sabedoria, apoio e nestes últimos momentos por ser meu companheiro diário.

Agradeço ao meu marido, Gustavo Parreira de Santana, por ser meu companheiro de todos os momentos. Por doar o nosso tempo de união para a construção desta tese. Agradeço pela sua compreensão, paciência, apoio e amor.

Agradeço a minha família de origem, por me dar a vida, pelo amor, pelo exemplo de vida e por me ensinar que podemos fazer muito mais que imaginamos ser capazes. Amo vocês!!!!!!

Agradeço ao Prof. Luiz Ricardo Goulart, pela orientação, pelo entusiasmo de todas as horas, por acreditar neste projeto e pela ajuda nesta etapa final.

Agradeço a Profa. Isabela Maria Bernardes Goulart, pela co-orientação e por estes últimos 5 anos de convivência, que me ensinaram muito sobre a vida. Agradeço a oportunidade de conhecer sobre a hanseníase e este belo trabalho realizado em Uberlândia. Obrigada por todos os seus ensinamentos.

Agradeço a toda a equipe do CREDESH, os que estão presentes e aqueles que já se foram, uma equipe de pessoas simples e que sabem amar o próximo com humanização.

Agradeço aos amigos do Laboratório do CREDESH, Érica Reis, Thiago Barbosa, Mariana Penna e Lorena Ottoni pela amizade, pelo apoio, por serem parte da minha família. Vocês deixaram um bom exemplo de amizade para mim, levarei vocês sempre no meu coração.

Agradeço aos meus amigos Fausto Emílio, Patrícia Tieme e Carol Reis, pelo ensinamento de Phage Display que foi uma oportunidade de estarmos juntos e criar uma amizade tão bonita e verdadeira. Conte comigo assim como posso contar com vocês.

Agradeço a todos os meus amigos Laboratório de Nanotecnologia, todos vocês me ensinaram a ser o que sou. Um pouquinho de cada um de vocês guardarei comigo. Vou levar o melhor exemplo de cada um. Obrigada.

Agradeço a direção, professores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica pelo apoio e conhecimento adquirido nestes 4 anos.

Agradeço a todos que contribuíram com este trabalho, seja de forma direta ou indireta.

## Índice

Lista de abreviaturas	xiii
Apresentação	01
<hr/>	
Capítulo I - Fundamentação teórica	05
1.0- Introdução	06
1.1- Transmissão do <i>M. leprae</i>	07
1.2- Resposta imune da hanseníase	07
1.3- Episódios reacionais	11
1.4- Diagnóstico da hanseníase	13
1.5- Antígenos potenciais para futuros diagnósticos	16
1.6- Phage Display	18
2.0- Referências Bibliográficas	21
<hr/>	
Capítulo II- Comparação de três testes sorológicos para o diagnóstico da hanseníase e detecção de infecção subclínica	34
Abstract	36
1.0- Introduction	37
2.0 Material and Methods	39
2.1- Subject of study and samples	39
2.2 Ethical aspects	39
2.3 Antigens	40
2.4 Antibody titer	40
2.5 Bacterial Index	41
2.6 Mitsuda test	41
2.7 Statistical methods	42
3.0- Results	43
3.1 Analysis of Mitsuda test and the Bacterial Index	43
3.2 Analysis of serological tests in patients with no prior treatment	43
3.3 Analysis of the PGL-1 ELISA serum test in patients after multidrug	45
3.4 Analysis of the PGL-I antibody response in household contacts	45
4.0- Discussion	46
5.0- References	50
Tables	57
Figures	61
<hr/>	
Capítulo III- Antígenos Miméticos de LAM: a resposta imune de IgG e suas subclasses na hanseníase e implicações	63
1.0- Introdução	66
2.0- Material e Métodos	70
2.1- Pacientes e Controles endêmicos	70
2.2- Anticorpos Monoclonais	72
2.3- Biopanning	72
2.4- Titulações	73
2.5- Extração de DNA de fagos	73
2.6- Sequenciamento	74
2.7- Purificação de fagos	74

2.8- ELISA direto para screening de fagos ligantes a anticorpos monoclonais	75
2.9- ELISA indireto para detecção de IgG utilizando fagos alvos e selvagens	75
2.10- ELISA indireto para detecção de IgG1, IgG2 e IgG3 anti- clones miméticos de LAM	76
2.11- ELISA indireto para detecção de IgGe suas subclasses anti- LAM-BSA	76
2.12- Análise estatística	77
3.0- Resultados	78
3.1- Biopanning do anticorpo monoclonal mAB CS-35 para seleção de clones miméticos de LAM	78
3.2- Reatividade dos clones miméticos pelo anticorpo monoclonal CS-35	78
3.3- Sequenciamento dos clones reativos	80
3.4- Imunoreatividade dos mimotopos de LAM em soros de pacientes com hanseníase	82
3.5- Resposta imune humoral de subclasses de IgG contra o clone mimético CS-35 A9 em pacientes com hanseníase	82
3.6- Correlações entre a resposta imune humoral contra o antígeno LAM sintético e o clone mimético CS-35 A9	85
3.7- Resposta imune humoral de subclasses de IgG contra o clone mimético CS-35 A9 em pacientes com reações hansênicas	86
4.0- Discussão	87
5.0- Referências Bibliográficas	91
<hr/>	
Capítulo IV- Detecção de IgG e suas subclasses contra peptídeos miméticos de GroES e GroEL: uma nova ferramenta no diagnóstico da hanseníase	98
Resumo	99
Abstract	100
1.0- Introdução	101
2.0- Material e Métodos	103
2.1- Pacientes, Contatos e Controles endêmicos	103
2.2- Anticorpos Monoclonais	105
2.3- Biopanning	105
2.4- Titulações	106
2.5- Extração de DNA de fagos	107
2.6- Sequenciamento	107
2.7- Purificação de fagos	107
2.8- ELISA direto para <i>screening</i> de fagos ligantes aos anticorpos monoclonais	107
2.9- ELISA indireto para detecção de IgG utilizando fagos alvos e selvagens	109
2.10- ELISA indireto para detecção de IgG1, IgG2 e IgG3 anti- clones miméticos de GroES e GroEL	109
2.11- Análise estatística	110
2.12- Aspectos Éticos	110
3.0- Resultados	111
4.0- Discussão	120
5.0- Referências Bibliográficas	127
<hr/>	



## Lista de abreviaturas

- °C – Graus Celsius
- ABS- Absorbância
- ABTS- 2,2' –azino-bis ácido 3-  
etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
- Ag85- Antígeno 85, secretado por *M. leprae*
- AIDS- Síndrome da imunodeficiência adquirida
- APC- Célula apresentadora de antígeno
- AraLAM- LAM sem a tampa de manose
- BSA- Soro albumina bovina
- CD- Grupo de diferenciação ou cluster of differentiation
- CD – cotovelo direito
- CE – Controle endêmico
- Ce – cotovelo esquerdo
- CREDESH- Centro de Referência Nacional em Hanseníase/ Dermatologia Sanitária.
- CS-01- Anticorpo monoclonal contra a proteína GroES de *M. leprae*
- CS-35- Anticorpo monoclonal contra o LAM de *M. leprae*
- CS-44- Anticorpo monoclonal contra o GroEL de *M. leprae*
- CSF- Fator estimulador de colônia
- cut-off- limite da positividade
- CXCL10- quimiocina indutora de interferon gama
- CXCR3- receptor da quimiocina CXC
- DD- Dimorfo-dimorfo
- DNA- ácido desoxirribonucléico
- DT-MB- Dimorfo tuberculóide-multibacilar
- DT-PB- Dimorfo tuberculóide-paucibacilar
- DV- Dimorfo virchowiano
- EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA- ensaio imunoenzimático
- ENL- Eritema nodoso hansênico
- ER2738- Cepa de *E. coli* resistente a tetraciclina
- GroEL- Chaperonina de bactérias responsáveis pelo enovelamento de proteína
- GroES- Chaperonina de bactérias responsáveis pelo enovelamento de proteína
- HLA-DRB5- Complexo de histocompatibilidade de classe II ligado a proteína DRB5 codificada pelo gene HLA-DRB5
- HSP- Proteína de choque térmico
- HSP60- Proteína de choque térmico de 60 kDa
- HSP65- Proteína de choque térmico de 65 kDa
- HSP70- Proteína de choque térmico de 70 kDa
- IB- Índice baciloscópio
- IC – intervalo de confiança
- IE- Índice ELISA
- IFN- $\gamma$ - citocina Interferon gama
- IgG- Imunoglobulina G
- IgG1, IgG2 e IgG3- Subclasses de imunoglobulinas de IgG
- IgM- Imunoglobulina M
- IL-10- Interleucina 10
- IL-1a- Interleucina 1 alfa
- IL-1b- Interleucina 1 beta
- IL-2- Interleucina 2
- IL-6- Interleucina 6

- IPTG/Xgal- Isopropil  $\alpha$ -D-tiogalactosise/  
5-Bromo-4-cloro-3indolil-  $\alpha$ -D-  
galactosideo
- JD – joelho direito
- JE – joelho esquerdo
- LAM- lipoarabinomanana
- LM- lipomanana
- PIMs- Manosideos fosfatidilinositol
- LAM-BSA- lipoarabinomanana ligado a  
soro albumina bovina
- LB- Meio de cultura Luria-Bertania
- LD – lóbulo direito
- LE – lóbulo esquerdo
- LID-1- fusão das proteínas ML0405 e  
ML2331
- M - Molar
- M13- bacteriófago filamentosos
- mAGP- Complexo Micolil-  
Arabinogalactano-Peptidoglicano
- ManLAM- LAM com tampa de manose
- MB- Multibacilar
- MHC- Complexo Principal de  
Histocompatibilidade
- ML-Flow- teste do fluxo lateral para  
hanseníase
- mm- milímetro
- ND-o-HSA- Molécula de PGL-1  
dissacarídeo ligado a soro albumina  
humana
- ng- nanograma
- NK- célula natural killer
- OD- densidade óptica
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- OPD- O-fenilenodiamina
- PB- Paucibacilares
- PBMC- Células mononucleares de  
sangue periférico
- PBS- Salina Tamponada com fosfatos
- PBS-Molico 5%- Salina Tamponada  
com fosfatos e leite em pó Molico
- PBS-T- Salina Tamponada com fosfatos  
e Tween 20
- PEG- Polietileno glycol
- Pfu- Unidades formadoras de colônia
- PGL-1- Glicolípido fenólico 1
- pH- Potencial Hidrogeniônico
- pIII- Proteína capsídica III de  
bacteriófagos filamentosos
- pmol - picomol
- PQT- Polioquimioterapia
- rpm – rotação por minuto
- RR- reação reversa
- T- Tuberculóide
- TBS- Salina tamponada com Tris
- TBS-T- Salina tamponada com Tris e  
Tween 20
- Th1- Células T helper 1
- Th2- Células T helper 2
- TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral
- V - Virchowiano
- $\mu$ L- Microlitros

# *Apresentação*

A hanseníase é a doença infecciosa mais antiga da humanidade. Ela surgiu em aproximadamente 600 anos a.C e acreditava-se que era uma doença hereditária, maldição ou punição de Deus. Somente em 1873, Armauer Hansen da Noruega descobriu que a doença era infecciosa e o agente causador desta patologia era *Mycobacterium leprae*. Hansen foi o descobridor da etiologia e do agente transmissível da hanseníase. Damião da Bélgica, hoje santo da Igreja Católica, teve hanseníase depois de conviver por muitos anos cuidando de pessoas com esta doença; com este fato, a ciência provou que a hanseníase era contagiosa.

Em 1981, iniciou-se em todo o mundo um tratamento efetivo para o controle da doença, a polioquimioterapia (PQT). Com o advento deste tratamento, o número de casos novos teve um declínio, mas ainda não se obteve os índices ideais para controle e eliminação da hanseníase.

As vias de transmissão ainda não são totalmente entendidas. Acredita-se que *M. leprae* seja transmitido de pessoa a pessoa, principalmente por gotículas nasais infectadas. O período de incubação é atipicamente longo para uma doença bacteriana, variando de 5-7 anos. O início das manifestações costuma ocorrer em indivíduos de 20-30 anos de idade. A hanseníase é a principal causa de incapacidade física permanente dentre as doenças infecto-contagiosas.

Atualmente o diagnóstico da hanseníase é realizado por exames clínicos e laboratoriais, estes que auxiliam na classificação da doença e modo de tratamento. Porém todas estas ferramentas são utilizadas para o paciente com a infecção já em fase crônica e, em alguns casos, com incapacidades motoras. O fato do paciente não apresentar sinais visíveis de infecção, impede um tratamento precoce e a quebra da transmissibilidade do bacilo para seus contatos domiciliares. Além disto, em pacientes com a forma mais branda da doença, os paucibacilares, por apresentarem baixa carga bacilar, os testes padronizados geralmente não detectam os alvos desejados para o diagnóstico da hanseníase. Nestes casos, o diagnóstico é baseado na clínica.

Entre as complicações desta doença, a principal é a reação hansênica, caracterizada por um forte episódio imunológico contra o bacilo, e se não controlado em tempo hábil, ocorre danos neurais irreversíveis.

Atualmente, os pesquisadores buscam por marcadores que possam ser usados no diagnóstico de infecções recentes de hanseníase e que estejam presentes em doentes paucibacilares e multibacilares; e no prognóstico para determinar o potencial do paciente desenvolver ou não reações hansênicas.

Uma das barreiras para o entendimento desta interação patógeno-hospedeiro é que o bacilo de *M. leprae* não cresce *in vitro*, sendo que o tatu *Dasypus novemcinctus* é o um único hospedeiro efetivo para a produção da bactéria e posteriormente, proteínas nativas.

Diversas estratégias para a busca de antígenos naturais, sintéticos e recombinantes têm sido aplicadas, utilizando técnicas imunológicas, moleculares e bioquímicas, com o intuito de descobrir marcadores mais efetivos no diagnóstico e prognóstico da hanseníase, porém os avanços têm sido relativamente pequenos. Contudo, na hanseníase, a tecnologia Phage Display, uma estratégia proteômica subtrativa, tem sido pouco utilizada nesta busca por novos biomarcadores, devido ao seu alto grau de complexidade e dificuldade na validação. Esta técnica apresenta um grande potencial a ser explorado principalmente com antígenos não proteicos ou com antígenos de superfície com grande quantidade de epitopos conformacionais, os quais não são passíveis de purificação. A tecnologia de Phage Display permite não só a seleção de pequenos peptídeos miméticos, mas também, devido ao seu pequeno tamanho, evita reações cruzadas, podendo aprimorar o diagnóstico diferencial.

Esta tese, além de realizar uma pequena revisão sobre hanseníase, explora a tecnologia de Phage Display, em dois capítulos, com o objetivo de identificar e caracterizar peptídeos miméticos recombinantes (mimotopos) do antígeno não proteico, lipoarabinomanana, e de proteínas de choque térmico, GroEL e GroES, todas consideradas proteínas imunogênicas e com provável associação com a imunopatogênese da doença. Nosso intuito é determinar como estes mimotopos se comportam no reconhecimento da resposta imune de pacientes e contatos, incluindo os episódios reacionais destes pacientes. Por fim, em um capítulo final, comparamos antígenos sintéticos e nativos com duas plataformas de diagnóstico, ELISA e fluxo lateral, demonstrando e sugerindo aplicações específicas. Esperamos que este trabalho possa promover um melhor entendimento da

resposta imunológica na hanseníase e que possamos contribuir para um diagnóstico mais efetivo da doença.

***Fundamentação***  
***teórica***

***Capítulo I***

## 1.0 Introdução

A hanseníase, uma das doenças mais antigas registradas, permanece ainda como uma importante causa de morbidade com aproximadamente 212000 casos novos por ano (1). O agente causador da hanseníase, *Mycobacterium leprae*, é um patógeno intracelular e o único entre as bactérias patogênicas, com a capacidade de invadir o sistema nervoso periférico. Esta forma de tropismo tecidual é a base do dano neural associado com a hanseníase, muitas vezes levando a neuropatia periférica, podendo causar sequela grave, comum em países endêmicos (2).

Em 1873, na primeira associação convincente do microorganismo com a doença humana, Armauer Hansen descobriu o bacilo da hanseníase em biópsias de pele, mas que não cresciam em meio de cultura celular. Um século depois, tatus foram utilizados como hospedeiros, permitindo grandes quantidades de bacilos para serem isolados para estudos bioquímicos e fisiológicos. Outros trabalhos subsequentes que tentaram demonstrar a multiplicação de *M. leprae* em meio de cultura foram em vão, embora a atividade metabólica possa ser detectada (3). O crescimento do bacilo é excepcionalmente lento, com um tempo de duplicação de aproximadamente de 14 dias (4).

*Mycobacterium leprae* tem a forma de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura. É um bacilo álcool-ácido resistente e cora-se em vermelho pela fucsina (5).

### 1.1 Transmissão de *M. leprae*

Atualmente, considera-se que a transmissão de *M. leprae* se dê pelo contato de pessoas suscetíveis à doença com os doentes não tratados das formas multibacilares. No entanto, acredita-se que a transmissão possa ocorrer por pessoas sem nenhum sintoma de hanseníase, porém com a presença de *M. leprae* na mucosa nasal, visto que, os programas de controle baseados na poliquimioterapia (PQT) não surtiram efeito esperado sobre a incidência da doença (6).

O contato não precisa ser necessariamente “pele a pele” como se acreditava previamente, porque a mucosa nasal, e não a pele é a principal porta de saída de



bacilos de pacientes com hanseníase multibacilar não tratados (7). Os bacilos são raramente encontrados na pele intacta, sendo apenas as lesões ulceradas consideradas como porta de saída de bacilos (8). Apesar destas teorias em relação à transmissão da hanseníase pela pele, alguns grupos acreditam que esta via pode ser possível (9).

Pacientes virchowianos não tratados podem liberar até 100 milhões de bacilos de hanseníase de suas secreções nasais diariamente (10). A mucosa nasal é o sítio preferencial para entrada e saída de *M. leprae* (11,12) como mostrado pela colonização de bacilos na concha nasal inferior (13). Seqüências específicas de DNA de *M. leprae* têm sido detectadas por PCR em swabs nasais de muitos indivíduos aparentemente saudáveis (14), bem como na mucosa oral, tendo sido sugerida como segundo sítio de transmissão e infecção de *M. leprae* (15).

Portanto, a excreção nasal de *M. leprae* por indivíduos infectados subclínicamente pode estar implicada na disseminação e transmissão do bacilo, uma vez que bacilos *M. leprae* foram encontrados no swab nasal e bucal de contatos domiciliares de pacientes de hanseníase multibacilares (16).

O domicílio é apontado como importante espaço de transmissão da doença, bem como a vizinhança próxima do caso índice (17). Existem lacunas de conhecimento quanto aos prováveis fatores de risco implicados na transmissão. No entanto, alguns fatores são apontados para novos casos de hanseníase secundários e com o risco do contato adquirir hanseníase, como idade do contato, classificação operacional do caso índice de hanseníase, relação genética, resposta imune celular e humoral, mas nenhum foi definido e aplicado nos programas de monitoramento da hanseníase (18,19).

Recentemente, a escassez de alimentos relacionada com a pobreza foi descrita como um fator preditor importante para a manifestação da hanseníase em áreas endêmicas (20).

## **1.2 Resposta Imune na Hanseníase**

As micobacterias necessitam de fagócitos profissionais para sobreviver e multiplicar. Estas bactérias tem a habilidade de evadir das atividades microbicidas que interferem nas funções de apresentação de antígenos por macrófagos, e isto

resulta em um desvio da resposta imune adaptativa e na diminuição dos parâmetros imunes críticos para uma imunidade protetora. Dentre estes, destaca-se a resposta imune de células T, que é crítica para a proteção de humanos contra *M. leprae* (21,22).

A ocorrência de um mecanismo de defesa do sistema imune, que opere no início da infecção e durante a fase indeterminada são os mecanismos menos compreendidos da imunologia na hanseníase. Uma resposta imune inata efetiva em combinação com a baixa virulência do bacilo da hanseníase pode ser à base da resistência do indivíduo no desenvolvimento da doença clínica (23).

A maioria dos humanos infectados desenvolve uma resposta imune suficiente para destruir o bacilo em pequenas quantidades. Uma pequena porcentagem de indivíduos infectados evolui para um dos extremos da doença, tuberculóide (T) ou virchowiano (V) (24,25). Após a infecção com *M. leprae*, tanto a imunidade protetora como a imunopatologia levam à doença, e acredita-se que ambos os processos são dependentes do reconhecimento das células T ao antígeno específico (26,27).

Quando o bacilo é fagocitado pelo macrófago do hospedeiro, esta célula do sistema imune passa a produzir citocinas IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12 que atuam sobre linfócitos T, principalmente CD4+ tornando-os ativados e capazes de produzir citocinas do perfil Th1. A IL-12 estimula a célula NK induzindo a produção de IFN- $\gamma$  (28-30).

Células T CD4+ que produzem citocinas do perfil Th1, incluindo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, são predominantes em lesões de pacientes T, enquanto células T supressoras, CD8+ do perfil Th2 e as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 estão presentes em lesões de pacientes V (31-36).

Em coloração imunohistológica, as lesões de pacientes T exibem células CD4 auxiliares com uma relação CD4/CD8 de 1,9:1 (37), embora a relação CD4/CD8 no sangue periférico normal seja de 2:1, parece haver uma migração preferencial de células CD4 para dentro das lesões.

Na proliferação, ou na retenção das células T presente nos diversos tipos de lesões de hanseníase, foi mostrado que as células T helper de memória superaram as células T “naive” em 14 vezes nas lesões de pacientes T. Células

T citotóxicas também são numerosas em lesões de pacientes T, com a função de orientar a localização dos macrófagos, sendo que as células T CD4+ são espalhadas por toda a lesão e as CD8+ estão na periferia das lesões de pacientes T. Nos pacientes V a relação de CD4+/CD8+ é de 0,6:1 e as células T CD8+ estão por toda a lesão em vez da periferia (38).

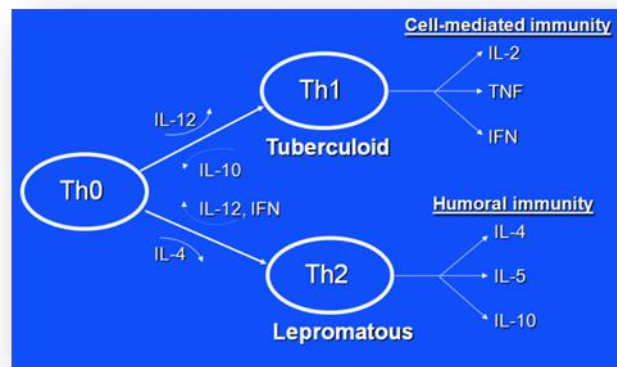


Figura 1- Perfil da resposta imune em pacientes com hanseníase, nos dois polos da doença, tuberculóide (T) e virchowiano (V).

O paradigma Th1/Th2, com base na discriminação funcional das células T helper, de acordo com a produção de suas citocinas, demonstra que as células Th1 e Th2 promovem uma resposta imune celular e humoral, respectivamente (39) (figura 1 e 2).

Esta diferenciação funcional tem oferecido uma hipótese para explicar as diferenças de resposta a *M. leprae* entre pacientes tuberculóides (T) e pacientes virchowianos (V). Grandes estudos de resposta imune local em hanseníase com lesões de pele foram publicados, porém são de difíceis comparações, porque eles têm usado diferentes modelos, métodos de quantificação e maneiras para expressar seus resultados.

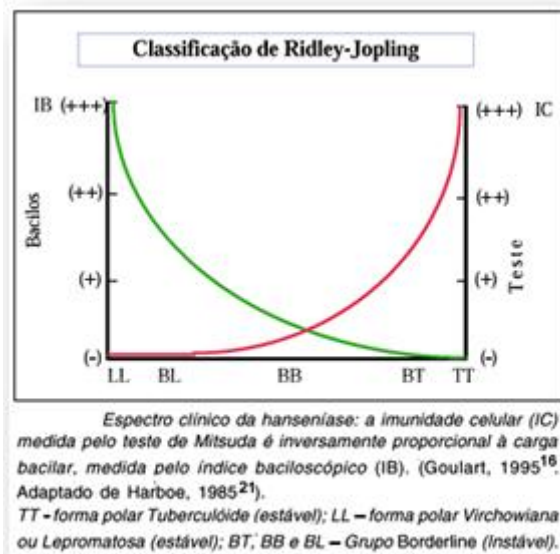


Figura 2- Caracterização da resposta imune celular e carga bacilar de pacientes utilizada para determinar as formas clínicas conforme a Classificação de Ridley & Jopling. (Fonte: (27)GOULART et al. 2002)

No geral, esses estudos revelam uma predominância de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em lesões tuberculóides e IL-4 e IL-10 nas lesões virchowianas, perfis de expressão gênica em conformidade com padrões Th1 e Th2, respectivamente (40-43,36).

Clones CD4+ isolados de lesões de pacientes T secretam principalmente IFN- $\gamma$ , diferentemente do clone de CD4+ de uma lesão de pacientes V, que produz predominantemente IL-4 (44), e clones de CD8+ do tipo Th2 de pacientes V geram grandes quantidades de IL-4 (45), que estimulam um fenótipo de macrófago nas lesões com características supressoras, com produção de IL-10 e TGF- $\beta$  (36,43,46,29) Outros estudos indicaram também que IL-12 e IL-18 promovem a resistência ao *M. leprae* e são altamente expressas em lesões tuberculóides (47,43,27).

A maioria dos estudos demonstra seus resultados apenas com pacientes dos grupos tuberculóide e virchowiano, no entanto, não está claro se esta variação na produção de citocinas ocorre também nas formas dimorfas da hanseníase.

Leucócitos circulantes e células T de pacientes tuberculóides quando estimulados com proteínas do *M. leprae in vitro* também produzem um padrão

de citocinas Th1, enquanto que leucócitos e células T de pacientes virchowianos produzem um padrão de citocinas Th2, incluindo TGF- $\beta$ , (46,48) uma potente citocina supressora de macrófago (30). No entanto, leucócitos de aproximadamente 40% de pacientes de todas as formas clínicas, produziram um misto de citocinas Th0, ou seja, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 (46). É possível que as células de pacientes que produziram citocinas do padrão Th0 sejam de pacientes dimorfos (DV ou DT).

Portanto, com base nos estudos aqui descritos e outros presentes na literatura pode-se inferir que a resposta imune dos seres humanos contra *M. leprae* pode não corresponder totalmente ao modelo Th1/Th2.

### **1.3 Episódios reacionais**

As reações hansênicas podem ser definidas como manifestações clínicas agudas resultantes de alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e *M. leprae* (49). Estes episódios agudos, que afetam principalmente pele e nervos, são as principais causas de morbidade e incapacidade da função do nervo periférico, e são classificados em dois tipos: reação Tipo 1 e reação Tipo 2 (50).

A reação tipo 1 ocorre em pacientes da categoria intermediária do espectro, ou seja, DT, DD e DV. Esta reação também é conhecida como reação reversa, porque as observações iniciais sugeriram que após a reação, evidências clínicas e histopatológicas indicavam que a imunidade nas lesões havia sido reforçada (51). Ela se caracteriza como uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) associada ao "clearance" bacilar das lesões e ascensão no espectro em direção ao pólo tuberculóide (52, 27). Estas reações apresentam endurecimento e eritema nas lesões existentes, e muitas vezes com neurite progressiva, causando neuropatia sensorial e motora. Em reações graves as lesões podem ulcerar (53). As reações tipo 1 geralmente se desenvolvem gradualmente e seu curso natural pode durar várias semanas (23).

Estudos funcionais com linfócitos de pacientes com reação tipo 1 demonstraram um aumento na proliferação de linfócitos em resposta aos antígenos do *M. leprae in vitro* (54,55). A imunofenotipagem posteriormente revelou que o número de células T CD4+ são aumentadas nas lesões da

pele (38,37,56,57). Receptores de IL-2 solúveis em soros de pacientes ficam em níveis elevados durante este episódio reacional e no final do tratamento estes níveis diminuem (58). Durante a reação tipo 1, ocorre o aumento da expressão dos genes de várias citocinas pro-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Essas ativações ocorrem tanto no local da lesão, como sistemicamente, no soro e em leucócitos circulantes (59,60,61,62). O padrão de expressão de citocinas em reações tipo 1 mostra um reforço espontâneo da resposta Th1 do paciente, em nível local contra *M. leprae* (37).

A reação do tipo 2, também conhecida como eritema nodoso hansênico (ENH), ocorre em pacientes multibacilares (DV e V). Estes pacientes apresentam um início abrupto de nódulos eritematosos que podem se desenvolver na face, extremidades ou tronco, sem predileção por lesões existentes. Sistemicamente, estes pacientes muitas vezes podem ter febre, mal-estar e algum grau de neurites, com neuropatia motora e sensitiva. Na reação tipo 2 grave algumas lesões cutâneas podem ulcerar. O curso natural das reações tipo 2 é de 1 a 2 semanas, mas muitos pacientes apresentam recorrências múltiplas durante vários meses (53).

O episódio de ENH aparentemente é desencadeado pelo depósito de complexos imunes nos tecidos, semelhante à reação de Arthus (62). Imunoglobulinas e depósitos de complemento foram demonstrados nas lesões de pele, e o complemento sérico mostrou estar diminuído nesses pacientes, sendo consistentes com a hipótese de que alguns componentes microbianos foram identificados nestes imunocomplexos (63).

Outros estudos identificaram possíveis evidências de ativação celular na reação tipo 2, incluindo o aumento de citocinas circulantes, como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (64). Os níveis de mRNA para estas citocinas estão aumentados em biópsias de lesões de pele, indicando que ocorreu a ativação celular imune neste local. Em contraste, ocorre o aumento da expressão de mRNA de IL-6, IL-8 e IL-10 e a expressão sustentada de mRNA para IL-4 e IL-5. Todas as citocinas associadas com a quimiotaxia de neutrófilos, produção de anticorpos e a redução da imunidade celular foram observados em lesões de ENH (59,48,61). Os níveis de TGF- $\beta$  em cultura de células aderentes de pacientes DV e V com reação tipo 2

(ENH) foram cinco vezes superior ao encontrado em pacientes DD e DT com reação tipo 1, atuando como uma citocina imunomodulatória associada com a resposta Th2 na reação ENH (30).

O fenômeno de Lúcio é uma doença aguda, grave, com vasculite necrotizante múltipla ocorrendo principalmente em pacientes de ascendência mexicana (65). Esta complicação é rara e está associada com alta morbidade e mortalidade. Estas reações foram associadas à presença de altos níveis de crioglobulinas e de antígenos de *M. leprae* (66, 67), as reações tipo 1 e 2 podem estar associadas a este fenômeno, mas o papel que ela podem desempenhar, ainda é incerto.

É possível ainda a ocorrência de reações mistas, principalmente nos pacientes da forma clínica DV, que se caracteriza por desenvolver reação tipo 1 e tipo 2 em diferentes momentos (68).

Os estados reacionais hansênicos podem ocorrer durante o curso natural da doença, durante o tratamento e até mesmo após o tratamento (68).

#### **1.4- Diagnóstico da Hanseníase**

O diagnóstico atual da hanseníase é baseado na clínica, avaliação neural e na detecção microscópica de bacilo álcool-ácido resistente em raspados dérmicos e no exame histopatológico de lesões cutâneas. A microscopia é baseada na coloração dos bacilos pelo método de Ziehl-Neelsen e esta técnica requer pelo menos mil organismos por grama de tecido para uma detecção confiável, o que resulta em teste de baixa sensibilidade, especialmente para a forma tuberculóide da doença, onde os bacilos são raros ou ausentes (69-71).

Devido ao amplo espectro de manifestações clínicas da hanseníase, a utilização de critérios histopatológicos, imunológicos e moleculares pode aumentar tanto a sensibilidade quanto a especificidade dos procedimentos envolvidos no diagnóstico e na correta alocação dos pacientes em diferentes esquemas terapêuticos (72).

Atualmente, com a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do DNA de *M. leprae*, eventualmente presente em amostras de esfregaço dérmico, biópsias de pele e nervo, pode-se alcançar um diagnóstico de

certeza em hanseníase, para instituir um tratamento com maior efetividade. Na tentativa de aperfeiçoar este método, vários *primers*, de diferentes tamanhos, têm sido testados e reportados na literatura, com diferentes graus de positividade (73-76,14,77,34,15).

O teste de Mitsuda é um teste intradérmico, que induz uma resposta de hipersensibilidade tardia tipo tuberculina. Este teste quantifica a resposta imune celular específica contra *M. leprae*. A lepromina, o reagente utilizado neste teste, é uma mistura de proteínas de *M. leprae* que foram destruídos pelo calor (78). Pacientes da forma clínica V apresentam anergia de células T e devido a esta alteração no sistema imune, possuem este teste negativo (57), enquanto nos pacientes T, o teste de Mitsuda é positivo. Do ponto de vista clínico, o teste é um importante indicador da eficiência da imunidade celular ao *M. leprae*, sendo considerado de alto valor prognóstico à resistência quando positivo ou à suscetibilidade quando negativo, e em indivíduos normais está associada a um risco menor de desenvolver a doença (19).

Para fins de tratamento com a poliquimioterapia (PQT), a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma classificação operacional, na qual os pacientes são divididos em Paucibacilares (PB), quando apresentam um número menor ou igual a cinco lesões cutâneas, e Multibacilares (MB), quando apresentam mais de cinco lesões. Contudo, se o exame baciloscópico estiver disponível, os pacientes que apresentarem baciloscopia do esfregaço dérmico positiva são classificados como MB, independente do número de lesões cutâneas (79).

Os testes sorodiagnósticos são uma forma fácil e tangível para o diagnóstico da doença, porém, na hanseníase tem sido usado atualmente somente um antígeno específico ao *M. leprae*, o glicolípido fenólico I (PGL-1). A descoberta desse antígeno ocorreu em 1981 (80) e o mesmo não apresenta reação cruzada com *M. tuberculosis* ou outras micobactérias.

Um teste de fluxo lateral simples e ensaios de “dipstick”, baseados no antígeno PGL-1, foram desenvolvidos para detectar indivíduos infectados por *M. leprae* em áreas endêmicas da doença (81,82). Os testes utilizando PGL-1 detectam a imunoglobulina IgM e apresentam uma correlação com a carga bacilar do paciente e com o espectro clínico da doença, sendo abundante em pacientes



multibacilares, principalmente naqueles com a forma clínica DV e V . Estas imunoglobulinas decrescem seus índices com o tratamento da PQT, porém permanecem no soro de pacientes e são detectadas por vários anos após a cura da doença (83).

Para uma melhor classificação operacional, alguns estudos têm usado o teste de fluxo lateral de *M. leprae* (ML-Flow). Pacientes soropositivos são classificados como MB, enquanto os soronegativos como PB (84-87,82).

Portanto, os testes ELISA e ML-Flow têm auxiliado a clínica no diagnóstico e na escolha do tratamento da PQT, visto que pacientes PB são submetidos ao tratamento por seis meses e os MB por 12 meses (19).

Um dos fatores limitantes deste teste sorológico é que, como os anticorpos IgM anti-PGL-1 estão relacionados diretamente com a carga bacilar dos pacientes com hanseníase, os pacientes PB apresentam baixos níveis de anticorpos específicos circulantes, o que torna a detecção de IgM específica nesse pólo da doença difícil ou ausente nos testes sorológicos, variando de acordo com a sensibilidade do teste (88,19). O teste anti-PGL-1, portanto, é recomendado como um suporte para a clínica e para direcionar o tratamento (89,90,83).

Muitos contatos domiciliares de pacientes com hanseníase apresentam estes anticorpos no soro por vários anos, mas não desenvolvem a doença, o que limita a capacidade deste teste de prever a ocorrência da doença. No entanto, trabalhos anteriores têm demonstrado que contatos soropositivos tem maior chance de desenvolver hanseníase que aqueles soronegativos (82,19) e, quando desenvolvem a doença, é primariamente MB (90). Conseqüentemente, a identificação de anticorpo anti-PGL-1 em contatos de pacientes com hanseníase poderia conduzir à detecção precoce da doença e à prevenção da transmissão (91,19).

Pessoas infectadas que não apresentam manifestação clínica da doença, mas com a presença do bacilo na mucosa nasal, podem também estar envolvidos na transmissão subclínica da hanseníase (88). A presença do bacilo em mucosa nasal pode alcançar 100% dos pacientes V e está presente em 10% dos contatos domiciliares de hanseníase, demonstrando que a mucosa nasal é o local preferencial para a entrada e saída de *M. leprae* (14,15) e a infecção inicial

parece ocorrer nas vias aéreas superiores. No entanto, o encontro de DNA de *M. leprae* na cavidade oral em torno de 7% dos contatos domiciliares de doentes de hanseníase tem demonstrado de forma inequívoca que há portadores sadios dessa micobactéria nas vias aéreas superiores e que os mesmos estão envolvidos com a disseminação de *M. leprae* em área endêmica e devem exercer um papel na produção de novos casos (15).

Isto poderia ter uma implicação direta para o programa de controle: monitoramento dos contatos por um período maior para evitar o diagnóstico tardio de casos de hanseníase em evolução e ou tratamento quimioprolático dos contatos domiciliares com intervenção sanitária controlada (6), estratégia já proposta pela OMS para os países endêmicos (92).

### **1.5- Antígenos potenciais para futuros diagnósticos**

O principal obstáculo na pesquisa para novos testes de diagnóstico na hanseníase é a impossibilidade de cultivar *M. leprae in vitro*.

O tatu *Dasypus novemcinctus* mostrou ser o melhor hospedeiro para o crescimento de *M. leprae* em que, 18 a 24 meses após a inoculação, o fígado e o baço apresentaram  $10^9$  bacilos por grama de tecido (93).

A identificação de antígenos informativos e específicos são um dos aspectos que mais dificulta o desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico, e isto é particularmente verdadeiro na hanseníase, porque ainda se tem poucas informações envolvendo o papel de muitas proteínas expressas ou o estado metabólico do organismo durante a infecção e progressão da doença (94).

A tecnologia de DNA recombinante tem sido uma importante ferramenta na identificação de antígenos envolvidos na resposta imune, que pode ser induzida após infecção com este patógeno intracelular (95). Muitos destes antígenos são proteínas de “heat shock” (HSPs), que são localizadas predominantemente no citoplasma da bactéria (96,97,6). Anticorpos monoclonais são utilizados para seleção dessas proteínas, que são as proteínas mais abundantes de *M. leprae* e induzem resposta de células B e células T no sistema imune humano (98, 99).

Nestes últimos anos vários genes também foram identificados como específicos de *M. leprae* e acredita-se que suas proteínas contenham epítopos de células T

restritos a via principal de alelos HLA-DR (6). Cinco destes antígenos (ML0576, ML1989, ML1990, ML2283, ML2567) foram capazes de induzir uma resposta significativa de células T em pacientes PB e controles sadios expostos ao *M. leprae*, mas não em pacientes MB, pacientes com tuberculose ou controles endêmicos (100). Essas proteínas mostraram ter um grande potencial no diagnóstico da infecção precoce, pois 71% dos controles sadios expostos ao *M. leprae* não tinham anticorpos contra o PGL-1, porém respondiam a pelo menos um dos cinco antígenos (100).

O antígeno LID, que é a fusão das proteínas ML0405 e ML2331, mostrou ser um antígeno ligante de imunoglobulinas IgG e IgM, que pode ser utilizado tanto no diagnóstico da hanseníase, como no monitoramento da eficiência da PQT (101).

Recentemente, Wiker e colaboradores (99), descreveram uma lista das proteínas mais abundantes de *M. leprae*. Dentre elas estão as proteínas de “heat shock”, e no topo da lista estão as chaperoninas GroEL2 e GroES. O complexo de antígeno 85, que são proteínas secretadas do bacilo, foi destacado também como proteínas abundantes. Dessas 20 proteínas, algumas se destacaram como boas candidatas para a pesquisa, pois eram específicas de *M. leprae*. Com estas características, foram relatadas treze proteínas, entre elas está a ML0050, que é uma proteína secretória filtrada de cultura, com grande potencial para testes sorológicos. Várias destas outras proteínas eram pseudogenes (99).

Entre as proteínas que mais se destacam como reagentes para futuros testes diagnósticos estão as chaperoninas de 65 kDa GroEL-2, a GroES de 10 kDa e a proteína HSP 18, que estão relacionadas com a família de pequenas proteínas de “heat shock” e são as principais proteínas presentes em *M. leprae* derivados do hospedeiro (102). A GroES é a proteína nativa mais expressa no bacilo, altamente imunogênica, e um terço de todas as células T reativas ao *M. leprae* reconhecem esta fração protéica em pacientes T/DT ou contatos saudáveis (97).

A lipoarabinomanana (LAM) é a principal constituinte da célula total de *M. leprae*, amplamente encontrada nas espécies de *Mycobacterium*. Ela constitui o principal imunógeno possuidor de carboidratos reconhecido pelo soro de pacientes com tuberculose e hanseníase (103,104). A molécula LAM exibe funções imunomoduladoras, já que inibe a ativação de células T, as funções induzidas por

IFN- $\gamma$  como os macrófagos microbicidas e atividades tumorocidas, a inibição da proteína C Kinase e o recrutamento de citocinas, como TNF- $\alpha$  (105-107).

LAM é um antígeno não protéico e, assim como PGL-1, também apresenta uma grande importância na resposta imune e ambos têm sido exaustivamente utilizados em testes de diagnóstico para a hanseníase (108).

Dentre as proteínas de membrana, as duas principais são: a proteína principal de membrana I de 35 kDa (MMP-I) e a bacterioferritina (Bfr/MMP-II). A MMP-I é uma proteína que leva a uma forte resposta de células T em 65% dos pacientes com hanseníase tuberculóide e em 80% de contatos saudáveis (109). O gene que codifica esta proteína é ausente em bacilos de *M. tuberculosis* e *M. bovis* (BCG), sendo homólogo somente com *M. avium* (110,111).

Proteínas associadas à célula total do bacilo (MLCwA) possuem determinantes cruciais de patogenicidade e imunogenicidade (112). Em uma análise recente, MLCwA revelou ser uma mistura complexa de proteínas, incluindo enzimas responsáveis pela biosíntese de componentes peptidoglicanos do envelope celular, arabinogalactano e lipídios, como ácido micólico, glicolípido fenólico (PGL-1) e *dimycocerosate phthiocerol* (PDIM) (112).

Diante de inúmeras proteínas descritas de *M. leprae*, o componente antigênico mais utilizado atualmente em teste de sorodiagnóstico na hanseníase, como já relatado, é o glicolípido fenólico (PGL-1), e nenhuma dessas novas proteínas apresentou melhor desempenho, até o momento.

## **1.6- Phage display**

A técnica de Phage Display tem se apresentado como uma ferramenta útil na seleção de porções antigênicas proteicas e não proteicas, pois consiste em um processo seletivo na qual uma biblioteca de peptídeos com sequências randomizadas expressas na superfície de uma partícula viral se liga a alvos específicos. Além do mais, as partículas virais apresentam o material genético codificante para cada resíduo no genoma viral. Com isto, é possível uma correlação entre cada sequência de DNA permitindo rápida identificação e caracterização de peptídeos ligantes para uma variedade de moléculas alvo, por um processo de seleção *in vitro* chamado *biopanning* (114).

A tecnologia de phage display pode levar a produção de uma enorme variação de ligantes, incluindo anticorpos recombinantes e peptídeos, com especificidades já predefinidas. A ferramenta de phage display de anticorpos monoclonais são importantes fontes para a descoberta de biomarcadores e de melhores estratégias de diagnóstico. Peptídeos miméticos selecionados contra anticorpos monoclonais são utilizados para diversas patologias, auxiliando no desenvolvimento de novos testes para um diagnóstico mais sensível e específico. Além disso, tecnologias emergentes baseadas em phage display podem beneficiar a produção de testes de diagnóstico, através da produção de moléculas que de outras formas seria impossível obter por métodos tradicionais (113). Atualmente já foram expressos na superfície viral: anticorpos (115-118), peptídeos (119), enzimas (120), receptores de superfície celular (121), entre outras estruturas.

A técnica phage display está sendo utilizada nos mais diversos trabalhos a respeito de enfermidades humanas e seus patógenos, como o vírus da dengue (122), o vírus HIV (123), hepatite C (124), *Toxoplasma gondii* (125), *Mycobacterium tuberculosis* (108), dentre vários outros. A identificação e caracterização de peptídeos miméticos responsivos a células T e células B contra micobactérias são importantes para o desenvolvimento de reagentes diagnósticos específicos (126).

Barenholz e colaboradores (127) selecionaram um antígeno mimético (B11) ao antígeno lipoarabinomanana manossilada (ManLAM) do *Mycobacterium tuberculosis* utilizando a técnica de phage display. A especificidade e sensibilidade do teste ELISA com o antígeno mimético foi similar ao teste ELISA com ManLAM nativo, antígeno utilizado no diagnóstico de tuberculose (TB). O antígeno mimético mostrou ser um excelente substituto do ManLAM na sorologia do diagnóstico de TB (127).

A tecnologia de phage display foi utilizada também para selecionar peptídeos miméticos ao antígeno PGL-1 do *M. leprae*, porém os peptídeos selecionados não foram efetivos para a detecção de anticorpos em ensaios sorológicos quando comparados com o antígeno nativo em soros de pacientes com hanseníase (128).

Esta tecnologia apresenta muitas vantagens, pois pode ser utilizada quando a natureza do antígeno ainda é desconhecida, quando o antígeno é conformacional e quando o alvo pode ter um papel antigênico ou imunomodulador (129,130).

Vários anticorpos monoclonais são utilizados como alvos para seleção de peptídeos miméticos na técnica de phage display. Centros de pesquisa têm desenvolvido anticorpos monoclonais contra antígenos importantes do *M. leprae* (<http://www.cvmbs.colostate.edu/mip/leprosy/rabbitpolymonocsu.html>).

O anticorpo monoclonal CS-35 é um anticorpo gerado contra o lipopolissacarídeo de *M. leprae*, a lipoarabinomanana (LAM). Esse anticorpo tem sido utilizado como um anticorpo de referência para a caracterização de anticorpos monoclonais contra LAM e estudar uma variedade de funções celulares, como o papel de LAM na interação de micobactérias com macrófagos (131-133). No entanto, as estruturas dos epítomos reconhecidos por este anticorpo ainda não foram identificadas.

Este anticorpo monoclonal foi utilizado na técnica de *biopanning* para seleção de peptídeos miméticos para o diagnóstico da tuberculose; para seleção de antígenos com potencial para diagnósticos combinatórios em chips; para agentes moduladores em terapias de câncer e como adjuvantes para vacina, devido à sua capacidade proinflamatória (108).

Outros anticorpos contra proteínas de *M. leprae* também são sintetizados e utilizados em pesquisas da hanseníase, dentre eles pode-se destacar os monoclonais CS-01 e CS-44. O CS-01 é um anticorpo monoclonal contra a proteína GroES e o CS-44 contra o GroEL (<http://www.cvmbs.colostate.edu/mip/leprosy/rabbitpolymonocsu.html>).

Nesta era proteômica, muitas informações e novos ensaios vêm surgindo, o que permite aos pesquisadores que utilizem dessas novas plataformas para desenvolver marcadores com potencial utilização como reagentes para o diagnóstico ou como imunógenos. Essas técnicas poderão levar também à obtenção de vacinas para o controle dessa doença estigmatizante, bem como levar a novos alvos para o desenho racional de drogas com potencial terapêutico contra *M. leprae*.

## 2.0- Referências Bibliográficas

- 1- World Health Organization. 2010. *Weekly Epidemiological Record*. 85:337.
- 2- Ridley, D. S. and Job, C. K. 1985. The pathology of leprosy. In: Hastings, R.C. Leprosy. (Medicine in the Tropics Series). Ed. Churchill Livingstone Inc. New York, p.100.
- 3- Franzblau, S. G. 1989. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* in the BACTEC 460 system. *Antimicrob Agents Chemother*. 33:2115.
- 4- Shepard, C. S. C. 1962. Multiplication of "*Mycobacterium leprae*" in the foot-pad of the mouse. *Int j lepr*. 30:291.
- 5- Rees, R. J., Valentine, R. C. and Wong, P. C. 1960. Application of quantitative electronmicroscopy to the study of *Mycobacterium lepraemurium* and *M. leprae*. *J Gen Microbiol*. 22:443.
- 6- Goulart, I. M. B. and Goulart, L. R. 2008. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch. Dermatol. Res*. 300:269.
- 7- de Wit, M. Y., Douglas, J. T., McFadden, J. and Klatser, P. R. 1993. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. *J Clin Microbiol*. 31:502.
- 8- Yawalkar, S. J. Leprosy for medical practitioners and paramedical workers. 5<sup>a</sup> ed. Basle, 1992. 132p.
- 9-Ghorpade, A. K. 2011. Transepidermal elimination of *Mycobacterium leprae* in histoid leprosy: a case report suggesting possible participation of skin in leprosy transmission. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 77:59.
- 10- Waters MF. 1981. The six disease of WHO. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 283: 1320.
- 11- McDougall, A. C., Rees, R. J., Weddell, A. G. and Kanan, M. W. 1975. The histopathology of lepromatous leprosy in the nose. *J Pathol*. 115:215.
- 12- Job, C.K. 1990. Nasal mucosa and abraded skin are the two routes of entry of *Mycobacterium leprae*. *Star*. 49:1.
- 13- Melo Naves, M., Gomes Patrocinio, L., Patrocinio, J. A., Naves Mota, F. M., Diniz de Souza, A., Negrão Fleury, R. and Bernardes Goulart, I. M. 2009. Contribution of nasal biopsy to leprosy diagnosis. *Am J Rhinol Allergy*.23:177.

- 14- Patrocínio, L. G., Goulart, I. M. B., Goulart, L. R., Patrocínio, J. A., Ferreira, F. R. and Fleury, R. N. 2005. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44:311.
- 15- Martinez, T. S., Figueira, M. M., Costa, A. V., Gonçalves, M. A., Goulart, L. R. and Goulart, I. M. 2010. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect.* doi: 10.1111/j.1469-0691. 2010. 03453.x.
- 16- Yawalkar, S. J. 2002. Leprosy for medical practitioners and paramedical workers, 7th ed. Basle, Novartis Foundation for Sustainable Development.
- 17- Richardus, J. H., Meima, A., van Marrewijk, C. J., Croft, R. P. and Smith, T. C. 2005. Close contacts with leprosy in newly diagnosed leprosy patients in a high and low endemic area: comparison between Bangladesh and Thailand. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 73:249.
- 18- Moet, F. J., Pahan, D., Schuring, R.P., Oskam, L. and Richardus, J. H. 2006. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis.* 193:346.
- 19- Goulart, I. M., Bernardes Souza, D. O., Marques, C. R., Pimenta, V. L., Gonçalves, M. A. and Goulart, L. R. 2008. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clin Vaccine Immunol.* 15:101.
- 20- Feenstra, S. G., Nahar, Q., Pahan, D., Oskam, L. and Richardus, J. H. 2011. Recent food shortage is associated with leprosy disease in bangladesh: a case-control study. *PLoS Negl Trop Dis.* 5:1029.
- 21- Sibley, L. D., Franzblau, S. G. and Krahenbuhl, J. L. 1987. Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. *Infect Immun.* 55:680.
- 22- Sibley, L. D. and Krahenbuhl, J. L. 1988. Induction of unresponsiveness to gamma interferon in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 56:1912.
- 23- Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J.L. and Truman, R. W. and Williams, D. L. 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 19:338.



24- Bloom, B. R. and Godal, T. 1983. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. V. Leprosy. *Rev Infect Dis*.5:765.

25- Jopling, W. H. Handbook of Leprosy, 1984, 3rd Edn., William Heinemann Medical Books Ltd., London, pp. 91-92.

26- Thole, J. E., Schöningh, R., Janson, A. A., Garbe, T., Cornelisse, Y. E., Clark-Curtiss, J. E., Kolk, A. H., Ottenhoff, T. H., De Vries, R. R. and Abou-Zeid, C. 1992. Molecular and immunological analysis of a fibronectin-binding protein antigen secreted by *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol*. 6:153.

27- Goulart, I. M. B., Penna, G. O. and Cunha, G. 2002. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Bras Med*. 35:365.

28- FOSS, N. T. 1997. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina*. 30:335.

29- Goulart, I. M., Figueiredo, F., Coimbra, T. and Foss, N. T. 1996. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am J Pathol*. 148:911.

30- Goulart, I. M., Mineo, J. R. and Foss, N. T. 2000. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. *Clin Exp Immunol*. 122:330.

31- Abulafia, J. and Vignale, R. A. 1999. Leprosy: pathogenesis updated. *Int J Dermatol*. 38:321.

32- Abulafia, J. and Vignale, R. A. 2001. Leprosy: accessory immune system as effector of infectious, metabolic, and immunologic reactions. *Int J Dermatol*. 40:673.

33- Modlin, R. L. and Brenner, M. B. 2009. T cell responses in microbial infection. *Curr Opin Immunol*. 21:365.

34- Goulart, I. M. B., Cardoso, A. M., Santos, M. S., Gonçalves, M. A., Pereira, J. E. and Goulart, L. R. 2007. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Archives of Dermatological Research*. 299:267.

35- Ridley, D. S. and Jopling, W. H. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 34:255.

- 36- Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Rea, T. H., Bloom, B. R. and Modlin, R. L. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 254:277.
- 37- Modlin, R. L., Melancon-Kaplan, J., Young, S. M., Pirmez, C., Kino, H., Convit, J., Rea, T. H. and Bloom, B. R. 1988. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:1213.
- 38- Modlin, R. L., Hofman, F. M., Meyer, P. R., Sharma, O. P., Taylor, C. R. and Rea, T. H. 1983. In situ demonstration of T lymphocyte subsets in granulomatous inflammation: leprosy, rhinoscleroma and sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*. 51:430.
- 39- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 136:2348.
- 40- Arnoldi, J., Gerdes, J. and Flad, H. D. 1990. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol*. 137:749.
- 41- Flad, H. D., Arnoldi, J., Ohlert, A., Kazda, J. and Gerdes, J. 1990. Cytokine production and proliferative capacity of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Trop Med Parasitol*. 41:307.
- 42- Mutis, T., Kraakman, E. M., Cornelisse, Y. E., Haanen, J. B., Spits, H., De Vries, R. R. and Ottenhoff, T. H. 1993. Analysis of cytokine production by Mycobacterium-reactive T cells. Failure to explain *Mycobacterium leprae*-specific nonresponsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. *J Immunol*. 150:4641.
- 43- Sieling, P. A. and Modlin, R. L. 1994. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology*. 191:378.
- 44- 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., et al. 1994. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J Immunol*. 153:3639.
- 45- Salgame, P., Abrams, J. S., Clayberger, C., Goldstein, H., Convit, J., Modlin, R. L. and Bloom, B. R. 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. 254:279.

- 46- Misra, N., Selvakumar, M., Singh, S., Bharadwaj, M., Ramesh, V., Misra, R. S. and Nath, I. 1995. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett.* 48:123.
- 47- García, V. E., Uyemura, K., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Morita, C. T., Okamura, H., Kurimoto, M., Rea, T. H. and Modlin, R.L. 1999. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J Immunol.* 162:6114.
- 48- Nath, I., Vemuri, N., Reddi, A. L., Bharadwaj, M., Brooks, P., Colston, M. J., Misra, R. S. and Ramesh, V. 2000. Dysregulation of IL-4 expression in lepromatous leprosy patients with and without erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev.* 71:130.
- 49- Sampaio, E. P. and Sarno, E. N. 1998. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz J Med Biol Res.* 31:69.
- 50- Ridley, D. S. 1969. Reactions in leprosy. *Lepr Rev.* 40:77.
- 51- Ridley D. S. and Radia, K. B. 1981. The histological course of reactions in borderline leprosy and their outcome. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 49:383.
- 52- Fleury, R. N. 1989. Difficulties in the use of the Ridley and Jopling classification--a morphological analysis. *Hansenol Int.* 14:101.
- 53- Foss, N. T., Souza, C. S. Goulart, I. M. B., Gonçalves, H. S., and Virmond, M. 2005. Hanseníase: Episódios Reacionais. *In: Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina*, 3:161.
- 54- Barnetson, R. S., Bjune, G., Pearson, J. M. and Kronvall, G. 1976. Cell mediated and humoral immunity in "reversal reactions". *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 44:267.
- 55- Godal, T. 1973. Lepra reactions. *Ethiop Med J.* 11: 194.
- 56- Scollard, D. M., Suriyanon, V., Bhoopat, L., Wagner, D. K., Smith, T. C., Thamprasert, K., Nelson, D. L. and Theetranont, C. 1990. Studies of human leprosy lesions in situ using suction-induced blisters. 2. Cell changes and soluble interleukin 2 receptor (Tac peptide) in reversal reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 58:469.

- 57- Modlin, R. L. and Rea, T. H. 1994. Immunopathology of leprosy granulomas. *Immunopathology*. 10:359.
- 58- Tung, K. S., Umland, E., Matzner, P., Nelson, K., Schauf, V., Rubin, L., Wagner, D., Scollard, D., Vithayasai, P., Vithayasai, V., et al. 1987. Soluble serum interleukin 2 receptor levels in leprosy patients. *Clin Exp Immunol*. 69:10.
- 59- Moraes, M. O., Sarno, E. N., Almeida, A. S., Saraiva, B. C., Nery, J. A., Martins, R. C. and Sampaio, E. P. 1999. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol*. 50:541.
- 60- Sarno, E. N., Grau, G. E., Vieira, L. M. and Nery, J. A. 1991. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol*. 84:103.
- 61- Sreenivasan, P., Misra, R. S., Wilfred, D. and Nath, I. 1998. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. *Immunology*. 95:529.
- 62- Wemambu, S. N., Turk, J. L., Waters, M. F. and Rees, R. J. 1969. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. *Lancet*. 2:933.
- 63- Rojas, R. E. and Segal-Eiras, A. 1997. Characterization of circulating immune complexes in leprosy patients and their correlation with specific antibodies against *Mycobacterium leprae*. *Clin Exp Dermatol*. 22:223.
- 64- Yamamura, M. 1992. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 255:12.
- 65- Donner, R. S. and Shively, J. A. 1967. The "Lucio phenomenon" in diffuse leprosy. *Ann Intern Med*. 67:831.
- 66- Drosos, A. A., Brennan, P. J., Elisaf, M. S., Stefanou, S. G., Papadimitriou, C. S. and Moutsopoulos, H. M. 1986. Specific antigen and antibody to *Mycobacterium leprae* in the cryoprecipitate of a patient with Lucio phenomenon. *Rheumatol Int*. 6:93.
- 67- Quismorio, F. P. Jr., Rea, T., Chandor, S., Levan, N. and Friou, G. J. 1978. Lucio's phenomenon: an immune complex deposition syndrome in lepromatous leprosy. *Clin Immunol Immunopathol*. 9:184.

- 68- Naafs, B. 1994. Leprosy reactions. New knowledge. *Trop Geogr Med.* 46:80.
- 69- Shepard, C. C. and McRae, D. H. 1968. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 36:78.
- 70- Bhatia, V. N. 1993. "Dancing particles" remembering late Dr.C.G.S. Iyer. *Indian J Lepr.* 65:453.
- 71- International Leprosy Association Technical Forum. 2002. The diagnosis and classification of leprosy. *Int J of Leprosy and Other Mycobact Dis* 70:23.
- 72- Teixeira, A. C., Cruvinel, D. L., Roma, F. R., Luppino, L. F., Resende, L. H. P., Sousa, T., Bühner-Sékula, S., Goulart, I. M. B. 2008. Evaluation of the concordance between clinical and laboratorial exams in the diagnosis of leprosy. *Rev Bras Med,* 41:48.
- 73- Yoon, K. H., Cho, S. N., Lee, M. K., Abalos, M. R., Cellona, R. V., Fajardo, J. R., Guido, L. S., Dela Cruz, E. C., Waijth, G. P. and Kim, J. D. 1993. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *J Clin Microbiol* 31:895.
- 74- Wichtwechkarn, J., Karnjan, S., Shuntawuttisetee, S., Sorjpravit, C., Kampirapap, K. and Peerapakorn, S. 1995. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. *J Clin Microbiol* 33:45.
- 75- Kampirapap, K., Singtham, N., Klaster, P. and Wirivawipart, S. 1998. DNA Amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *Int J of Leprosy and Other Mycobact Dis* 66:16.
- 76- Kang, T. J., Kim, S. K., Lee, S. B., Chae, G.T. and Kim, J. P. 2003. Comparison of two different amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. *Clin Exp Dermatol* 28:420.
- 77- Martinez, A. N., Britto, C. F. P. C., Nery, J. A. C., Sampaio, E. P., Jardim, M. R., Sarno, E. N., and Moraes, M. O. 2006. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol* 44:3154.
- 78- Languillon, J. 1978. Leprosy. *Acta Leprol.* 71:1.

79- Normam, G., Joseph, G. and Richard, J. 2004. Validity of the WHO operational classification and value of other clinical signs in the classification of leprosy. *International Journal Leprosy Other Mycobacterial Disease* 72:278.

80- Hunter, S. W. and Brennan, P. J. 1981. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol.* 147:728.

81- Izumi, S., Fujiwara, T., Ikeda, M., Nishimura, Y., Sugiyama, K. and Kawatsu, K. 1990. Novel gelatin particle agglutination test for serodiagnosis of leprosy in the field. *J Clin Microbiol.* 28:525.

82- Bühner-Sékula, S., Smits, H. L., Gussenhoven, G. C., van Leeuwen, J., Amador, S., Fujiwara, T. et al. 2003. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol* 41:1991.

83- Zenha, E. M., Ferreira, M. A. and Foss, N. T. 2009. Use of anti-PGL-1 antibodies to monitor therapy regimes in leprosy patients. *Braz J Med Biol Res.* 42:968.

84- Agis, F., Schlich, P., Cartel, J. L., Guidi, C. and Bach, M. A. 1988. Use of anti-*M. leprae* phenolic glycolipid-I antibody detection for early diagnosis and prognosis of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 56:527.

85- Chanteau, S., Cartel, J. L., Spiegel, A., Plichart, R. and Roux, J. 1990. [The detection of IgM antibodies to phenolglycolipid I for serodiagnosis of Hansen's disease and monitoring the contact population in Polynesia. Five year evaluation]. *Bull Soc Pathol Exot.* 83:649.

86- Cho, S. N., Cellona, R. V., Fajardo, T. T. Jr., Abalos, R. M., dela Cruz, E. C., Walsh, G. P., Kim, J. D. and Brennan, P. J. 1991. Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 59:25.

87- Cho, S. N., Fujiwara, T., Hunter, S. W., Rea, T. H., Gewber, R. H. and Brennan, P. J. 1994. Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-o-methyl-beta- d-glucopyranosyl epitope for the diagnosis of leprosy. *J. Infect. Dis.* 150:311.

88- Moet, F. J., Meima, A., Oskam, L. and Richardus, J. H. 2004. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr Rev.* 75:310.

89- Goulart, I. M. B., Reis, E. M., Nunes, M. M., Lobato, J. Gonçalves, M. A. and Costa, A. V. 2008. Sorologia e PCR quantitativa na classificação clínica de Ridley-Jopling da hanseníase. In: Seixas, J. e Cerasoli, J. (org.). UFU, ano 30 – tropeçando universos (arte, humanidades e ciências). Uberlândia: EDUFU, 529.

90- Cunanan Jr, A., Chan, G. P. and Douglas, J. T. 1998. Risk of development of leprosy among culion contacts. In: International Leprosy Congress, 15TH, Beijing, *Int J Lep.* 66:78.

91- Douglas, J. T. and Worth, R. M. 1984. Field evaluation of an ELISA to detect antibody in leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 52:26.

92- World Health Organization. 2010. Leprosy (Hansen disease). 128<sup>th</sup> Session Provisional agenda. EB 128/16. 16 december 2010.

93- Kirchheimer, W. F. and Storrs, E. E. 1971. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 39:693.

94- Groathouse, N. A., Brown, S. E., Knudson, D. L., Brennan, P. J. and Slayden, R. A. 2006. Isothermal amplification and molecular typing of the obligate intracellular pathogen *Mycobacterium leprae* isolated from tissues of unknown origin. *J Clin Microbiol* 44:1502.

95- Young, M. R. and Hart P. D. 1992. Amalgamation of two endocytic probe techniques: fluoresceinated cationized ferritin can show up, sequentially, selected structures, first in living cells and then by electron microscopy. *Histochemistry.* 98:141.

96- McKenzie, K. R., Adams, E., Britton, W. J., Garsia, R.J. and Basten, A. 1991. Sequence and immunogenicity of the 70-kDa heat shock protein of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol.* 147:312.

97- Mehra, V., Bloom, B. R., Bajardi, A. C., Grisso, C. L., Sieling, P. A., Alland, D., Convit, J., Fan, X. D., Hunter, S. W. and Brennan PJ, et al. 1992. A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10-kD heat-shock cognate protein. *J Exp Med.* 175:275.

98- Young, R. A., Mehra, V., Sweetser, D., Buchanan, T., Clark-Curtiss, J., Davis, R. W. and Bloom, B. R. 1985. Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. *Nature.* 316:450.

- 99- Wiker, H. G., Tomazella, G. G. and de Souza, G. A. 2011. A quantitative view on *Mycobacterium leprae* antigens by proteomics. *J Proteomics*.
- 100- Geluk, A., Klein, M. R., Franken, K. L., van Meijgaarden, K. E., Wieles, B., Pereira, K. C., Bühner-Sékula, S., Klatser, P. R., Brennan, P. J., Spencer, J. S., Williams, D. L., Pessolani, M. C., Sampaio, E. P. and Ottenhoff, T. H. 2005. Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. *Infect Immun*. 73:5636.
- 101- Duthie, M. S., Hay, M. N., Rada, E. M., Convit, J., Ito, L., Oyafuso, L. K., Manini, M. I., Goulart, I. M., Lobato, J., Goulart, L. R., Carter, D. and Reed, S. G. 2011. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011.
- 102- Hunter, S. W., Rivoire, B., Mehra, V., Bloom, B. R. and Brennan, P. J. 1990. The major native proteins of the leprosy bacillus. *J Biol Chem*. 265: 14065.
- 103- Hunter, S. W., Gaylord, H. and Brennan, P. J. 1986. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J Biol Chem*. 261:12345.
- 104- Misaki, A., Azuma, I. and Yamamura, Y. 1977. Structural and immunochemical studies on D-arabino-D-mannans and D-mannans of *Mycobacterium tuberculosis* and other *Mycobacterium* species. *J Biochem*. 82:1759.
- 105- Kaplan, G., Gandhi, R. R., Weinstein, D. E., Levis, W. R., Patarroyo, M. E., Brennan, P. J. and Cohn, Z. A. 1987. *Mycobacterium leprae* antigen-induced suppression of T cell proliferation in vitro. *J Immunol*. 138:3028.
- 106- Chan, J., Fan, X. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J. and Bloom, B. R. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun*. 59:1755.
- 107- Moreno, C., Mehlert, A. and Lamb, J. 1988. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin Exp Immunol*. 74:206.
- 108- Sharma, A., Saha, A., Bhattacharjee, S., Majumdar, S. and Das Gupta, S. K. 2006. Specific and randomly derived immunoactive peptide mimotopes of mycobacterial antigens. *Clin Vaccine Immunol*. 13:1143.



- 109- Triccas, J. A., Roche, P. W., Winter, N., Feng, C. G., Butlin, C. R. and Britton, W. J. 1996. A 35-kilodalton protein is a major target of the human immune response to *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 64:5171.
- 110- Ivanyi, J., Krambovitis, E. and Keen, M. 1983. Evaluation of a monoclonal antibody (TB72) based serological test for tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 54:337.
- 111- Triccas, J. A., Winter, N., Roche, P. W., Gilpin, A., Kendrick, K. E. and Britton, W. J. 1998. Molecular and immunological analyses of the *Mycobacterium avium* homolog of the immunodominant *Mycobacterium leprae* 35-kilodalton protein. *Infect Immun.* 66:2684.
- 112- Marques, M. A., Neves-Ferreira, A. G., da Silveira, E. K., Valente, R. H., Chapeaurouge, A., Perales, J., da Silva Bernardes, R., Dobos, K. M., Spencer, J. S., Brennan, P. J. and Pessolani, M. C. 2008. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. *Proteomics.* 8:2477.
- 113- Goulart, L. R., Vieira, C. U., Freschi, A. P., Capparelli, F. E., Fujimura, P. T., Almeida, J. F., Ferreira, L. F., Goulart, I. M., Brito-Madurro, A. G. and Madurro, J. M. 2010. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. *Crit Rev Immunol.* 30:201.
- 114- Parmley, S. F. and Smith, G. P. 1988. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene.* 73:305.
- 115- Barbas, C. F. 3<sup>rd</sup>, Crowe, J. E. Jr., Cababa, D., Jones, T. M., Zebedee, S. L., Murphy, B. R., Chanock, R. M. and Burton, D. R. 1992. Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:10164.
- 116- Liu, J. X., Meng, L., Xu, J., Jia, H. R. and Song, Z. X. 2004. Isolation of single chain antibodies against cell surface molecules by pathfinder selection. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 26:405.
- 117- Hoogenboom, H. R. 1997. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.* 15:62.
- 118- Rader, C. and Barbas, C. F. 3<sup>rd</sup>. 1997. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr Opin Biotechnol.* 8:503.
- 119- Noren, K. A. and Noren, C. J. 2001. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods.* 23:169.

120- Soumillion, P., Jespers, L., Bouchet, M., Marchand-Brynaert, J., Sartiaux, P. and Fastrez, J. 1994. Phage display of enzymes and in vitro selection for catalytic activity. *Appl Biochem Biotechnol.* 47:175.

121- Robertson, M. W. 1993. Phage and Escherichia coli expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alpha-subunit ectodomain. Domain localization of the IgE-binding site. *J Biol Chem.* 268:12736.

122- Wu, H. C., Huang, Y. L., Chao, T. T., Jan, J. T., Huang, J. L., Chiang, H. Y., King, C. C. and Shaio, M. F. 2001. Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J Clin Microbiol.* 39:977.

123- Guardiola, J., De Berardinis, P., Sartorius, R., Fanutti, C., Perham, R. N. and Del Pozzo, G. 2001. Phage display of epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses in vitro and in vivo. *Adv Exp Med Biol.* 495:291.

124- Cao, J., Zhao, P., Miao, X. H., Zhao, L. J., Xue, L. J. and Qi, Z. T. Z. 2003. Phage display selection on whole cells yields a small peptide specific for HCV receptor human CD81. *Cell Res.*13:473.

125- Cunha-Júnior, J. P., Silva, D. A., Silva, N. M., Souza, M. A., Souza, G. R., Prudencio, C. R., Pirovani, C. P., Cezar, M., Cascardo, J., Barbosa, B. F., Goulart, L. R. and Mineo, J. R. 2010. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. *Immunobiology.* 215:26.

126- Mustafa, A. S., Lundin, K. E. Of and Oftung, F. 1993. 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.* 61:5294.

127- Barenholz, A., Hovav, A. H., Fishman, Y., Rahav, G., Gershoni, J. M. and Bercovier, H. 2007. A peptide mimetic of the mycobacterial mannosylated lipoarabinomannan: characterization and potential applications. *J Med Microbiol.* 56:579.

128- Youn, J. H., Myung, H. J., Liav, A., Chatterjee, D., Brennan, P. J., Choi, I. H., Cho, S. N. and Shin, J. S. 2004. Production and characterization of peptide mimotopes of phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 41:51.

129- Dybwad, A., Førre, O., Kjeldsen-Kragh, J., Natvig, J. B. and Sioud, M. 1993. Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur J Immunol.* 23:3189.

130- Mintz, P. J., Kim, J., Do, K. A., Wang, X., Zinner, R. G., Cristofanilli, M., Arap, M. A., Hong, W. K., Troncoso, P., Logothetis, C. J., Pasqualini, R. and Arap, W. 2003. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol.* 21:57.

131- Hamasur, B., Källenius, G., Svenson, S. B. 1999. Synthesis and immunologic characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan specific oligosaccharide-protein conjugates. *Vaccine.* 17:2853.

132- Schlesinger, L. S., Hull, S. R. and Kaufman, T. M. 1994. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol.* 152:4070.

133- Schlesinger, L. S., Kaufman, T. M., Iyer, S., Hull, S. R. and Marchiando LK. 1996. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol.* 157:4568.

## ***Comparação de três testes sorológicos para o diagnóstico da hanseníase e detecção de infecção subclínica***

Este trabalho segue as normas necessárias para a publicação da revista Leprosy Review.

## COMPARISON OF THREE IMMUNOLOGICAL TESTS FOR LEPROSY DIAGNOSIS AND DETECTION OF SUBCLINICAL INFECTION

### Authors:

Janaina Lobato<sup>1</sup>  
Mariana Pena Costa<sup>1</sup>  
Érica De Melo Reis<sup>1</sup>  
Maria Aparecida Gonçalves<sup>1</sup>  
John S. Spencer<sup>2</sup>  
Patrick J. Brennan<sup>2</sup>  
Luiz Ricardo Goulart<sup>1,3,\*,Ω</sup>  
Isabela Maria Bernardes Goulart<sup>1</sup>

### Affiliations:

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia – Centro de Referência Nacional em Hanseníase

Av. Aspirante Mega, 77 – Bairro Jaraguá, 38413-018 – Uberlândia, MG, Brazil.

<sup>2</sup> Mycobacteria Research Laboratories, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, 1682 Campus Delivery, Fort Collins, CO 80523, USA.

<sup>3</sup> Dept. Medical Microbiology & Immunology, Genome & Biomedical Sciences Facility, GBSF Suite 5503, room 5521, University of California - Davis Davis, CA, 95616, USA.

<sup>Ω</sup> L.R.G and I.M.B.G are Senior Co-authors.

---

### \*Corresponding Author:

Luiz Ricardo Goulart, PhD - Professor  
Dept. Medical Microbiology & Immunology  
Genome & Biomedical Sciences Facility  
GBSF Suite 5503, Room 5521  
University of California - Davis  
Davis, CA, USA 95616  
Phone: (530) 752-8113 -Fax: (530) 754-7240

E-mail: [lrgoulart@ucdavis.edu](mailto:lrgoulart@ucdavis.edu)

## **Abstract**

**Objective:** Our aim was to compare the performance of three serological assays in leprosy patients and their household contacts utilizing two quantitative ELISA tests using native PGL-I (PGL-1 ELISA), synthetic ND-O-HSA (ND-O-HSA ELISA), and the semi-quantitative lateral flow test (ML-Flow).

**Methods:** Compare the performance of three immunological assays, PGL-I ELISA, ND-O-HSA ELISA, and ML-Flow were evaluated in 156 leprosy patients and 191 household contacts.

**Results:** The sensitivity results of the PGL-1, ND-O-HSA, and ML-Flow were 68.83%, 63.65%, and 60.65%, respectively. The native and synthetic PGL-I ELISA assays detected antibodies in 22.73%, 31.82% of the paucibacillary (PB) patients, and the ML Flow test did not detect antibodies in this group. The ML-Flow test was able to discriminate patients into PB and multibacillary (MB) forms, while the native PGL-I and ND-O-HSA correlated with the bacillary load and the Ridley-Jopling clinical forms. In household contacts, the native PGL-I, ND-O-HSA, and ML-Flow assays detected seropositivity of 25%, 17%, and 10%, respectively.

**Conclusions:** The use of ELISA and ML-Flow tests are thus recommended as additional tools in the diagnosis and classification of the clinical forms, aiding in prescribing the correct treatment regimen to prevent subsequent nerve damage and disability.

**Key-words:** *Mycobacterium leprae*, leprosy, PGL-I, ND-O-HSA, ML-Flow, ELISA.

## 1. Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular parasite that affects peripheral nerves, skin, and other organs. Despite the success of multidrug therapy (MDT) introduced in the mid-1980's, the world prevalence of 211,903 cases registered at the beginning of 2010 still makes the disease a serious public health problem <sup>1</sup>. If not properly diagnosed or treated, leprosy can result in permanent physical impairment. It is a disease associated with deformity and disability, generating social stigmas and discrimination against patients and their respective families<sup>2</sup>.

Leprosy is a disease with a wide spectrum of clinical forms for which there is still no gold standard diagnostic test, and its detection is usually based on clinical signs and symptoms. Various clinical manifestations can present in leprosy, considering immunopathological parameters and bacterial load. According to the spectrum, leprosy patients are classified as tuberculoid (TT), borderline tuberculoid (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatous (BL), and lepromatous (LL) <sup>3</sup>. Currently, patients are classified based on the number of skin lesions, with the paucibacillary (PB) group presenting 5 lesions or less, and the multibacillary (MB) group with 6 or more lesions <sup>4</sup>. However, the reliability of this classification criterion has been questioned, since patients with less than 5 lesions may be classified as MB based on an assessment of the Bacterial Index (BI) results <sup>5</sup>.

In endemic areas of leprosy, sensitive and specific diagnostic laboratory tests would be of great use in the detection of leprosy patients in early stages of the disease <sup>6</sup>. One of the first *M. leprae*-specific antigens to be isolated and characterized was the phenolic glycolipid (PGL-1). The PGL-I is an antigen found within the cell wall of the bacillus, which is able to induce the production of antibodies in the host. The presence of circulating IgM antibodies has been correlated with the clinical spectrum and bacterial index in leprosy patients <sup>7,8,6,9</sup>. A significant inverse correlation has been shown between the antibody titer and the Mitsuda test, which evaluates the specific cellular immune response against Hansen's bacilli<sup>10,11</sup>.

The main antigenic determinant of PGL-I recognized is the trisaccharide portion of the molecule. Assays that detect PGL-I antibodies can utilize the native glycolipid, synthetic PGL-I di- or trisaccharides coupled to bovine or human serum albumin and a variety of neoglycoconjugates with up to 40 to 50 residues per molecule, with a sensitivity higher than that of the native PGL-I antigen<sup>12,13,14</sup>. These soluble forms of PGL-1 can also be more readily incorporated into lateral flow devices for the rapid detection of antibodies in multibacillary patient sera<sup>15,16,17,18</sup>.

Although PGL-I antibody levels in tuberculoid patients are low or negative, the use of the quantitative PGL-I assay to assess the titer plays an important role in detecting subclinical infection, determining the proper duration and regimen of MDT, and in the prevention of relapses<sup>6</sup>.

Household contacts of leprosy patients that are positive for PGL-I display about a 7.2-fold higher risk of developing leprosy relative to PGL-I antibody-negative household contacts, and those who progress to disease predominantly develop the more severe MB form<sup>19,20</sup>. Consequently, the identification of household contacts of leprosy patients who are positive for the PGL-I antibody could lead to an earlier detection of infection, more prompt diagnosis and treatment, and limit further lines of transmission<sup>19</sup>.

This study was undertaken in order to develop a standardized protocol for a more sensitive and specific serological ELISA assay to detect the PGL-I antibody in patients and contacts screened at Reference Centers. To this end, we have compared the performance of three serological assays in leprosy patients and their household contacts using two quantitative ELISA tests using native PGL-I, synthetic ND-O-HSA, and the semi-quantitative lateral flow test (ML-Flow).



## **2. Material and Methods**

### **2.1 Subject of study and samples**

The study population was comprised of 191 serum samples of household contacts and 154 serum samples of newly diagnosed leprosy patients seen at the National Reference Center of Leprosy and Sanitary Dermatology of the teaching hospital - *Hospital de Clínicas*, Federal University of Uberlândia (CREDESH/HC/UFU), Minas Gerais, Brazil. The patients were diagnosed according to dermatoneurological clinical exams and laboratory tests, as per Ridley-Jopling's spectrum<sup>3</sup>, into the five clinical forms: tuberculoid (TT), borderline-tuberculoid (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatous (BL), and lepromatous leprosy (LL). The number of skin lesions and the bacilloscopic index of the skin smear were used to determine the operational classification (OC), considering as paucibacillary (PB) patients who had up to five skin lesions and a negative bacilloscopy; and multibacillary (MB), those with more than five lesions and/or positive bacilloscopy (WHO, 1988). Based on this parameter, 100% (14/14) of the TT patients and 51.67% (31/60) of the BT patients were considered PB. The rest of the BT (48.33% - 29/60) patients and 100% of the BB (28), BL (21), and LL (31) patients were classified as MB. As negative control of the ELISA tests we used 52 sera samples from healthy individuals who have no contact with leprosy patients. Of the 154 patients diagnosed with leprosy, 84 were followed during treatment, and the PGL-1 ELISA was performed at the beginning and end of the MDT. The other two serology tests (ML-Flow and ND-O-HSA ELISA) were not performed at the end of treatment due to the scarcity of these tests.

### **2.2 Ethical aspects**

The present study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia (UFU) under protocol # 099/2003. Patients and contacts who voluntarily agreed to participate in the study were enrolled after giving their Informed Consent.

### 2.3 Antigens

Two antigens were used for ELISA antibody detection, the native PGL-I isolated by organic extraction of *M. leprae*-infected armadillo tissues from which the bacteria had been purified and utilized in PGL-1 ELISA, the ND-O-HSA ELISA used the synthetic natural disaccharide octyl linked to human serum albumin (ND-O-HSA), obtained from Colorado State University through the NIH/NIAID Leprosy Contract N01 AI 25469. For the lateral flow assay, antigen NT-P-BSA was used, which is a natural trisaccharide antigen linked to bovine serum albumin. This is the antigen used in the ML-Flow kit (KIT Biomedical Research, Amsterdam, The Netherlands).

### 2.4 Antibody titer

Briefly, for the PGL-I antibody detection ELISA assays, microtiter plates (Maxisorp®, NUNC) were coated with native PGL-I diluted in absolute ethyl alcohol, or synthetic ND-O-HSA in Phosphate Buffered Saline (PBS), at concentrations of 10µg/ml and 0.2µg/ml, respectively. Serum samples were added in duplicate using a dilution of 1:100 (native PGL-I) and 1:300 (ND-O-HSA) in PBS/BSA 1%, incubated for 1 hour at 37°C, followed by washing. The anti-human IgM-peroxidase conjugate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was added to the plates in the dilution of 1:10,000 (PGL-I ELISA) and 1:2,000 (ND-O-HSA). The substrate o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma) enzyme substrate was added to the plates and incubated at room temperature for 10 minutes in the dark. The reaction was stopped by the addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. The optical density (OD) was obtained in a microplate reader (THERMO PLATE, TP-READER, Rayto Life and Analytical Sciences C. Ltd, Germany) at 492 nm. Two positive and three negative controls were included in each plate. The cut-off level for positivity was a standard deviation above the OD average obtained for the three negative controls. The antibody titers were expressed as the ELISA index (EI) according to the following formula:  $EI = OD_{\text{sample}}/OD_{\text{cut-off}}$ , in which the cut-off point was determined by the average OD of the negative controls plus 3 standard deviations (ND-O-HSA ELISA) or 4 standard deviations (native PGL-1 ELISA), as described previously<sup>21</sup>. EI values above 1.1 were considered positive. We used

two positive controls on each plate, one low positive, of low EI, and a strong positive of high EI. The ELISA specificity was calculated based on tests of 52 sera samples from healthy individuals. For the negative control, sera from 3 individuals mentioned above were selected and included in all test plates.

For the ML-Flow (a lateral immunochromatographic flow test for anti-PGL-1 detection to investigate the *Mycobacterium leprae* immune response), 5 µl of whole blood was collected from the tip of the left index finger. The blood was placed in the test cartridge together with the buffer solution, and after 5 minutes the result was read by three independent readers. The absence of a line in the test zone indicated a negative result, while a positive result was graded in intensity from 1+ to 4+<sup>15</sup>.

## **2.5 Bacterial Index**

The bacterial load was calculated from the average of skin smears obtained from seven sites: the right and left earlobes, elbows, knees, and from one active lesion. The bacterial index (BI) was calculated according to Ridley's Logarithmic Scale<sup>22</sup>, based on the number of bacilli detected by field microscopy, using 100 X oil immersion lens, where: BI=0 (no bacilli in 100 immersion fields); BI = 1 (average of 1 to 10 bacilli in 100 fields); BI = 2 (average of 1 to 10 bacilli in 10 fields); BI = 3 (1 to 10 bacilli in 1 field); BI = 4 (10 to 100 bacilli in 1 field); BI = 5 (100 to 1,000 bacilli in 1 field); and BI = 6 (> 1,000 bacilli in 1 field).

## **2.6 Mitsuda test**

The Mitsuda antigen is a heat-killed suspension of  $6 \times 10^7$  bacilli/ml produced and donated by Dr. Maria Esther Nogueira Sales from the Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, SP, Brazil (ILSL-Bauru, SP). An intradermal injection of 0.1 ml was applied at the upper third of the anterior surface of the right forearm of patients and contacts, and the presence or absence of a granulomatous response on the 28<sup>th</sup> day following injection was determined. The diameter of the granulomatous lesion was measured in millimeters for quantitative and qualitative analyses<sup>23</sup>. Patients and contacts were categorized into classes according to the World Health Organization (WHO) using the following criteria: negative – no

reaction; doubtful – 0 to 3 mm; weakly positive – 4 to 7 mm; definitely positive - 8 to 10, and strongly positive – readings >10 mm or a granulomatous lesion of any diameter with ulceration.

## **2.7 Statistical methods**

Pearson's coefficient was used to verify the degree of correlation among the tests and was applied to determine the degree of significance of the differences among the average of the serological and BI results. Student's t test was used to analyze the differences between the average of the serological tests at the beginning and end of the MDT. The concordance between the laboratory tests was calculated by dividing the number of congruent cases by the total number of patients. The Kappa test was applied to evaluate the concordance results. Kappa values and their interpretations varied as follows: <0, no agreement; 0-0.19, poor agreement; 0.20-0.39, fair agreement; 0.40-0.59, moderate agreement; 0.60-0.79, substantial agreement; 0.80-1.00, almost perfect agreement<sup>24</sup>. Differences between the groups were assessed by chi-square, when appropriate.

### **3. Results**

Patients were classified into five clinical forms, represented in the following frequencies: 9.09% (14/154) were TT, 38.96% (60/154) were BT, 18.18% (28/154) were BB, 13.64% (21/154) were BL, and 20.13% (31/154) were LL.

#### **3.1 Analysis of Mitsuda test and the Bacterial Index**

A classification of the clinical forms using Ridley & Jopling criteria <sup>3</sup> is shown on Table 1. A negative correlation was noted between the Mitsuda test results and the BI of the skin smear covering the spectrum of clinical forms. In patients with the TT form, the average Mitsuda intradermal test result was 11.15 mm and the BI was equal to zero (BI=0), while at the other pole of the disease, patients with the LL form, presented a negative Mitsuda and a average value for skin smear BI of 5.16. Traversing the spectrum of the disease, from the TT pole to the LL pole, in patients in the borderline group, from the BT to the BL form, a gradual decrease in the cellular immune response was observed, along with an increase in BI (Table 1).

#### **3.2 Analysis of serological tests in patients with no prior treatment**

The sensitivity, specificity, and accuracy of the two ELISA tests were calculated, in which native PGL-1 ELISA and ND-O-HSA displayed, respectively, 68.83 and 63.84% for sensitivity; 98 and 98% for specificity; and 76 and 71% in accuracy. The detection of IgM antibodies against PGL-1 in patient serum in the three tests analyzed were 68.83% (106/154) for native PGL-1 ELISA, 63.64% (98/154) for ND-O-HSA ELISA, and 60.65% (74/122) for the ML-Flow test. According to the operational classification (PB and MB), among the 44 PB patients, PGL-1 ELISA was reactive in 22.73% (10/44), ND-O-HSA ELISA in 31.82% (14/44), and the ML-Flow test showed no reactivity in any of the PB patient sera samples (0/44). In the group of MB patients, the reactivity of the three tests was 86.36% (95/110) for PGL-1 ELISA, 76.36% (84/110) for ND-O-HSA ELISA, and 90% (99/110) for ML-Flow.

In the classification of clinical forms <sup>3</sup>, it was demonstrated that the seroreactivity for the three serum tests showed a gradual increase in positivity according to the spectrum of the disease in the direction of the LL pole (Table 1).

As to the dynamic range of the results of the three serology tests, the two quantitative ELISA tests showed greater range than the semi-quantitative ML-Flow. The ELISA test showed the dynamic range of the ELISA Index (EI) wider, varying from 0.1 to 31.0 for the native PGL-1 and from 0.3 to 27.8 for the ND-O-HSA, differentiating the five clinical forms, with a gradual increase of EI accompanying the increase in BI towards the LL pole. The results of the ML-Flow test varied from zero to four (0 to 4+) and did not differentiate between patients with clinical forms BT and BB, and between BL and LL (Table 1).

The PGL-1 ELISA displayed a significant positive correlation between positivity and clinical forms ( $r = 0.92$ ;  $p < 0.05$ ), and between EI average and clinical forms ( $r = 0.97$   $p < 0.05$ ); for ND-O-HSA ELISA, the correlation was also significant ( $r = 0.95$ ;  $p < 0.05$ ) and ( $r = 0.93$ ;  $p < 0.05$ ), respectively. The ML-Flow test positivity and average also showed a correlation per clinical form: ( $r = 0.91$ ;  $p < 0.05$ ) and ( $r = 0.96$ ;  $p < 0.05$ ), respectively.

As to the quantitative results of the serological tests and the BI of the skin smear of the patients, the quantification of IgM antibodies in the three tests, using the EI for the ELISA tests and the positivity intensity for the ML-Flow test, a positive and significant correlation was demonstrated for PGL-1 ELISA ( $r = 0.98$ ;  $p = 0.001$ ), signifying that the greater the number of bacilli, the greater the quantity of IgM anti-PGL-1 antibodies. There was a significant correlation for ND-O-HSA ELISA ( $r = 0.88$ ;  $p < 0.05$ ), and for ML-Flow ( $r = 0.94$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 1) as well.

The concordance among the three serological tests was calculated using Kappa's coefficient (Table 2). Between PGL-1 ELISA and the ML-Flow, the concordance was substantial ( $k = 0.75$ ;  $p < 0.0001$ ). Between the PGL-1 ELISA and the ND-O-HSA ELISA, and between the ND-O-HSA ELISA and the ML-Flow test, concordances were moderate and significant, with  $k = 0.48$  and  $k = 0.53$ , respectively ( $p < 0.001$ ) (Table 2).

### **3.3 Analysis of the PGL-1 ELISA serum test in patients after multidrug therapy**

With the exception of the TT clinical form, which displayed reduced PGL-1 levels before treatment, all clinical forms showed a significant decline in PGL-1 upon MDT treatment (Figure 2).

### **3.4 Analysis of the PGL-I antibody response in household contacts**

Each of the household contacts was categorized according to their relationship with the index case. Accordingly, it was observed that 26% (49/191) were contacts of PB and 74% (142/191) were contacts of MB patients.

Positivity of the three tests was not different in contacts of MB patients when compared to contacts of PB patients, following the same positivity pattern found in patients, i.e., greater reactivity for PGL-I ELISA with 25% (49/141) of the contacts followed by 17% (32/191) for the ND-O-HSA ELISA, and 10% (19/191) for the ML-Flow, although with no statistical differences between the tests (Table 3).

#### 4. Discussion

This present study proposed a comparison among three serology tests for the detection of specific anti-PGL-1 antibodies of *M. leprae* in treatment-naïve leprosy patients and their household contacts, seeking to assess their use in diagnosis and/or in subclinical leprosy infections, as well as to monitor patient treatment, since there is considerable difficulty in leprosy in identifying the three reference points that are involved in the transmission of the disease, i.e., the onset points of exposure, infection, and disease<sup>25</sup>. In order to identify these points involved in transmission, several markers for epidemiology and control of leprosy have been evaluated, including the use of molecular and immunological methods in the detection of *M. leprae*, in an effort to differentiate individuals with subclinical infections, as well as the early onset of the disease<sup>26,27,28,15,29</sup>. In order to eliminate the bias of an incorrect clinical classification, analysis of the BI of the skin smear and Mitsuda test demonstrated that the clinical forms of the patients are consistent with the classification of Ridley & Jopling<sup>3</sup>, i.e., the cellular immune response and the bacillary load were inversely proportional. This differentiation of patients in the spectrum and the correct classification are essential for a work of this nature since it guarantees reliability of the serology results presented. This is the first study comparing seropositivity of patients with Hansen's disease with the PGL-1 ELISA test, the ND-O-HSA ELISA test, and the ML-Flow test, according to the clinical forms of Ridley and Jopling<sup>3</sup>. The native PGL-1 ELISA test showed greater seropositivity when compared to the other tests, with a growing EI accompanying the spectrum of the disease and it also showed an amplitude of EI that was able to better differentiate between the five clinical forms of leprosy, although the difference between the tests showed no statistical differences.

The two ELISA tests showed a positive correlation with the bacterial load, and the average of the EIs, as well as their amplitudes, increased in proportion to the BI, especially for the PGL-1 ELISA test. The lowest sensitivity observed with ND-O-HSA ELISA may be due to the use of the synthetic disaccharide antigen, since the antigenic determinant of PGL-1 is represented by the trisaccharide terminal, and among the synthetic antigens those that result in best reactivity with patient sera



are those with di- (D-BSA) and trisaccharide (T-BSA) residues, which possess the non-reducing sugar 3, 6-dio-methyl B D-glycopyranoside<sup>30,31,32</sup>. The two ELISA tests, with similar specificity, showed a variation scale of amplitude in the determination of the results, with a gradual increase of EI according to clinical forms of the disease, the native PGL-1 ELISA showed greater sensitivity and accuracy, making this test an important tool for the determination of the Ridley and Jopling forms, as well as for the control of therapeutic, as is demonstrated in the present paper<sup>6</sup>. Nevertheless, since the ML-Flow test is semi-quantitative, it has a small scale of variation ranging from 0 (negative) to 4+ (highly positive), which makes it difficult to precisely differentiate the levels of antibodies among the clinical forms and to monitor treatment (unpublished results).

The results of the ML-Flow test showed an excellent correlation with the operational classification and the BI, as had already been reported in literature<sup>33,34,35,18</sup>. The high positivity observed in MB patients to the ML-Flow test may be due to the association of the anti-PGL1 antibodies in the more bacillary forms of the disease with the synthetic trisaccharide antigen PGL-1 contained in the said test, demonstrating a positive correlation between the levels of antibodies and the bacterial load, such as is reported in literature<sup>33,34,35</sup>.

The ML-Flow is a limited test for the detection of anti-PGL-1 antibodies in sera of PB patients, as is shown in literature<sup>15,36,17</sup>. Nonetheless, in this study, the semi-quantitative ML-Flow test demonstrated an excellent performance for discriminating patients as to the operational classification (PB and MB)<sup>15,36,17,18</sup>, which gives it the status of an important tool to be utilized by healthcare teams not specialized in leprosy in the care of field patients, seeking to classify the patient after diagnosis, considering that it is a simple and quick test to perform<sup>17, 35</sup>.

Recently, studies performed with leprosy patients in Brazil, Nepal, and Nigeria with the ML-Flow test, noted that the use of the test helped in the operational classification of the disease, reducing the risk of allocating patients to inadequate treatment schemes, which could favor sub-treatment and relapses<sup>36, 33</sup>.

The analysis of concordance among the three tests showed substantial agreement between PGL-I ELISA and the ML-Flow, probably because the two antigens used in the tests are trisaccharides<sup>32,37,38</sup>. As to the two ELISA tests displaying

moderate concordance, this may be due to the difference in protocols and antigens. The ND-O-HSA is a terminal disaccharide epitope of the synthetic PGL-1, conjugated with a human seroalbumin, containing only one fraction of the glycolipid, with a structure different from the native PGL-1 and from the synthetic trisaccharide antigen<sup>12,37</sup>. New glycoconjugated antigens are correlated with the native PGL-1 in the detection of antibodies due to the presence of carbohydrate epitopes of PGL-1 that are critical in the antigen-antibody bond<sup>39,40,41</sup>.

The decline of the EI in the PGL-1 ELISA test after MDT treatment was observed in patients of the borderline group (BT, BB, and BL) and of the clinical form, LL, showing that the quantitative test had good sensitivity to the decrease in antibodies that correlate with the drop in bacterial load promoted by the MDT. These serum monitoring patient data corroborate other studies<sup>42,43,6,44</sup> which have demonstrated a gradual reduction in IgM-anti PGL-1 antibodies in patients under treatment.

This present study demonstrated that there was persistence of IgM anti-PGL-1 antibodies at the end of treatment in the bacilliferous forms. The persistence of these antibodies at high levels of MDT in MB patients may be due to the inefficiency of macrophages in cleaning out dead *M. leprae* and their antigenic fragments from lesions<sup>45,46</sup>. This fact may occur since the clearance of bacilli from the body is a slow process, and may represent a continual stimulus in antibody production<sup>7</sup>, corroborating the determination of the epidemiology of *M. leprae* as a bacillus to slow growth<sup>47</sup>.

In order to approach the problems with the point of onset of exposure and/or with the point of onset of infection, the present study evaluated the serum response of household contacts of patients with leprosy to the three anti-PGL-1 tests, considering that this is the group considered as having the greatest risk of becoming ill when compared to the general population of non-contacts<sup>25,48,49,50,51,52</sup>. Among the three serology tests analyzed in sera of contacts, the native ELISA anti-PGL-1 displayed the greatest seropositivity. As the ELISA PGL-I test showed greatest sensitivity and accuracy, as well as a greater correlation with BI and clinical forms of the Ridley and Jopling spectrum, its indication for monitoring contacts seems obvious. Seropositive contacts have

demonstrated a risk 7.2 times higher of becoming ill when compared to seronegative contacts for ELISA anti-PGL-1<sup>20</sup>. Another study also demonstrated that contacts with positive ML-Flow, negative Mitsuda, and no BCG scar have a 24.26-fold higher risk of developing leprosy, as has been demonstrated by prior study of our group<sup>53</sup>.

There are already enough studies in literature that recommend the use of serological tests in the control of leprosy, and even as an aid in diagnosis<sup>54,7,55,56,57</sup> and prognosis<sup>58,59,53,60</sup>. The present work corroborates and advances knowledge as to prior study, demonstrating the novel pattern of anti-PGL-1 antibody detection in leprosy patients according to the clinical forms of Ridley-Jopling<sup>3</sup>, determining the power of the PGL-1 ELISA test in discriminating titers of antibodies correlated to the bacterial index of patients, favoring the monitoring of treatment, as well as its performance for detection of subclinical infection in contacts.

Since the ELISA anti-PGL-1 test demands laboratorial structure and specialized human resources, it could be implanted in the routine of leprosy reference centers of endemic countries, while the ML-Flow could be made available to the basic non-specialized healthcare services, favoring allocation of patients to treatment regimens for PB and MB, since these services do not have the bacilloscopic test available for all patients, besides the fact that the reliability of these tests have been questioned in some control programs<sup>61</sup>.

In concluding, the serological PGL-1 ELISA test could be offered by reference centers to patients referred by healthcare services, within a network of facilities between Basic Healthcare Units and Reference Centers, in order to accrue experience of their potential benefit for patients when used on a large scale in routines of leprosy control programs, as well as to facilitate the identification and assessment of individuals with a higher risk of becoming ill for intervention with chemoprophylaxis.

**Acknowledgments:**

Grants were provided by the following agencies: CNPq, FAPEMIG, CAPES, FINEP, and the Ministry of Health, Brazil. The authors are also grateful for the kind donation of antigens by Dr. John Spencer (generated through the NIH/NIAID N01 AI 25469 Leprosy Research Contract). Similarly, the authors would like to thank KIT Biomedical Research, Amsterdam, The Netherlands, for the ML-Flow assays that were provided as a donation.

## 5. References:

- 1- World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record*. 2010;**85**: 337-348.
- 2- World Health Organization. *Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities (Plan period: 2006-2010)* 2005;**53**:1-17.
- 3- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int J Leprosy* 1966;**34**:255-273.
- 4- World Health Organization. Study Group Chemotherapy of leprosy. *Technical Report Series* 1994; 847. Geneva, Switzerland.
- 5- Croft RP, Smith WC, Nicholls P, Richardus JH. Sensitivity and specificity of methods of classification of leprosy without use of skin-smear examination. *Int J Leprosy* 1998;**66**:445-450.
- 6- Cho S, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo T, Balagon MVF, Abalos RM, Tan EV, Walsh GP, Kim J, Brennan PJ. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immun* 2001;**8**:138-142.
- 7- Chanteau S, Cartel JL, Celerier P, Plichart R, Desforges S, Roux J. PGL-I antigen and antibody detection in leprosy patients: evolution under chemotherapy. *Int J Leprosy* 1989;**57**:735-743.
- 8- Tomimori-Yamashita J, Nguyen TH, Maeda SM, Flageul, B, Rotta O, Cruaud P. Anti-phenolic Glycolipid-I (PGL-I) determination using blood collection on filter paper in leprosy patients. *Rev Inst Med Trop* 1999;**41**:239-242.
- 9- Shuring RP, Moet FJ, Pahan D, Richardus JH, Oskam L. Association between anti-PGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. *Leprosy Rev* 2006;**77**:343-355.
- 10- Maeda SM, Rotta O, Michalany NS, Camargo ZP, Sunderkötter C, Tomimori-Yamashita J. Comparison between anti-PGL-I serology and Mitsuda reaction: clinical reading, microscopic findings and immunohistochemical analysis. *Leprosy Rev* 2003;**74**:263-274.

11- de Souza FC, Marcos EV, Ura S, Opromolla PA., Nogueira ME. Comparative study between the Mitsuda test and the human leukocyte antigens in leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;**40**:188-191.

12- Chatterjee D, Cho SN, Brennan PJ, Aspinall GO. Chemical synthesis and seroreactivity of O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3-di-O-methyl- alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----9)-oxynonanoyl-bovine serum albumin--the leprosy-specific, natural disaccharidase-octyl-neoglycoprotein. *Carbohydr Res* 1986; **156**:39-56.

13- Hussain R, Jamil S, Kifayet A, Firdausi F, Dockrell HM, Lucas S, Hasan S. Quantitation of IgM antibodies to the *M. leprae* synthetic disaccharide can predict early bacterial multiplication in leprosy. *Int J Leprosy* 1990;**58**:491-502.

14- Barros RPC, Oliveira MLWR. Detection of specific antibodies for the phenolic-1 glycolipid antigen of *M. leprae* (antiPGL-1IgM): applications and limitations. *An Bras Dermatol* 2000;**75**:745-753.

15- Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskan L. Simple and Fast Lateral Flow Test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:1991–1995.

16- Bühner-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MAF., Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskan L. The ML Flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Leprosy Rev* 2007;**78**:70-79.

17- Parkash O, Kumar A, Pandey R, Nigam A, Girdhar BK. Performance of a lateral flow test for the detection of leprosy patients in India. *J Med Microbiol* 2008;**57**:130-132.

18- Contin LA, Alves CJ, Fogagnolo L, Nassif PW, Barreto JA, Lauris JR, Nogueira ME. Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy. *An Bras Dermatol*.2011; **86**(1):91-95.

19- Douglas JT & Worth RM. Field evaluation of an ELISA to detect antibody in leprosy patients and their contacts. *Int J Leprosy* 1984;**57**:744-751.

20- Douglas JT, Cellona RV, Fajardo TT Jr, Abalos RM, Balagon MV, Klatser PR. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clin Diagn Lab Immun* 2004;**11**:897-900.

- 21- Lobato J, Silva DA, Mineo TW, Amaral JD, Segundo GR, Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Borges AS, Mineo JR. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin. Vaccine Immunol* 2006;**13**:84-89.
- 22- Ridley DS. Skin biopsy in leprosy. *Document Geigy* 3<sup>a</sup> ed. Basle: CIBA-GEIGY 1990; p.63.
- 23- Gaylord H, Brennan PJ. Leprosy and the leprosy bacillus: recent developments in characterization of antigens and immunology of the disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;**41**:645-675.
- 24- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;**33**: 159-174.
- 25- Noordeen SK. The epidemiology of leprosy. In: Hastings RC. *Leprosy: Medicine in the tropics*. New York: Churchill Livingstone 1985; p.15-30.
- 26- Van Beers SM, Izumi S, Madrid B, Maeda Y, Day R, Klatser PR. An Epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. *Int J Leprosy* 1994;**62**:1-9.
- 27- Van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int J Leprosy* 1999;**67**:119-128.
- 28- Van Beers S, Hatta M, Klatser PR. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-1 among school children as an indicator of leprosy endemicity. *Int J Leprosy* 1999;**67**:243-249.
- 29- Wallace C, Clayton D, Fine P. Estimating the relative risk ratio for leprosy in Karonga District, Malawi. *Leprosy Rev* 2003;**74**:133–140.
- 30- Brennan PJ, Barrow WW. Evidence for species lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. *Int J Leprosy* 1980; **48**:382-387.
- 31- Hunter SW, Brennan PJ. A novel glycolipid from *M. leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol* 1981;**147**:728-735.
- 32- Fujiwara T, Hunter SW, Cho S, Aspinall GO, Brennan PJ. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun* 1984;**43**:245-252.

33- Lyon S, Lyon AC, Da Silva RC, Grossi MA, Lyon SH, Bühner-Sékula S, Rocha MO. A comparison of ML Flow serology and slit skin smears to assess the bacterial load in newly diagnosed leprosy patients in Brazil. *Leprosy Rev* 2008;**79**:162-170.

34- Lyon S, Castorina da Silva R, Lyon AC, Grossi MA, Lyon SH, Azevedo ML, Bühner-Sékula S, Rocha MO. Association of the ML Flow serologic test to slit skin smear. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; **41**:23-26

35- Bühner-Sékula S, Illarramendi X, Teles RB, Penna ML, Nery JA, Sales AM, Oskam L, Sampaio EP, Sarno EN. The additional benefit of the ML Flow test to classify leprosy patients. *Acta Trop* 2009; **111**:172-176.

36- Bühner-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MA, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskam L. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Leprosy Rev*. 2007;**78**(1):70-79.

37- Fujiwara T, Aspinall GO, Hunter SW, Brennan PJ. Chemical Synthesis of the trisaccharide unit of species-specific a phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Carbohydr Res* 1987;**163**:41-52.

38- Da Silva RC, Lyon S, Lyon AC, Grossi MA, Lyon SH, Bühner-Sékula S, Antunes CM. Correlation between ELISA and ML Flow assays applied to 60 Brazilian patients affected by leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;**104**(8):546-550.

39- Chanteau S, Cartel JL, Roux J, Plichart R, Bach MA. Comparison of synthetic antigens for detecting antibodies to phenolic glycolipid I in patients with leprosy and their household contacts. *J Infect Dis* 1988;**157**: 770-776.

40- Cho SN, Fujiwara T, Hunter SW, Rea TH, Gelber RH, Brennan PJ. Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl epitope for the serodiagnosis of Leprosy. *J Infect Dis* 1984;**150**: 311-322.

41- Fujiwara T, Hunter SW, Brennan PJ. Chemical Synthesis of the disaccharides of the specific phenolic glycolipid antigens from *Mycobacterium leprae* and of related sugars. *Carbohydr Res* 1986;**148**:287-298.

42- Bach MA, Wallach D, Flaguel B. Antibodies to Phenolic glycolipid- I and to whole *M. leprae*, in leprosy patients: evolution during therapy. *Int J Leprosy* 1986;**54**:256-267.



- 43- Roche PW, Britton WJ, Failbus SS, Neupane KD, Theuvenet WJ. Serological monitoring of the response to chemotherapy in leprosy patients. *Int J Leprosy* 1993;**61**:35-43.
- 44- Silva EA, Iyer A, Ura S, Lauris JR, Naafs B, Das PK, Vilani-Moreno F. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multidrug treatment and reactions. *Trop Med Int Health* 2007;**12**:1450-1458.
- 45- Ebenezer GJ, Job A, Abraham S, Arunthathi S, Rao PS, Job CK. Nasal mucosa and skin of smear-positive leprosy patients after 24 months of fixed duration MDT: histopathological and microbiological study. *Int J Leprosy* 1999;**67**:292-297.
- 46- Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg* 2008;**78**:518-521.
- 47- Fine PE, Floyd S, Stanford JL, Nkhosa P, Kasunga A, Chaguluka S, Warndorf DK, Jenkins PA, Yates M, Ponnighaus JM. Environmental mycobacteria in northern Malawi: implications for the epidemiology of tuberculosis and leprosy. *Epidemiol Infect* 2001;**126**:379-387.
- 48- Fine PE, Sterne JA, Ponnighaus JM, Bliss L, Saul J, Chihana A, Munthali M, Warndorff DK. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *Am J Epidemiol* 1997;**146**:91-102.
- 49- Cunaman jr A, Chan GP, Douglas JT. Risk of development of leprosy among Culsion contacts. *Int J Leprosy* 1998;**66**: 578.
- 50- Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Van Mosseveld P, Faber WR, Klatser PR, Oskam L. Risk factors for developing leprosy: a population-based cohort study in Indonesia. *Leprosy Rev* 2006;**77**:48-61.
- 51- Goulart LR & Goulart IM. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res* 2008; **300**: 269-290.
- 52- Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of Mycobacterium leprae infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect* 2010; doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03453.x.

- 53- Goulart IM, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;**15**(1):101-105.
- 54- Cho SN, Yanagibara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid in from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun* 1983;**41**:1077-1083.
- 55- Cho SN, Cellona RV, Fajardo TT, Abalos RM, Dela Cruz EC, Walsh GP, Kim J, Brennan PJ. Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. *Int J Leprosy* 1991;**59**:25-31.
- 56- Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate JC, Manrique-Hernández R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;**103**(4):332-336.
- 57- Duthie MS, Hay MN, Rada EM, Convit J, Ito L, Oyafuso LK, Manini MI, Goulart IM, Lobato J, Goulart LR, Carter D, Reed SG. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; May 5, DOI: 10.1007/s10096-011-1221-2.
- 58- Agis F, Schlich P, Cartel JL, Guidi C, Bach MA. Use of anti-*M. leprae* phenolic glycolipid-I antibody detection for early diagnosis and prognosis of leprosy. *Int J Leprosy* 1988;**56**:527-535.
- 59- Saad MH, Medeiros MA, Gallo ME, Gontijo PP, Fonseca LS. IgM immunoglobulins reacting with the phenolic glycolipid-1 antigen from *Mycobacterium leprae* in sera of leprosy patients and their contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;**85**:191-194.
- 60- Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Leprosy serology using PGL-1: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;**41**:11-18.
- 61- ILA. Summary of the Report of the ILA Technical Forum *Lep Review* 2002;**70**: 3-5.

## Tables

Table 1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes de acordo com as formas clínicas da hanseníase, contatos domiciliares e controles endêmicos, segundo a resposta imune celular (Teste de Mitsuda), índice baciloscópico (IB) e resposta imune humoral (Teste ELISA).

Tests	Clinical Forms				
	TT	BT	BB	BL	LL
Mitsuda positivity (%)	100	86.66	7.69	0	0
Mitsuda averages	11.15	5.49	0.92	0	0
BI positivity (%)	0	9.43	100	100	100
BI averages	0	0.05	1.90	4.22	5.16
ML Flow positivity (%)	0	32.65	94.73	100	100
ML Flow averages	0	0.47	2.5	3.81	3.96
ML Flow magnitude	0	0 - 3	0 - 4	3 - 4	3 - 4
PGL-1 ELISA positivity (%)	0	38.33	92.86	100	100
PGL-1 ELISA averages	0	1.59	4.25	9.96	11.21
PGL-1 ELISA magnitude	0.1 - 0.8	0.2 - 11.4	0.2 - 12.2	1.4 - 28.0	2.68 - 31.0
ND-O-HSA ELISA positivity (%)	35.71	38.33	57.14	95.24	100
ND-O-HSA ELISA averages	1.11	1.33	1,89	5.87	7.62
ND-O-HSA ELISA magnitude	0.3 - 2.8	0.3 - 6.4	0.2 - 8.4	1.1 - 23.6	1.8 - 27.8

Clinical forms: TT- tuberculoid, BT- borderline tuberculoid, BB- borderline-borderline, BL- borderline-lepromatous, and LL- lepromatous. BI: Bacterial Index

Table 2. Analysis of the Kappa agreement index among three serological assays in leprosy patients.

		<b>ML Flow</b>			<b>Kappa</b>
		<b>Positive (N)</b>	<b>Negative (N)</b>	<b>Total</b>	
<b>PGL-1 ELISA</b>	<b>Positive (N)</b>	69	10	79	0.75*
	<b>Negative (N)</b>	4	38	42	
	<b>Total</b>	73	48	121	
		<b>ND-O-HSA ELISA</b>			<b>Kappa</b>
		<b>Positive (N)</b>	<b>Negative (N)</b>	<b>Total</b>	
<b>PGL-1 ELISA</b>	<b>Positive (N)</b>	62	17	79	0.48*
	<b>Negative (N)</b>	12	30	42	
	<b>Total</b>	74	47	121	
		<b>ML Flow</b>			<b>Kappa</b>
		<b>Positive (N)</b>	<b>Negative (N)</b>	<b>Total</b>	
<b>ND-O-HSA ELISA</b>	<b>Positive (N)</b>	60	14	74	0.53*
	<b>Negative (N)</b>	13	34	47	
	<b>Total</b>	73	48	121	

\* p<0.0001

Table 3. Seropositivity of the three serological assays for household contacts according to the operational classification of their index case (leprosy patients). MB- Multibacillary and PB- Paucibacillary.

<b>OC Index Case</b>	<b>Contacts (N)</b>	<b>Positivity in PGL-1 ELISA N (%)</b>	<b>Positivity in ND-O-HSA ELISA N (%)</b>	<b>Positivity in ML Flow N (%)</b>
<b>MB</b>	142	39 (27,46)	25 (17)	14 (10)
<b>PB</b>	49	10 (20,41)	7 (14)	5 (10)
<b>Total</b>	191	49 (25,65)	32 (17)	19 (10)

MB: Multibacillary; PB: Paucibacillary.

## Figure legends

Figure 1. Average values for the native PGL-I ELISA, ND-O-HSA ELISA and ML-Flow assays, according to the bacterial index of leprosy patients.

Figure 2. Average EI values for the native PGL-I assays, according to clinical forms of the leprosy before and after treatment whit MDT.

Figure 1

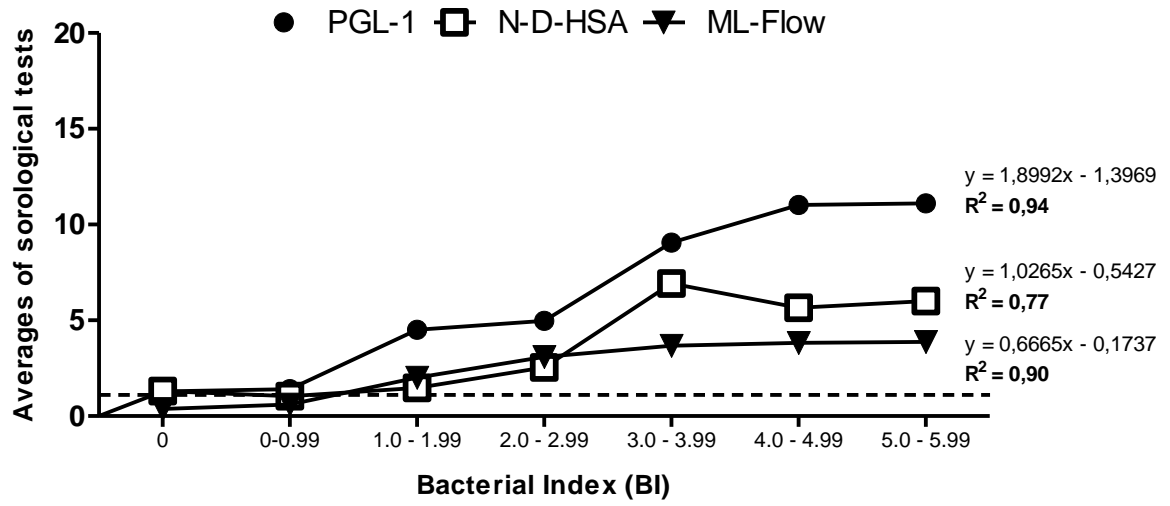
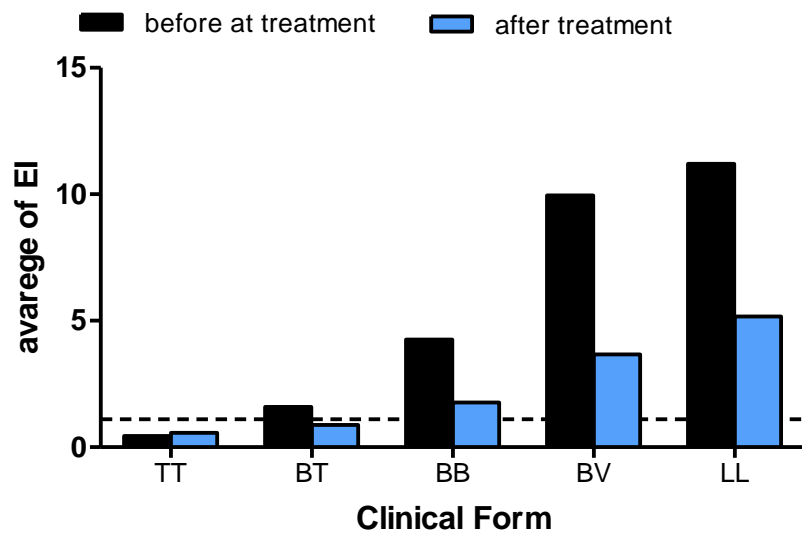


Figure 2





***Antígenos miméticos de LAM: a resposta imune de IgG e suas subclasses na hanseníase e implicações***

## **Resumo**

Interação patógeno-hospedeiro é mediada principalmente por moléculas especializadas do envelope celular. Um dos componentes essenciais da parede celular das micobactérias é a lipoarabinomanana (LAM). A LAM tem um papel imunomodulador, mas a sua heterogeneidade pode ser responsável pela resposta imune diferenciada em pacientes com hanseníase e contatos. Espera-se que a pesquisa por motivos estruturais de *M. leprae* possam contribuir, como fatores de virulência ou epítomos de proteção, e assim, derivar biomarcadores eficazes para o diagnóstico, drogas e vacinas contra a hanseníase. Portanto, nosso objetivo foi desenvolver peptídeos miméticos específicos à LAM utilizando Phage Display de uma biblioteca aleatória de peptídeos heptâmeros que possam reconhecer uma resposta diferencial em pacientes com hanseníase e contatos. Nós utilizamos o anticorpo monoclonal anti-LAM, CS-35, como um alvo de três rodadas de seleção. Após seqüenciamento e tradução, os peptídeos foram pré-validados por ELISA e comparados com o antígeno sintético LAM-BSA. O motivo peptídico mais reativo e repetitivo (A9) foi posteriormente testado contra o soro de 54 pacientes com hanseníase e 27 controles endêmicos por ELISA. O clone mimético A9 apresentou altos níveis de anticorpos IgG em pacientes paucibacilares (PB), sendo que 50% destes soros foram altamente reativos. Esta reação também ocorreu em pacientes tuberculóides, dimorfo-dimorfo e virchowiano. Controles endêmicos e pacientes reacionais apresentaram altos níveis de IgG1 no soro. Por outro lado, o perfil de IgG e suas subclasses em pacientes apresentou altos níveis de IgG e IgG2 e baixos níveis de IgG1. O clone A9 apresentou uma correlação positiva significativa com o antígeno LAM-BSA sintético para a resposta IgG1. A resposta de IgG altamente reativa contra o clone A9 foi associada com o diagnóstico da forma clínica tuberculóide, e a detecção de ambos, IgG1 e IgG3, contra esse clone foi associado à proteção nos controles endêmicos.

## **Abstract**

Host–pathogen interactions are mainly mediated by specialized molecules of the cell envelope. One of these essential mycobacterial cell wall components is the lipoarabinomannan (LAM). LAM has immunomodulatory roles, but its heterogeneity may be responsible for the differential immune response in leprosy patients and contacts. The research to structural motifs that could contribute as virulence factors and/or protective epitopes, and thereby derive effective biomarkers for diagnosis, drugs and/ or vaccines against leprosy has been very developed. Therefore, our aim was to develop specific mimetic peptides to this lipoglycan by using Phage Display of a random heptamer peptide library that may recognize a differential response in patients and contacts. We have used the anti-LAM CS-35 monoclonal antibody as a target for three rounds of selection. After sequencing and translation, peptides were pre-validated by ELISA and compared to the synthetic LAM-BSA antigen. The most reactive and repetitive peptide motif (A9) was subsequently tested against serum from 54 leprosy patients and 27 endemic controls by ELISA. The A9 phage-displayed peptide clone presented high levels of IgG antibodies in paucibacillary patients, from which 50% of them presented highly reactive sera. This reactivity has also been detected in tuberculoid, borderline-borderline and lepromatous patients. High levels of IgG1 were most frequent in endemic controls and reactional patients. On the other hand, the IgG profile and its subclasses in patients presented high levels of IgG and IgG2 and low levels of IgG1. The A9 clone presented a significant correlation with the synthetic LAM-BSA, for the IgG1 response. The highly reactive IgG response against the A9 clone was associated with the tuberculoid clinical form diagnosis, and detection of both IgG1 and IgG3 against this clone was associated with protection in endemic controls.

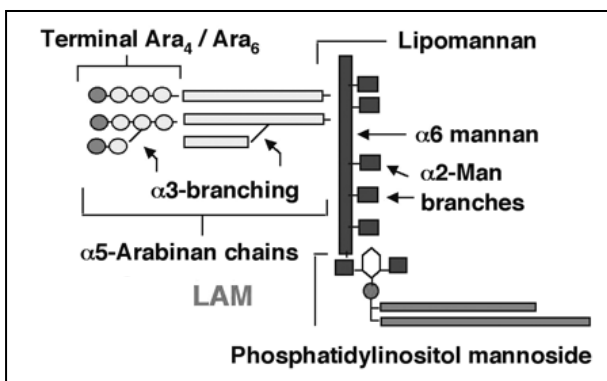
## 1.0- Introdução

As micobactérias têm desenvolvido adaptações específicas que garantem o sucesso de sua sobrevivência nas células do hospedeiro. O sucesso desta interação é mediado por moléculas especializadas, em particular, as do envelope celular. A essência da célula micobacteriana é formada pelo complexo “mycolyl arabinogalactan peptideoglican” (mAGP) e a lipoarabinomanana (LAM), sendo que o mAGP forma a base da parede micobacteriana e a molécula LAM tem função de exercer intensos efeitos fisiológicos (1).

LAM não é somente essencial para o crescimento micobacteriano e viabilidade celular, mas também nas interações entre as micobactérias e seus hospedeiros (1).

Muitos receptores da célula do hospedeiro interagem com uma variedade de ligantes expostos na superfície da micobactéria. A maioria destes ligantes são açúcares complexos, com a função de ativar a resposta celular no hospedeiro (2,3). As arabinomananas de LAM têm demonstrado ser expostas na superfície celular e também estão diretamente ligadas à imunopatogênese da hanseníase e tuberculose (4). A molécula de LAM parece estar ligada firmemente a parede celular, mas não completamente (5) (Figura 1).

O anticorpo monoclonal anti-LAM reconhece a célula micobacteriana em experimentos de ELISA, sugerindo que o reconhecimento seja direcionado contra as arabinomananas extracelulares ligadas a via da ancora de manosylfosfatidylinositol (MPI) na superfície da célula, sendo acessível ao ambiente (5).



**FIGURA 1:** Esquema da molécula lipoarabinomannan (LAM) em uma bactéria Gran-negativa. Fonte: Torrelles et al., 2004

A inibição da maturação do fagossomo infectado com *Mycobacterium* ssp pode ser o primeiro passo crítico para a sobrevivência intracelular. Provavelmente a micobactéria utiliza de vários mecanismos para prevenir a transferência lisossomal, um deles é a interferência do Man-LAM no processo de maturação do fagossomo (6).

O reconhecimento de LAM por células T ocorre por uma via independente do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (7). A apresentação destes antígenos lipoglicanos requer a internalização e acidificação endossomal, porém independente de MHC de classe I e II.

As moléculas de CD1 são responsáveis pela apresentação dos glicolipídeos às células do sistema imune. O CD1 é um importante antígeno presente nas moléculas do sistema imune, semelhante aos MHC de classe I e II. Em infecções micobacterianas, o CD1 garante a apresentação de glicolipídeos para ativar células T restritas a CD-1, sendo assim uma importante molécula envolvida na resposta imune das micobactérias (8,9).

Células T obtidas da lesão de pele de pacientes com hanseníase somente respondem a LAM de *M. leprae*, enquanto que doadores saudáveis reconhecem LAMs de *M. tuberculosis* e *M. leprae*. Isto sugere que embora as unidades lipídicas sejam necessárias, provavelmente as ligações de domínios hidrofóbicos  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  de CD1 correspondem espacialmente ao sulco do peptídeo ligante em moléculas de MHC (10). Interessantemente, uma linhagem de células T respondeu especificamente ao LAM de *M. leprae*, mas não ao do *M. tuberculosis* (11).

As linhagens de células T de lesão de pele de pacientes com hanseníase e sangue de doadores saudáveis foram responsivos para LAM/ lipomanana(LM) / manosídeos fosfatidilinositol (PIMs) na presença de células apresentadoras de antígenos (APC) que expressam CD1b.

A LAM exibe um amplo espectro de funções imunomoduladoras, mas seu envolvimento em ensaios imunológicos *in vitro* ainda não são bem entendidos. Em um experimento usando AraLAM, ManLAM e LAM de *M. leprae*, os primeiros dados obtidos foram a inibição da ativação de células T induzida por LAM (12); a inibição de várias funções induzidas por IFN- $\gamma$ , incluindo macrófagos microbicidas

e atividades tumoricidas (13); destruição de NO potenciais (14); inibição da atividade de proteína C quinase (14); o recrutamento de citocinas associadas a macrófagos, como TNF- $\alpha$ ; CSF granulócitos-macrófagos, IL-1a, IL-1b, IL-6 e IL-10 (15-17).

Vesículas contendo LAM são liberadas por fagossomos que contêm micobactérias, sugerindo um transporte ativo para fora das células infectadas (18,19). Moléculas de LAM liberadas pelos macrófagos infectados podem agir de forma parácrina modulando a função dos leucócitos próximos. A LAM altera os processos de sinalização em macrófagos (20), e tem sido relatado que a LAM de *M. tuberculosis* inibe a apoptose induzida (21). Recentemente, também foi relatado que a LAM afeta as vias de sinalização envolvidas na sobrevivência celular (22).

O entendimento do reconhecimento de LAM e LM por células T restritas a CD-1 ainda é obscuro até o presente, já foi descrito que células T quando ativadas por LAM secretam citocinas próinflamatórias e são citolíticas, o que diferencia da função de LAM já descrita na literatura. (23). A presença de células T que reconhecem especificamente o LAM do *M. leprae* em lesões de pele de pacientes com hanseníase indicam um papel nesta nova via de apresentação de antígenos na defesa do hospedeiro. Isto pode ser importante na requisição da imunidade mediada por células para patógenos intracelulares persistentes que sintetizam uma grande variedade de lipoglicanas, incluindo a LAM (24).

Um estudo recente demonstrou que em pacientes com hanseníase existe uma resposta humoral contra LAM, sendo que 100% dos pacientes do polo lepromatoso apresentam uma forte reatividade ao LAM. Dos pacientes do polo tuberculóide, 90% responderam a LAM em teste ELISA. A resposta humoral foi detectada também em controles de área endêmica, chegando a 75% de reatividade contra este antígeno (25).

A molécula de LAM já foi detectada utilizando o anticorpo monoclonal SA1C7F em biópsias de pele e nervo de pacientes hansenícos não tratados, tratados e em reação tipo 1. A molécula foi detectada em biópsias de pele e nervo dos pacientes dimorfos virchowiano (DV) e dimorfo tuberculóide (DT) com reação. A LAM também foi detectada em todas as biópsias de pacientes tuberculóides (T) e

dimorfos tuberculóides (DT). Na análise do grupo de pacientes tratados, LAM permaneceu sendo detectada nas biópsias, mesmo após o tratamento (26).

As subclasses de IgG têm sido investigadas frente a molécula LAM e diferentes resultados controversos têm sido relatados, pois os antígenos utilizados foram diferentes em cada estudo. Em 2011, Jadhav e colaboradores (27) utilizaram o antígeno ManLAM e não observaram aumento das subclasses de IgG nos pacientes com hanseníase, somente na forma clínica DV. E neste estudo, não houve correlação da positividade de ManLAM com as reações hansênicas (27), mas quando se utiliza somente o antígeno LAM, observa-se uma queda de IgG3 em reações de eritema nodoso hansênico (ENH) e um aumento dos níveis de IgG1 e IgG2 em pacientes com reação reversa (RR) quando comparados aos pacientes sem reação (28). Quando utilizado o sonicado celular total de *M. leprae*, percebe-se um aumento na imunoglobulina IgG e suas subclasses, com uma forte correlação com a carga bacilar (29).

Diante do potencial imunomodulatório da LAM na hanseníase, procurou-se neste trabalho utilizar uma tecnologia proteômica que pudesse explorar a exposição de diferentes epítomos da molécula no reconhecimento da resposta imune humoral de pacientes com hanseníase. Esta tecnologia, chamada Phage Display, que permite a geração de mimotopos de antígenos proteicos com potencial uso em diagnósticos (30) também inclui a produção de mimotopos de antígenos não proteicos, como os lipopolissacarídeos (LPSs) (31). A técnica possui a vantagem de permitir a seleção de mimotopos mesmo quando a natureza do antígeno não é conhecida (32). Isto é particularmente importante em casos como câncer, artrite reumatoide e doenças infecciosas, em que o antígeno ou epítomo imunogênico são conformacionais e desconhecidos, em sua maioria, e desta maneira a seleção de epítomos por Phage Display pode ser um diferencial, especialmente quando se utiliza o soro de pacientes e controles sadios (33-39).

Nossa hipótese é que peptídeos miméticos de LAM podem ser produzidos por Phage Display e que estes pequenos motivos proteicos podem mimetizar algum antígeno de *M. leprae*. A presença de anti-LAM mimético no soro de pacientes e sua provável associação com as diferentes formas clínicas da doença e/ou as reações hansênicas será investigada. Objetivamos assim obter um maior

conhecimento da resposta humoral de imunoglobulinas IgG e suas subclasses, discutindo as prováveis implicações no diagnóstico diferencial de pacientes com hanseníase e suas complicações.

## **2.0- Material e Métodos**

### **2.1-Pacientes e Controles endêmicos**

Amostras de soro de 54 pacientes com hanseníase, virgens de tratamento, atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase/ (CREDESH), do Hospital de Clínicas (HC), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – MG, foram coletadas para realização do presente estudo.

Os pacientes receberam uma classificação operacional, sendo 18 paucibacilares (PB) e 36 multibacilares (MB). De acordo com a classificação clínica espectral de Ridley & Jopling (40), os pacientes foram distribuídos nas seguintes formas clínicas: 10 pacientes da forma tuberculóide (T), 08 da dimorfa-tuberculóide PB (DT-PB), 07 dimorfa-tuberculóide MB (DT-MB), 08 da forma dimorfa-dimorfa (DD), 10 dimorfa-virchowiana (DV) e 11 pacientes com a forma virchowiana (V).

Os pacientes foram avaliados durante o tratamento quanto a presença de reações hansênicas, quando presentes, eram classificadas em reação tipo 1, reação tipo 2 e reação mista (1 e 2).

Todos os pacientes foram submetidos a um protocolo clínico-laboratorial para o diagnóstico de hanseníase e classificação clínica do paciente, sendo eles: o histopatológico das biópsias da lesão de pele, a baciloscopia dos esfregaços dérmicos de no mínimo 7 locais, o teste de Mitsuda para análise da resposta imune celular específica ao *M. leprae* e teste ELISA indireto anti-PGL-1 para análise da resposta imune humoral.

A baciloscopia foi realizada para determinar a carga bacilar presente nos esfregaços dérmicos do paciente, que foram retirados dos lóbulos das orelhas (LD e LE), cotovelos (CD e CE), joelhos (JD e JE) e uma das lesões, com resultados descritos como Índice Baciloscópico (IB) de acordo com a Escala Logarítmica de Ridley (41), que varia de IB=0 a IB=6.



O teste de Mitsuda foi avaliado nos pacientes para quantificar a resposta imune celular específica a *M. leprae*. O antígeno de Mitsuda é uma suspensão de  $6 \times 10^7$  de bacilos de *M. leprae* mortos pelo calor. A leitura deste teste é feita após quatro semanas da aplicação intradérmica de 0,1ml do antígeno de Mitsuda no antebraço direito, por meio da medida do diâmetro da induração local em milímetros (mm). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os resultados do teste de Mitsuda são os seguintes: 0-3mm – negativo ou duvidoso; 4-7mm- positivo fraco; 8-10mm- positivo forte e maior que 10- fortemente positivo (42).

O ELISA indireto anti-PGL-1 é um teste sorológico que detecta e quantifica a presença de anticorpos IgM contra a fração glicolipídica presente na parede de *M. leprae* e sua positividade correlaciona-se com o espectro clínico e o índice baciloscópico dos pacientes com hanseníase (43-45). O resultado do teste é apresentado em Índice ELISA (IE), considerado positivo quando maior que 1,1(46).

Os soros de 27 controles endêmicos foram obtidos de indivíduos sadios, maiores de 18 anos de idade e doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia.

A tabela 1 mostra as características clínicas e laboratoriais dos pacientes e controles endêmicos participantes desta pesquisa. O comitê de ética da Universidade Federal de Uberlândia aprovou a realização deste projeto, número #499/08.

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes de acordo com as formas clínicas da hanseníase e controles endêmicos (CE), segundo a resposta imune celular (Teste de Mitsuda), índice bacilar (IB) e resposta imune humoral (Índice ELISA- IE).

Testes	Formas Clínicas (N)						CE (27)
	T (10)	DT-PB (8)	DT-MB (7)	DD (8)	DV (10)	V (11)	
Positividade do Mitsuda (%)	100	100	40	12.50	10	0	-
Média Mitsuda (mm)	10.00	7.25	2.40	0.25	0.30	0	-
Positividade Índice bacilar (%)	0	0	57	100	100	100	-
Média do Índice bacilar (IB)	0	0	0.29	1.41	4.20	5.20	-
Positividade ELISA PGL-1 (%)	0	12.50	28.60	100	100	100	0
Média ELISA PGL-1 (IE)	0.49	0.60	1.71	6.30	6.87	6.89	0.34

## 2.2 Anticorpos Monoclonais

O anticorpo monoclonal CS-35 foi utilizado neste trabalho para a seleção de fagos miméticos na técnica de biopanning. O anticorpo monoclonal CS-35, que é um anticorpo de isotipo IgG3 contra LAM de *M. leprae*, gentilmente cedido pelo Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia da Universidade do Estado do Colorado, pelos pesquisadores Drs. John Spencer e Patrick Brennan.

## 2.3 Biopanning

Uma biblioteca de Ph.D.-C7C (*NEW ENGLAND Biolabs®<sub>inc</sub>*) de peptídeos randômicos fusionados à proteína pIII de bacteriófagos filamentosos M13 foi utilizada. Ela é composta de sequências de sete aminoácidos flanqueados por dois resíduos de cisteína, um de cada lado, seguido por uma curta sequência espaçadora Gly-Gly-Gly fusionada à região N-terminal da pIII. Esta é uma biblioteca de sequências conformacionais, que possui estruturas secundárias devido à posição das cisteínas nas extremidades da sequência dos sete aminoácidos.

Foram utilizadas 5µL ( $1 \times 10^{11}$  partículas virais) da biblioteca Ph.D.-C7C e realizado três ciclos de seleção de fagos ligantes ao anticorpo monoclonal. Em cada um dos ciclos, um poço de uma microplaca de 96 poços (*Maxisorp- Nunc®*) foi previamente adsorvido com anticorpo monoclonal CS-35 (100µg/mL em 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6) a 4°C por 12-16 horas (*overnight*), a placa foi bloqueada com 300µL de tampão de bloqueio (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,6; 5mg/mL de BSA) por uma hora a 4°C; e lavada seis vezes com TBS-T (TBS contendo 0,1% tween-20). Acrescentou-se, no mesmo orifício da placa, 5µL da biblioteca diluídos em 100µL de TBS-T agitando por uma hora a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos com seis lavagens de TBS-T 0,1% no primeiro ciclo de seleção e nos dois ciclos subsequentes com TBS-T 0,5%. Os fagos ligantes foram retirados por eluição ácida (Glicina-HCl 0,2 M, pH 2,2). Pequenas alíquotas do eluato foram utilizadas para titulação.

O eluato remanescente foi amplificado da seguinte maneira: inicialmente retirou-se a colônia (isolada) de *Escherichia coli* ER2738 previamente crescida em meio LB (0,2g LB em 20 mL de água esterilizada) com tetraciclina, sob agitação a 37°C

até a fase *early-log* ( $OD_{600} \sim 0,3$ ) e incubou-se o eluato por 4-5 horas sob forte agitação (250 rpm). A cultura foi submetida à centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Logo após, o sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado e adicionou-se 1/6 de PEG/NaCl (20% de polietilenoglicol 8000 e 2,5 M NaCl em solução estéril) incubando-se por 12 a 16 horas a 4°C. Decorrida a precipitação, centrifugou-se a solução a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso em 1 mL de TBS e precipitado novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl e incubado durante 1 hora no gelo. Centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C descartando o sobrenadante. O precipitado foi suspenso em 100µL de TBS, 0.02%  $NaN_3$ , obtendo-se então o eluato amplificado, que foi posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

## 2.4- Titulações

A titulação é um procedimento necessário para determinar o número de entrada e saída das partículas virais durante os ciclos de seleção.

Os fagos foram submetidos a diluições seriadas de 10 vezes em meio LB. Para eluatos não amplificados foram utilizadas as diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ; e para fagos amplificados a diluição utilizada foi de  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$ . Cada diluição foi acrescida de 200µL da cultura de ER2738 na fase *mid-log* ( $OD_{600} \sim 0,5$ ). Esta mistura foi agitada brevemente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As bactérias infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3 mL de agarose Top a 45°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio sólido, com IPTG/Xgal 0.1 mM e tetraciclina. Para cada diluição foi confeccionada uma placa.

As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas e após este período contaram-se as colônias das placas que, apresentaram aproximadamente 100 colônias. Multiplicou-se cada número pelo fator de diluição de cada placa para obter o título dos fagos.

## 2.5- Extração de DNA de fagos

Para a extração do DNA dos fagos, colônias isoladas de uma placa oriunda do 3º ciclo de seleção do *Biopanning* foram transferidas para poços de cultura em placa

tipo *Deepwell*, contendo 1 mL de meio de cultura de ER2738 em fase *early-log* ( $OD_{600} \sim 0,3$ ); a cada poço foi adicionada apenas uma colônia de fagos. A placa ficou sob forte agitação (250 rpm) por 16 horas a 37°C. Após o crescimento dos fagos, as placas foram centrifugadas a 3700 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma placa estéril e incubada com PEG/NaCl por 10 minutos. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm por 40 minutos a 20°C para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µL de tampão Tris suplementado com iodeto (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foi adicionado ao precipitado de fagos. As placas passaram por forte agitação e em seguida os DNAs dos fagos foram precipitados com 250µL de etanol absoluto. As placas foram centrifugadas e o precipitado lavado com etanol 70% e recentrifugadas. O precipitado final foi diluído em 20µL de água Milli-Q. A qualidade e quantidade dos DNAs foram verificadas pela corrida eletroforética em gel de agarose 1%, corado com solução de brometo de etídeo.

## **2.6- Sequenciamento**

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do primer- 96gIII e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de amplificação foi realizada com 35 ciclos em um Termociclador de placas (MasterCycler - Eppendorf). O DNA a ser sequenciado foi precipitado com 1µL de Acetato de Amônio e Etanol e acrescentados 27,5µL de Etanol absoluto; em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugou-se por 10 minutos, a 4000 rpm. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A leitura do sequenciamento foi realizada em um sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU) .

## **2.7- Purificação de fagos**

Fagos selecionados do 3º ciclo de seleção foram amplificados em meio de cultura contendo bactérias ER2738 em fase *early-log* ( $OD_{600} \sim 0,3$ ); por 16 horas, com

forte agitação (250 rpm) a 37°C em tubos tipo falcon. Após o crescimento, os tubos foram centrifugados a 4500 rpm por 10 minutos, no sobrenadante, separado das bactérias, foi acrescido 1/6 do volume de PEG/NaCl, e colocado em repouso por 16 horas a 4°C. Os fagos foram precipitados após uma centrifugação de 10000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi diluído em 1 mL de PBS estéril e centrifugado novamente, para retirada de bactérias. O sobrenadante foi colocado em outro tubo limpo e acrescido 1/6 do volume de PEG/NaCl, que ficou em repouso por uma hora em gelo. Logo após, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos e o precipitado de fagos foi diluído em 200 µL de PBS.

## **2.8- ELISA direto para *screening* de fagos ligantes aos anticorpos monoclonais**

Para verificar a reatividade dos fagos selecionados na 3ª seleção do *biopanning* foi realizado um ensaio ELISA. Placas de alta afinidade (Maxsorp - Nunc®) de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal CS-35 diluído em NaHCO<sub>3</sub> (0,1M, pH 8,6) a 0,25 µg/poço por uma hora a temperatura ambiente. A placa foi lavada por duas vezes com o tampão de lavagem (PBS- T 0,1%). Os poços foram bloqueados com soroalbumina bovina (BSA) 1% em tampão PBS-T 0,1%, esta solução foi adicionada aos poços da placa e armazenadas por 16 horas a 4°C. Foi realizada três lavagens com o tampão de lavagem e o sobrenadante da cultura dos fagos foi adicionado individualmente a cada poço da placa. A placa foi incubada por duas horas a temperatura ambiente e seguida por cinco lavagens. O conjugado anti-M13 peroxidase foi diluído a 1:5000 em PBS-T 0,1% e incubado por uma hora a temperatura ambiente. A placa foi revelada com substrato OPD (o-Phenylenediamine) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 492 nm após o “stop” da reação.

## **2.9- ELISA indireto para detecção de IgG utilizando fagos alvos e selvagens**

Placas de alta afinidade (Maxsorp - Nunc®) de 96 poços foram sensibilizadas com o fago purificado A9 de CS-35 e fago selvagem. Todas as placas foram sensibilizadas com o fago alvo e com fago selvagem em poços diferentes e todos os soros foram avaliados quanto à reatividade para ambos. A placa foi incubada

com ambos os fagos diluídos em PBS em uma concentração de  $1 \times 10^{11}$  por poço por 16 horas a 4°C. Os fagos não ligantes foram retirados por lavagens e 300µL de solução bloqueadora contendo PBS-Molico 5% foi adicionado nos poços e incubado por uma hora a 37°C. A placa foi lavada duas vezes com PBS e soros diluídos em concentração de 1:100 em solução de PBS-Molico 5%+ Tween 0,5% e incubados por uma hora a 37°C. Após incubação, a placa passou por três lavagens com PBS+Tween 0,5% e o anticorpo secundário anti-IgG humana marcada com peroxidase (Sigma) diluído a 1:1000 em PBS-Molico 5%+ Tween 0,5% e foi adicionado aos poços da placa e esta foi incubada por uma hora a 37°C. Após três lavagens da placa, esta foi revelada com OPD. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, baseando-se nos sinais dos controles da reação. Cada soro foi testado em duplicata tanto para o fago alvo quanto para o fago selvagem e a média da absorbância do fago alvo foi subtraída pela média da absorbância do fago selvagem, resultando na absorbância líquida. Os dados foram apresentados em absorbância (ABS) líquida.

#### **2.10- ELISA indireto para detecção de IgG1, IgG2 e IgG3 anti-clones miméticos de LAM**

As reações foram realizadas como descrito anteriormente com as seguintes modificações: a solução de bloqueio utilizada foi PBS-BSA 5%; as amostras de soro foram diluídas a 1:20 em PBS- T-BSA 1% para todas as subclasses testadas e incubados por duas horas a 37°C; após lavagem as placas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-IgG1 ou anti-IgG2 ou anti-IgG3 humana (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:1000 por duas horas a 37°C e, em seguida, com estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:1000 por uma hora a 37°C. As placas foram reveladas com substrato ABTS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a leitura da absorbância foi feita em comprimento de onda de 405 nm.

Os dados também foram analisados em absorbância líquida, conforme descrito anteriormente.

### **2.11 ELISA indireto para detecção de IgG e suas subclasses anti-LAM-BSA**

Placas de alta afinidade (Maxsorp - Nunc®) de 96 poços foram sensibilizadas com LAM-BSA (47) em concentração de 10µg/ ml diluído em PBS, incubada por 16 horas a 4°C. A placa foi lavada duas vezes e 300µL de solução bloqueadora contendo PBS-BSA 1% foi adicionado nos poços e incubado por uma hora a 37°C. A placa foi lavada duas vezes com PBS e soros diluídos em concentração de 1:100 em solução de PBS-BSA 1% + Tween 0,5% e incubados por duas hora a temperatura ambiente. Após incubação, a placa passou por seis lavagens com PBS + Tween 0,5%, o anticorpo secundário anti-IgG humana marcada com peroxidase (Sigma) foi diluído a 1:1000 em PBS-BSA 1% + Tween 0,5% e adicionado aos poços da placa e esta foi incubada por uma hora a 37°C. Após seis lavagens da placa, esta foi revelada com OPD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, considerando a reatividade de amostras controles utilizadas nos ensaios.

O teste ELISA para detecção de IgG1, IgG2 e IgG3 teve o mesmo protocolo utilizado para detecção destas subclasses com o fago mimético A9. A diferença ocorreu apenas na sensibilização da placa. A placa foi sensibilizada com LAM-BSA (47). em concentração de 10µg/ ml diluído em PBS.

### **2.12- Análise estatística**

Para análise estatística, foi utilizado o software GraphPad Prism, v. 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os níveis de anticorpos foram comparados entre os grupos utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Diferenças apresentando valores de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes. Para análise dos resultados entre as diferentes formas clínicas e em dados com mais de 3 grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Para análise do risco relativo, os pacientes positivos para os testes com o clone mimético A9 foram os que após a subtração da absorbância do teste com o clone A9 pela absorbância do mesmo teste com o clone selvagem tiveram um valor positivo, ou seja  $(ABS \text{ do clone A9}) - (ABS \text{ do clone selvagem}) = \text{valor positivo}$ .

Para análise das correlações foi utilizado a correlação de Spearman, para testes não paramétricos.

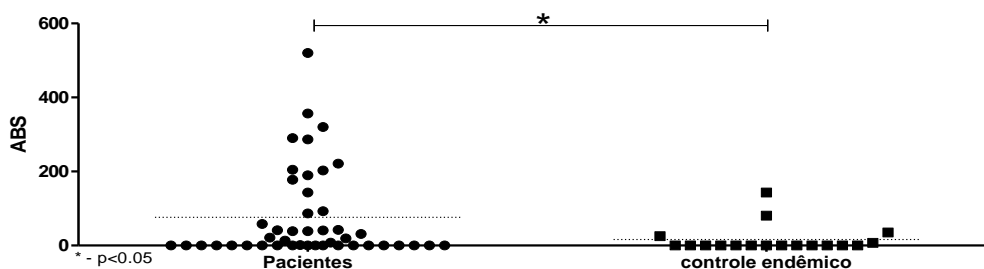
### 3.0- Resultados

#### 3.1- Biopanning do anticorpo monoclonal mAb CS-35 para seleção de clones miméticos a lipoarabinomanana

Foram realizados três ciclos de seleção para obtenção de 96 fagos; neste conjunto de fagos haviam peptídeos ligantes semelhantes e diferenciados. A quantidade de fagos selecionados durante os três ciclos de seleção foi estimada pela titulação de eluatos não amplificados (entrada) e amplificados (saída) de cada ciclo (TABELA 2). Os títulos de entrada dos fagos no “biopanning” são sempre maiores do que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados na placa ficam ligados a estes pela interação paratopo/mimotopo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade ao anticorpo são removidos durante as lavagens da técnica de “biopanning”.

TABELA 2- Seleção de fagos com peptídeos ligantes ao anticorpo monoclonal CS-35, título obtido (pfu) no processo de ligação por imunoafinidade.

Sororeatividade ao CS-35 B7 em soros de pacientes hansênicos e controles endêmicos



#### 3.2- Reatividade dos clones miméticos pelo anticorpo monoclonal CS-35

Após a terceira seleção, dos 96 clones selecionados, 92 clones (A1-H8) foram submetidos a um teste ELISA direto para verificar sua reatividade contra o anticorpo monoclonal CS-35 (FIGURA 2). Com este teste verificou-se se as porções miméticas de sete aminoácidos selecionadas, realmente eram ligantes ao CS-35. O fago selvagem, que é um fago controle que apresenta a proteína M13, mas não apresenta o peptídeo, também foi testado juntamente com uma reação sem clone (branco).



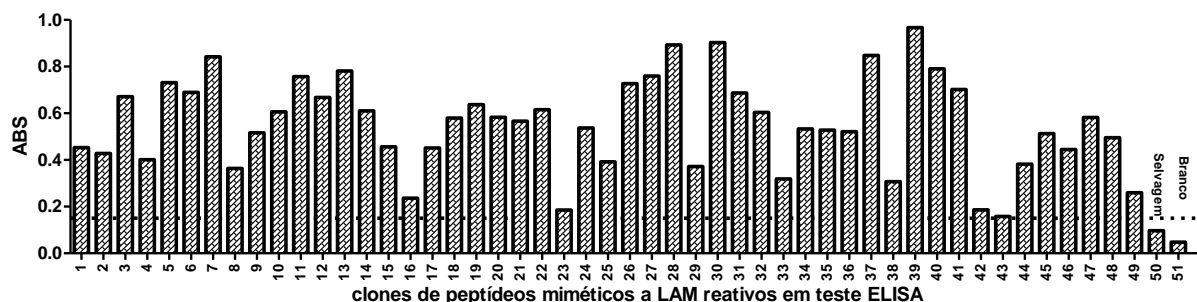


FIGURA 2- Reatividade dos clones selecionados na técnica de biopanning ao anticorpo monoclonal CS-35 e positivos ao teste ELISA direto. O clone 50 corresponde ao clone selvagem e o número 51 corresponde ao um controle da reação. A linha tracejada é o limite da positividade, calculado pela média da ABS selvagem + 2 desvios padrões da duplicata.

O valor do *cut-off* foi calculado baseado na absorbância do fago selvagem; sendo o *cut-off*= média da ABS selvagem + 2 vezes o desvio padrão. Neste teste 73% (67/92) dos clones miméticos foram reativos no teste ELISA, ou seja, apresentaram uma absorbância acima do *cut-off* calculado.

### 3.3- Sequenciamento dos clones reativos

Vinte seis clones com alta e moderada reatividade (ABS >0.700) foram selecionados, sequenciados e traduzidos por bioinformática. As regiões codificadoras do peptídeo foram obtidas e a frequência dos motivos entre os 26 clones sequenciados está apresentada na TABELA 3. O clone CS-35 A9 foi o mais frequente com 23 repetições, e baseando-se no alinhamento das sequências peptídicas dos outros 2 clones, foi também demonstrado que o clone mais frequente também possui o motivo proteico de consenso completo.

TABELA 3- Sequencia de peptídeos ligantes selecionados após a terceira seleção do biopanning

Clone	Sequência de aminoácidos	Frequência	Reatividade ao CS-35 (ABS)
CS-35 A9	<b>GDWLHPP</b>	23/26	0.842
CS-35 B7	<b>CGDWLHP</b>	2/26	0.702
CS-35 E7	<b>DWLHPPL</b>	1/26	0.967
Consenso	<b>GDWLHPP</b>		

### **3.4- Imunorreatividade dos mimotopos de LAM em soros de pacientes com hanseníase**

Os peptídeos miméticos estão em fusão com a proteína pIII do capsídeo do fago, e esta proteína pode apresentar imunorreatividade com alguns soros humanos, o que pode dificultar a diferenciação da resposta contra o peptídeo em fusão.

Para verificar se os anticorpos presentes nos soros dos pacientes estavam se ligando ao peptídeo alvo e não à pIII, todo soro foi testado frente ao fago alvo e ao fago selvagem.

Dos clones sequenciados, três foram selecionados, o A9, B7 e E7 e estes foram testados quanto à reatividade ao fago alvo e selvagem. O teste foi padronizado utilizando-se soros controles positivos e negativos, sendo que a resposta ao fago alvo foi significativamente maior que a do fago selvagem nos clones CS-35 A9 e E7 (dados não mostrados). Os três clones apresentaram perfis muito semelhantes por possuírem motivos proteicos quase que inteiramente comuns entre si, mas com apenas 1 aminoácido de diferença nas extremidades.

O clone A9 foi selecionado para a realização dos experimentos devido a sua alta frequência no “biopanning” e melhor sororeatividade em pacientes diagnosticados com hanseníase virgens do tratamento com poliquimioterapia (PQT) e menor sororeatividade em controles endêmicos sadios quando comparado aos clones B7 e E7 (dados não mostrados).

O clone A9 apresentou diferença entre a reatividade de IgG nos soros de pacientes com hanseníase (FIGURA 3), demonstrando uma alta reatividade (ABS líquida > 80) em 58% dos pacientes (A), tanto em soro de pacientes PB com 50% (10/20) como em MB com 64% (16/25) (B), comparado aos controles endêmicos 10% (2/20)(A e B) de alta reatividade.

Para uma descrição ainda mais detalhada, os pacientes foram separados conforme a classificação clínica de Ridley e Jopling, que é baseada nas diferentes respostas imunológicas dos pacientes ao *M. leprae*. Nesta análise observou-se que pacientes nos dois pólos opostos da doença (T e V) responderam a este clone mimético ao LAM de forma significativamente diferente dos controles endêmicos e pacientes da forma borderline intermediária (DD) também produziram

anticorpos contra este mimotopo e se ligaram ao clone mimético A9 (FIGURA 3C), porém não significativo.

Interessantemente soros de pacientes com a forma T apresentaram alta reatividade a este clone mimético A9, acima de todos os outros pacientes do grupo dimorfo (DT-PB, DT-MB, DD e DV), embora não significativa. A forma clínica T não apresentou nenhum resultado negativo, enquanto que todas as outras formas clínicas apresentaram alguns soros não reativos.

O clone A9 apresentou diferenças de reatividade entre os pacientes e com os controles endêmicos. Também, quando comparado com as formas clínicas da doença os anticorpos estavam presentes em todo o espectro da doença. Os dois pólos da doença (T e V) apresentaram diferença significativa com os controles endêmicos. Devido a estes resultados encontrados, para os testes da subclasse de IgG foi utilizado apenas o clone mimético A9.

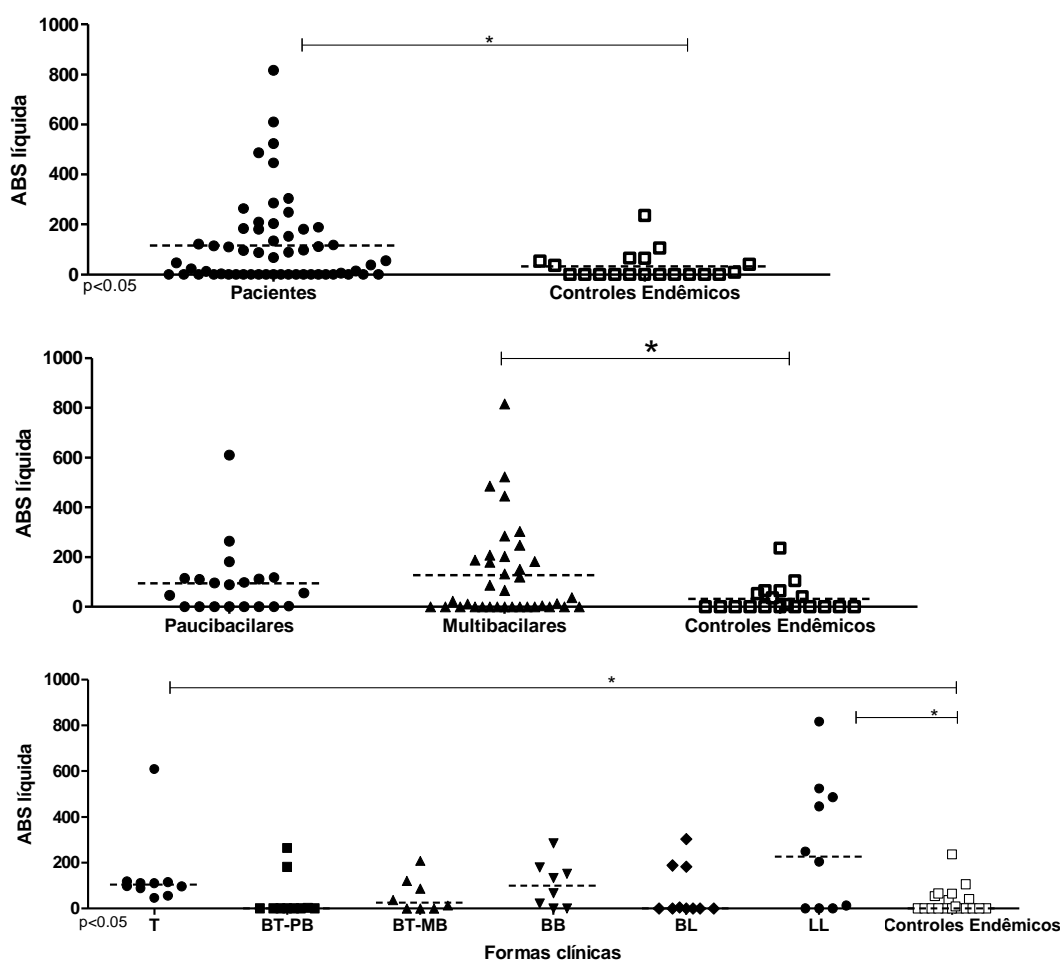


FIGURA 3 - Sororeatividade de IgG ao fago mimético de LAM CS-35 A9 de pacientes hansênicos e controles endêmicos (A). Sororeatividade de acordo com a classificação operacional da hanseníase: Multibacilares e Paucibacilares (B). Sororeatividade dos pacientes de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (C). A linha pontilhada indica a mediana da ABS líquida de cada grupo.

### 3.5- Resposta imune humoral de subclasses de IgG contra o clone mimético CS-35 A9 em pacientes com hanseníase

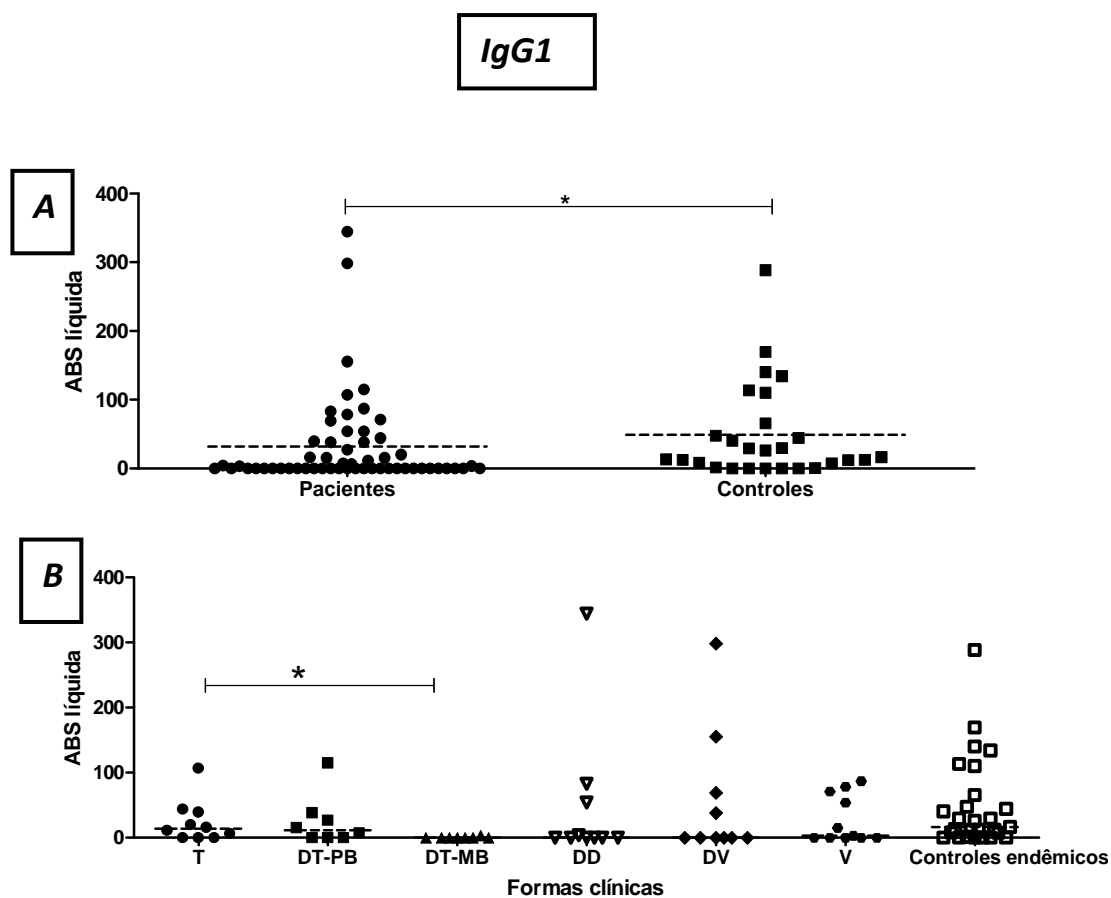


FIGURA 4 - Sororeatividade de IgG1 ao fago mimético CS-35 A9 do antígeno LAM do *M. leprae* em pacientes hanseníase e controles endêmicos (A) e sua sororeatividade de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling (B). A linha pontilhada indica a mediana da ABS líquida de cada grupo.

A presença de reatividade de IgG1 contra o clone mimético foi demonstrada em pacientes com hanseníase e em controles endêmicos, mas com maior mediana nos controles endêmicos ( $p < 0.05$ ) (Figura 4A). Quanto à reatividade nos pacientes de acordo com as formas clínicas observou-se que os pacientes do polo tuberculóide (T) responderam ao clone mimético de LAM enquanto que aqueles das forma DT-MB não apresentaram reatividade ( $p < 0.05$ ) (Figura 4B). É importante ressaltar que os pacientes MB que apresentaram resposta de IgG1 eram pacientes reacionais, sendo que os que pertenciam ao grupo DD e DV

apresentaram reação tipo 1 e aqueles do grupo V, estavam em reação tipo 2 (Figura 4B).

Quanto testado se existe a produção de anticorpos IgG2 ligantes ao clone mimético A9 de LAM verificou-se que não há diferença entre pacientes com hanseníase e controles (Figura 5A) e entre pacientes das diferentes formas clínicas do espectro de Ridley & Jopling ( $p>0.05$ ) (Figura 5B).

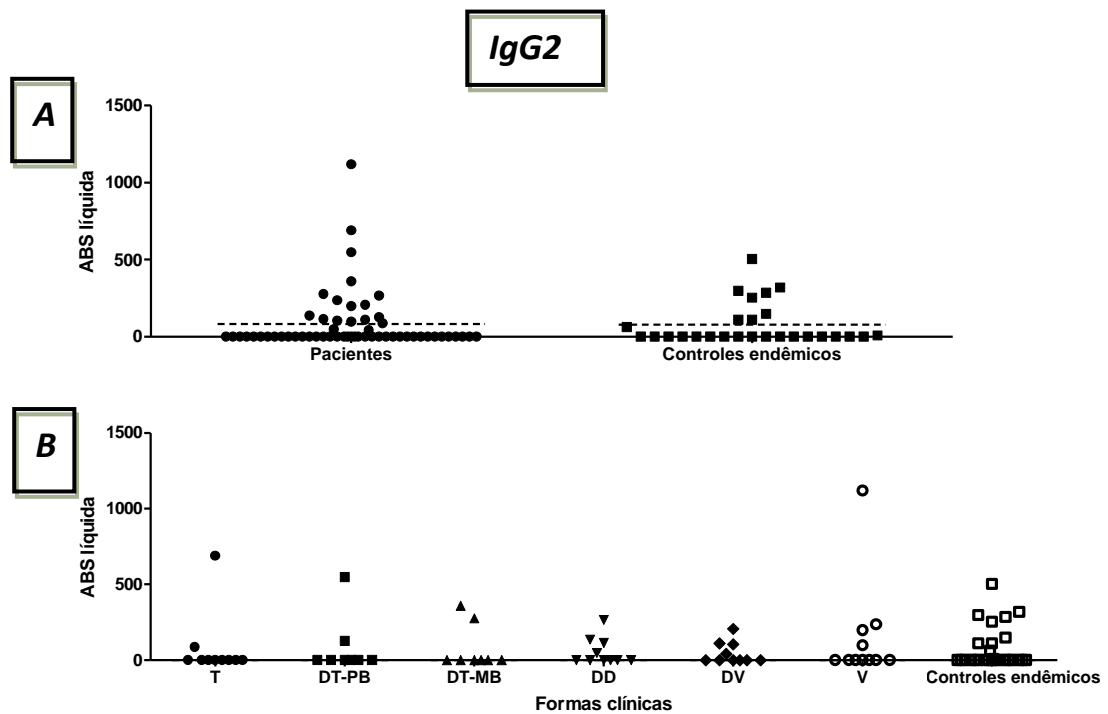


FIGURA 5- Sororeatividade de IgG2 ao fago mimético CS-35 A9 do antígeno LAM do *M. leprae* em pacientes hanseníase e controles endêmicos (A) e sua sororeatividade de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling (B). A linha pontilhada indica a mediana da ABS líquida de cada grupo.

A resposta imune da subclasse IgG3 contra o clone mimético A9 foi mais frequente em controles endêmicos que em pacientes ( $p<0.05$ ) (FIGURA 6A) e quando se comparou os pacientes PB e MB observou-se que o grupo MB apresentou a menor mediana (FIGURA 6B). Entre as diferentes formas clínicas de Ridley e Jopling não houve diferença entre as sororeatividades dos pacientes (FIGURA 6C).

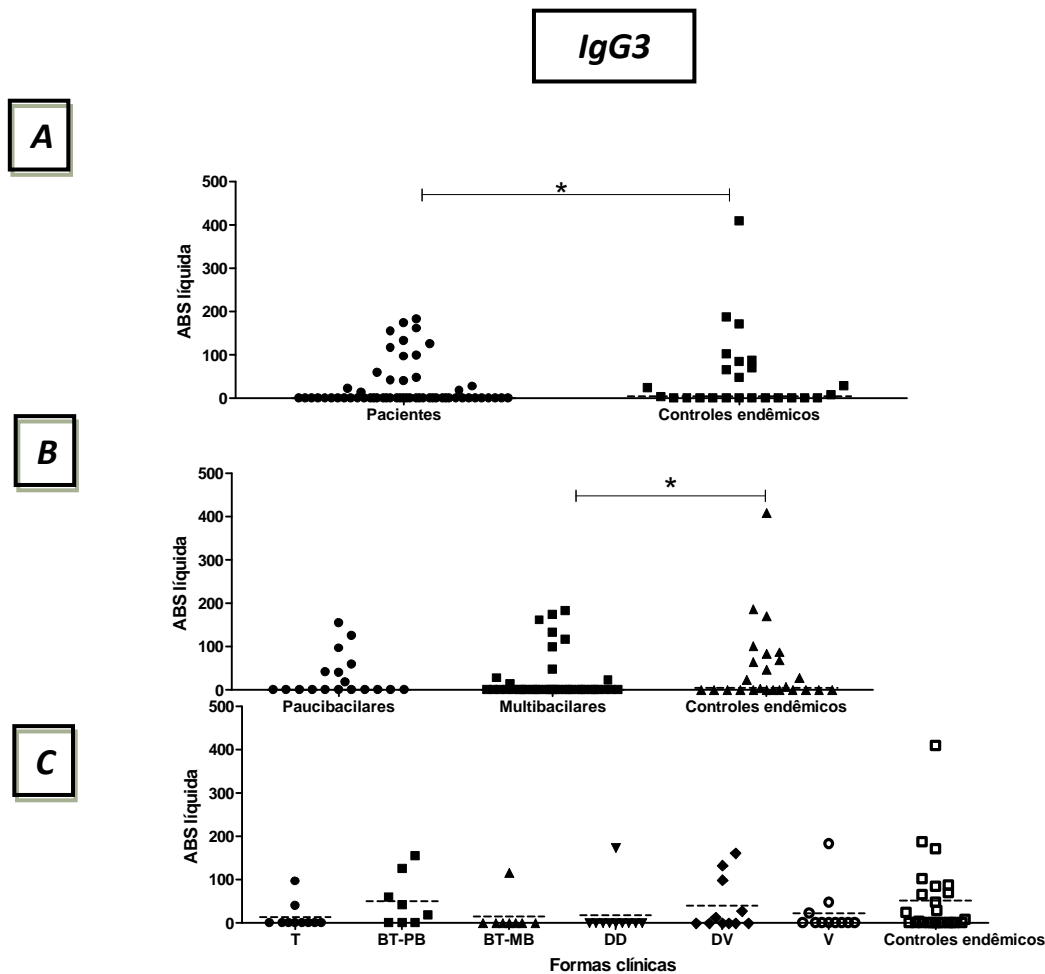


FIGURA 6 - Sororeatividade de IgG3 ao fago mimético CS-35 A9 do antígeno LAM do *M. leprae* em pacientes com hanseníase e controles endêmicos (CE) (A), de acordo com a classificação operacional: Paucibacilares e Multibacilares (B) e a sororeatividade de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling (C). A linha pontilhada indica a mediana da ABS líquida de cada grupo.

O perfil de resposta de imunoglobulinas IgG e suas subclasses produzidas contra o clone mimético A9 em pacientes com hanseníase caracterizou-se por altos níveis de anticorpos IgG e IgG2, com diferença significativa entre IgG e IgG3 ( $p < 0.05$ ) (FIGURA 7). Observou-se que entre os pacientes com diferentes formas clínicas ocorreu uma diferença significativa entre as respostas produzidas. Quando comparado pacientes e controles endêmicos, os níveis de anticorpos IgG1 apresentaram diferença significativa ( $p < 0.05$ ), sendo maior nos controles

endêmicos ( $p < 0.05$ ). Com a imunoglobulina IgG a resposta foi inversa à resposta de IgG1, com um aumento significativo nos soros dos pacientes com hanseníase ( $p > 0.05$ ).

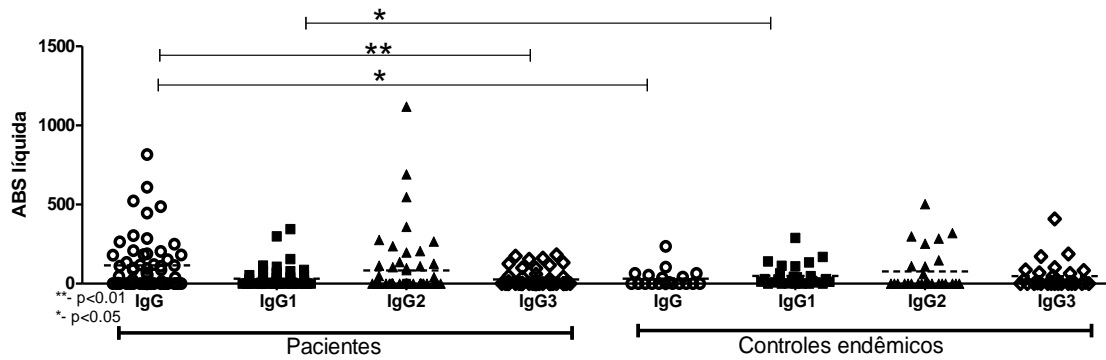


FIGURA 7 - Sororeatividade das subclases de IgG: IgG1, IgG2 e IgG3 ao fago mimético CS-35 A9 do antígeno LAM do *M. leprae* em pacientes com hanseníase e controles endêmicos. A linha pontilhada indica a mediana da ABS líquida de cada grupo.

### 3.6- Correlações entre a resposta imune humoral contra o antígeno LAM sintético e o clone mimético CS-35 A9

O carboidrato LAM sintético de *M. leprae* foi selecionado pelo anticorpo monoclonal CS-35 (47) e associado a uma molécula de BSA. Este antígeno sintético foi utilizado em ELISA indireto para comparar sua resposta a do clone mimético A9, ambos selecionados pelo mesmo anticorpo monoclonal.

Foi detectada correlação positiva, porém não significativas, da resposta de subclasse IgG1 entre o LAM-BSA sintético e o clone mimético A9, a análise da subclasse de anticorpos IgG1 ( $r = 0,77$ ;  $P = 0,06$ ) (FIGURA 8).

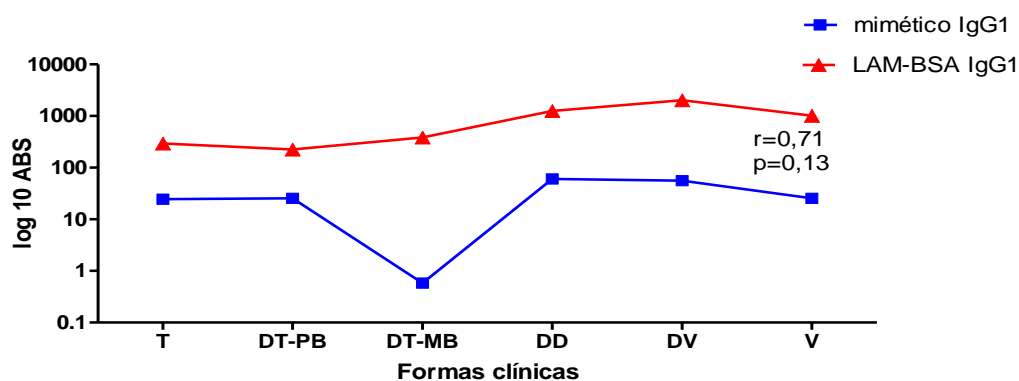


FIGURA 8 – Correlação da reatividade das imunoglobulinas de IgG1 do fago mimético A9 e ao antígeno LAM-BSA sintético soro de pacientes com hanseníase.

### 3.7- Resposta imune humoral de subclasses de IgG contra o clone mimético CS-35 A9 em pacientes com reações hansênicas

Devido à presença de reatividade de IgG1 contra o clone mimético A9 em pacientes com hanseníase que apresentavam reações hansênicas tipo 1 e tipo 2 foi calculado o risco relativo para a ocorrência de reações hansênicas na presença das imunoglobulinas em soros de pacientes reativos ao LAM-BSA sintético e ao clone mimético A9.

No teste ELISA de LAM-BSA sintético a detecção de IgG2 em soro de pacientes com hanseníase gerou um risco relativo de 1,65 vezes para o desenvolvimento de reação hansênica tipo 1, porém não significativo. Similarmente, a presença de IgG2 contra o clone mimético A9 também apresentou um risco de 1,5 vezes maior para a ocorrência de reação tipo 1 nestes pacientes. Para os pacientes que produziram IgG1 ao clone mimético A9 foi observado um risco relativo de 1,22 para o desenvolvimento de reação tipo 1, enquanto que naqueles que produziram IgG1 ao LAM-BSA esta ocorrência não foi observada (TABELA 4). O clone mimético A9 não apresentou qualquer significância com relação à reação tipo 1 e 2.

TABELA 4- Risco relativo de pacientes com ELISA positivo nos testes de LAM-BSA e do clone mimético desenvolverem reações hansênicas.

	ELISA LAM-BSA sintético				ELISA LAM mimético			
	IgG +	IgG1 +	IgG2 +	IgG3+	IgG +	IgG1 +	IgG2 +	IgG3+
<b>Reação tipo 1</b>								
Risco relativo	1,2	0,98	<b>1,65</b>	1,03	0,6	<b>1,22</b>	<b>1,5</b>	1,04
IC	0,66 - 2,24	0,52 - 1,84	0,94 - 2,89	0,62 - 1,73	0,40 - 0,92	0,69 - 2,16	0,84 - 2,67	0,49 - 2,21
<b>Reação tipo 2</b>								
Risco relativo	0,84	0,71	<b>1,09</b>	0,84	0,77	0,87	<b>1</b>	0
IC	0,04 - 49,8	0,44 - 1,14	0,65 - 1,83	0,67 - 1,06	0,54 - 1,1	0,46 - 1,66	0,49 - 2,21	∞



#### 4.0- Discussão

O presente trabalho explorou a possibilidade de encontrar peptídeos miméticos aos antígenos de *M. leprae*, utilizando a técnica de *Phage Display*. Nesta última década muitos antígenos novos foram apresentados como possíveis marcadores de infecção recente, de diagnóstico e monitoramento do tratamento hanseníase. No entanto, ainda é desconhecido como estes antígenos agem sobre o sistema imune, qual antígeno da bactéria que induz a uma resposta imune celular eficiente e protetora, se existem anticorpos protetores e qual a diferença existente entre indivíduos que desenvolvem a doença e outros que mesmo expostos ao *M. leprae* não desenvolvem a doença. Nesta investigação foi caracterizada a resposta imune humoral de IgG e suas subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) produzida contra a molécula LAM, utilizando um clone mimético, visando elucidar a resposta de anticorpos dos pacientes com hanseníase contra esta molécula e se ela desempenha alguma função nesta patologia, seja na patogênese das formas clínicas e nas reações hansênicas.

Por ter apresentado maior diferença de reatividade de IgG entre os pacientes (PB e MB) e controles endêmicos; entre as formas clínicas T, DD e V com os controles; demonstrando o seu potencial de induzir reatividade de anticorpos em todas as formas clínicas do espectro da hanseníase nos testes para detecção de subclasses de IgG, foi utilizado apenas o antígeno do clone mimético A9.

Nesta presente investigação foi demonstrado que apenas IgG2 parece apresentar uma resposta humoral não diferencial contra LAM entre pacientes e controles. O primeiro estudo sobre a resposta de anticorpos com as subclasses de IgG específicas a vários antígenos nativos de *M. leprae*, incluindo, extrato sonicado do bacilo, LAM e PGL-I, em diferentes apresentações clínicas da hanseníase, mostrou que a subclasse de anticorpos IgG predominante contra todos os antígenos de *M. leprae* foi IgG2, independente da classificação clínica (52).

Trabalho anterior que utilizou células T CD1-restritas derivadas de lesão de pele de pacientes com hanseníase demonstrou que ao serem estimuladas por LAM, houve indução de IgG1 e IgG3, sendo que a IgG2 não foi detectada, mesmo após a adição de IFN- $\gamma$  (49). Essa diferença do presente trabalho que detectou IgG2 em soro de pacientes pode ser explicado pelas diferentes metodologias

empregadas, sendo que o trabalho referido acima foi em sobrenadante de culturas de células (PBMC) estimuladas pelo antígeno não protéico LAM, considerado imunomodulador (1,53) que é apresentado por células com CD1b às células T, e quando células T CD1-restritas derivadas de lesão de pele de pacientes com hanseníase são estimuladas por LAM, IgG1 e IgG3 são induzidas e IgG2 não, mesmo após adição de interferon-gama (49). Diferentemente, nesta investigação demonstramos que apenas IgG2 parece apresentar uma resposta humoral não diferencial entre pacientes contra LAM.

As células T são reguladoras importantes da resposta imune contra patógenos intracelulares, inclusive na hanseníase. A anergia das células T leva a falhas funcionais na resposta, quando esta é estimulada (54). Esta anergia advém de vários fatores nesta infecção, e um dos mais importantes é a presença de lipídeos, dentre eles a LAM, que inibe a produção de IFN, e juntamente com a deficiência de IL-2, ocorre uma escassez de células T. A redução na proliferação de células T e na produção de IFN- $\gamma$  em indivíduos saudáveis e em pacientes com hanseníase está correlacionada com a presença destes lipídeos derivados de bacilos (55, 56).

A resposta da subclasse IgG1 contra o clone A9 mostrou ter um perfil mais protetor, estando aumentada nos controles endêmicos em relação ao grupo de pacientes e, nos pacientes do grupo PB, apresentou maior reatividade que os MB. Esse resultado foi diferente do reportado por trabalho anterior, no qual a IgG1 e IgG3 específica contra o sonicado de *M. leprae* mostraram uma correlação positiva maior com o índice baciloscópico dos pacientes com hanseníase, isto é, a progressão da doença em direção ao pólo lepromatoso correlacionou-se a um aumento seletivo da resposta IgG1 e IgG3 (57).

As classes de anticorpos IgG1 e IgG3 apresentam-se aumentadas como anticorpos protetores anti-proteínas (58). Apesar do antígeno trabalhado neste estudo não ser proteico, os anticorpos encontrados parecem ter uma característica protetora.

Uma das funções de LAM é ser imunomodulador, inibindo IFN- $\gamma$ ; isto pode ser um dos fatores que impedem ainda mais, uma maior produção de IgG1 em pacientes MB (6), visto que IgG1 é formada a partir da presença de IFN- $\gamma$  e IgG3 (59, 60).

As imunoglobulinas IgG1 e IgG3 são típicas de uma resposta imune Th1, porém não é incomum encontrar estas imunoglobulinas no polo lepromatoso, onde a resposta Th1 é muito baixa ou indetectável no teste de Mitsuda e em testes de estimulação de PBMC com antígenos do *M. leprae* (57).

A resposta de IgG2 é advinda contra antígenos carboidratos, e neste relato não houve uma diferença entre os grupos de pacientes e controles endêmicos. O mesmo ocorreu nas formas clínicas, não teve uma forma que tivesse maior produção desta imunoglobulina. Na literatura já foram citados trabalhos que não encontraram diferença de IgG2 em pacientes e controles e entre os polos T e V, demonstrando ser um antígeno de células T independente (57). Estes antígenos podem produzir uma resposta sem o auxílio das células T, passando pelas células B e sendo apresentado pelo receptor CD1b. (61).

IgG2 é uma imunoglobulina menor que IgG1, com 12 resíduos de aminoácidos e quatro pontes disulfeto na região de dobradiça. A região de dobradiça de IgG2 falta uma glicina, que é relativamente pequena e contém uma dupla hélice rígida de poli-prolinas, ela é estabilizada por uma ponte disulfeto entre as cadeias pesadas, todas estas propriedades restringem o movimento de IgG2 (61). Devido esta rigidez de IgG2, pode ser que ocorra uma ligação não efetiva entre o clone de 7 aminoácidos deste estudo e esta imunoglobulina, não gerando assim resultados diferenciados entre as formas clínicas da hanseníase e entre os grupos de pacientes e controles endêmicos.

A presença de IgG3 contra o clone A9 mimético de LAM apresentou uma resposta semelhante a IgG1, apresentando maiores soropositividades em controles que em pacientes MB.

Os pacientes MB reacionais foram responsivos a IgG1 contra o clone A9, os pertencentes às formas clínicas DD e DV desenvolveram reação tipo 1. Esta alteração imunológica é uma reação tardia semelhante à reação tipo IV de Gell e Combs, que está relacionada ao recrutamento de linfócitos, macrófagos e monócitos, com secreção de citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF (26,62). A molécula de LAM é detectada em biópsias de pele e nervos de pacientes com reação tipo 1 associada a macrófagos (26) e em granulomas de casos MB em reação (63). Recentemente, foi descrito que a quimiocina CXCL10, também

conhecida como proteína indutora de IFN- $\gamma$ , está presente em níveis maiores nas lesões e nos soros de pacientes com reação tipo 1, e que sua molécula é um quimioatraente para células T positivas para CXCR3, encontradas em células T ativadas e NK. Além disto, esta quimiocina se liga a glicosaminoglicanos, que permite sua fixação em células endoteliais (64). Isto reforça a hipótese que pacientes MB reacionais respondem com IgG1 devido a maior produção de IFN- $\gamma$  que ocorre em pacientes que desenvolvem reação tipo 1. Em pacientes T, a citocina IFN- $\gamma$  está presente nas lesões, mas não tem LAM, enquanto que os *boderline* têm LAM e IFN- $\gamma$ , o que gera maior risco para reação tipo 1.

Jadhav e colaboradores demonstraram em um trabalho realizado na Índia, que anticorpos IgG1 e IgG3 contra a molécula ManLAM não apresentam uma correlação com a reação tipo 1 e danos neurais na hanseníase (27). A utilização de uma molécula completa impede que anticorpos se liguem a domínios menores não acessíveis nos ensaios *in vitro*, diferentemente de quando se utiliza pequenos peptídeos, onde permite uma reação mais fácil para a ligação antígeno-anticorpo, apesar de restrita a riqueza de antígenos.

O perfil geral de imunoglobulinas IgG e suas subclasses contra o clone A9 apresentou um aumento de IgG total e IgG2 em pacientes, e em controles endêmicos IgG1 e IgG3 tiveram maiores níveis, o que pode caracterizar uma função protetora contra a infecção de micobacterias.

O clone mimético A9 encontra-se em fusão com a proteína pIII do fago selvagem, e o próximo passo será a síntese do peptídeo para aplica-lo em ensaios sorológicos e em estímulos de PBMCs. Se pudermos confirmar estes dados com o peptídeo sintético, o clone poderá ser testado também em vacinas, verificando o potencial protetor contra a infecção de *M. leprae*. Contudo, nós observamos que peptídeos miméticos gerados por Phage Display podem gerar respostas diferentes da molécula antigênica completa, e que estes peptídeos podem ser marcadores de pacientes PB, auxiliando os profissionais da saúde a acompanharem pacientes MB com maiores riscos de desenvolverem reação tipo 1. Frente a tantos trabalhos que buscam marcadores de reações hansênicas este clone mimético pode ser mais um alvo a ser estudado.

## 5.0 Referências Bibliográficas

- 1-Brennan, P.J. and Nikaido, H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev.Biochem.* 64:29.
- 2- Bersa, G. S. and Chatterjee, D. 1994. Lipids and Carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control* (Bloom, B. R.). ASM Press, 285.
- 3- Ehlers, M. R. and Daffé, M. 1998. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol.* 6:328.
- 4- Brennan, P.J., Hunter, S.W., McNeil, M., Chatterjee, D. and Daffe, M. 1990 Reappraisal of the chemistry of mycobacterial cell walls, with a view to understanding the roles of individual entities in disease processes. In Ayoub,E.M., Cassell,G.H., Branche,W.C.,Jr. and Henry,T.J. (eds.) *Microbial Determinants of Virulence and Host Response*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 55.
- 5- Gaylord, H., Brennan, P. J., Young, D. B. and Buchanan, T. M. 1987. Most *Mycobacterium leprae* carbohydrate-reactive monoclonal antibodies are directed to lipoarabinomannan. *Infect. Immun.* 55:2860.
- 6- Chatterjee, D. and Khoo, K. H. 1998. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology.* 8:113.
- 7- Melián, A., Beckman, E. M., Porcelli, S. A. and Brenner, M. B. 1996. Antigen presentation by CD1 and MHC-encoded class I-like molecules. *Curr Opin Immunol.* 8:82.
- 8- Porcelli, S.A., Segelke, B. W., Sugita, M., Wilson, I. A. and Brenner, M. B. 1998. The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunol Today.* 19:362.
- 9- Barral, D. C. and Brenner, M. B. 2007. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol.* 7:929.
- 10- Porcelli, S. A. 1995. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv Immunol.* 59:1.
- 11-Beckman, E. M., Melián, A., Behar, S. M., Sieling, P. A., Chatterjee, D., Furlong, S. T., Matsumoto, R., Rosat, J. P., Modlin, R. L. and Porcelli, S. A. 1996. CD1c restricts responses of mycobacteria-specific T cells—evidence for antigen presentation by a second member of the human CD1 family. *J. Immunol.*, 157: 2795.

- 12- Kaplan, G., Gandhi, R. R., Weinstein, D. E., Levis, W. R., Patarroyo, M. E., Brennan, P. J. and Cohn, Z. A. 1987. *Mycobacterium leprae* antigen-induced suppression of T cell proliferation *in vitro*. *J. Immunol.* 138:3028.
- 13- Sibley, L. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J. and Krahenbuhl, J. L. 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect. Immun.* 56:1232.
- 14- Chan, J., Fan, X., Hunter, S. W., Brennan, P. J. and Bloom, B. R. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* 59:1755.
- 15- Moreno, C., Mehlert, A. and Lamb, J. 1988. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* 74:206.
- 16- Moreno, C., Taverne, J., Mehlert, A., Bate, C. A. W., Brealey, R. J., Meager, A., Rook, G. A. W. and Playfair, J. H. L. 1989 Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumor necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 76:240.
- 17- Barnes, P. F., Chatterjee, D., Abrams, J. S., Lu, S., Wang, E., Yamamura, M., Brennan, P. J. and Modlin, R. L. 1992. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan: relationship to chemical structure. *J. Immunol.* 149:541.
- 18- Schaible, U. E., K. Hagens, K. Fischer, Collins, H. L. and Kaufmann, S. H. 2000. Intersection of group I CD1 molecules and mycobacteria in different intracellular compartments of dendritic cells. *J. Immunol.* 164:4843.
- 19- Xu, S., Cooper, A., Sturgill-Kosycki, S., van Heyningen T., Chatterjee, D. Orme, I., Allen, P. and Russell, D. G. 1994 Intracellular trafficking in *M. tuberculosis* and *M. avium*-infected macrophages. *J. Immunol.* 153:2568.
- 20- Ghosh, S., Pal, S., Das, S., Dasgupta, S. K., Majumdar, S. 1998. LAM induced cytotoxic effects in human mononuclear cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21:181.
- 21- Rojas, M., Garcia, L. F., Nigou, J., Puzo, G., Olivier, M. 2000 Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis by altering Ca<sup>2+</sup>-dependent cell signaling. *J. Infect. Dis.* 182:240.
- 22- Maiti, D., Bhattacharya, A. and Basu J. 2001 Lipoarabinomannan from *M. tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylation of Bad through PI3 kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* 276:329.
- 23- Sieling, P. A., Chatterjee, D., Porcelli, S. A., Prigozy, T. I., Mazzacaro, R. J., Soriano, T., Bloom, B. R., Brenner, M. B., Kronenberg, M., Brennan, P. J. and

Modlin, R. L. 1995. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycans. *Science*, 269:227.

24- Prigozy, T. I., Sieling, P. A., Clemens, D., Stewart, P. L., Behar, S. M., Porcelli, S. A., Brenner, M. B., Modlin, R. L. and Kronenberg, M. 1997. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity*. 6:187.

25- Spencer, J.; Kim, S., Hee J., Wheat, W. H., Chatterjee, D., Balagon, M. V., Cellona, R. V., Tan, E. V., Gelber, R., Saunderson, P., Duthie, M. S., Reece, S. T., Burman, W., Belknap, R., Mac Kenzie, W. R., Geluk, A., Oskam, L., Dockrell, H. M. and Brennan, P. J. on behalf of the IDEAL Consortium. 2011. Analysis of Antibody Responses to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I, Lipoarabinomannan, and Recombinant Proteins To Define Disease Subtype-Specific Antigenic Profiles in Leprosy. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18:260.

26- Lockwood, D. N., Colston, M. J. and Khanolkar-Young, S. R. 2002. The detection of *Mycobacterium leprae* protein and carbohydrate antigens in skin and nerve from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions. *Am J Trop Med Hyg.* 66:409.

27- Jadhav, R., Suneetha, L., Kamble, R., Shinde, V., Devi, K., et al. 2011. Analysis of Antibody and Cytokine Markers for Leprosy Nerve Damage and Reactions in the INFIR Cohort in India. *PLoS Negl Trop Dis.* 5:977.

28- Beuria, M. K., Mohanty, K. K., Katoch, K. and Sengupta, U. 1999. Determination of circulating IgG subclasses against Lipoarabinomanna in the leprosy spectrum and reactions. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 67:422.

29- Beuria, M. K., Parkash, O., Joshi, B., Mohanty, K. K., Katoch, K. and Sengupta, U. 1998. Levels of IgG Subclasses in Active and Inactive Cases in the Disease Spectrum of Leprosy. *Int Arch Allergy Immunol.* 115:61.

30- Kouzmitcheva, G. A., Petrenko, V. A. and Smith, G. P. 2001. Identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8:150.

31- Cunto-Amesty, G., Luo, P., Monzavi-Karbassi, B., Lees, A., Alexander, J., del Guercio, M. F., Nahm, M. H., Artaud, C., Stanley, J. and Kieber-Emmons, T. 2003. Peptide mimotopes as prototypic templates of broad-spectrum surrogates of carbohydrate antigens. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 49:245.

32- Smith, G. P. and Petrenko, V. A. 1997. Phage Display. *Chem Rev.* 97:391.

- 33- Dybwad, A., Forre, O., Kjeldsen-Kragh, J., Natvig, J. B. and Sioud, M. 1993. Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur J Immunol.* 23:3189.
- 34- Mintz, P. J., Kim, J., Do, K. A., Wang, X., Zinner, R. G., Cristofanilli, M., Arap, M. A., Hong, W. K., Troncoso, P., Logothetis, C. J., Pasqualini, R. and Arap, W. 2003. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol.* 21:57.
- 35- Scala, G., Chen, X., Liu, W., Telles, J. N., Cohen, O. J, Vaccarezza, M., Igarashi, T. and Fauci, A. S. 1999. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J Immunol.* 162:6155.
- 36- Goulart, L. R., Vieira, C. U., Freschi, A. P., Capparelli, F. E., Fujimura, P. T., Almeida, J. F., Ferreira, L. F., Goulart, I. M., Brito-Madurro, A. G. and Madurro, J. M. 2010. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. *Crit Rev Immunol.* 30:201.
- 37- Cunha-Júnior, J. P., Silva, D. A., Silva, N. M., Souza, M. A., Souza, G. R., Prudencio, C. R., Pirovani, C. P., Cezar, M., Cascardo, J., Barbosa, B. F., Goulart, L. R. and Mineo, J. R. 2010. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. *Immunobiology.* 215:26.
- 38- Manhani, M. N., Ribeiro, V. S., Cardoso, R., Ueira-Vieira, C., Goulart, L. R. and Costa-Cruz, J. M. 2011. Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. *Parasite Immunol.* 33:322.
- 39- de Almeida, S. S., Magalhaes, A. A., de Castro Soares, S., Zurita-Turk, M., Goulart, L. R., Miyoshi, A. and Azevedo, V. 2011. Recent Patents of Phage Display Peptide Sequences. *Recent Pat DNA Gene Seq.*
- 40- Ridley, D. S. and Jopling, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. 1966. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 34:255.
- 41- Ridley, D. S. 1990. Skin biopsy in leprosy. *Document Geigy* 3<sup>a</sup> ed. Basle: CIBA-GEIGY, p. 63.
- 42- Jopling, W. H. and Mc Dougall, A.C. 1991. A doença. In: Manual de hanseníase, 4<sup>o</sup> ed, Atheneu .Editora, São Paulo.
- 43- Cho, S. N., Cellona, R. V., Fajardo, T. T., Abalos, R. M., Dela Cruz, E. C., Walsh, G. P., Kim, J. and Brennan, P. J. 1991. Detection of phenolic glycolipid-I



antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. *Int J Leprosy* 59:25.

44- Calado, K. I. S., Vieira, A. G., Durães, S., Sékula, S. B. and Oliveira, M. L. W. 2005. Positividade sorológica antiPGL-I em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 80:301.

45- Shuring, R. P., Moet, F.J., Pahan, D., Richardus, J. H. and Oskam, L. 2006. Association between anti-PGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. *Leprosy Rev* 77:343.

46- Lobato, J., Silva, D. A., Mineo, T. W., Amaral, J. D., Segundo, G. R., Costa-Cruz, J. M., Ferreira, M. S., Borges, A. S. and Mineo, J. R. 2006. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin. Vaccine Immunol* 13:84.

47- Kaur, D., Lowary, T. L., Vissa, V. D., Crick, D. C., Brennan, P. J. 2002. Characterization of the epitope of anti-lipoarabinomannan antibodies as the terminal hexaarabinofuranosyl motif of mycobacterial arabinans. *Microbiology*. 148: 3049.

48- Teixeira, A. C., Cruvinel, D. L., Roma, F. R., Luppino, L. F., Resende, L. H., Sousa, T., Bühner-Sékula, S. and Goulart, I. M. 2008. Evaluation of the agreement between clinical and laboratorial exams in the diagnosis of leprosy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2:48.

49- Fujiueda, S., Sieling, P. A., Modlin, R. L. and Saxon, A. 1998. Immunodeficiency and other clinical immunology: CD1-restricted T-cells influence IgG subclass and IgE production. *J Allergy Clin Immunol* .101:545.

50- Cardona-Castro, N., Beltrán-Alzate, J. C. and Romero-Montoya, M. 2009. Clinical, bacteriological and immunological follow-up of household contacts of leprosy patients from a post-elimination area - Antioquia, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104: 935.

51- Rada, E., Aranzazu, N., Rodríguez, V., Borges, R. and Convit, J. 2010. Serological and cellular reactivity to mycobacterial proteins in Hansen's disease. *Invest Clin*. 51:325.

52- Dhandayuthapani, S., Izumi, S., Anandan, D. and Bhatia, V. N. 1992. Specificity of IgG subclass antibodies in different clinical manifestations of leprosy. *Clin Exp Immunol*. 88:253.

53- Chatterjee, D. 1997. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol*. 1:579.

- 54- Crabtree, G. R. 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science*. 243:355.
- 55- Koster, F. T., Scollard, D. M., Umland, E. T., Fishbein, D. B., Hanly, W. C., Brennan, P. J. and Nelson, K. E. 1987. Cellular and humoral immune response to a phenolic glycolipid antigen (PhenGL-I) in patients with leprosy. *J Clin Microbiol*. 25:551.
- 56- Molloy, A., Gaudernack, G., Levis, W. R., Cohn, Z. A. and Kaplan, G. 1990. Suppression of T-cell proliferation by *Mycobacterium leprae* and its products: the role of lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:973.
- 57- Hussain, R., Kifayet, A. and Chiang, T. J. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. 1995. *Infect Immun*. 63: 410.
- 58-von Gunten, S., Smith, D. F., Cummings, R. D., Riedel, S., Miescher, S., Schaub, A., Hamilton, R. G. and Bochner, B. S. 2009. Intravenous immunoglobulin contains a broad repertoire of anticarbohydrate antibodies that is not restricted to the IgG2 subclass. *J Allergy Clin Immunol*. 123:1268.
- 59- Finkelman, F. D., Katona, I. M., Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. 1988. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol*. 140:1022.
- 60- Hussain, R., Dockrell, H. M. and Chiang, T. J. 1999. Dominant recognition of a cross-reactive B-cell epitope in *Mycobacterium leprae* 10 K antigen by immunoglobulin G1 antibodies across the disease spectrum in leprosy. *Immunology*. 96:620.
- 61- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. 2005. Immunobiology., 6<sup>th</sup>. ed., Garland Publishing, Edinburgh, UK (ISBN 0-8153-4101-6).
- 62- Motta, A. C., Furini, R. B., Simão, J. C., Ferreira, M. A., Komesu, M. C. and Foss, N. T. 2010. The recurrence of leprosy reactional episodes could be associated with oral chronic infections and expression of serum IL-1, TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma and IL-10. *Braz Dent J*. 21:158.
- 63- Verhagen, C. E., van der Pouw Kraan, T. C., Buffing, A. A., Chand, M. A., Faber, W. R., Aarden, L. A. and Das, P. K. 1998. Type 1- and type 2-like lesional skin-derived *Mycobacterium leprae*-responsive T cell clones are characterized by coexpression of IFN-gamma/TNF-alpha and IL-4/IL-5/IL-13, respectively. *J Immunol*. 160:2380.

64- Scollard, D. M., Chaduvula, M. V., Martinez, A., Fowlkes, N., Nath, I., Stryjewska, B. M., Kearney, M. T., and Williams, D. L. Increased CXC ligand 10 levels and gene expression in type 1 leprosy reactions. *Clin Vaccine Immunol.* 18: 947.

***Detecção de IgG e suas  
subclasses contra peptídeos  
miméticos de GroES e GroEL:  
uma nova ferramenta no  
diagnóstico da hanseníase***

## Resumo

As proteínas de *Heat Shock* (HSPs), GroES e GroEL, são alvos de forte resposta de células T humanas, sendo que um terço das células responsivas ao *M. leprae*, reconhecem estas proteínas. Anticorpos monoclonais mAbs CS-01 e CS-44 selecionaram peptídeos miméticos ligantes de suas porções Fab pela técnica de phage display. Soros de 54 pacientes, 48 contatos domiciliares e 27 controles endêmicos foram submetidos ao teste ELISA com os clones miméticos de GroEL e GroES para detecção de IgG e suas subclasses. Utilizando o clone mimético de GroES B2, o ELISA detectou anticorpos IgG presente em soros de pacientes, contatos e controles endêmicos. Elas foram abundantes em soros de pacientes multibacilares, em especial, nos virchowianos (V) com correlação positiva com a carga bacilar. Um declínio de IgG1 foi identificado em pacientes e em contatos domiciliares que vieram a adoecer com hanseníase e um aumento desta subclasse estava presente em soro de contatos domiciliares que não desenvolveram a doença. A imunoglobulina IgG1 contra um peptídeo de GroES também mostrou ser um marcador de indivíduos expostos e saudáveis e IgG3 anti-GroES mostrou ser um fator prognóstico de doença, favorecendo medidas de intervenção para diagnóstico precoce.

Com o clone mimético de GroEL A1, os anticorpos IgG reativos foram abundantes em pacientes multibacilares, com uma correlação com a carga bacilar. Neste estudo observou-se que anticorpos IgG contra GroEL e GroES podem ser detectados para o diagnóstico da hanseníase com testes sorológicos produzidos com os clones miméticos destas proteínas. E as subclasses de IgG contra GroES podem demonstrar um direcionamento de moléculas antigênicas que induzem a produção de anticorpos protetores.

## **Abstract**

Heat Shock Proteins (HSPs), GroES and GroEL, are targets of strong human T-cell response, and a third of the cells responsive to *M. leprae*, recognize these proteins. Monoclonal antibodies mAbs CS-01 and CS-44 selected mimetic peptides that are ligands of their Fab portions, by phage display technique. Sera from 54 patients, 48 household contacts and 27 endemic controls were submitted to ELISA with B2 and A1 mimetic clones of the GroES and GroEL proteins, respectively, for detection of IgG and its subclasses. Using the mimetic clone of B2 GroES, the ELISA detected IgG antibodies present in sera of patients, contacts and endemic controls. The IgG antibodies were abundant in sera from multibacillary patients, especially in lepromatous (LL). A decline of IgG1 was found in patients and household contacts that became sick with leprosy and a raise of this subclass was present in sera of household contacts that did not develop the disease. With the mimetic clone of GroEL A1, the reactive antibodies were abundant in multibacillary patients, with a correlation with the bacillary load. In this study we observed that IgG antibodies against GroEL and GroES can be detected in the diagnosis of leprosy in serological tests produced with clones mimetics of these proteins. And the subclasses of IgG antibodies to GroES can demonstrate a targeting of antigenic molecules that induce the production of protective antibodies.

## 1.0 Introdução

A família das proteínas de heat shock (HSPs) inclui proteínas que se encontram conservadas ao longo da evolução, e participam de processos celulares fundamentais. Os níveis aumentados de expressão destas moléculas sob estresse celular, somada à possibilidade da condição inflamatória alterar o reconhecimento e a apresentação de antígenos, direcionando e amplificando a resposta imune para HSP60, sustentam a participação destas moléculas em processos crônicos degenerativos (1). Membros de HSP60 e HSP70 têm sido identificados como alvos de resposta imune de mamíferos contra micobactérias (2).

Existe uma homologia entre as HSPs de *M. leprae* e de *M. tuberculosis*, porém anticorpos monoclonais contra GroES e clones de células T reconhecem exclusivamente esta proteína de *M. leprae*, indicando que existem sequências que diferenciam as HSPs destas duas micobactérias (3).

Recentemente, as duas HSPs de *M. leprae*, GroEL (ML0317) e GroES (ML0380) demonstraram ser as proteínas mais abundantes de *M. leprae*, chegando a  $2.4 \times 10^{10}$  moléculas (4). A GroES de *M. leprae* é reconhecida por um terço de precursores de células T humanas específicas de *M. leprae* e devido a estas características, este antígeno demonstra ser um adequado candidato para reagentes de diagnóstico para a hanseníase (5).

De 10 ou mais antígenos de *M. leprae* que foram caracterizados e clonados, as HSPs mostraram serem alvos de forte resposta de células T em pacientes com hanseníase do polo tuberculóide ou com doença auto-imune (6). Devido a esta forte indução de respostas de células T em pacientes tuberculóides (5,7) e em contatos saudáveis de pacientes com hanseníase (8), este antígeno tem sido foco de estudo como candidato potencial para vacina.

Altos níveis de anticorpos IgG1 contra GroES foram demonstrados em pacientes com hanseníase, uma resposta associada com a progressão da doença e uma associação negativa com interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), uma citocina produzida em células T, crítica para ativação de macrófagos e morte intracelular de micobactérias (9). Existe diferença na resposta imune de células T e B contra GroES em indivíduos

sadios e em pacientes com hanseníase, sendo que anticorpos IgG1 e IgG3 foram associados com a disseminação da doença e, IgG2 e IgG4 com a limitação da doença (10).

A proteína GroEL, conhecida também como HSP65 ou ML0317, tem a função de chaperonina responsável pelo enovelamento de proteínas, e na modulação da resposta imune inata e adquirida. Dados têm demonstrado que a HSP65 é o principal alvo para a resposta imune de patógenos (6). Esta proteína pode ser um adjuvante natural e interagir com células apresentadoras de antígenos, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias (11).

A similaridade na sequência principal entre as espécies torna a HSP65 um indutor potencial da resposta imune contra moléculas próprias do hospedeiro, levando a um fenômeno auto-imune (12).

Em experimentos com camundongos infectados com HSP recombinantes de *M. leprae* (rHSP65) foram detectados anticorpos anti-HSP65 e na análise das subclasses de IgG, a IgG2a foi detectada e o mesmo não ocorreu com IgG1, caracterizando uma resposta Th1(13).

Neste trabalho, nosso objetivo foi encontrar clones miméticos das proteínas de heat shock (HSPs) de *M. leprae*, GroEL e GroES para verificar sua reatividade frente a pacientes com hanseníase não tratados e avaliar se clones miméticos recombinantes poderiam ser utilizados como antígenos para testes de diagnóstico.



## 2.0- Material e Métodos

### 2.1- Pacientes, Contatos e Controles endêmicos

Amostras de soro de 54 pacientes com hanseníase, virgens de tratamento, atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase/ (CREDESH), do Hospital de Clínicas (HC), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – MG, foram coletadas para realização do presente estudo.

Os pacientes receberam uma classificação operacional, sendo 18 paucibacilares (PB) e 39 multibacilares (MB). De acordo com a classificação clínica espectral de Ridley & Jopling (14), os pacientes foram distribuídos nas seguintes formas clínicas: 10 pacientes da forma tuberculóide (T), 08 da dimorfa-tuberculóide PB (DT-PB), 07 dimorfa-tuberculóide MB (DT-MB), 11 da forma dimorfa-dimorfa (DD), 10 dimorfa-virchowiana (DV) e 11 pacientes com a forma virchowiana (V).

Todos os pacientes foram submetidos a um protocolo clínico-laboratorial para o diagnóstico de hanseníase e classificação clínica do paciente, sendo eles: o histopatológico das biópsias da lesão de pele, a baciloscopia dos esfregaços dérmicos de no mínimo 7 locais, o teste de Mitsuda para análise da resposta imune celular específica ao *M. leprae* e teste ELISA indireto anti-PGL-1 para análise da resposta imune humoral.

A baciloscopia foi realizada para determinar a carga bacilar presente nos esfregaços dérmicos do paciente, que foram retirados dos lóbulos das orelhas (LD e LE), cotovelos (CD e CE), joelhos (JD e JE) e uma das lesões, com resultados descritos como Índice Baciloscópico (IB) de acordo com a Escala Logarítmica de Ridley (15), que varia de IB=0 a IB=6.

O teste de Mitsuda foi avaliado nos pacientes para quantificar a resposta imune celular específica ao *M. leprae*. O antígeno de Mitsuda é uma suspensão de  $6 \times 10^7$  de bacilos de *M. leprae* mortos pelo calor. A leitura do teste é feita após quatro semanas da aplicação intradérmica de 0,1ml do antígeno no antebraço.direito, por meio da medida do diâmetro da induração local em milímetros (mm). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os resultados do teste de Mitsuda são os seguintes: 0-3mm – negativo ou duvidoso; 4-7mm- positivo fraco; 8-10mm- positivo forte e maior que 10- fortemente positivo (16).

O ELISA indireto anti-PGL-1 é um teste sorológico que detecta e quantifica a presença de anticorpos IgM contra a fração glicolípida presente na parede de *M. leprae* e sua positividade correlaciona-se com o espectro clínico e o índice baciloscópico dos pacientes com hanseníase (17-19). O resultado do teste é apresentado em Índice ELISA (IE), considerado positivo quando maior que 1,1 (20).

Amostras de soro de contatos domiciliares também fizeram parte desta pesquisa, sendo que, dos 48 contatos domiciliares, 24 eram contatos que se mantiveram saudáveis e 24 eram contatos que desenvolveram hanseníase durante o monitoramento clínico e laboratorial por 5 anos, feito pela equipe do CREDESH/HC/UFU. Os contatos que adoeceram passaram pelos mesmos testes laboratoriais de diagnóstico de pacientes, no entanto, os soros dos mesmos foram coletados no período do monitoramento, antes do diagnóstico de hanseníase.

Os soros de 27 controles endêmicos foram obtidos de indivíduos saudáveis, maiores de 18 anos de idade e doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia.

A tabela 1 mostra as características clínicas e laboratoriais dos pacientes, contatos domiciliares e controles endêmicos participantes desta pesquisa.

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes de acordo com as formas clínicas da hanseníase, contatos domiciliares e controles endêmicos, segundo a resposta imune celular (Teste de Mitsuda), índice baciloscópico (IB) e resposta imune humoral (Índice ELISA- IE).

Testes	Formas Clínicas (N)					
	T (10)	DT-PB (8)	DT-MB (7)	DD (11)	DV (10)	V (11)
Positividade do Mitsuda (%)	100	100	40	12.50	10	0
Média Mitsuda (mm)	10.00	7.25	2.40	0.25	0.30	0
Positividade da baciloscopia (%)	0	0	57	100	100	100
Média do Índice bacilar (IB)	0	0	0.29	1.41	4.20	5.20
Positividade ELISA PGL-1 (%)	0	12.50	28.60	100	100	100
Média do Índice ELISA PGL-1 (IE)	0.49	0.60	1.71	6.30	6.87	6.89
	Contato doente (N=24)		Contato sadio (N=24)		Controle endêmico (N=27)	
Positividade ELISA PGL-1 (%)	54		4.16		0	
Média do Índice ELISA PGL-1 (IE)	3.18		0.49		0.34	

## 2.2 Anticorpos Monoclonais

Dois anticorpos monoclonais foram utilizados neste trabalho para a seleção de fagos miméticos na técnica de “biopanning”. O anticorpo monoclonal CS-01, que é um anticorpo monoclonal de isotipo IgG3 contra GroES de *M. leprae* (NR-19364) e o CS-44, um anticorpo monoclonal de isotipo IgG2a contra GroEL de *M. leprae*. Eles foram cedidos gentilmente pelo Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia da Universidade do Estado do Colorado, pelos Drs. John Spencer e Patrick Brennan.

## 2.3 Biopanning

Uma biblioteca de Ph.D.-C7C (*NEW ENGLAND Biolabs®<sub>inc</sub>*) de peptídeos randômicos fusionados à proteína pIII de bacteriófagos filamentosos M13. A biblioteca é composta de sequências de sete aminoácidos flanqueados por dois resíduos de cisteína, um de cada lado, seguido por uma curta sequência espaçadora Gly-Gly-Gly fusionada à região N-terminal da pIII. Esta é uma biblioteca de sequências conformacionais, que possui estruturas secundárias devido a posição das cisteínas nas extremidades da sequência dos sete aminoácidos.

Foram utilizadas 5µL ( $1 \times 10^{11}$  partículas virais) da biblioteca Ph.D.-C7C e realizado três ciclos de seleção de fagos ligantes ao anticorpo monoclonal. Em cada um dos ciclos, um poço de uma microplaca de 96 poços (*Maxisorp- Nunc®*) foi previamente adsorvido com anticorpo monoclonal (100µg/mL em 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6) a 4°C por 12-16 horas (*overnight*), a placa foi bloqueada com 300µL de tampão de bloqueio (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,6; 5mg/mL de BSA) por uma hora a 4°C; e lavada seis vezes com TBS-T (TBS contendo 0,1% tween-20). Acrescentou-se, no mesmo orifício da placa, 5µL da biblioteca diluídos em 100µL de TBS-T agitando por uma hora a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos com seis lavagens de TBS-T 0,1% no primeiro ciclo de seleção e nos dois ciclos subsequentes com TBS-T 0,5%. Os fagos ligantes foram retirados por eluição ácida (Glicina-HCl 0,2 M, pH 2,2). Pequenas alíquotas do eluato foram utilizadas para titulação.

O eluato remanescente foi amplificado da seguinte maneira: inicialmente retirou-se a colônia (isolada) de *Escherichia coli* ER2738 previamente crescida em meio LB (0,2g LB em 20 mL de água esterilizada) com tetraciclina, sob agitação a 37°C até a fase *early-log* ( $OD_{600} \sim 0,3$ ) e incubou-se o eluato por 4-5 horas sob forte agitação (250 rpm). A cultura foi submetida à centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Logo após, o sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado e adicionou-se 1/6 de PEG/NaCl (20% de polietilenglicol 8000 e 2,5 M NaCl em solução estéril) incubando-se por 12 a 16 horas a 4°C. Decorrida a precipitação, centrifugou-se a solução a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso em 1 mL de TBS e precipitado novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de polietilenglicol 8000 e 2,5 M NaCl em solução estéril) e incubado durante 1 hora no gelo. Centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C descartando o sobrenadante. O precipitado foi suspenso em 100µL de TBS, 0.02%  $NaN_3$ , obtendo-se então o eluato amplificado, que foi posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

#### **2.4- Titulações**

A titulação é um procedimento necessário para determinar o número de entrada e saída das partículas virais durante os ciclos de seleção.

Os fagos foram submetidos a diluições seriadas de 10 vezes em meio LB. Para eluatos não amplificados foram utilizadas as diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ; e para fagos amplificados a diluição utilizada foi de  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$ . Cada diluição foi acrescida de 200µL da cultura de ER2738 na fase *mid-log* ( $OD_{600} \sim 0,5$ ). Esta mistura foi agitada brevemente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As bactérias infectadas foram transferidas para tubos de cultura contendo 3 mL de agarose Top a 45°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio sólido, com IPTG/Xgal 0.1 mM e tetraciclina. Para cada diluição foi confeccionada uma placa.

As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas e após este período contaram-se as colônias das placas que apresentaram aproximadamente 100 colônias. Multiplicou-se cada número pelo fator de diluição de cada placa para obter o título dos fagos.

## 2.5- Extração de DNA de fagos

Para a extração do DNA dos fagos, colônias isoladas de uma placa oriunda do 3º ciclo de seleção do *Biopanning* foram transferidas para poços de cultura em placa tipo *Deepwell*, contendo 1 mL de meio de cultura de ER2738 em fase *early-log* ( $OD_{600} \sim 0,3$ ); a cada poço foi adicionada apenas uma colônia de fagos. A placa ficou sob forte agitação (250 rpm) por 16 horas a 37°C. Após o crescimento dos fagos, as placas foram centrifugadas a 3700 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma placa estéril e incubada com PEG/NaCl por 10 minutos. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm por 40 minutos a 20°C para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µL de tampão iodeto (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foi adicionado ao precipitado de fagos. As placas passaram por forte agitação e em seguida os DNAs dos fagos foram precipitados com 250µL de etanol absoluto. As placas foram centrifugadas e o precipitado lavado com etanol 70% e recentrifugadas. O precipitado final foi diluído em 20µL de água Milli-Q. A qualidade e quantidade dos DNAs foram verificadas pela corrida eletroforética em gel de agarose 1%, corado com solução de brometo de etídeo.

## 2.6- Sequenciamento

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do primer- 96gIII e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de amplificação foi realizada com 35 ciclos em um Termociclador de placas (MasterCycler - Eppendorf). O DNA a ser sequenciado foi precipitado com 1µL de Acetato de Amônio e Etanol e acrescentados 27,5µL de Etanol absoluto; em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugou-se por 10 minutos, a 4000 rpm. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A leitura do sequenciamento foi realizada em um sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU).

## **2.7- Purificação de fagos**

Fagos selecionados do 3º ciclo de seleção foram amplificados em meio de cultura contendo bactérias ER2738 em fase *early-log* ( $OD_{600} \sim 0,3$ ); por 16 horas, com forte agitação (250 rpm) a 37°C em tubos tipo falcon. Após o crescimento, os tubos foram centrifugados a 4500 rpm por 10 minutos; no sobrenadante, separado das bactérias, foi acrescido 1/6 do volume de PEG/NaCl, e colocado em repouso por 16 horas a 4°C. Os fagos foram precipitados após uma centrifugação de 10000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi diluído em 1 mL de PBS estéril e centrifugado novamente, para retirada de bactérias. O sobrenadante foi colocado em outro tubo limpo e acrescido 1/6 do volume de PEG/NaCl, que ficou em repouso por uma hora em gelo. Logo após, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos e o precipitado de fagos foi diluído em 200 µL de PBS.

## **2.8- ELISA direto para *screening* de fagos ligantes aos anticorpos monoclonais**

Para verificar a reatividade dos fagos selecionados na 3ª seleção do *biopannig* foi realizado um ensaio ELISA. Placas de alta afinidade (Maxsorp - Nunc®) de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais CS-44 ou CS-01 diluído em  $NaHCO_3$  (0,1M, pH 8,6) a 0,25 µg/poço por uma hora a temperatura ambiente. A placa foi lavada por duas vezes com o tampão de lavagem (PBS- T 0,1%). Os poços foram bloqueados com soroalbumina bovina (BSA) 1% em tampão PBS-T 0,1%; esta solução foi adicionada aos poços da placa e armazenada por 16 horas a 4°C. Foram realizadas três lavagens com o tampão de lavagem e o sobrenadante da cultura dos fagos foi adicionado individualmente a cada poço da placa. A placa foi incubada por duas horas a temperatura ambiente e seguida por cinco lavagens. O conjugado anti-M13 peroxidase foi diluído a 1:5000 em PBS-T 0,1% e foi incubado por uma hora a temperatura ambiente. A placa foi revelada com substrato OPD (o-Phenylenediamine) e  $H_2O_2$  0,03% e a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 492 nm após “stop” da reação com  $H_2SO_4$  2N.

## **2.9- ELISA indireto para detecção de IgG utilizando fagos alvos e selvagens**

Placas de alta afinidade (Maxsorp - Nunc®) de 96 poços foram sensibilizadas com os fagos purificado B2 de CS-01 ou A1 de CS-44 e fago selvagem. Todas as placas foram sensibilizadas com o fago alvo e com fago selvagem e todos os soros foram avaliados quanto à reatividade para ambos. A placa foi incubada com os fagos diluídos em PBS em uma concentração de  $1 \times 10^{11}$  por poço por 16 horas a 4°C. Os fagos não ligantes foram retirados por lavagem e 300µL de solução bloqueadora contendo PBS-Molico 5% foi adicionado nos poços e incubado por uma hora a 37°C. A placa foi lavada duas vezes com PBS e soros diluídos em concentração de 1:100 em solução de PBS-Molico 5% + Tween 0,5% e incubados por uma hora a 37°C. Após incubação, a placa passou por três lavagens com PBS + Tween 0,5% e o anticorpo secundário anti-IgG humana marcada com peroxidase (Sigma) diluído a 1:1000 em PBS-Molico 5%+ Tween 0,5% e foi adicionado aos poços da placa e esta foi incubada por uma hora a 37°C. Após três lavagens da placa, esta foi revelada com OPD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 492 nm após “stop” da reação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, baseando-se nos sinais dos controles da reação.

Cada soro foi testado em duplicata tanto para o fago alvo quanto para o fago selvagem e a média da absorbância do fago alvo foi subtraída pela média da absorbância do fago selvagem, resultando na absorbância líquida. Os dados foram apresentados em absorbância (ABS) líquida.

## **2.10- ELISA indireto para detecção de IgG1, IgG2 e IgG3 anti-clones miméticos de GroES e GroEL**

As reações foram realizadas como descrito anteriormente com as seguintes modificações: a solução de bloqueio utilizada foi PBS-BSA 5%; as amostras de soro foram diluídas a 1:20 em PBS- T-BSA 1% para todas as subclasses testadas e incubados por duas horas a 37°C; após lavagem as placas foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado anti-IgG1 ou anti-IgG2 ou anti-IgG3 humana (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:1000 por duas horas a 37°C e, em seguida, com estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:1000 por uma hora a 37°C. As placas foram reveladas com substrato ABTS H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e a

leitura da absorbância foi feita em comprimento de onda de 405 nm. Os dados também foram analisados em absorbância líquida, conforme descrito anteriormente.

### **2.11- Análise estatística**

Para análise estatística, foi utilizado o software GraphPad Prism, v. 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os níveis de anticorpos foram comparados entre os grupos utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Para comparar as diferentes formas clínicas (PB, MB e CE) e (T, DT-PB, DT-MB, DD, DV e V) utilizou o teste Kruskal-Wallis e o Teste de Dunn. Diferenças apresentando valores de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes.

### **2.12- Aspectos Éticos**

Todos os participantes receberam informações verbais sobre o estudo e foram convidados a assinar um termo de consentimento esclarecido. O Comitê de Ética da UFU deu um parecer de aprovação sob o número #499/08.



### 3.0 – Resultados

#### 3.1- Seleção de clones miméticos à proteína GroES e sequenciamento

A técnica de “biopanning” selecionou peptídeos miméticos de sete aminoácidos conformacionais ligantes ao anticorpo monoclonal CS-01 que é um anticorpo anti-GroES (ML0380). Um total de 92 ligantes foram selecionados e triados em teste ELISA para verificar a reatividade dos clones miméticos com o anticorpo CS-01. Todos os 92 clones selecionados apresentaram reatividade na técnica de ELISA de triagem, variando de baixa a alta reatividade, com absorvância (ABS) de 0.146 a 1.005, respectivamente (dados não mostrados).

Três clones de fagos foram obtidos pelo crescimento em meio de cultura, isolados do 3º ciclo de seleção, tiveram seu DNA extraído, sequenciado e traduzido, e as seqüências peptídicas são apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2- Clones válidos anti-GroES obtidos do biopanning, seus motivos proteicos, frequência e reatividade ao CS-01 em teste ELISA de triagem.

Clone	Sequencia	frequência	reatividade ao CS-01(ABS)
B2	<b>TPGYLLH</b>	20/31	0.719
D3	<b>LPGYLLH</b>	04/31	0.732
A8	<b>PGICIH</b>	01/31	1.005
branco	-	-	0.003
selvagem	-	-	0.050

A localização destes 3 clones selecionado pelo “biopanning” na proteína GroES de *M. leprae* tridimensional e a localização do clone B2 foram demonstradas na figura 1, utilizando ferramentas de bioinformática pelo programa *Pepitope View*.

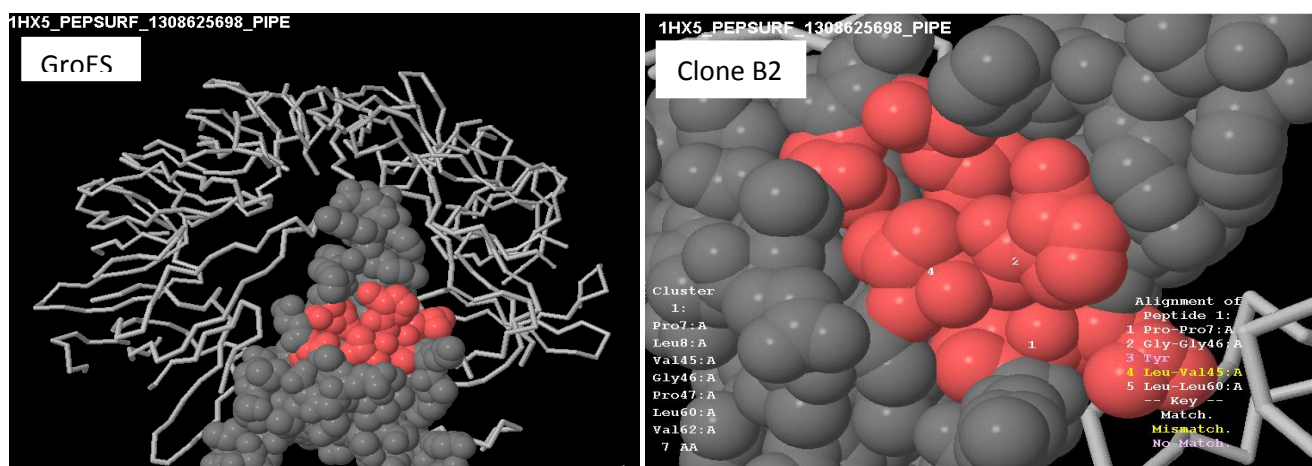


Figura 1- Demonstração tridimensional da proteína GroES com localização dos três clones selecionados por Phage Display. (GroES) e o clone B2 separadamente (clone B2). Obtido pelo programa *Pepitope View*.

### 3.2- ELISA com clone mimético para detecção de anticorpos IgG anti-GroES

O clone mimético B2, por ser o mais frequente na seleção pela técnica do “biopanning”, foi escolhido para as análises de detecção de anticorpos IgG e suas subclasses anti-GroES. O teste ELISA foi padronizado e em todos os experimentos os soros utilizados foram testados com o clone mimético alvo e o fago selvagem. Isto ocorreu devido ao clone mimético estar ligado a PIII do fago e alguns soros reagirem contra esta proteína. Para descartar um falso sinal advindo da ligação cruzada entre anticorpos do paciente e a proteína pIII do fago, todo resultado foi obtido pela subtração da absorbância (ABS) do clone mimético B2 pela ABS do fago selvagem (pIII). Esta diferença foi demonstrada neste estudo como ABS líquida.

Imunoglobulinas G foram detectadas pelo teste ELISA em soros de pacientes com hanseníase e controles endêmicos, mas a sororeatividade de IgG foi significativamente maior em pacientes com hanseníase (Figura 2A). Quando separados os pacientes de acordo com a classificação operacional da hanseníase, observou-se que a maior reatividade de IgG contra o clone mimético B2 de GroES foi no grupo de pacientes MB, que apresentou reatividade maior que o grupo de pacientes PB e controles endêmicos ( $p < 0,05$ ) (Figura 2B).

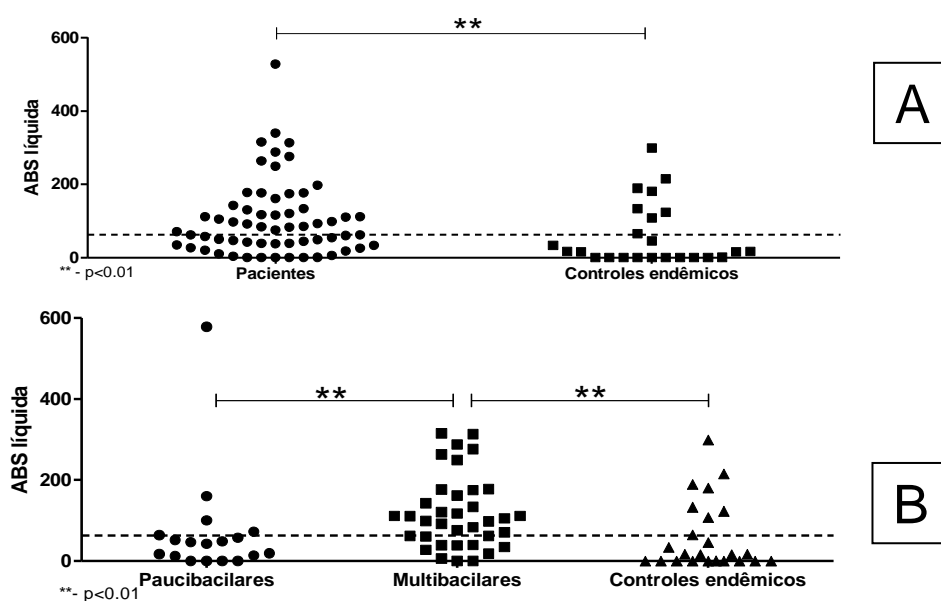


Figura 2- Sororeatividade do anticorpo IgG contra o clone mimético B2 da proteína GroES de *M. leprae*: em pacientes diagnosticados com hanseníase e controles endêmicos (A), e em pacientes com hanseníase de acordo com a classificação operacional (PB e MB) e controles endêmicos (B). A linha pontilhada define o limite da positividade (cut-off).

Quando observado a resposta humoral dos pacientes de acordo com as formas clínicas da hanseníase, em relação a reatividade do clone mimético de GroES, encontra-se diferenças significativas entre as formas no espectro de Ridley & Jopling. Os soros de pacientes da forma clínica V apresentaram maior reatividade de IgG que os de pacientes PB (T e DT-PB). Os pacientes DT-MB, DV e V foram significativamente diferentes da reatividade dos controles endêmicos (CE) (Figura 3).

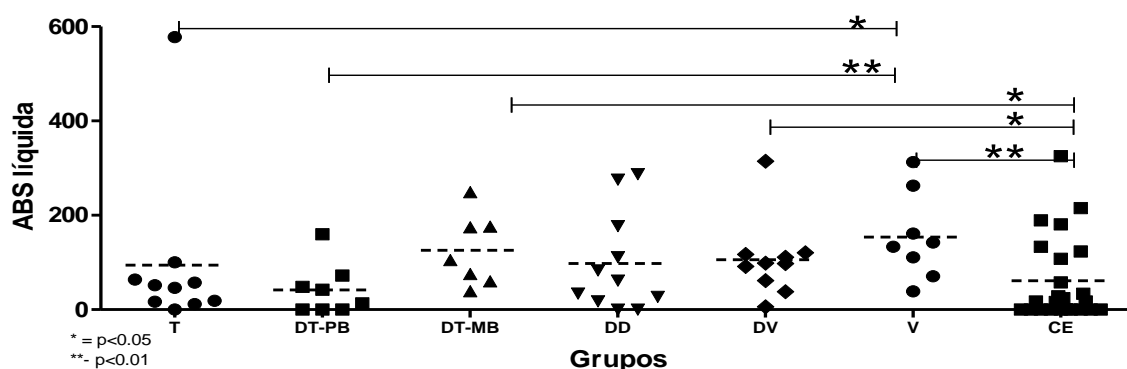


Figura 3- Sororeatividade do anticorpo IgG contra o clone mimético B2 da proteína GroES do *M. leprae* em pacientes diagnosticados com hanseníase de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling e controles endêmicos (CE).

Houve uma correlação positiva entre os níveis de IgG contra o clone mimético de GroES com a carga bacilar (IB) dos pacientes ( $r= 0.3318$ ,  $p<0.05$ ), sendo que quanto maior a carga bacilar, em direção ao pólo V, maiores foram os níveis de anticorpos IgG contra este peptídeo (dados não mostrados).

### 3.3- ELISA com clone mimético para detecção das subclasses de IgG anti-GroES em pacientes diagnosticados com hanseníase

Os anticorpos das subclasses de IgG de soros de pacientes diagnosticados com hanseníase que se ligaram com eficiência ao clone mimético B2 foram detectados em teste ELISA. Nos ensaios de ELISA, observou-se que a subclasses de IgG mais abundante foi IgG2, seguida por IgG3 e IgG1 (Figura 4).

Os pacientes DD foram significativamente mais responsivos na produção de IgG1 contra o clone mimético de GroES ( $p<0.01$ ). Todos os pacientes da forma clínica DD (11/11) tiveram reatividade com IgG1 anti-GroES e, dentre os pacientes das outras formas clínicas, oito (8/46) foram positivos para IgG1, sendo 3 PB (1 T e 2

DT-PB) e 5 MB (3 DT-MB e 2 V) e todos os outros foram negativos para esta subclasse de IgG (Figura 5).

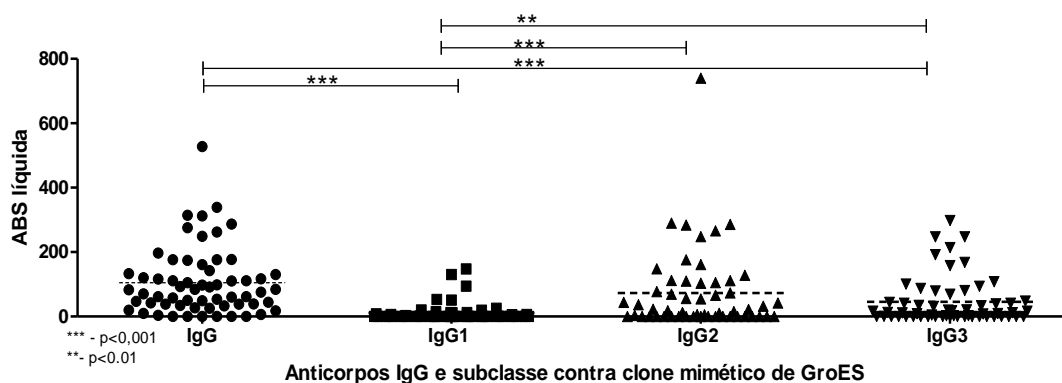


Figura 4- Sororeatividade dos anticorpos IgG e suas subclasses contra o clone mimético B2 da proteína GroES do *M. leprae* em pacientes diagnosticados com hanseníase.

A resposta de IgG2 entre os pacientes T, DD e V foi diferenciada, os pacientes dimorfos, DT-PB, DT-MB e DD, apresentaram maior reatividade para a subclasse IgG2 contra o clone mimético que os pacientes das formas clínicas T, DV e V (dados não mostrados).

A imunoglobulina IgG3 foi a segunda mais abundante das três subclasses analisadas em soro de pacientes com hanseníase (Figura 4) e sua maior produção foi em pacientes T, DD e V uma resposta aparentemente oposta da IgG2 (Figura 5).

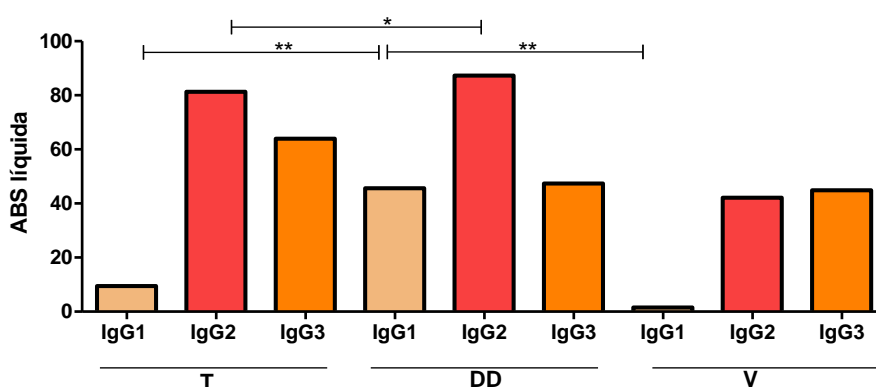


Figura 5- Sororeatividade de IgG1, IgG2 e IgG3 contra fago mimético B2 da proteína GroES de *M. leprae* nas formas clínicas T, DD e V da Hanseníase.\*-  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ .

A forma clínica DD foi a que apresentou maiores níveis de anticorpos das subclasses de IgG, principalmente IgG1 e IgG2 ( $p < 0.01$ ). A presença de IgG1 em

pacientes DD foi significativamente maior ( $p < 0.001$ ) quando comparado à forma clínica T e V, a despeito de que nessa última, houve discreta reatividade. Para a IgG2, soros de pacientes DD também mostraram significativamente maior reatividade que em pacientes T ( $p < 0.05$ ) (Figura 5).

### 3.4- ELISA com clone mimético para detecção das subclasses de IgG anti-GroES em contatos domiciliares e indivíduos saudáveis

Dois grupos de contatos domiciliares foram analisados, um grupo continha contatos sadios, que foram monitorados anualmente e não apresentaram nenhum sinal clínico ou exame laboratorial que pudesse sugerir infecção por *M. leprae*; e o segundo grupo consistiu de contatos que adoeceram durante o seguimento por 5 anos.

Quando comparado os dois grupos de contatos domiciliares, observou-se diferenças em resposta ao antígeno GroES, um aumento dos níveis de IgG total anti-GroES nos contatos que adoeceram e um aumento de IgG3 em relação a IgG1 neste mesmo grupo (Figura 6). Ocorreu uma semelhança nas respostas de pacientes e de contatos que desenvolveram a doença, o que era esperado, visto que todos passaram a serem casos de hanseníase.

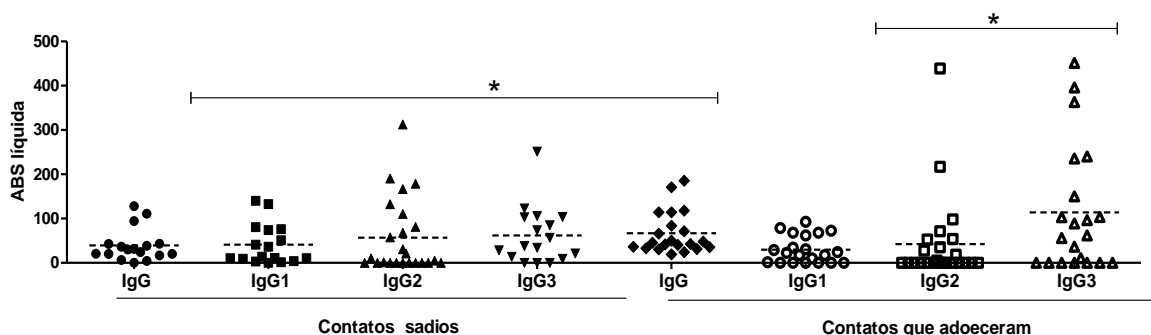


Figura 6- Sororeatividade de IgG total, IgG1, IgG2 e IgG3 ao fago mimético B2 da proteína GroES em contatos domiciliares sadios e contatos que adoeceram de hanseníase. \* -  $p < 0.05$

Como os contatos domiciliares possuem uma exposição e pressão maior de carga bacilar que o controle endêmico, foram comparados as respostas de IgG e suas subclasses para verificar se a resposta gerada pelos contatos sadios era semelhante à dos controles endêmicos (Figura 7).

Interessantemente, foi observado que existem diferenças entre estas respostas, sendo que os contatos sadios produziram maiores níveis de anticorpos IgG1 que os controles endêmicos (Figura 7), uma resposta oposta aos contatos que adoeceram, que apresentaram uma resposta de IgG1 diminuídos (Figura 6).

Além disto, entre todas as proporções das subclasses de IgG dentro destes dois grupos estudados, somente a proporção IgG1/IgG3 foi significativa ( $P < 0.05$ ), apresentando as proporções de 1,29 e 0,19 para o grupo de contatos sadios e de contatos doentes, respectivamente, reforçando o efeito protetor da IgG1.

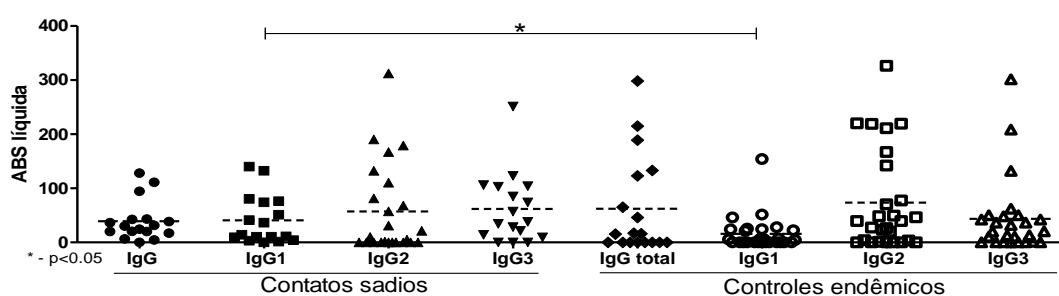


Figura 7- Sororeatividade de IgG total, IgG1, IgG2 e IgG3 ao fago mimético B2 da proteína GroES de contatos domiciliares sadios e controles endêmicos.

Os níveis de IgG total e das subclasses IgG2 e IgG3 não diferenciaram entre contatos sadios e controles endêmicos (Figura 7).

### 3.5- Seleção de clones miméticos à proteína GroEL e sequenciamento

Para a seleção da técnica de “biopanning com a proteína GroEL, foi utilizado um anticorpo monoclonal CS-44 anti-GroEL, produzido em camundongos e com isotipo IgG2a. Selecionou-se 92 clones miméticos de GroEL e ligantes ao CS-44. Destes, três clones foram selecionados e suas sequências de aminoácidos foram analisadas no *Blast* e alinhadas com a proteína de heat shock de *M. leprae* (Tabela 3).

TABELA 3- Clones obtidos do “biopanning” de GroEL, suas sequências de aminoácidos, sua reatividade ao CS-44 em teste ELISA e o potencial alvo de acordo com o *Blast*

Clone	Sequencia	reatividade CS-44	potencial alvo gene bank
A1	HAGETLQ	0.516	YP- 00203748-1
A3	LDMGDLQ	0.916	
B3	WWGDTLQ	0.749	NP 302608.1
selvagem	-	0.092	
Branco	-	0.051	

Os três clones foram localizados na proteína GroEL tridimensional, sendo que A1, A3 e B3 estavam em diferentes sítios da proteína (Figura 8).

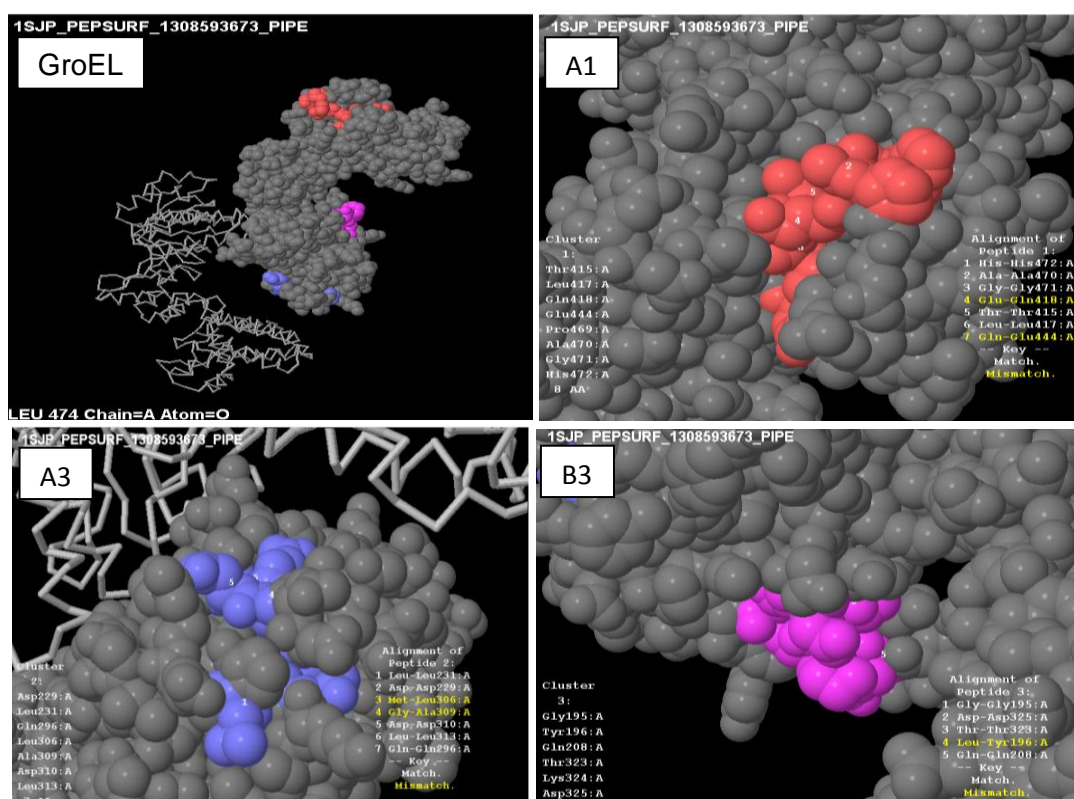


Figura 8- Estrutura tridimensional de GroEL de *M. leprae* e os três clones selecionados pela técnica de Phage Display (A1, A3 e B3). Obtido pelo programa *Peptide View*.

### 3.6- ELISA com clone mimético para detecção de anticorpos IgG anti-GroEL

O teste ELISA utilizando o clone mimético A1 de GroEL foi capaz de diferenciar soros de pacientes e de controles endêmicos ( $p < 0.001$ ) (Figura 9A), e este mesmo clone diferenciou os pacientes quanto à sua classificação operacional, sendo que o grupo de controles endêmicos foi significativamente menos reativo que o grupo de pacientes PB ( $p < 0.01$ ) e MB ( $p < 0.001$ ). Entre os dois grupos de pacientes PB e MB também ocorreram diferenças na produção de anticorpos contra o clone mimético A1 de GroEL (Figura 9B).

A maior reatividade entre os pacientes foi observada nos MB, seguida pelos PB. Alguns indivíduos controles (11/27), 41% também foram reativos para este teste. Estes mesmos resultados foram separados de acordo com a classificação clínica de Ridley & Jopling (Figura 9).

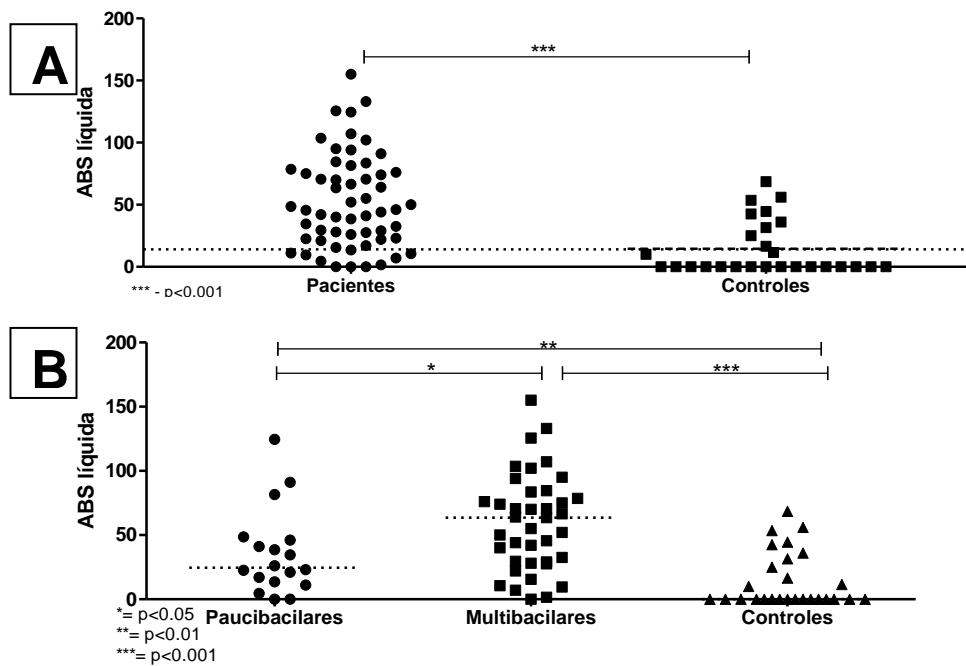


Figura 9- Sororeatividade do anticorpo IgG contra o clone mimético A1 da proteína GroEL do *M. leprae*: em pacientes diagnosticados com hanseníase e controles endêmicos (A), em pacientes com hanseníase de acordo com a classificação operacional e controles endêmicos (B). A linha contínua determina a média (A) e a mediana de cada grupo(B).

Pacientes de todas as formas clínicas produziram mais anticorpos ligantes ao clone mimético A1 de GroEL que os controles endêmicos, exceto a forma clínica T. Entre os pacientes, os da forma T produziram menores quantidades de anticorpos ligantes ao clone mimético A1 que os pacientes das formas clínicas DT-MB, DV e V ( $p < 0.05$ ) e semelhantes à reatividade das formas DT-PB e DD.

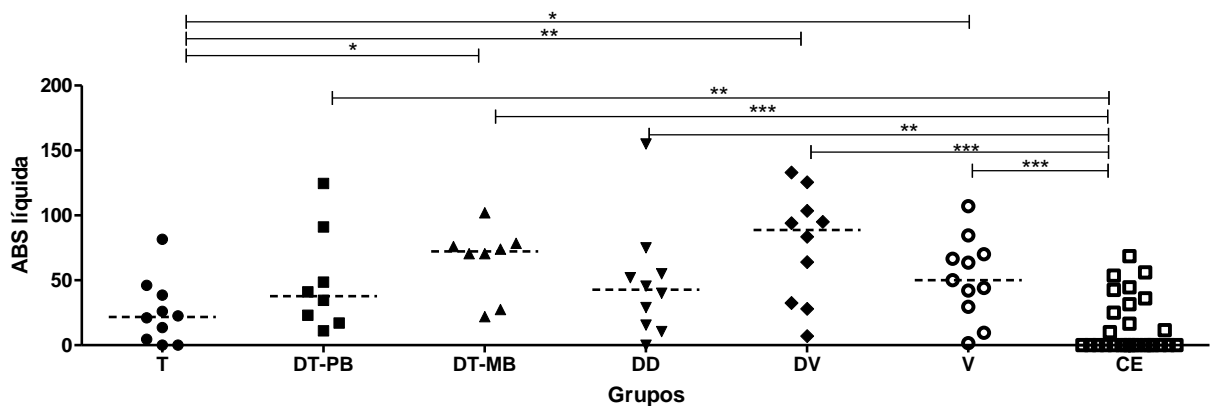


Figura 10- Sororeatividade contra fago mimético a proteína GroEL do *M. leprae* de acordo com as formas clínicas da Hanseníase. A linha contínua determina a mediana de cada grupo.



Foi calculado o cut-off para este teste e uma positividade de 81% (foi detectada nos pacientes com hanseníase). Os pacientes PB apresentaram 66% (12/18) de positividade, sendo que entre os pacientes T, 60% (6/10) foram positivos. Em soros de pacientes MB 66% foram positivos (26/39) e 30% (9/27) nos soros de controles endêmicos.

Este teste ELISA IgG anti-GroEL apresentou uma sensibilidade de 81%, especificidade de 67% e acurácia de 76%.

Foi observada uma correlação entre a carga bacilar e os anticorpos IgG anti GroEL ( $r=0.3091$ ,  $p<0.05$ ), semelhante à correlação encontrada para anticorpos anti- GroES.

Não houve diferença entre a presença de anticorpos das subclasses de IgG contra o clone mimético entre pacientes e controles endêmicos.

#### 4.0 Discussão

O tratamento com a PQT tem reduzido a prevalência da hanseníase em aproximadamente 90% desde 1992, porém a detecção de casos novos tem apresentado uma redução lenta, ainda se mantendo em patamares altos, chegando a 244.796 casos novos em 2009 (21). Isto demonstra claramente que a implantação da PQT não impediu de forma drástica a transmissão da doença em áreas endêmicas. As lacunas do conhecimento sobre a transmissão da doença e a falta de ferramentas adequadas para a detecção de indivíduos expostos e infectados, de prognóstico de adoecimento e de diagnóstico precoce, impedem que a doença seja efetivamente controlada (22).

Nesta era da genômica e proteômica diversos antígenos têm sido caracterizados e o perfil da resposta imune desenvolvida frente a eles em pacientes tem sido descrita, porém poucos marcadores que auxiliem neste diagnóstico precoce foram descobertos.

A utilização de bibliotecas de fagos com anticorpos monoclonais para triagem de fagos alvo, seguido pela clonagem e o sequenciamento de genes, tem sido recomendada recentemente na literatura, como forma de conhecer a resposta imune à antígenos na hanseníase (4). Nessa presente investigação foram utilizados epítomos das proteínas GroEs e GroEL que foram descritas como imunogênicas, com epítomos para células B e T do sistema imune e estão entre as proteínas mais abundantes do *M. leprae* (23,10,4).

A ferramenta de phage display possibilitou obter clones miméticos de GroES e GroEL e conhecer a resposta imune humoral contra uma pequena fração destas proteínas, que são miméticos aos peptídeos apresentados a células T por fagócitos infectados pelo *M. leprae*. Com estes clones foi observado a produção de IgG e suas subclasses.

Os pacientes com hanseníase apresentaram um maior nível de anticorpos IgG anti-GroES, com uma correlação positiva com a carga bacilar. Este resultado se assemelha aos marcadores sorológicos já descritos na literatura, como PGL-1, LAM, Ag85, LID, dentre outros (24-28). O mesmo ocorreu utilizando o clone mimético de GroEL: nos soros de pacientes foram detectados anticorpos IgG contra este clone e o aumento dos níveis desta imunoglobulina se correlacionou

com o aumento da carga bacilar em direção ao pólo V da doença. Esses resultados demonstraram que neste estudo com fagos miméticos, a ligação antígeno-anticorpo ocorreu de forma efetiva e específica.

Os pacientes tuberculóides (T) geralmente apresentam menor reatividade aos antígenos correlacionados com a carga bacilar, mas no presente estudo, os soros destes pacientes reconheceram os epítomos, tanto de GroES, como de GroEL.

A proteína GroES tem sido identificada como principal antígeno de células T e seus determinantes, tornando-a candidata a reagente para imunodiagnóstico de hanseníase (3). A resposta de células T em pacientes com hanseníase na forma tuberculóide pode ser mediada pela habilidade de HLA-DRB5\*0101 se ligar a peptídeos imunodominantes de GroES (7). E estes peptídeos podem ser utilizados em testes sorológicos ou testes cutâneos, para o diagnóstico de pacientes T (3), pois um terço das células T que respondem ao *M. leprae*, também respondem a proteína GroES nestes pacientes (29). Apesar deste achado, têm sido demonstrado que proteínas recombinantes ML0380 (GroES) podem não apresentar reatividade em pacientes T (27). Essa diferença com os resultados encontrados no presente estudo pode ser explicada pelos diferentes métodos e epítomos utilizados nos ensaios.

Em relação às subclasses de IgG, dados importantes com o clone mimético de GroES foram encontrados, enquanto que o clone mimético de GroEL não apresentou diferenças entre as subclasses de IgG nos soros de pacientes e controles, tendo sua maior importância na detecção dos anticorpos IgG anti-GroEL.

Utilizando o clone mimético de GroES observou-se que existem anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 que se ligam neste clone, e que a maior detecção nos soros dos pacientes ocorreu com a IgG2, seguida pela IgG3 e por último, com a IgG1. Tem sido demonstrado que o isotipo IgG1, tanto para antígenos protéicos como para antígenos polissacarídeos são predominantes no padrão de resposta Th1, como foi observado em outro estudo em hanseníase nas formas clínicas T e do grupo *borderline*; e que o *switch* para IgG2 acontece quando o padrão de resposta é dirigido para citocinas Th2, como ocorre na forma lepromatosa (30). No presente estudo, as amostras de pacientes MB foram o dobro das amostras de pacientes

PB, o que poderia justificar o aumento da detecção de IgG2 nos pacientes e uma diminuição de IgG1 em relação aos controles endêmicos. O aumento de IgG3 e de IgG1 geralmente estão associados a resposta contra antígenos protéicos. Nesta pesquisa com o clone mimético de GroES, que é uma proteína, as dosagens de IgG1 foram baixas, porém os níveis de IgG3 foram aumentadas nos doentes. O aumento da resposta humoral observada em pacientes do pólo lepromatoso são essencialmente relacionadas a anticorpos anti-proteínas nas formas lepromatosas (30).

Subclasses específicas de IgG podem estar associadas com o processo individual de cada doença, respondendo de modo diferenciado (31). O estímulo de *switch* para IgG3 e IgG1 pode ocorrer devido a presença de IL-10 e IFN- $\gamma$ , que são fatores de *switch* (32,33). Pelos dados obtidos, o *switch* para IgG3 ocorreu, porém o de IgG1 não ocorreu na maioria dos pacientes. O *switch* de IgG3 para IgG1 pode ocorrer devido a presença de IFN- $\gamma$  (10), e pode ser este o componente alvo que impede a produção de IgG1 contra epítomos de GroES em pacientes, visto que a maioria dos pacientes são MB e possuem déficit da resposta imune celular. Além dos fatores de *switch* relacionados ao padrão de citocinas, outros fatores, tais como a natureza dos antígenos pode influenciar a produção de isotipos de anticorpos. Apesar dessa premissa, estudos com foco na distribuição de anticorpos de isotipos de IgG a diferentes antígenos micobacterianos reportaram resultados contraditórios. Em formas disseminadas de hanseníase, (34) encontraram anticorpos principalmente dos isotipos IgG1 e IgG3 contra sonicação de *M. leprae*, enquanto que, de acordo com (35), a IgG2 foi predominante contra antígenos sonicados e LAM nesse pólo da doença.

Neste estudo, a reatividade de IgG2 apesar de ser a mais abundante, não apresentou diferenças em soros de pacientes e controles endêmicos como também entre contatos sadios e doentes. A produção de IgG2 ocorre em resposta a antígenos carboidratos e podem ter sido produzidas em resposta à interação de células T com peptídeos de GroES do *M. leprae*, tanto de pacientes como de contatos capazes de produzir tal resposta após terem sido expostos ao bacilo (10). A ausência de diferença entre pacientes para a IgG2 pode ser devido a ausência de porções de carboidratos neste peptídeo mimético. A ligação entre

antígeno e anticorpo ocorre, mas com uma ligação mais fraca, não diferenciando entre controles e pacientes.

Na detecção de IgG1 contra o clone mimético de GroES, o grupo que apresentou uma maior reatividade foram os da forma DD, sendo que todos estes pacientes foram reativos, enquanto que nas outras formas clínicas ocorreram baixas reatividades entre IgG1 e o clone mimético.

Os pacientes da forma DD apresentaram um aumento de IgG1, também presente em menor proporção em pacientes T e rara em pacientes V. Isto sugere que a IgG1 contra GroES na forma DD sofreu ação das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , predominantes nessa forma clínica de extrema instabilidade imunológica, em constantes reações inflamatórias do tipo 1, levando a uma resposta Th1, com grande necrose tecidual e neural, influenciando um *switch* de classe com predomínio de IgG1, que em menor proporção também aparece com reatividade na forma T polar, sem reação hansênica.

Quando observado os níveis das subclasses nos contatos que adoeceram e sadios, observamos que o mesmo declínio de IgG1 e o aumento de IgG3 contra o clone mimético de GroES ocorreram nos contatos que desenvolveram hanseníase, semelhante a resposta encontrada nos pacientes. Como os soros desses contatos que adoeceram foram coletados previamente ao aparecimento da doença, podemos supor que durante o seguimento dos mesmos, este exame para detectar IgG3 anti-GroES poderia ser um fator prognóstico de doença, favorecendo medidas de intervenção para diagnóstico precoce.

Como os contatos domiciliares, são pessoas que convivem junto com o doente por no mínimo cinco anos, estes indivíduos estão sob uma maior pressão da carga bacilar que os controles endêmicos e, devido a isto, nós comparamos os níveis de anticorpos das subclasses de IgG, para verificar se eram diferentes entre estes dois grupos. E realmente um destes marcadores diferenciou entre estes dois grupos, os níveis de IgG1 em contatos sadios foram maiores que os níveis de IgG1 de controles endêmicos. Isto pode demonstrar que a imunoglobulina IgG1 quando produzida em resposta a uma infecção com o bacilo da hanseníase, pode proteger o indivíduo, pois notamos que os contatos doentes que estão expostos de maneira semelhante aos sadios e que não produziram

maiores níveis de IgG1 ficaram doentes. E os controles endêmicos podem estar apresentando menores níveis de IgG1 devido a uma menor exposição ao bacilo, quando comparado aos contatos saudáveis.

Uma das principais funções de IgG1 é a opsonização, sendo este processo uma marcação de células infectadas ou bacilos extracelulares que sinalizam para macrófagos ou outros fagócitos que devem digerir o alvo, o que pode facilitar a morte do bacilo de *M. leprae*.

Muitos trabalhos que detectaram as subclasses de IgG em soros de pacientes com hanseníase utilizaram como antígeno no teste ELISA o sonificado de *M. leprae*, e encontraram um aumento de IgG1 e IgG3, relacionado com a carga bacilar e com a progressão da doença (34). Em outro estudo, utilizando a proteína GroES total, detectou-se um aumento nos níveis de IgG1, e também foi associado com a progressão da doença (9). Nosso estudo utilizando apenas um pequeno fragmento desta proteína verificou que para este clone mimético a resposta imune produzida é diferenciada, apresentando um aumento nos níveis de IgG1 em contatos saudáveis e uma diminuição em pacientes e contatos que vieram a adoecer. A proteína GroES do *M. leprae* tem induzido forte resposta de células T em contatos saudáveis de pacientes com hanseníase (8,10).

Neste trabalho a imunoglobulina IgG1 contra um peptídeo de GroES também mostrou ser um marcador de indivíduos expostos e saudáveis, o que afirma, juntamente com outros estudos, que GroES é um potente candidato a vacinas para a hanseníase (8,10,36). No entanto, alguns peptídeos desta proteína tem induzido uma forte resposta de IgG1 associada negativamente com IFN- $\gamma$ , o que demonstra que a natureza qualitativa de IgG1 contra a proteína GroES varia conforme os peptídeos testados desta proteína. A caracterização de epítomos portanto, se faz necessária para desenvolvimento de uma vacina, para uma indução de uma forte resposta protetora.

Neste estudo nós observamos que os anticorpos IgG contra a proteína GroES e GroEL contribuem para gerar uma resposta imune contra o *M. leprae*, porém sua função ainda não é clara, dentre as funções que elas podem desempenhar estão: ligar ao complemento, neutralizar antígenos ou opsonizar o bacilo para seu "clearance" e ainda pode ser uma ferramenta no diagnóstico sorológico da

hanseníase, tanto para paucibacilares como multibacilares. Este teste apresentou alta sensibilidade, especificidade e acurácia, sendo mais sensível que a baciloscopia, que é o teste padrão da hanseníase. A baciloscopia do esfregaço dérmico para hanseníase apresenta aproximadamente 50% de sensibilidade (37), o que demonstra que este clone mimético utilizado sozinho como reagente de testes sorológicos é capaz de identificar mais pacientes com hanseníase, e de uma maneira menos invasiva.

As subclasses de IgG evidenciam a interação de antígenos e anticorpos na hanseníase e sugerem que a exposição de alguns motivos proteicos derivados das proteínas GroES são reconhecidos pela subclasse IgG1 e estão associados com uma resposta protetora em indivíduos expostos e saudáveis.

O aumento da concentração total de IgG no soro de doentes de hanseníase sugere que o efeito dessa micobacteriose não é restrita à produção específica de anticorpos, mas também envolve uma estimulação policlonal não específica de célula B, com maior proporção nas formas V e em menor proporção nas formas do pólo T. Fatores relacionados ao espectro clínico e imunológico da doença pode influenciar a resposta de anticorpos de subclasses de IgG, que não podem ser explicados somente pelo perfil de citocinas Th1 e Th2 e nem apenas pela natureza bioquímica dos antígenos. Essa resposta humoral pode resultar de mecanismos desconhecidos mais ou menos independentes de eventos celulares nas lesões de hanseníase.

A descoberta de novos componentes efetivos do sistema imune poderá explicar parcialmente esse processo da resposta à infecção por *M. leprae* em hospedeiros humanos.

O próximo passo deste estudo é a construção de peptídeos sintéticos para o desenvolvimento de testes sorológicos mais simples e com menor possibilidade de reatividade cruzada com as proteínas expressas em M13.

O entendimento da resposta imune produzida frente a estes epítomos das proteínas GroES e GroEL será investigado por meio de ensaios de estimulação *in vitro* de PBMCs de pacientes em suas diferentes formas clínicas e seus contatos domiciliares, dosando-se um painel de citocinas produzidas, e por fim por meio de ensaios *in vivo* em camundongos e/ou tatus desafiados com os peptídeos

recombinantes, como forma de determinar o potencial vacinal contra o bacilo do *M. leprae* em indivíduos expostos.



## Referencias bibliográficas

- 1- Marengo, E. B. and Sant'Ana, A. O. 2009. HSP60 and autoimmunity: as racing a broken mirror. *ConScientiae*. 8:451.
- 2- Young, R.A. 1990. Stress proteins and immunology. *Ann. Rev.Immunol.* 8:401.
- 3- Chua-Intra, B., Ivanyi, J., Hills, A., Thole, J., Moreno, C. and Vordermeier, H. M.1998. Predominant recognition of species-specific determinants of the GroES homologues from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*. *Immunology*. 93:64.
- 4- Wiker, H. G., Tomazella, G. G. and de Souza, G. A. 2011. A quantitative view on *Mycobacterium leprae* antigens by proteomics. *J Proteomics*. doi:10.1016/j.jprot.2011.01.004.
- 5- Mehra, V., Bloom, B. R., Bajardi, A. C., Grisso, C. L., Sieling, P. A., Alland, D., Convit, J., Fan, X. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J., et al. 1992. A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10-kD heat-shock cognate protein. *J Exp Med*.175:275.
- 6- Young, D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D. and Young, R. A. 1988. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:4267.
- 7- Kim, J., Sette, A., Rodda, S., Southwood, S., Sieling, P. A., Mehra, V., Ohmen, J. D., Oliveros, J., Appella, E., Higashimoto, Y., Rea, T. H., Bloom, B. R. and Modlin, R. L. 1997. Determinants of T cell reactivity to the *Mycobacterium leprae* GroES homologue. *J Immunol*. 159:335.
- 8- Launois, P., N'Diaye, M. N., Cartel, J. L., Mane, I., Drowart, A., Van Vooren, J. P., Sarthou, J. L. and Huygen, K. 1995. Fibronectin-binding antigen 85 and the 10-kilodalton GroES-related heat shock protein are the predominant TH-1 response inducers in leprosy contacts. *Infect Immun*. 63:88.
- 9- Hussain, R., Dockrell, H. M. and Chiang TJ. 1999. Dominant recognition of a cross-reactive B-cell epitope in *Mycobacterium leprae* 10 K antigen by immunoglobulin G1 antibodies across the disease spectrum in leprosy. *Immunology*. 96:620.
- 10- Hussain, R., Shahid, F., Zafar, S., Dojki, M. and Dockrell, H. M. 2004. Immune profiling of leprosy and tuberculosis patients to 15-mer peptides of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* GroES in a BCG vaccinated area: implications for development of vaccine and diagnostic reagents. *Immunology*. 111:462.

- 11- Peetermans, W. E., Raats, C. J., Langermans, J. A. and van Furth, R. 1994. Mycobacterial heat-shock protein 65 induces proinflammatory cytokines but does not activate human mononuclear phagocytes. *Scand J Immunol.* 39:613.
- 12- Cohen IR. 1991. T-cell vaccination in immunological disease. *J Intern Med.* 230:471.
- 13- Marengo E. B., de Moraes, L. V., Faria, M., Fernandes, B. L., Carvalho, L. V., Tambourgi, D. V., Rizzo, L. V., Portaro, F. C., Camargo, A. C. and Sant'anna, O. A. 2008. Administration of *M. leprae* Hsp65 interferes with the murine lupus progression. *PLoS One.* 3:3025.
- 14- Ridley, D. S. and Jopling, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. 1966. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 34:255.
- 15- Ridley, D. S. 1990. Skin biopsy in leprosy. *Document Geigy* 3<sup>a</sup> ed. Basle: CIBA-GEIGY, p. 63.
- 16- Jopling, W. H. and Mc Dougall, A.C. 1991. A doença. In: Manual de hanseníase, 4<sup>o</sup> ed, Atheneu .Editora, São Paulo.
- 17- Cho, S. N., Cellona, R. V., Fajardo, T. T., Abalos, R. M., Dela Cruz, E. C., Walsh, G. P., Kim, J. and Brennan, P. J. 1991. Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. *Int J Leprosy* 59:25.
- 18- Calado, K. I. S., Vieira, A. G., Durães, S., Sékula, S. B. and Oliveira, M. L. W. 2005. Positividade sorológica antiPGL-I em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 80:301.
- 19- Shuring, R. P., Moet, F.J., Pahan, D., Richardus, J. H. and Oskam, L. 2006. Association between anti-PGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. *Leprosy Rev* 77:343.
- 20- Lobato, J., Silva, D. A., Mineo, T. W., Amaral, J. D., Segundo, G. R., Costa-Cruz, J. M., Ferreira, M. S., Borges, A. S. and Mineo, J. R. 2006. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin. Vaccine Immunol* 13:84.
- 21- 1- World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record.* 2010. 85:337.
- 22- Goulart, I. M., Goulart, L. R. 2008. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res.* 300:269.

- 23- Hunter, S. W., Rivoire, B., Mehra, V., Bloom, B. R. and Brennan, P. J. 1990. The major native proteins of the leprosy bacillus. *J Biol Chem.* 265:14065.
- 24- Levis, W. R., Meeker, H. C., Schuller-Levis, G., Sersen, E. and Schwerer, B. 1986. IgM and IgG antibodies to phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* in leprosy: insight into patient monitoring, erythema nodosum leprosum, and bacillary persistence. *J Invest Dermatol.* 86:529.
- 25- Roche, P. W., Britton, W. J., Failbus, S. S., Williams, D., Pradhan, H. M. and Theuvenet, W. J. 1990. Operational value of serological measurements in multibacillary leprosy patients: clinical and bacteriological correlates of antibody responses. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 58:480.
- 26- Lyon, S., Lyon, A. C., Da Silva, R. C., Grossi, M. A., Lyon, S. H., Bühner-Sékula, S. and Rocha, M. O. 2008. A comparison of ML Flow serology and slit skin smears to assess the bacterial load in newly diagnosed leprosy patients in Brazil. *Lepr Rev.* 79:162.
- 27- Spencer, J.; Kim, S., Hee J., Wheat, W. H., Chatterjee, D., Balagon, M. V., Cellona, R. V., Tan, E. V., Gelber, R., Saunderson, P., Duthie, M. S., Reece, S. T., Burman, W., Belknap, R., Mac Kenzie, W. R., Geluk, A., Oskam, L., Dockrell, H. M. and Brennan, P. J. on behalf of the IDEAL Consortium. 2011. Analysis of Antibody Responses to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I, Lipoarabinomannan, and Recombinant Proteins To Define Disease Subtype-Specific Antigenic Profiles in Leprosy. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18:260.
- 28- Duthie, M. S., Hay, M. N., Rada, E. M., Convit, J., Ito, L., Oyafuso, L. K., Manini, M. I., Goulart, I. M., Lobato, J., Goulart, L. R., Carter, D. and Reed SG. 2011. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 DOI: 10.1007/s10096-011-1221-2.
- 29- Mehra, V., Bloom, B. R., Bajardi, A. C., Grisso, C. L., Sieling, P. A., Alland, D., Convit, J., Fan, X. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J., et al. 1992. A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10-kD heat-shock cognate protein. *J Exp Med.* 175:275.
- 30- Sousa, A. O., Henry, S., Marója, F. M., Lee, F. K., Brum, L., Singh, M., Lagrange, P. H. and Aucouturier, P. 1998. IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol.* 111:48.
- 31- Schroeder, H. W. Jr. and Cavacini, L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 125: 41.

- 32- Fujieda, S., Saxon, A. and Zhang, K. 1996. Direct evidence that gamma 1 and gamma 3 switching in human B cells is interleukin-10 dependent. *Mol Immunol.* 33:1335.
- 33- Bendtzen, K. 2004. Natural and therapy-induced antibodies to cytokines. *Drug Discov Today.* 9:259.
- 34- Hussain, R., Dawood, G., Abrar, N., Toossi, Z., Minai, A., Dojki, M. and Ellner, J. J. 1995. Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2:726.
- 35- Dhandayuthapani, S., Izumi, S., Anandan, D. and Bhatia, V. N. 1992. Specificity of IgG subclass antibodies in different clinical manifestations of leprosy. *Clin Exp Immunol.* 88:253.
- 36- Cobb, A. J. and Frothingham R. 1999. The GroES antigens of Mycobacterium avium and Mycobacterium paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 67:31.
- 37- Teixeira, A. C., Cruvinel, D. L., Roma, F. R., Luppino, L. F., Resende, L. H. P., Sousa, T., Bühner-Sékula, S., Goulart, I. M. B. 2008. Evaluation of the concordance between clinical and laboratorial exams in the diagnosis of leprosy. *Rev Bras Med,* 41:48.