



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

Desenvolvimento de peptídeos miméticos de antígenos do *M. leprae* e implicações no diagnóstico e prognóstico da hanseníase.

Aluna: Mayara Ingrid Sousa Lima

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

Co-Orientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart

**UBERLÂNDIA - MG
2015**



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

Desenvolvimento de peptídeos miméticos de antígenos de *M. leprae* e implicações no diagnóstico e prognóstico da hanseníase.

Aluna: Mayara Ingrid Sousa Lima

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

Co-Orientadora: 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: Genética)

**UBERLÂNDIA - MG
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L732d
2015
Lima, Mayara Ingrid Sousa,
Desenvolvimento de peptídeos miméticos de antígenos do *M. leprae*
e implicações no diagnóstico e prognóstico da hanseníase / Mayara
Ingrid Sousa Lima. - 2015.

102 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart.

Coorientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Hanseníase - Diagnóstico - Teses. 3.
Peptídeos - Teses. I. Goulart, Luiz Ricardo. II. Goulart, Isabela Maria
Bernardes. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Desenvolvimento de peptídeos miméticos de antígenos de *M. leprae* e implicações no diagnóstico e prognóstico da hanseníase.

ALUNA: Mayara Ingrid Sousa Lima

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Luiz Ricardo Goulart

Examinadores: Mariane Martins de Araújo Stefani

Milton Ozório Moraes

Jair Pereira da Cunha Junior

Robinson Sabino da Silva

Data da Defesa: 11/03 /2015

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

Luiz Ricardo Goulart

Dedico este trabalho:

... a todos os pacientes que deram sentido a minha busca, mostrando que por trás de amostras e técnicas, existem rostos e vidas;

... a minha mãe Francisca e meu paidrasto Antônio alicerces da minha história;

... ao meu companheiro Laécio que está ao meu lado todos os dias (*de janeiro a janeiro*).

AGRADECIMENTOS:

A Deus pelo dom da vida, em uma época de tantos conflitos religiosos Tu se manifesta na essência das pessoas e nos simples gestos diários, onde estás ao meu lado. E a Francisco de Assis que me inspirou viver ideais de justiça, paz e fraternidade;

A minha mãe Francisca, meu paidrasto Antônio e minha prima/irmã Ranielha que estão comigo em todos os momentos. E minha grande família especialmente os que estão em Poção de Pedras, que me acolhem com tanto carinho sempre que volto para o aconchego do lar. Quantas coisas alegres e tristes estive longe de vocês, mas encontrei sempre o apoio de continuar acreditando nos sonhos.

Ao meu amor, namorado, companheiro, amigo Laécio que escolhi para partilhar a vida, os sonhos e as lutas. Obrigada por estar ao meu lado, especialmente nessas últimas semanas de escrita da tese onde esteve comigo diariamente.

A minha família espiritual Franciscana, irmãos e irmãs da Juventude Franciscana, da Ordem Franciscana Secular, todos os Frades. Os laços que nos unem foram inspirados no que acreditamos e por isso são indissolúveis. Em especial, quero agradecer aos companheiros do Secretariado Nacional da JUFRA, quantas partilhas e ajudas. E aos meus irmãos da jufra, da ordem e os frades de Uberlândia, vocês foram importantes demais nesses anos todos. O que vivi aqui está marcado pra sempre em mim, pois mais que fazer um doutorado, aqui resgatei a minha essência, os meus ideais;

Ao meu orientador Luiz Ricardo, grande inspiração na vida científica, agradeço por todas as oportunidades e porque um dia acreditou naquela menina maranhense. Nunca esquecerei o dia onde me dissestes que me formaria para ser uma grande profissional na minha terra, e assim será;

A minha co-orientadora Isabela Goulart, que abriu tantas portas para mim e me fez vê a pesquisa com outros olhos, de uma pessoa que luta incansavelmente para que todos tenham mais dignidade no serviço público de saúde. Admiro sua competência e sua força;

Aos professores Milton, Mariane, Jair e Robinson que aceitaram participar da minha banca, mesmo com um tempo tão curto para leitura da tese;

Aos profissionais do CREDESH e todos os colegas do Laboratório de Hanseníase que sempre foram tão gentis comigo e deixaram meu trabalho mais simples. Aprendi que sem uma boa equipe de saúde na base não se faz pesquisa;

A família nanobio, amigos de ontem e de hoje. A maioria dos momentos vividos no doutorado foram com vocês, quantos experimentos até tarde, finais de semana juntos no laboratório, muitas

discussões em torno da mesa, inúmeras ajudas e momentos divertidos também. Companheiros de doutorado são amigos para vida. Peço licença a todos, para agradecer Galber (“personal” tradutor) e Ulisses (“personal” bioinformata). E especialmente a três pessoas que foram minhas mãos, meus pés e meus olhos para que essa tese fosse construída, Aline (para sempre DNA), Jéssica e Bruna. Nanos, a Chayene sempre estarás com vocês!

A prof^a Neide e a querida Ester que me apresentaram o mundo novo da histologia. Aprendi muito com vocês. Fica a certeza que por trás de uma boa imagem está a dedicação de muitos meses de trabalho;

A prof^a Ana Graci e minha amiga Renata (companheira das disciplinas difíceis) por terem aceito tão prontamente o nosso pedido de conduzir os experimentos com SPR. O mundo nanotecnológico ficou bem simples com a ajuda de vocês;

As minhas amigas Rosiane e Risely que dividiram as suas casas e suas vidas comigo, quando eu literalmente estava com as malas nas mãos. E a minha família adotiva em Uberlândia, família Bastos, em especial minha mãe Maria e irmão Igor;

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

As amigas Vanessa, Marta, Carol e Perla obrigada pelas tantas ajudas no período em que estive como prof^a substituta, sem vocês teria sido muito difícil conciliar doutorado e trabalho;

Ao amigo Marcelo, que me ajudou muito nesse doutorado, os primeiros anos dessa jornada teriam sido impossíveis sem você. A vida nos ensinou muito e não poderia deixar de agradecê-lo;

Ao programa de pós-graduação em Genética e Bioquímica da UFU, em especial ao prof^o Carlos Ueira, coordenador da pós e entusiasta dessa minha jornada. A toda equipe de secretaria e os professores que tanto me ensinaram durante esses anos. Aos colegas da pós-graduação que estiveram juntos comigo durante as disciplinas, nos corredores do prédio...muitas amizades!

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

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

Luiz Gonzaga

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO DA TESE	11
ABSTRACT	12
APRESENTAÇÃO	13
CAPÍTULO I:.....	14
FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	14
1. Aspectos Gerais, Epidemiologia e Situação da Hanseníase no Brasil.....	15
2. Classificação da Hanseníase	17
3. Imunologia da Hanseníase.....	18
4. Diagnóstico: marcadores e novas tecnologias	20
4.1 PGL-1 na sorologia da hanseníase	21
4.2 Proteínas e peptídeos no diagnóstico da hanseníase	23
4.3 Imunossensores por Ressonância plasmônica de superfície	24
5. Tecnologia <i>phage display</i>	26
5.1 <i>Phage display</i> de peptídeos	27
5.2 <i>Phage display</i> de Anticorpos.....	28
5.3 Aplicações em doenças infecciosas.....	31
REFERENCIAS	33
OBJETIVOS	46
Objetivo Geral.....	46
Objetivos Específicos.....	46
JUSTIFICATIVA	47
CAPÍTULO II.....	49
Resumo:.....	50
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS.....	53
RESULTADOS.....	58
DISCUSSÃO.....	65
REFERENCIAS.....	69
CAPÍTULO III.....	72
Resumo.....	73
Sumário do Autor.....	74
Introdução.....	75
Metodologia.....	76
Resultados.....	82
Discussão.....	93
Conclusão.....	98
Referencias.....	99

LISTA DE FIGURAS
(Fundamentação teórica)

<i>Figura 1:</i> Mapa mundial da prevalência de hanseníase em 2012.....	16
<i>Figura 2:</i> Coeficiente de detecção geral da hanseníase por estado, Brasil, 2012.....	17
<i>Figura 3:</i> Relações das formas de hanseníase, resposta imune, carga bacteriana e lesões cutâneas.....	19
<i>Figura 4:</i> Estrutura química de PGL-1 do <i>M. leprae</i>	22
<i>Figura 5:</i> Esquema do princípio de funcionamento de um biossensor por ressonância plasmônica de superfície.....	25
<i>Figura 6:</i> Estrutura do Bacteriófago M13.....	26
<i>Figura 7:</i> Representação esquemática do <i>biopanning</i> de peptídeos utilizando como alvo anticorpos presentes no soro.....	28
<i>Figura 8:</i> A. Estrutura típica de uma molécula de IgG e seus fragmentos; B. Estrutura genética do domínio variável e construção de uma biblioteca de <i>phage display</i>	29
<i>Figura 9:</i> Biblioteca de ScFv construída a partir de mRNA extraídos de linfócitos de sangue periférico humano.....	30

ABREVIATURAS E SIGLAS

anti-HA	anti- epítopo da hemaglutinina de Influenza
anti-HIS	anti-histidinas
BSA	soro albumina bovina
ELISA	ensaio de imunoadsorção enzimática
Fab	fragmento de ligação com o antígeno
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IFNγ	interferon gama
IG	imunoglobulina
IgBlast	ferramenta básica para alinhamento local de sequências de imunoglobulinas
IL	interleucina
IPTG	isopropil a-D-tiogalactosidase
LAM	lipoarabinomanana
mAb	anticorpo monoclonal
ng	nanograma
OMS	organização Mundial de Saúde
PBS	tampão fosfato salino
PDB	banco de dados de proteínas
PGL-1	glicolípido Fenólico-1
Ph.D- C7C	biblioteca contendo 7 peptídeos randômicos
pIII	proteína III do capsídeo de bacteriófagos filamentosos
Pymol	sistema de visualização molecular
ScFv	fragmentos variáveis em cadeia única
SPR	ressonância Plasmônica de Superfície
TBS	tampão tri-hidroxi-metil-aminometano/ácido clorídrico e Sódio
TLR	receptores <i>toll like</i>
TNFα	fator de necrose tumoral alfa

LIMA, Mayara Ingrid Sousa. Desenvolvimento de peptídeos miméticos de antígenos de *M. leprae* e implicações no diagnóstico e prognóstico da hanseníase. f 93. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2015.

RESUMO DA TESE

O diagnóstico precoce da hanseníase representa uma contribuição importante para diminuir a incidência da doença. Para isso é fundamental o desenvolvimento de novas plataformas, que incluam o mapeamento de antígenos com potencial para o imunodiagnóstico. Dentre estes destaca-se o PGL-1 e epítomos obtidos de proteínas específicas do bacilo. Alternativamente, peptídeos miméticos apresentam-se como uma importante ferramenta, pela versatilidade em desempenhar as mesmas funções que os antígenos naturais proteicos e não-proteicos. Dessa forma, nosso objetivo foi produzir peptídeos miméticos a antígenos do *Mycobacterium leprae* e que sejam promissores como marcadores sorológicos, os quais serão explorados em novas plataformas diagnósticas. Para produzir os peptídeos miméticos foi utilizada a tecnologia *phage display*. No primeiro processo utilizou-se um anticorpo monoclonal anti-PGL-1 (CS-38) para obter peptídeos miméticos ao PGL-1. No segundo processo, os peptídeos foram produzidos tendo como alvo IgGs purificadas de pacientes com hanseníase. As sequências dos peptídeos expressos nos fagos foram sintetizadas quimicamente. Os peptídeos sintéticos foram validados por ELISA (processo 1 e 2) e imunossensor baseado em Ressonância Plasmônica de Superfície (processo 1). Por meio de engenharia reversa, anticorpos scFv foram produzidos para confirmar e identificar alvos dos peptídeos miméticos. O peptídeo PGL-1-M3 mimético ao PGL-1 nativo apresentou sensibilidade de 89,11% e especificidade de 100,00% na detecção de IgM, com positividade de 100% em lepromatosos (LL), bem como títulos de IgG detectaram positividade de 60% para tuberculóides (TT) e 39% para contatos domiciliares (HC). Com este peptídeo foi montada uma plataforma biofotônica, que diferencia todas as formas clínicas de hanseníase ($p < 0,05$). O scFv anti-PGL-1-M3 reconheceu PGL-1 nativo e detectou com precisão o *M. leprae* na imuno-histoquímica. Os peptídeos MPML11, MPML12 e MPML14 miméticos de antígenos do *M. leprae* detectam IgG e IgA em pacientes e HC. Na detecção de IgG, MPML11 apresentou positividade de 52,2% em TT e 35% em HC e também é um promissor marcador de reação tipo 2. MPML12 e MPML14 apresentaram um comportamento muito similar ao PGL-1, tendo 100% e 92,85% de positividade em LL, respectivamente. Os três peptídeos detectaram IgA nos soros de pacientes, especialmente multibacilares (MBs); bem como IgA na saliva de MBs e HC cujo caso índice era multibacilar. Os peptídeos miméticos obtidos nesse trabalho foram confirmados como miméticos verdadeiros de antígenos do *M. leprae* e podem ser aplicados no diagnóstico da hanseníase em diferentes plataformas.

LIMA, Mayara Ingrid Sousa. Desenvolvimento de peptídeos miméticos de antígenos de *M. leprae* e implicações no diagnóstico e prognóstico da hanseníase. f 93. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2015.

ABSTRACT

Early diagnosis of leprosy is an important contribution to reducing the incidence of the disease. For its early detection, the development of new platforms that include the mapping of antigens with potential to be used in immunodiagnostic is of great interest. Among these antigens, the PGL-1 and epitopes derived from specific bacillus proteins have received great attention. Alternatively, due to their versatility to perform the same functions as the protein and non-protein natural antigens, mimetic peptides are considered an important tool. Thus, our goal was to produce mimetic peptides of *Mycobacterium leprae* antigens that are promising as serological markers, which will be explored in new diagnostic platforms. To produce peptide mimetics, *phage display* technology was used. In the first case, we used a monoclonal anti-PGL-1 (CS-38) aiming to obtain peptides that mimics the PGL-1. In the second case, the peptides were obtained having purified IgGs from patients with leprosy as target. The sequences of the selected peptides expressed on the phage surface were chemically synthesized. The synthetic peptides were validated by ELISA (case 1 and 2) and by an immunosensor based on Surface Plasmon Resonance (case 1). Aiming to confirm and identify the targets of the mimetic peptides, scFv antibodies were produced by reverse engineering. The PGL-1-M3 peptide that mimics the native PGL-1 had a sensitivity of 89.11% and specificity of 100.00% in the IgM detection, with positivity of 100% in lepromatous (LL). The IgG detection had positivity of 60% for tuberculoid (TT) and 39% for household contacts (HC). This peptide was used in assembling one biophotonics platform, which allowed the differentiation of all forms of leprosy ($p < 0.05$). The anti-scFv-M3 PGL-1 recognized native PGL-1 and accurately detected the *M. leprae* in immunohistochemistry tests. The MPML11, MPML14 and MPML12 peptides that mimics *M. leprae* antigens detect IgG and IgA in patients and HC. In IgG detection, MPML11 peptide showed positivity in 52.2% of TT and 35% of HC, and is also a promising marker of type 2 reaction. MPML12 and MPML14 peptides showed a very similar behavior to the PGL-1, with positivity of 100% and 92.85% in LL, respectively. The three peptides detected IgA in the serum of patients, especially multibacillary (MBs); and IgA in saliva of MBs and HC which index case was multibacillary. Mimetic peptides obtained in this work were confirmed as true mimetics of *M. leprae* antigens and can be applied in the diagnosis of leprosy in different platforms.

APRESENTAÇÃO

A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, é uma doença infecciosa crônica, dermatoneurológica, que acomete o tecido cutâneo e nervos periféricos, gerando lesões na pele, degeneração do nervo, anestesia e deformidades. Do ponto de vista epidemiológico possui um grande impacto em saúde pública, uma vez que o Brasil é o segundo no mundo em prevalência da doença. Diante disso, é fundamental a adoção de estratégias que diminuam o número de casos da hanseníase, como por exemplo desenvolver tecnologias que permitam um diagnóstico rápido e eficaz.

Esse trabalho de doutorado tem como enfoque desenvolver peptídeos miméticos de importantes antígenos do *M. leprae* e demonstrar as implicações destes no diagnóstico da hanseníase. Para isso, utilizou-se de maneira geral a tecnologia de *phage display* que permite o mapeamento de peptídeos, proteínas e anticorpos contra uma variedade de alvos diferentes.

No primeiro capítulo trazemos uma revisão bibliográfica sobre Hanseníase, destacando aspectos epidemiológicos, ferramentas diagnósticas, classificação e imunologia. Além, de explicar sobre a tecnologia de *phage display* tanto para produção de peptídeos miméticos, como para desenvolvimento de fragmentos de anticorpos monoclonais. E por fim, expomos técnicas utilizadas para validação de peptídeos no diagnóstico da hanseníase.

No segundo capítulo apresentamos os resultados obtidos com o desenvolvimento de peptídeos miméticos ao Glicolípido Fenólico 1, principal antígeno da parede celular do *M. leprae*, que tem sido utilizado em diferentes ensaios imunológicos como ELISA e ML-Flow para uma amplitude de aplicações na prática clínica. Esse peptídeo mimético foi sintetizado quimicamente e acoplado numa plataforma de Ressonância Plasmônica de Superfície, uma técnica que mede interação antígeno e anticorpo com alta eficiência e sensibilidade.

No terceiro capítulo apresentamos peptídeos miméticos que reconhecem anticorpos do tipo IgG no soro e do tipo IgA na saliva de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares em ensaios de ELISA, o que representa uma importante ferramenta para o diagnóstico complementar dessa doença.

Assim, essa tese de doutorado aponta ferramentas importantes que podem auxiliar no diagnóstico precoce da hanseníase, utilizando plataformas eficientes, sensíveis e com aplicação prática.

**CAPÍTULO I:
FUNDAMENTAÇÃO TEORICA**

1. Aspectos Gerais, Epidemiologia e Situação da Hanseníase no Brasil.

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, dermatoneurológica, que acomete o tecido cutâneo e nervos periféricos, gerando lesões na pele, degeneração do nervo, anestesia e deformidades^{4; 5}. Tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente, em forma de bastonete, parasita intracelular obrigatório de células do sistema mononuclear fagocitário^{6; 7}. É a única espécie de micobactéria que infecta células de *Schwann*, ligando-se ao domínio G da cadeia de laminina- α 2, expressa especialmente na lâmina basal de nervos periféricos⁸. Há uma dificuldade no cultivo do *Mycobacterium leprae*, pois este não cresce em meios de cultura artificiais⁹.

A transmissão do *M. leprae* ocorre pelo contato próximo e prolongado entre indivíduos suscetíveis e um paciente infectado através das vias aéreas superiores⁹, principalmente a mucosa nasal^{10; 11}. O bacilo é considerado de alta infectividade, mas de baixa patogenicidade, pois somente 10% dos infectados efetivamente chegam a apresentar sintomas da doença^{12; 13}, após um período de incubação que atinge em média, de 2 a 7 anos¹⁴.

De acordo com relatórios oficiais da Organização Mundial de Saúde (OMS), no final de 2013 a prevalência mundial de hanseníase foi de 180.618, demonstrando uma redução em relação a 2012 com 181.941. O número de casos novos detectados em 2013 foi de 215 656, considerando 103 países, o que representa uma taxa global de 3,81 (casos novos) por 100.000 habitantes. A Índia, o Brasil e a Indonésia são os países com maiores números de casos novos registrados^{15; 16}.

Atualmente, o Brasil ocupa o segundo lugar no mundo em prevalência da hanseníase. Considerando as Américas, dos 33.084 casos novos registrados em 2013, 31.044 foram notificados no Brasil¹⁶. Existe uma tendência de redução, pois em 2006 o número de casos novos era de 44.436¹⁷. Entretanto, o Brasil ainda não atingiu a meta proposta pela OMS de menos de 1 caso para 10.000 habitantes (Figura 1), pois continua com bolsões de alta endemicidade.

O último estudo de tendência realizado no Brasil revelou um período inicial de redução nas taxas de detecção. Entretanto, ainda são identificados 10 *clusters* (agrupamentos), envolvendo 14 estados brasileiros, responsáveis por 51% do total de casos novos de hanseníase notificados e 60% dos casos novos notificados em menores de 15 anos¹⁸.

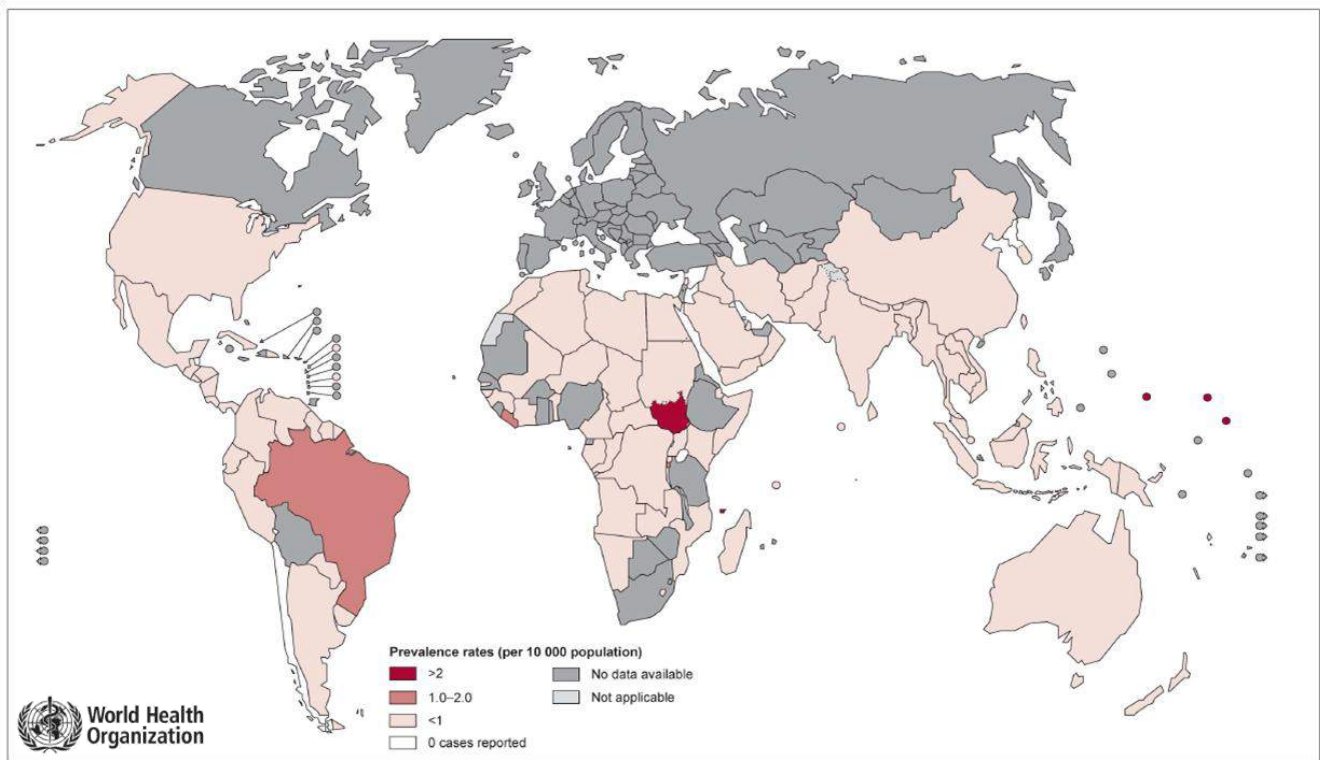


Figura 1: Mapa mundial da prevalência de hanseníase em 2012. Disponível em: http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2011.pdf?ua=1. Acessado: 15.02.2015.

As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste ainda mantêm taxas de detecção em patamares muito elevados com 53,5% dos casos novos detectados. Essas regiões concentram 17,5% da população brasileira, residentes em extensas áreas geográficas, o que adiciona maior complexidade a intervenções efetivas¹⁹. Os estados do Maranhão, Pará, Rondônia, Tocantins e Mato Grosso são considerados hiperendêmicos (Figura 2).

Os dados epidemiológicos reforçam que a transmissão ativa continua ocorrendo, mesmo com o uso da poliquimioterapia como estratégia de eliminação da hanseníase²⁰. Esta transmissão pode ser causada pelo reservatório permanente de *M. leprae* em contatos com infecção subclínica⁴.

Nesse sentido, a estratégia global aprimorada (2011-2015) visa reduzir a taxa de casos novos, especialmente nos pacientes com grau 2 de incapacidade em pelo menos 35% até o final de 2015, em comparação com dados de 2010. Dessa forma, haverá menor transmissão da doença na comunidade²¹. Para atingir essa meta mundial destaca-se a importância do diagnóstico precoce e a qualidade dos cuidados na definição do atendimento de forma integrada.

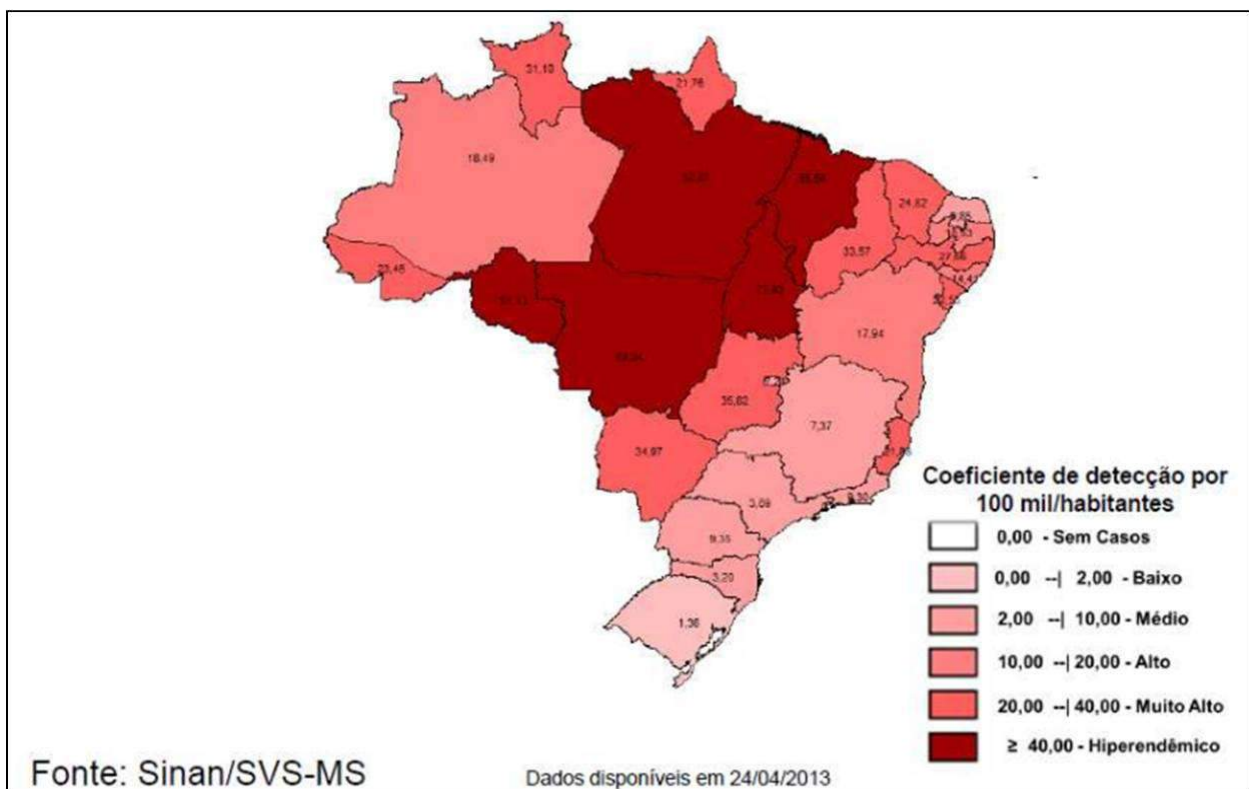


Figura 2: Coeficiente de detecção geral da hanseníase por estado, Brasil, 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/outubro/09/Mapa---Coeficiente-de-detec-----o-geral-de-hansen--ase-por-estado-2012.pdf>. Acessado em: 15.02.2015

2. Classificação da Hanseníase

A classificação adequada da doença é de fundamental importância para o tratamento e manejo do paciente³. Por esse motivo, várias tentativas foram realizadas a fim de classificar a hanseníase²². O sistema de Ridley & Jopling²³ é amplamente utilizado nos dias atuais. De acordo com a escala proposta, os pacientes são agrupados em cinco formas clínicas: lepromatosa (LL), *borderline*-lepromatosa (BL), *borderline-borderline* (BB), *borderline*-tuberculóide (BT) e tuberculóide (TT). Essa classificação considera parâmetros clínicos, imunológicos e histopatológicos²³. Assim, temos duas formas polares (LL e TT) e três formas intermediárias (BL, BB, BT)⁹.

No grupo Indeterminado (I), enquadram-se aqueles pacientes nos quais os aspectos de diferenciação da hanseníase não se desenvolveram, podendo evoluir para cura espontânea ou desenvolver aspectos clínicos após um período de incubação^{6; 24}.

As instalações para exames histopatológicos da pele e/ou biópsias de nervos necessários para classificação pela escala de Ridley & Jopling não estão disponíveis em todos os lugares, especialmente nos países endêmicos com poucos recursos³. Por esse motivo, a OMS estabeleceu uma classificação operacional, onde os pacientes são

divididos em paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB). Essa classificação é baseada no número de lesões cutâneas, de modo que, os pacientes com até cinco lesões de pele são classificados como PB, e aqueles com mais de cinco lesões, como MB²⁵. Além disso, considerando-se a apresentação clínica e, na prerrogativa de evitar ineficiência do tratamento, todos os casos com baciloscopia positiva são classificados como MB, enquanto os casos com baciloscopia negativa, como PB²⁶.

Os pacientes PB não são considerados importantes fontes de transmissão da doença, devido à baixa carga bacilar. Contudo, os pacientes MB constituem o grupo transmissor, mantendo-se como fonte de infecção, enquanto o tratamento específico não for iniciado²⁷.

3. Imunologia da Hanseníase

A hanseníase é considerada uma doença espectral, cujas manifestações clínicas se correlacionam com a resposta imune do hospedeiro. Em um dos polos, encontram-se os pacientes com hanseníase TT que apresentam uma resposta típica de resistência e controle do crescimento do patógeno. Em contrapartida, pacientes com hanseníase LL representam o extremo susceptível à infecção pelo *M. leprae*. Essas apresentações clínicas correlacionam-se com o grau de imunidade mediada por célula²⁸.

A primeira barreira à infecção pelo *M. leprae* é a imunidade inata, representada pela integridade do epitélio, secreções e a imunoglobulina A (IgA)⁹. A resposta inata é mediada por receptores *Toll-Like* (TLRs) das células do hospedeiro que reconhecem padrões moleculares das micobactérias^{7; 29}. As lipoproteínas do *M. leprae* ativam os receptores TLRs, especialmente o heterodímero TLR2-TLR1, que mediarão uma cascata celular para provocar a morte do bacilo³⁰.

A imunidade adaptativa na hanseníase tem como padrão a resposta TH1/TH2³¹. Nos pacientes TT observa-se uma forte resposta imune celular típica do padrão Th1 (Figura 3), com a produção de IL-2 e interferon gama (IFN γ), além de fator de necrose tumoral alfa (TNF α), IL-12, IL-15 e IL-18^{28; 32; 33; 34; 35; 36}. A grande quantidade de IL-2 e IFN γ em lesões de tuberculóides contribuem para o estado de imunidade resistente⁶, uma vez que, a IL-2 induz a expansão clonal de células T CD4+ ativadas e aumentam a produção de IFN γ ³⁷. Isto induz a produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio em macrófagos, estimulando-os a matar ou restringir a proliferação de micobactérias³⁸. Além disso, a IL-12 estimula diretamente células natural killer (NK), induzindo a produção de IFN γ , com função de potencializar a ativação do macrófago³⁹, levando a destruição do bacilo. Esse modelo de imunidade se reflete em granulomas que se formam em torno dos nervos e produzem dano neural sensorial periférico e lesões de pele secundárias²⁴.

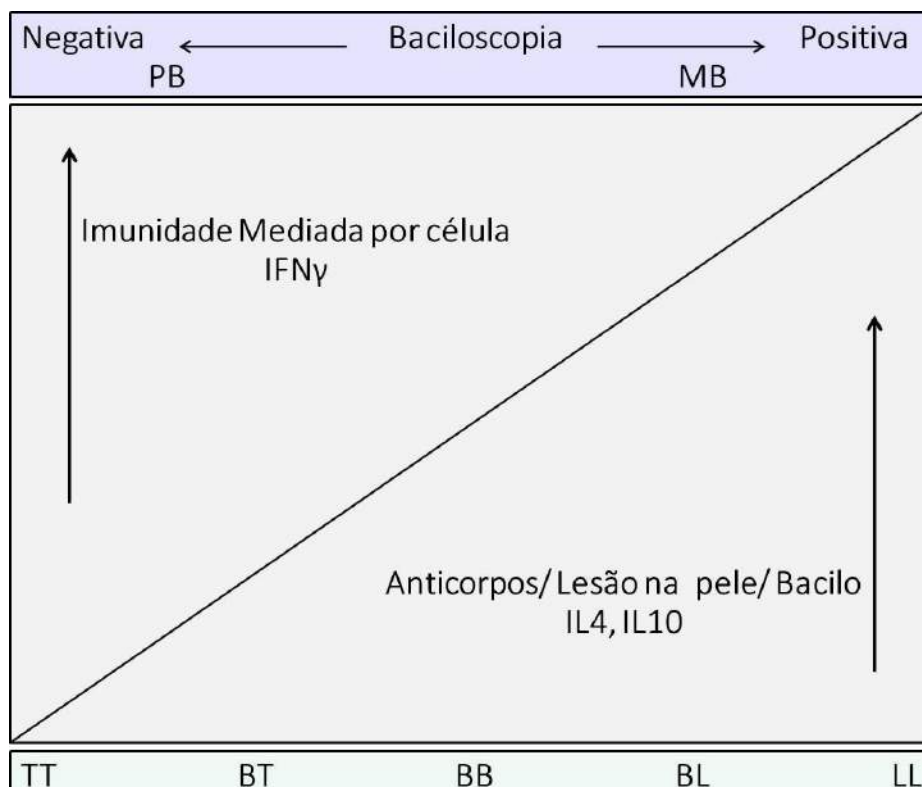


Figura 3: Relações das formas de hanseníase, resposta imune, carga bacteriana e lesões cutâneas. Adaptado de Om Parkash³. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 55:1-5.

Nos pacientes LL predominam os linfócitos T da população Th2 (Figura 3)⁶. As células T CD8+ são abundantes e produzem altos níveis de citocinas supressoras da atividade dos macrófagos, como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, bem como baixos níveis de IFN γ ^{7; 33; 40; 41}. A imunidade humoral exhibe altos títulos de anticorpos (IGs)⁴², principalmente a produção de anticorpos IgM anti-PGL-1 (glicolípido fenólico1), antígeno específico do *M. leprae*, que não oferece proteção e permite a difusão bacilar^{6; 43}. Enquanto, o polo LL tem maior produção de anticorpos, nos pacientes TT são encontradas baixas concentrações de imunoglobulinas⁴⁴.

A IL-4 pode contribuir para o aumento de anticorpos nos pacientes lepromatosos, pelo seu papel na diferenciação de células B, bem como sua habilidade para estimular a proliferação das células Th2³³. Já a IL-10 estimula células B e inibe ativação de macrófago resultando em infecção progressiva⁴¹.

Os pacientes *borderlines* (BT, BB, BL) são imunologicamente dinâmicos, ocorrendo uma progressiva redução da resposta mediada por células, à medida que se evolui da forma BT para BL. Isso, acompanhado pelo aumento no número de lesões, nos níveis de anticorpos circulantes e na carga bacilar⁴⁵ (Figura 3).

3.1 Papel dos anticorpos IgM, IgG, e IgA

Os anticorpos são produzidos em resposta a antígenos do *M. leprae*, tais como PGL-1, LAM (lipoarabinomanana)^{6; 39} e GroES (proteína de choque térmico HSP10)⁴⁶. Durante a resposta imunológica diferentes tipos de citocinas podem estar correlacionadas com a produção de anticorpos.

Em camundongos, IL-4 induz a secreção de IgG1 e IgE; IL-5 aumenta a secreção de IgA; e IFN γ aumenta a secreção de IgG2a⁴². Nesse mesmo modelo animal, um estudo demonstrou uma associação negativa entre produção de IgG1 e IFN γ ⁴⁸. Nesse sentido, as IgGs apresentam uma função imunorregulatória intrínseca. IgG2a regula o aumento da apresentação de anticorpos para células T CD4+, pelos receptores Fc γ R+ das células apresentadoras de antígenos⁵².

Em humanos, mais precisamente nos pacientes com hanseníase, tem-se encontrado maiores níveis de IgM em pacientes Lepromatosos^{6; 43}, estando correlacionado com a disseminação da hanseníase⁴⁰. Também em pacientes, estudos sugerem o efeito da IL-5 no incremento da secreção de IgM pelas células B na presença de células T⁴⁷. Esse tipo de citocina é encontrada nos pacientes com hanseníase onde predomina a resposta humoral⁴¹.

Já para os anticorpos da classe IgG, as subclasses IgG2 e IgG4 anti-GroES são mais predominantes em pacientes TT⁴⁶. Por outro lado, IgG1 anti-MSE (sonicato do extrato de *M. leprae*) encontra-se com níveis mais elevados em pacientes LL⁴⁸, enquanto a IgG3 é mais abundante em pacientes LL com eritema nodoso lepromatoso (ELN)⁴⁹. Dessa forma, IgG1 e IgG3 estão relacionadas com a disseminação da doença, enquanto IgG2 e IgG4 com o controle.

IgA específica anti-*M. leprae* tem sido relatada em secreções salivares de pacientes com hanseníase^{51; 52}. O efeito imunorregulador da IgA é mediado pelos receptores Fc de IgA, que são expressos em neutrófilos, monócitos, macrófagos teciduais, eosinófilos e células dendríticas⁴⁷. Existe a hipótese que a IgA esteja relacionada com uma função anti-inflamatória, agindo na supressão da quimiotaxia de neutrófilos, na neutralização de lipopolissacarídeos, na *down*-regulação de espécies reativas de oxigênio e na indução de antagonistas de receptores de IL-1^{53; 54; 55}.

4. Diagnóstico: marcadores e novas tecnologias

O diagnóstico clínico e epidemiológico da hanseníase é realizado por meio da análise da história e condições de vida do indivíduo e pelo exame dermatoneurológico, a fim de

identificar lesões características na pele, áreas com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos: sensitivo, motor ou autonômico¹⁹.

A baciloscopia é o exame complementar mais importante na hanseníase para identificar o agente causal, permitindo a classificação dos casos em PB ou MB. Dessa forma, pacientes com baciloscopia positiva são classificados como MB, independente do número de lesões. Entretanto, o exame baciloscópico apresenta baixa sensibilidade, especialmente nas formas paucibacilares⁵⁶, e para sua execução, faz-se necessária infraestrutura laboratoriais e profissionais capacitados⁵⁷.

A reação de Mitsuda consiste na inoculação intradermicamente de uma suspensão de bacilos mortos pelo calor (lepromina), a fim de avaliar o grau de resposta imune celular caracterizada pela fagocitose dos bacilos⁵⁸. É um teste oficialmente aceito e com elevado valor prognóstico para avaliar susceptibilidade ou resistência as formas lepromatosas da hanseníase^{23; 59}. No consenso geral, pacientes TT são definidos como Mitsuda positivos e LL como Mitsuda negativos⁶⁰, porém esse teste não tem valor diagnóstico.

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

4.1 PGL-1 na sorologia da hanseníase

A elucidação da estrutura química do PGL-1 demonstrou que este glicolípido é formado por uma extremidade lipofílica e um trissacarídeo único⁶¹ (Figura 4), que é a região de grande antigenicidade da molécula⁶². Trabalhos têm demonstrado o envolvimento do trissacarídeo na predileção do *M. leprae* pelos nervos periféricos. O PGL-1 liga-se especificamente à laminina-2 na lâmina basal de células de Schwann⁶³.

A comprovação da antigenicidade e especificidade do PGL-1⁶⁴ possibilitaram grandes inovações na pesquisa em hanseníase, uma vez que esse componente antigênico tem sido explorado no diagnóstico sorológico⁶⁵.

O uso do PGL-1 nativo como antígeno para o teste de ELISA é validado como um método para detecção de novos casos de hanseníase e para um diagnóstico precoce da

infecção subclínica, uma vez que estes anticorpos refletem um sinal de estimulação antigênica^{52; 66; 67}.

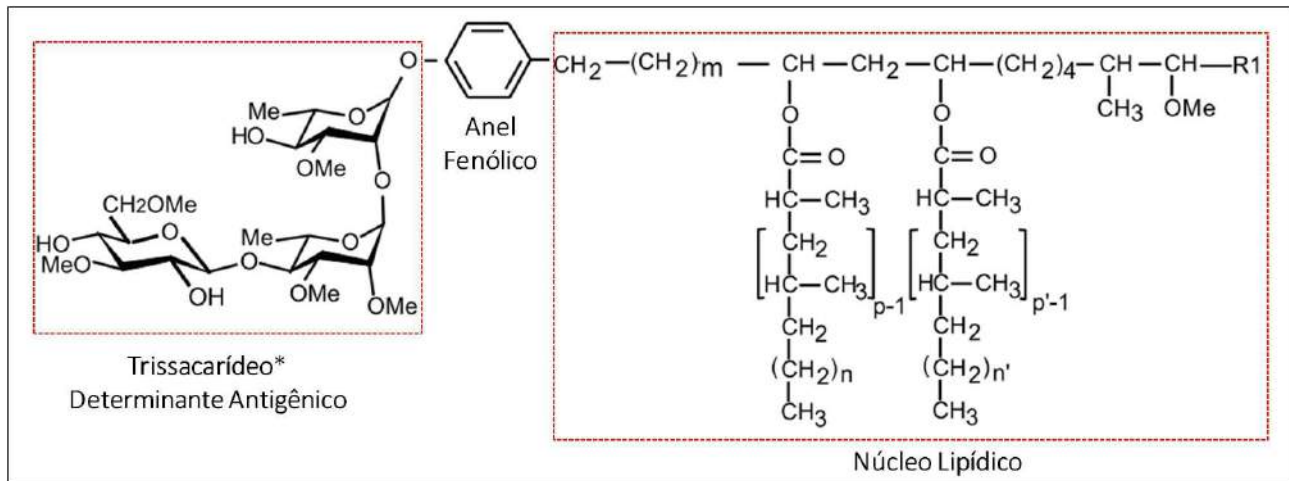


Figura 4: Estrutura química de PGL-1 do *M. leprae*. Trissacarídeo: 3,6-di-O-metila- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-O-metila- α -L-ramnopiranosil. Adaptado de Tabouret, G et al.² Plos pathogens, 2010; 6: 1-13.

Além disso, existe uma correlação significativa entre os anticorpos IgM anti-PGL-1 e o índice baciloscópico (BI), indicando que o anti-PGL-1 reflete o total da carga bacilar dos pacientes com hanseníase e, portanto, pode ser útil para o monitoramento da resposta do paciente à quimioterapia anti-hansênica^{62; 68; 69; 70}.

Os anticorpos anti-PGL-1 estão presentes em grande quantidade nos multibacilares, especialmente nos pacientes LL⁶⁸, entretanto somente um pequeno número de pacientes PB são reativos, por apresentarem baixa concentração de anticorpos circulantes⁷¹. Dessa forma, os paucibacilares podem apresentar resultados negativos na sorologia para PGL-1 mesmo com diagnóstico clínico de hanseníase.

O PGL-1 nativo tem sido utilizado em ensaios de ELISA, mas também em outras plataformas como o teste ML-Flow, um teste imunocromatográfico simples que pode ser executado sem equipamentos e fora de laboratórios⁷².

Mesmo com a utilidade do PGL-1 nativo, existe uma grande limitação na obtenção da molécula nativa, restrita ao crescimento de *M. leprae* em tatus e camundongos^{73; 74}. Como alternativa, têm sido produzidas várias moléculas sintéticas como: monossacarídeo-octil-BSA (M-O-BSA), dissacarídeo-BSA (D-BSA)⁷⁵, dissacarídeo natural-octil-BSA e natural-octil-HSA (ND-O-BSA e ND-O-HSA)⁷⁶ e trissacarídeo natural-fenol-BSA (NT-P-BSA)⁷⁷. Estas podem ser utilizadas em imunoenaios de ELISA e ML-Flow.

4.2 Proteínas e peptídeos no diagnóstico da hanseníase

Vários trabalhos têm utilizado procedimentos pós genômicos para a descoberta de novos antígenos que possam ser utilizados no diagnóstico da hanseníase^{78; 79; 80; 81}. Estes estudos têm explorado sequências de genes do *M. leprae* para a identificação de proteínas ou peptídeos que possam ser adequados ao sorodiagnóstico das diferentes formas clínicas da hanseníase.

Antes da decodificação do genoma do *M. leprae*, a disponibilidade de novos antígenos era limitada, principalmente devido ao fato do bacilo não ser cultivável em cultura axênica⁸². Todavia, com a publicação da sequência completa do genoma⁸³ novas possibilidades foram sendo descobertas.

A análise das sequências do *M. leprae* revelou uma redução dramática de seus genes funcionais quando comparado ao genoma de *M. tuberculosis*, resultando na eliminação de várias vias metabólicas importantes, o que justifica o habitat intracelular e a incapacidade do cultivo *in vitro* desse patógeno⁸³. A genômica e a proteômica comparativa revelaram que dos 1.614 genes presentes no *M. leprae*, 1429 são comuns ao *M. tuberculosis*, restando 165 proteínas que parecem ser específicas do *M. leprae*⁸². Essas proteínas, em conjunto com antígenos não proteicos, como o PGL-1, parecem ser promissoras para o diagnóstico da hanseníase.

Os antígenos ML0405, ML2331 e ML2055, sendo os dois primeiros de função previamente desconhecida e o último uma proteína de membrana, foram identificados, apresentando alta reatividade com anticorpos em soro de pacientes multibacilares LL e BL não tratados⁸⁴. Os mesmos antígenos ML0405 e ML2331 foram reconhecidos em soros de diversas regiões: Filipinas, Brasil, Japão e Venezuela^{85; 86}. As proteínas ML0308 e ML2498, uma proteína hipotética conservada e uma enoil-CoA hidratase, respectivamente, revelaram uma imunogenicidade humoral e celular acentuadas, apresentando-se como fortes candidatas para diagnóstico tanto da hanseníase tuberculóide como lepromatosa⁸⁷.

Alguns desses antígenos foram utilizados na construção de proteínas de fusão, como LID-1 (ML0405 e ML2331)⁸⁵ e PADL (proteínas avançadas para o diagnóstico da hanseníase)^{88; 89}, que foram acopladas a diferentes testes, como ELISA⁶⁶ e plataformas quantitativas ligadas a *smart phones*, demonstrando aplicações no diagnóstico da hanseníase⁹⁰.

Muitos antígenos da parede de *M. leprae* pertencem à família das proteínas de choque térmico (HSP), como HSP10 e HSP60 análogas em estrutura e função a GroEL e GroES

de *Escherichia coli*, respectivamente⁹¹. As Hsp microbianas são produzidas em condições de estresse, e alvos antigênicos dominantes para imunidade celular⁹². Alguns trabalhos têm demonstrado a produção de IgG em pacientes com hanseníase, especialmente os multibacilares, em resposta a essas proteínas^{46; 93}, demonstrando o potencial das mesmas no diagnóstico sorológico da hanseníase.

As ferramentas de bioinformática, análise de genômica e proteômica também estão sendo utilizadas para o mapeamento *in silico* de importantes alvos antigênicos do *M. leprae*⁹⁴. Esse tipo de análise foi utilizada para definir um grupo de 50 potenciais antígenos em micobactérias, sendo que alguns deles parecem ser restritos a *M. leprae*, classificados como classe I⁸⁷.

Além de proteínas recombinantes, peptídeos derivados de proteínas específicas e imunogênicas do *M. leprae* também já foram testados em pacientes com hanseníase e controles⁹⁵. Peptídeos relacionados as proteínas de virulência do *M. leprae* foram promissores como indicadores de exposição⁹⁶. Peptídeos sintéticos também foram validados no diagnóstico da tuberculose⁹⁷.

Os peptídeos são biomoléculas que contêm de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas, podendo ser facilmente sintetizados quimicamente por diferentes métodos, de forma a manter as propriedades das moléculas naturais⁹⁸.

Devido ao tamanho reduzido dos peptídeos, estes podem ser expressos na superfície de bacteriófagos, a fim de selecionar peptídeos miméticos de diferentes alvos⁹⁹. Esses peptídeos miméticos podem ter importantes aplicações no diagnóstico da hanseníase, podendo mimetizar antígenos como PGL-1¹⁰⁰ ou outros antígenos naturais do *M. leprae*^{101; 102}.

4.3 Imunosensores por Ressonância plasmônica de superfície

Biossensores são dispositivos analíticos que envolvem um componente de reconhecimento biológico (antígenos, anticorpos, receptores, enzimas) em contato com uma superfície do transdutor que converte o sinal biológico em um sinal quantificável¹⁰³. Uma classe específica de biossensores são os imunosensores que exploram a capacidade de um anticorpo em reconhecer seu antígeno em um meio muito complexo, considerando a afinidade antígeno-anticorpo¹⁰⁴.

Os imunosensores podem ser construídos utilizando o princípio de transdução de sinal por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). O princípio da construção dos

chamados sensores de SPR envolve um feixe luminoso que atravessa um prisma e alcança uma superfície metálica, geralmente de ouro, de forma a excitar os plásmons de superfície¹⁰⁵ (Figura 5).

Quando uma luz monocromática atinge uma interface contendo dois meios com constantes dielétricas diferentes (exemplo ar-água), parte da luz é refletida e parte é refratada, gerando um ângulo de incidência e um ângulo de refração¹⁰⁶. Em certos ângulos de incidência, os elétrons livres do metal (ouro) oscilam e absorvem energia da radiação incidente dando origem a um campo eletromagnético devido à formação de ondas de plásmons de superfície (OPS). Quando a radiação incidente transfere energia para a OPS ocorre o fenômeno da ressonância entre as mesmas¹⁰⁷. O resultado da análise é mostrado em um gráfico denominado sensorgrama (Figura 5).

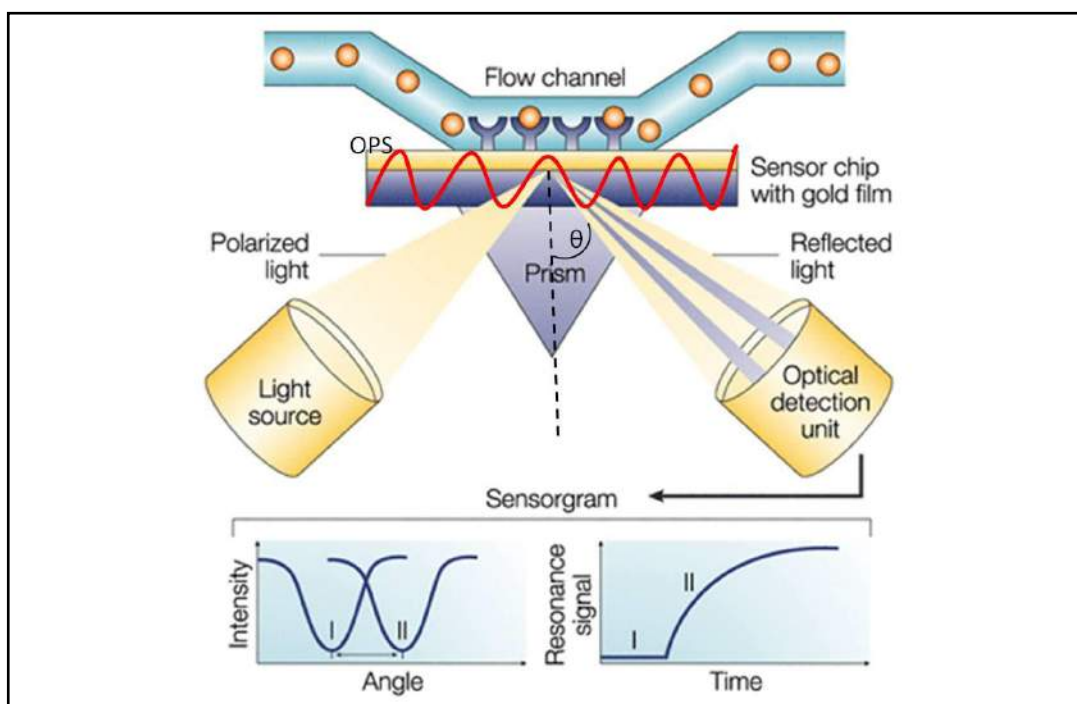


Figura 5: Esquema do princípio de funcionamento de um biossensor por ressonância plasmônica de superfície. Sensorgrama representativo da relação entre o θ_{SPR} e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico. Adaptado de Matthew A. Cooper. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 515-528 (July 2002)¹.

Os imunossensores por SPR representam um grande avanço para a construção de plataformas de diagnóstico, permitindo uma análise em tempo real, quantitativa e muito mais sensível que os imunoenaios convencionais¹⁰⁸. Já existem imunossensores para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas como Hepatite¹⁰⁹, Tuberculose¹⁰⁸ e Dengue¹¹⁰.

5. Tecnologia *phage display*

A tecnologia de *phage display*⁹⁹ tem apresentado um grande impacto na descoberta de fármacos, vacinas e testes diagnósticos, sendo uma ferramenta muito útil em caracterizações antigênicas, por permitir uma rápida identificação e caracterização de peptídeos ou anticorpos, envolvidos diretamente na resposta imune a agentes infecciosos¹¹¹. Pode ser utilizada para revelar os diversos tipos de interações que existem entre antígeno-anticorpo, definir possíveis epítomos para anticorpos monoclonais e selecionar substratos para enzimas¹¹².

Essa tecnologia é baseada no uso de um fago filamentoso (M13), um bacteriófago que infecta bactérias gram negativas, como *Escherichia coli*. A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa proteica constituída por cinco proteínas: pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX¹¹³ (Figura 6).

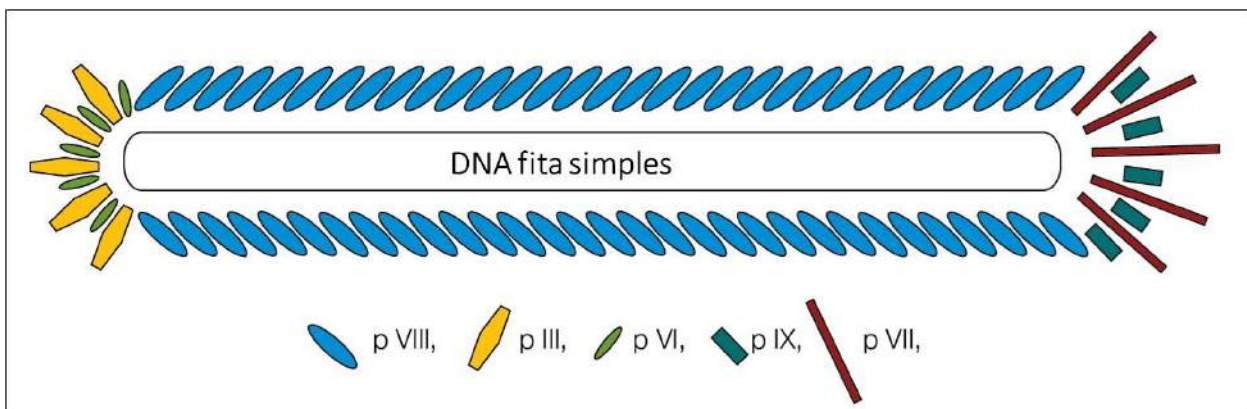


Figura 6: Estrutura do Bacteriófago M13. Esquema adaptado de “M13 with enzymes”. Imagem disponível em: http://2011.igem.org/File:M13_with_enzymes.png. Acessado em: 22.02.2015

A técnica utiliza o princípio de que polipeptídeos ou fragmentos de anticorpos podem ser expressos na superfície desses bacteriófagos pela inserção de um segmento de DNA codificante, de modo que a molécula expressa fique exposta na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína endógena, pIII ou pVIII, enquanto seu material genético permanece no interior do fago¹¹⁴.

Esta ligação entre o genótipo e fenótipo permite o enriquecimento de fagos específicos, por exemplo, usando a seleção em alvos imobilizados. Dessa forma, fagos que exibem um ligante que seja relevante são retidos em virtude de sua ligação com o alvo, enquanto que os fagos não aderentes são lavados¹¹⁵. Esse processo de seleção é feito artificialmente e denominado *biopanning*, no qual a molécula alvo é imobilizada em um

suporte sólido, geralmente uma placa de ELISA, mas também podem ser utilizados *beads*, resinas ou membranas¹¹⁶.

O fago M13 infecta naturalmente *E. coli*, pela ligação da pIII ao *pilus* F da célula bacteriana¹¹⁷. Esse processo tem sido utilizado para recuperar os fagos ligados ao alvo amplificando-os na bactéria. Outra característica importante é que essa metodologia utiliza os mais rápidos protocolos de seleção já descritos, uma vez que o sobrenadante das culturas infectadas pode ser utilizado diretamente para a seleção¹¹⁸.

5.1 Phage display de peptídeos

As bibliotecas de *phage display* de peptídeo consistem na fusão de um DNA exógeno com o DNA viral, em que as sequências de aminoácidos são expressas no fago¹¹⁴. As bibliotecas randômicas são geradas pela utilização de oligonucleotídeos degenerados, podendo ter sete ou doze aminoácidos, em estruturas lineares ou conformacionais¹¹⁹. Enquanto, que as bibliotecas genômicas são construídas pela fragmentação do DNA de um determinado organismo, como um patógeno, utilizando princípios da engenharia genética¹²⁰.

Durante o processo de *biopanning* diferentes estratégias podem ser utilizadas, com o objetivo de selecionar os peptídeos apresentados nos fagos. Para identificar peptídeos imunogênicos, anticorpos presentes nos soros de pacientes/animais podem ser capturados e utilizados como alvos para seleção^{121; 122}. Outra alternativa seria utilizar preparações de anticorpos monoclonais contra patógenos¹¹⁶.

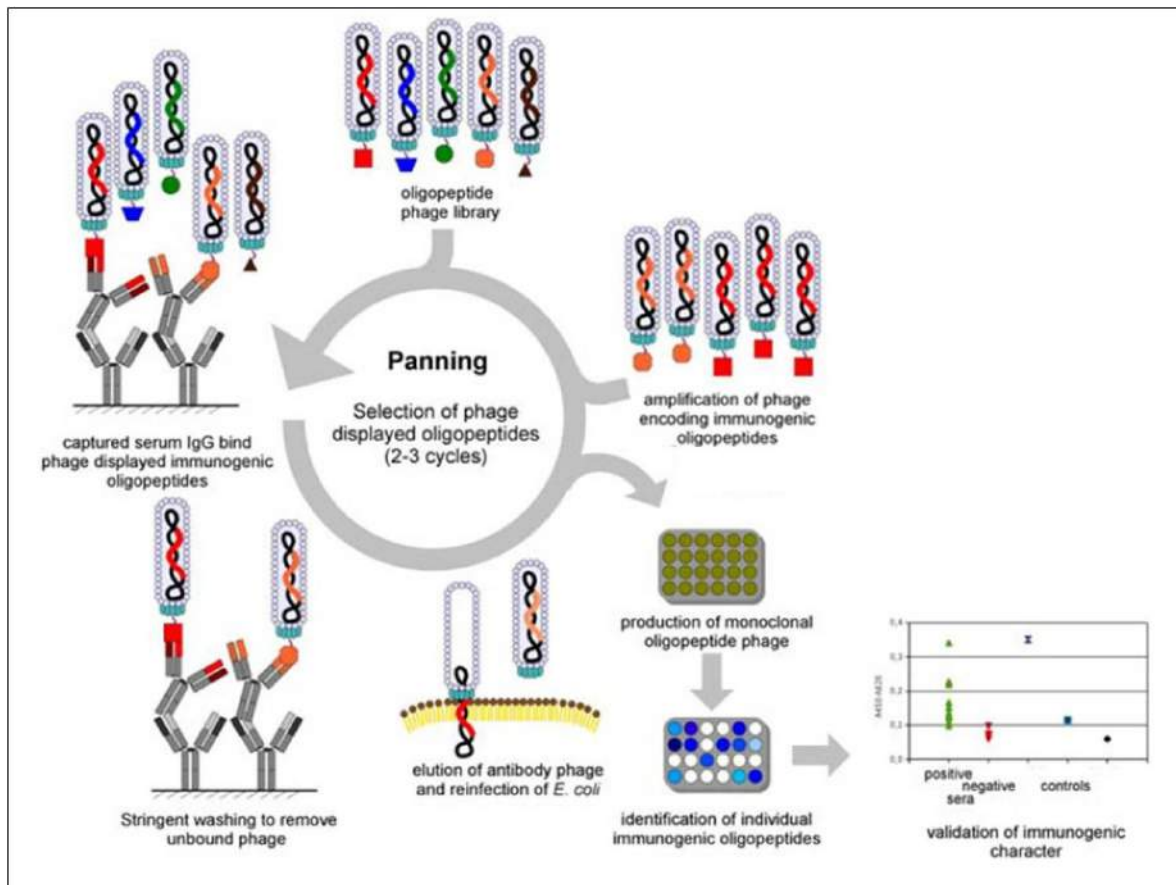


Figura 7: Representação esquemática do *biopanning* de peptídeos utilizando como alvo anticorpos presentes no soro. Adaptado de: Kugler, J. et al.¹¹⁸ *Viruses* 2013; 5: 2531-2545.

O processo de *biopanning* para seleção de peptídeos envolve a incubação da biblioteca com o alvo imobilizado. Remove-se partículas de fagos que não se ligaram ou ligaram fracamente por lavagens vigorosas. Os fagos específicos devem ser eluídos com soluções de baixo pH e utilizados para infecção em *E. coli* (Figura 7).

5.2 Phage display de Anticorpos

Os anticorpos produzidos por *phage display* podem ser utilizados na geração de anticorpos monoclonais para imunoterapia, no isolamento de anticorpos a partir de pacientes expostos a um determinado patógeno e no mapeamento de proteínas nativas¹¹⁷.

Essa tecnologia não possibilita construir a molécula completa do anticorpo, mas fragmentos que podem ser de dois tipos: fragmento de ligação com o antígeno (Fab ou fragment antigen-binding) e fragmentos variáveis em cadeia única (scFv ou *single-chain variable fragment*). Os fragmentos do tipo Fab consistem em segmentos VH-CH e VL-CL, unidos por pontes dissulfeto e que necessitam ser montados na região periplasmática da

bactéria. O fragmento menor scFv é composto apenas pelas regiões VL e VH unidas por um peptídeo flexível (adaptador) composto por 15 aminoácidos¹²³. (Figura 8)

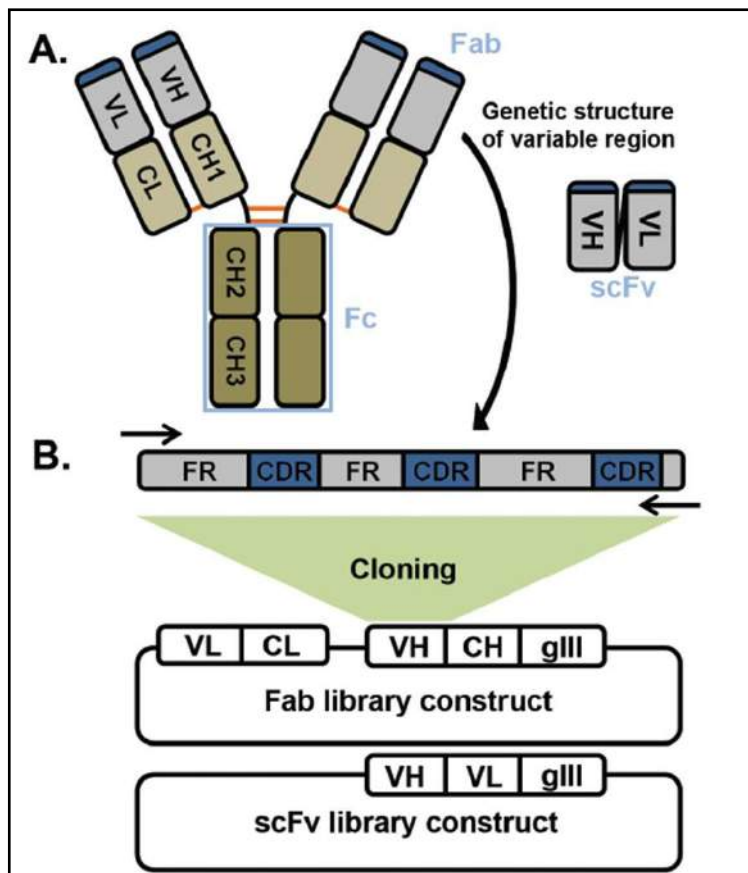


Figura 8: A. Estrutura típica de uma molécula de IgG e seus fragmentos; B. Estrutura genética do domínio variável e construção de uma biblioteca de *phage display*. VL (domínio variável da cadeia leve); VH (domínio variável da cadeia pesada); CL (2º domínio da cadeia leve); CH1 (2º domínio da cadeia pesada). Adaptado de Chan et al.¹²⁵ International Immunology. 2014; 26: 649–657.

As bibliotecas de anticorpos *naive* são construídas utilizando técnicas básicas de biologia molecular, como transcrição reversa de mRNA, seguida por uma série de reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) a fim de amplificar os genes cadeias leves e pesadas. Por clonagem molecular esses segmentos devem ser inseridos em vetores específicos¹²⁴ (Figura 9).

Os vetores utilizados para bibliotecas de anticorpos devem ser do tipo fagomídeo, que possuem origem de replicação bacteriana e viral (Figura 9). Como esses vetores não possuem todos os genes necessários para formação do capsídeo viral, fago auxiliares (*helper*) são utilizados nas culturas de células transformadas com o fagomídeo, permitindo a construção da partícula viral¹¹⁴.

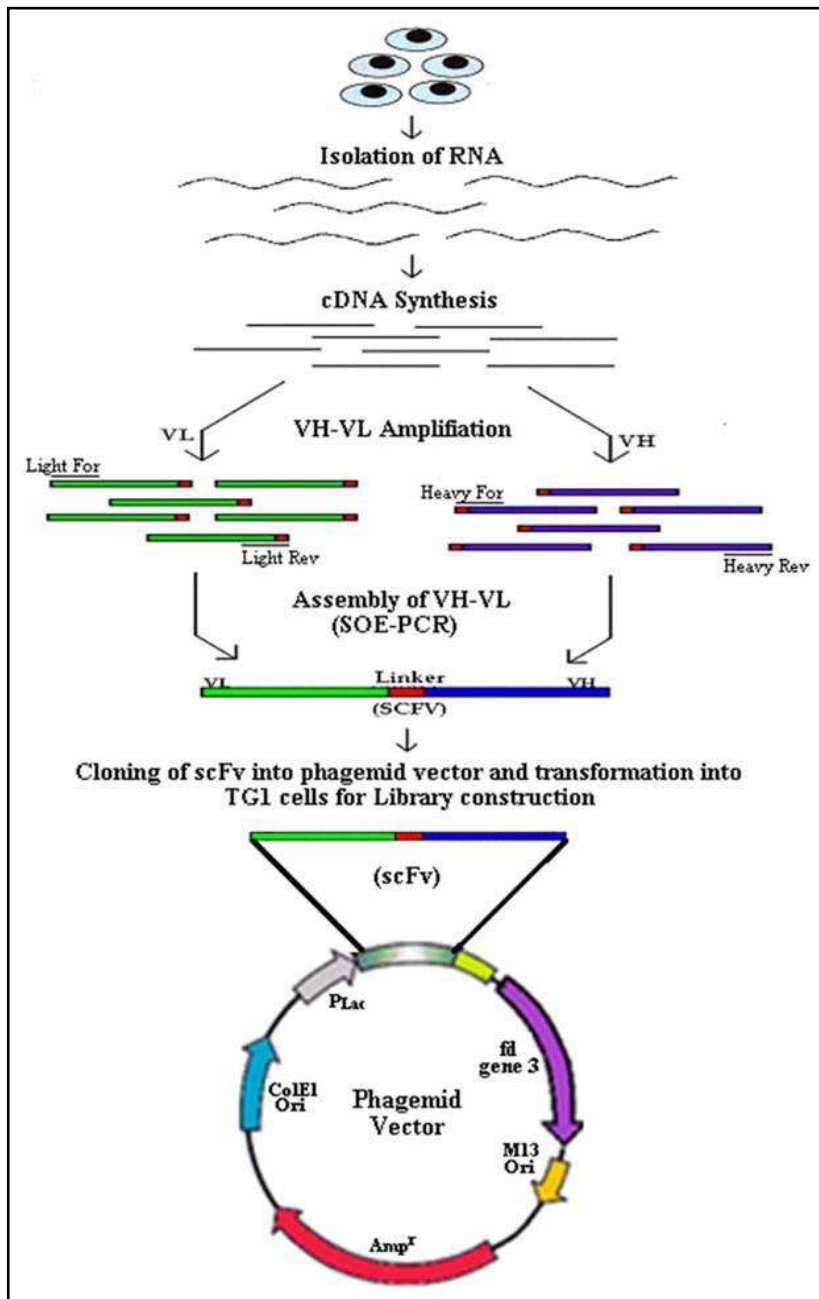


Figura 9: Biblioteca de ScFv construída a partir de mRNA extraídos de linfócitos de sangue periférico humano. Shukra et al.¹²⁶ *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2014; 2: 91–98.

Após a montagem das bibliotecas, deve-se proceder com o *biopanning*, a fim de obter clones capazes de reconhecer determinados alvos, como peptídeos e células, reduzindo muitas milhares de sequências a algumas com potencial interesse biotecnológico. Os fagos recombinantes devem ser selecionados por afinidade a antígenos imobilizados em suportes sólidos, e a seguir ser expandidos em ciclos de crescimento em bactérias *E. coli* na presença do fago auxiliar, que permite a formação do capsídeo viral¹²⁵.

5.3 Aplicações em doenças infecciosas

Muitos trabalhos foram desenvolvidos utilizando a tecnologia de *phage display* na identificação de peptídeos e anticorpos como ferramentas no diagnóstico e terapêutica das doenças infecciosas^{116; 126}. Essa tecnologia tem sido útil na seleção de moléculas específicas que são altamente reativos contra uma variedade de alvos biológicos¹²⁷.

Peptídeos miméticos, obtidos por *phage display*, teriam aplicações potenciais no diagnóstico da tuberculose¹²⁸. Foram selecionados peptídeos de glicoproteínas de superfície celular importantes na resposta imunológica contra o *M. tuberculosis*¹²⁹ e também peptídeos miméticos do complexo ManLAM (lipo arabinomanana manosilada), principal componente do *M. tuberculosis*¹³⁰. Mais recentemente a detecção de *M. tuberculosis* foi realizada utilizando peptídeos miméticos funcionalizados em microesferas magnéticas acopladas a *quantum dots*¹³¹.

Além da tuberculose, peptídeos miméticos com aplicações diagnósticas e vacinais foram produzidos na Pneumonia¹³², Leishmaniose¹²⁶, Neurocisticercose¹³³, Hepatite¹³⁴ e para proteínas do vírus HIV¹³⁵. Na hanseníase foram produzidos peptídeos miméticos contra o PGL-1, com pouco valor diagnóstico¹⁰⁰, e mais recentemente mimotopos e peptídeos sintéticos com potencial para diagnóstico sorológico da doença^{101; 102}.

Na área da veterinária, tem-se peptídeos miméticos para o diagnóstico sorológico de Leishmaniose canina¹²⁷ e Anaplasmose¹³⁶. Essa tecnologia também foi empregada no desenvolvimento de anticorpos scFv, com especificidade contra determinantes de superfície em *M. avium* subsp. *Paratuberculosis*¹³⁷.

Os anticorpos monoclonais conseguem se ligar com grande afinidade a proteínas dos patógenos, que justifica o grande potencial para aplicações diagnósticas¹³⁸. Nesse sentido, existem fragmentos de anticorpos scFv contra: antígeno 85 de *M. tuberculosis*¹³⁹; antígeno de superfície do vírus da hepatite B¹⁴⁰; proteína TgMIC2 de *Toxoplasma gondii*¹⁴¹ e proteína MSP-3 de *Plasmodium falciparum*¹⁴². Ainda, fragmentos Fab foram produzidos contra glicoproteína de envelope do vírus da dengue¹⁴³ e vírus do Nilo Ocidental¹⁴⁴.

As terapias que utilizam anticorpos monoclonais são ainda muito incipientes no tratamento das doenças infecciosas, porém existem várias aplicações propostas para HIV¹⁴⁵, malária¹⁴⁶ e tuberculose¹⁴⁷.

Os peptídeos e anticorpos obtidos por *phage display* têm um potencial promissor para terapêutica e diagnóstico de doenças infecciosas, com aplicações já demonstradas na literatura.

REFERENCIAS

- 1 COOPER, M. A. Optical biosensors in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 7, p. 515-528, 07//print 2002. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrd838> >.
- 2 TABOURET, G. et al. <italic>Mycobacterium leprae</italic> Phenolglycolipid-1 Expressed by Engineered <italic>M. bovis</italic> BCG Modulates Early Interaction with Human Phagocytes. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 10, p. e1001159, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001159> >.
- 3 PARKASH, O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 55, n. 1, p. 1-5, Jan 2009. ISSN 1574-695X (Electronic) 0928-8244 (Linking).
- 4 GELUK, A. et al. From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 3, p. 352-9, Mar 2009. ISSN 1556-679X (Electronic) 1556-679X (Linking).
- 5 EICHELMANN, K. et al. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 104, n. 07, p. 554-563, 2013. ISSN 403. Disponível em: < <http://www.actasdermo.org/en/leprosy-an-update-definition-pathogenesis/articulo/90221060/> >.
- 6 GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 363-375, 2002. ISSN 0037-8682. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822002000400014&nrm=iso >.
- 7 MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, p. 343-350, 2008. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962008000400010&nrm=iso >.
- 8 SHIMOJI, Y. et al. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 17, p. 9857-62, Aug 17 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).
- 9 LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. D. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 205-218, 2014. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962014000200205&nrm=iso >.
- 10 PATROCINIO, L. G. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 44, n. 3, p. 311-6, Jun 1 2005. ISSN 0928-8244 (Print) 0928-8244 (Linking).

- 11 JOB, C. K. et al. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, n. 3, p. 518-21, Mar 2008. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking).
- 12 ROTBERG, A. Fiftieth anniversary of the "N-factor/Hansen-anegetic fringe" hypothesis for hanseniasis. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 57, n. 4, p. 864-6, Dec 1989. ISSN 0148-916X (Print) 0148-916X (Linking).
- 13 BARRETO, J. G. et al. Spatial Analysis Spotlighting Early Childhood Leprosy Transmission in a Hyperendemic Municipality of the Brazilian Amazon Region. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2665, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002665>>.
- 14 PEREIRA, G. F. M. **Guia para o controle da Hanseníase**. Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, 2002. ISBN 8533403461.
- 15 Global leprosy: update on the 2012 situation. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 88, n. 35, p. 365-79, Aug 30 2013. ISSN 0049-8114 (Print) 0049-8114 (Linking).
- 16 Global leprosy update, 2013; reducing disease burden. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 89, n. 36, p. 389-400, Sep 5 2014. ISSN 0049-8114 (Print) 0049-8114 (Linking).
- 17 Global leprosy situation, 2006. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 81, n. 32, p. 309-16, Aug 11 2006. ISSN 0049-8114 (Print) 0049-8114 (Linking).
- 18 BRASIL, M. D. S. **Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**: SVS, MS Brasília 2008.
- 19 _____. Hanseníase no Brasil: dados e indicadores epidemiológicos selecionados. Brasília: Ministério da Saúde. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/caderno_de_indicadores_hanse_brasil_01_a08_atual.pdf>.
- 20 ALBERTS, C. J. et al. Potential effect of the World Health Organization's 2011-2015 global leprosy strategy on the prevalence of grade 2 disability: a trend analysis. **Bull World Health Organ**, v. 89, n. 7, p. 487-95, Jul 1 2011. ISSN 1564-0604 (Electronic) 0042-9686 (Linking).
- 21 PANNIKAR, V. Enhanced global strategy for further reducing the disease burden due to leprosy: 2011-2015. **Lepr Rev**, v. 80, n. 4, p. 353-4, Dec 2009. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518 (Linking).
- 22 DHARMENDRA. Classification of leprosy. **Lepr India**, v. 54, n. 1, p. 8-16, Jan 1982. ISSN 0024-1024 (Print) 0024-1024 (Linking).
- 23 RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, Jul-Sep 1966. ISSN 0148-916X (Print) 0148-916X (Linking).

- 24 YAWALKAR, S. J. **Leprosy: For Medical Practitioners and Paramedical Workers.** Novartis Foundation for Sustainable Development, 2002. Disponível em: <
<http://books.google.com.br/books?id=kdpUywAACAAJ> >.
- 25 Chemotherapy of leprosy for control programmes. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 675, p. 1-33, 1982. ISSN 0512-3054 (Print) 0512-3054 (Linking).
- 26 LEPROSY, W. E. C. O. **WHO Expert Committee on Leprosy: sixth report.** World Health Organization, 1988. Disponível em: <
<http://books.google.com.au/books?id=TZMKAQAAMAAJ> >.
- 27 BRASIL, M. D. S. Guia de Vigilância Epidemiológica. Hanseníase. 7^a ed. 2010. Disponível em: <
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_hansenia.pdf >.
- 28 MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **J Invest Dermatol**, v. 102, n. 6, p. 828-32, Jun 1994. ISSN 0022-202X (Print) 0022-202X (Linking).
- 29 BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732-6, Jul 30 1999. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).
- 30 MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 1, p. 48-54, 01/07 2010. ISSN 0952-79151879-0372. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882026/> >.
- 31 NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 90-8, Jan-Feb 2015. ISSN 1879-1131 (Electronic) 0738-081X (Linking).
- 32 CHER, D. J.; MOSMANN, T. R. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. **J Immunol**, v. 138, n. 11, p. 3688-94, Jun 1 1987. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).
- 33 SIELING, P. A. et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. **J Immunol**, v. 150, n. 12, p. 5501-10, Jun 15 1993. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).
- 34 JULLIEN, D. et al. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. **J Immunol**, v. 158, n. 2, p. 800-6, Jan 15 1997. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).
- 35 GARCIA, V. E. et al. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. **J Immunol**, v. 162, n. 10, p. 6114-21, May 15 1999. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).
- 36 MONTROYA, D. et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host Microbe**, v. 6, n. 4, p. 343-53, Oct 22 2009. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking).

- 37 KASAHARA, T. et al. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. **J Immunol**, v. 130, n. 4, p. 1784-9, Apr 1983. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).
- 38 NATHAN, C. F. et al. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J Exp Med**, v. 158, n. 3, p. 670-89, Sep 1 1983. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking).
- 39 FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 30, n. 3, p. 335-339, 1997. ISSN 2176-7262.
- 40 YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277-9, Oct 11 1991. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).
- 41 SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Regulation of Cytokine Patterns in Leprosy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 730, n. 1, p. 42-52, 1994. ISSN 1749-6632.
- 42 STEVENS, T. L. et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v. 334, n. 6179, p. 255-8, Jul 21 1988. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).
- 43 OLIVEIRA, M. L. et al. The use of serology as an additional tool to support diagnosis of difficult multibacillary leprosy cases: lessons from clinical care. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 27-33, 2008. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking).
- 44 BUHRER, S. S. et al. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of Mycobacterium leprae. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 2, p. 133-6, Feb 1998. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking).
- 45 BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-19, Apr 10 2004. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).
- 46 HUSSAIN, R. et al. Immune profiling of leprosy and tuberculosis patients to 15-mer peptides of Mycobacterium leprae and M. tuberculosis GroES in a BCG vaccinated area: implications for development of vaccine and diagnostic reagents. **Immunology**, v. 111, n. 4, p. 462-71, Apr 2004. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking).
- 47 OCHOA, M. T. et al. A role for interleukin-5 in promoting increased immunoglobulin M at the site of disease in leprosy. **Immunology**, v. 131, n. 3, p. 405-414, 01/22/received 04/26/revised 05/06/accepted 2010. ISSN 0019-2805 1365-2567. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2996561/>>.
- 48 DHANDAYUTHAPANI, S. et al. Specificity of IgG subclass antibodies in different clinical manifestations of leprosy. **Clin Exp Immunol**, v. 88, n. 2, p. 253-7, May 1992. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104 (Linking).
- 49 BEURIA, M. K. et al. Levels of IgG subclasses in active and inactive cases in the disease spectrum of leprosy. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 115, n. 1, p. 61-6, Jan 1998. ISSN 1018-2438 (Print) 1018-2438 (Linking).

- 50 GETAHUN, A. et al. IgG2a-mediated enhancement of antibody and T cell responses and its relation to inhibitory and activating Fc gamma receptors. **J Immunol**, v. 172, n. 9, p. 5269-76, May 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).
- 51 NAGAO-DIAS, A. T. et al. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. **Braz J Infect Dis**, v. 11, n. 2, p. 215-9, Apr 2007. ISSN 1413-8670 (Print) 1413-8670 (Linking).
- 52 CABRAL, P. B. E. et al. Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal Mycobacterium leprae DNA in individuals with household contact with leprosy. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e1005-e1010, 11// 2013. ISSN 1201-9712. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971213002075> >.
- 53 VAN EPPS, D. E.; WILLIAMS, R. C., JR. Suppression of leukocyte chemotaxis by human IgA myeloma components. **J Exp Med**, v. 144, n. 5, p. 1227-42, Nov 2 1976. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking).
- 54 WOLF, H. M. et al. Anti-inflammatory properties of human serum IgA: induction of IL-1 receptor antagonist and Fc alpha R (CD89)-mediated down-regulation of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and IL-6 in human monocytes. **Clin Exp Immunol**, v. 105, n. 3, p. 537-43, Sep 1996. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104 (Linking).
- 55 FERNANDEZ, M. I. et al. Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. **Immunity**, v. 18, n. 6, p. 739-49, Jun 2003. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking).
- 56 ASSOCIATION, I. L. The diagnosis and classification of leprosy. **International Journal of Leprosy** v. 70, n. 1, p. 23-31, 2002.
- 57 PENNA, G.; PEREIRA, G.; MOREIRA, M. Guia Para o Controle da Hanseníase-Cadernos da Atenção Básica nº 10. **Ministério da Saúde, Brasília**, 2002.
- 58 MITSUDA, K. **On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules**. Tulane University Press, 1953.
- 59 ALCAIS, A. et al. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. **J Infect Dis**, v. 181, n. 1, p. 302-8, Jan 2000. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking).
- 60 SOUZA, F. C. D. et al. Estudo comparativo entre reação de Mitsuda e antígenos leucocitários humanos em pacientes hansenianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 188-191, 2007. ISSN 0037-8682. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822007000200008&nrm=iso >.
- 61 HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **J Bacteriol**, v. 147, n. 3, p. 728-35, Sep 1981. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking).

- 62 SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 344-57, Dec 2011. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439275> >.
- 63 NG, V. et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511-24, Oct 27 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).
- 64 PAYNE, S. N.; DRAPER, P.; REES, R. J. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 50, n. 2, p. 220-1, Jun 1982. ISSN 0148-916X (Print) 0148-916X (Linking).
- 65 MOURA, R. S. D. et al. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 11-18, 2008. ISSN 0037-8682. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000700004&nrm=iso >.
- 66 LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 389-401, Dec 2011. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518 (Linking).
- 67 BAZAN-FURINI, R. et al. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 536-540, 2011. ISSN 0074-0276. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762011000500003&nrm=iso >.
- 68 CHO, S. N. et al. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1077-1083, 1983. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC264610/> >.
- 69 BURGESS, P. J. et al. Serological tests in leprosy. The sensitivity, specificity and predictive value of ELISA tests based on phenolic glycolipid antigens, and the implications for their use in epidemiological studies. **Epidemiology and Infection**, v. 101, n. 1, p. 159-171, 1988. ISSN 0950-2688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2249338/> >.
- 70 ZENHA, E. M.; FERREIRA, M. A.; FOSS, N. T. Use of anti-PGL-1 antibodies to monitor therapy regimes in leprosy patients. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 10, p. 968-72, Oct 2009. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking).
- 71 MOET, F. J. et al. A study on transmission and a trial of chemoprophylaxis in contacts of leprosy patients: design, methodology and recruitment findings of COLEP. **Lepr Rev**, v. 75, n. 4, p. 376-88, Dec 2004. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518 (Linking).
- 72 BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991-1995, 12/09/received 01/15/revised

- 73 KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus 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**, v. 39, n. 3, p. 693-702, Jul-Sep 1971. ISSN 0148-916X (Print) 0148-916X (Linking).
- 74 LEVY, L.; JI, B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. **Lepr Rev**, v. 77, n. 1, p. 5-24, Mar 2006. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518 (Linking).
- 75 GIGG, J. et al. The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. 17. Synthesis of propyl O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3- di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----2)-3-O-methyl-alpha- L-rhamnopyranoside: the oligosaccharide portion of the major serologically active glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **Chem Phys Lipids**, v. 38, n. 3, p. 299-307, Sep 1985. ISSN 0009-3084 (Print) 0009-3084 (Linking).
- 76 CHATTERJEE, D. et al. 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 disaccharide-octyl-neoglycoprotein. **Carbohydr Res**, v. 156, p. 39-56, Nov 15 1986. ISSN 0008-6215 (Print) 0008-6215 (Linking).
- 77 FUJIWARA, T.; IZUMI, S. Synthesis of the Neoglycoconjugates of Phenolic Glycolipid-related Trisaccharides for the Serodiagnosis of Leprosy. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2539-2547, 1987.
- 78 BOBOSHA, K. et al. Peptides Derived from *Mycobacterium leprae* ML1601c Discriminate between Leprosy Patients and Healthy Endemic Controls. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 11, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/132049>>.
- 79 GELUK, A. et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. **J Immunol**, v. 188, n. 10, p. 4782-91, May 15 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking).
- 80 GELUK, A.; DUTHIE, M. S.; SPENCER, J. S. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 402-21, Dec 2011. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518 (Linking).
- 81 DUTHIE, M. S. et al. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 11, p. 1659-65, Nov 2008. ISSN 1556-679X (Electronic) 1556-679X (Linking).
- 82 STEFANI, M. M. D. A. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 89-94, 2008. ISSN 0037-8682. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000700018&nrm=iso>.

- 83 COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007-11, Feb 22 2001. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).
- 84 REECE, S. T. et al. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 3, p. 333-40, Mar 2006. ISSN 1556-6811 (Print) 1556-679X (Linking).
- 85 DUTHIE, M. S. et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 11, p. 1400-8, Nov 2007. ISSN 1556-6811 (Print) 1556-679X (Linking).
- 86 RADA, E. et al. Serologic follow-up of IgG responses against recombinant mycobacterial proteins ML0405, ML2331 and LID-1 in a leprosy hyperendemic area in Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 90-4, Dec 2012. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking).
- 87 ARAOZ, R. et al. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infect Immun**, v. 74, n. 1, p. 175-82, Jan 2006. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking).
- 88 DUTHIE, M. S. et al. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 2, p. 298-303, Feb 2010. ISSN 1556-679X (Electronic) 1556-679X (Linking).
- 89 DE SOUZA, M. M. et al. Utility of recombinant proteins LID-1 and PADL in screening for *Mycobacterium leprae* infection and leprosy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 108, n. 8, p. 495-501, Aug 2014. ISSN 1878-3503 (Electronic) 0035-9203 (Linking).
- 90 PAULA VAZ CARDOSO, L. et al. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 497, 2013. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/497> >.
- 91 MANDE, S. C. et al. Structure of the heat shock protein chaperonin-10 of *Mycobacterium leprae*. **Science**, v. 271, n. 5246, p. 203-7, Jan 12 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).
- 92 RHA, Y.-H. et al. Effect of Microbial Heat Shock Proteins on Airway Inflammation and Hyperresponsiveness. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 5300-5307, November 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/169/9/5300.abstract> >.
- 93 ROJAS, R. E.; SEGAL-EIRAS, A. Immunoglobulin G response against 10-kDa and 65-kDa heat-shock proteins in leprosy patients and their household contacts. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 189-198, 1996. ISSN 1574-695X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.1996.tb00085.x> >.
- 94 WIKER, H. G.; TOMAZELLA, G. G.; DE SOUZA, G. A. A quantitative view on *Mycobacterium leprae* antigens by proteomics. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1711-9, Aug 24 2011. ISSN 1876-7737 (Electronic).
- 95 GELUK, A. et al. Rational combination of peptides derived from different *Mycobacterium leprae* proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of *M. leprae* infection. **Clin**

Vaccine Immunol, v. 15, n. 3, p. 522-33, Mar 2008. ISSN 1556-679X (Electronic) 1556-679X (Linking).

- ⁹⁶ BOBOSHA, K. et al. Mycobacterium leprae virulence-associated peptides are indicators of exposure to M. leprae in Brazil, Ethiopia and Nepal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 112-23, Dec 2012. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking).
- ⁹⁷ ARAUJO, Z. et al. Immunologic evaluation and validation of methods using synthetic peptides derived from Mycobacterium tuberculosis for the diagnosis of tuberculosis infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 131-9, Apr 2013. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking).
- ⁹⁸ MACHADO, A. et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, p. 781-789, 2004. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500018&nrm=iso >.
- ⁹⁹ SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-7, Jun 14 1985. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).
- ¹⁰⁰ YOUN, J. H. et al. Production and characterization of peptide mimotopes of phenolic glycolipid-I of Mycobacterium leprae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 51-57, 5/1/ 2004. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928824404000173> >.
- ¹⁰¹ ALBAN, S. et al. Identification of mimotopes of Mycobacterium leprae as potential diagnostic reagents. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 42, 2013. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/42> >.
- ¹⁰² ALBAN, S. M. et al. Phage Display and Synthetic Peptides as Promising Biotechnological Tools for the Serological Diagnosis of Leprosy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e106222, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106222> >.
- ¹⁰³ GRONOW, M. Biosensors. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 9, n. 8, p. 336-340, Disponível em: <[http://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/abstract/0968-0004\(84\)90055-0](http://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/abstract/0968-0004(84)90055-0)>. Acesso em: 2015/02/22.
- ¹⁰⁴ PERIASAMY, A. P.; UMASANKAR, Y.; CHEN, S. M. Nanomaterials - acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors: a review. **Sensors (Basel)**, v. 9, n. 6, p. 4034-55, 2009. ISSN 1424-8220 (Electronic) 1424-8220 (Linking).
- ¹⁰⁵ KRETSCHMANN, E.; RAETHER, H. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. **Z. Naturforsch. A**, v. 23, p. 2135, // 1968.
- ¹⁰⁶ OLARU, A. et al. Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 97-105, 2015/04/03 2014. ISSN 1040-8347. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10408347.2014.881250> >. Acesso em: 2015/02/22.

- 107 KRETSCHMANN, E. The determination of the optical constants of metals by excitation of surface plasmons. 1971.
- 108 NGUBANE, N. A. C. et al. High-Throughput Sequencing Enhanced Phage Display Identifies Peptides That Bind Mycobacteria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e77844, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077844> >.
- 109 VILLIERS, M. B. et al. Protein/peptide arrays to detect anti-Delta genotype 1, 6, 8 specific antibodies among Hepatitis D Virus infected patients by surface plasmon resonance imaging. **J Clin Microbiol**, Jan 28 2015. ISSN 1098-660X (Electronic) 0095-1137 (Linking).
- 110 KUMBHAT, S. et al. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. **J Pharm Biomed Anal**, v. 52, n. 2, p. 255-9, Jun 5 2010. ISSN 1873-264X (Electronic) 0731-7085 (Linking).
- 111 BLANK, M. et al. Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by synthetic peptides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 9, p. 5164-8, Apr 27 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).
- 112 KAY, B. K.; HOESS, R. H. Chapter 2 - Principles and Applications of Phage Display. In: KAY, B. K.; WINTER, J., et al (Ed.). **Phage Display of Peptides and Proteins**. Burlington: Academic Press, 1996. p.21-34. ISBN 978-0-12-402380-2.
- 113 RAKONJAC, J. Filamentous Bacteriophages: Biology and Applications. In: (Ed.). **eLS**: John Wiley & Sons, Ltd, 2001. ISBN 9780470015902.
- 114 BARBAS, C. F. **Phage Display: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 9780879695460. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=V7bwAAAAMAAJ> >.
- 115 BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol Adv**, v. 19, n. 1, p. 1-33, Feb 1 2001. ISSN 0734-9750 (Print) 0734-9750 (Linking).
- 116 KÜGLER, J. et al. Oligopeptide M13 Phage Display in Pathogen Research. **Viruses**, v. 5, n. 10, p. 2531-2545, 2013. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1999-4915/5/10/2531> >.
- 117 AZZAZY, H. M.; HIGHSMITH, W. E., JR. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin Biochem**, v. 35, n. 6, p. 425-45, Sep 2002. ISSN 0009-9120 (Print) 0009-9120 (Linking).
- 118 BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biociência**, v. 26, p. 44-51, 2002.
- 119 SZARDENINGS, M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 23, n. 4, p. 307-49, 2003. ISSN 1079-9893 (Print) 1079-9893 (Linking).

- 120 KUGLER, J. et al. Identification of immunogenic polypeptides from a *Mycoplasma hyopneumoniae* genome library by phage display. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 80, n. 3, p. 447-58, Sep 2008. ISSN 1432-0614 (Electronic) 0175-7598 (Linking).
- 121 NASEEM, S. et al. Phage display-based identification and potential diagnostic application of novel antigens from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. **Vet Microbiol**, v. 142, n. 3-4, p. 285-92, May 19 2010. ISSN 1873-2542 (Electronic) 0378-1135 (Linking).
- 122 SCHAFFARTZIK, A. et al. Selective cloning, characterization, and production of the *Culicoides nubeculosus* salivary gland allergen repertoire associated with equine insect bite hypersensitivity. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 139, n. 2-4, p. 200-9, Feb 15 2011. ISSN 1873-2534 (Electronic) 0165-2427 (Linking).
- 123 CHAN, C. E. et al. The role of phage display in therapeutic antibody discovery. **Int Immunol**, v. 26, n. 12, p. 649-57, Dec 2014. ISSN 1460-2377 (Electronic) 0953-8178 (Linking).
- 124 SHUKRA, A. M. et al. Production of recombinant antibodies using bacteriophages. **Eur J Microbiol Immunol (Bp)**, v. 4, n. 2, p. 91-8, Jun 2014. ISSN 2062-509X (Print) 2062-509X (Linking).
- 125 HAMMERS, C. M.; STANLEY, J. R. Antibody Phage Display: Technique and Applications. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 2, p. e17, 02//print 2014. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.521> >.
- 126 GOULART, L. R. et al. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. **Crit Rev Immunol**, v. 30, n. 2, p. 201-22, 2010. ISSN 1040-8401 (Print) 1040-8401 (Linking).
- 127 COSTA, L. E. et al. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. **Clin Vaccine Immunol**, v. 21, n. 1, p. 96-106, Jan 2014. ISSN 1556-679X (Electronic) 1556-679X (Linking).
- 128 SHARMA, A. et al. Specific and Randomly Derived Immunoactive Peptide Mimotopes of Mycobacterial Antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 10, p. 1143-1154, 08/17 03/22/received05/04/revised 08/07/accepted 2006. ISSN 1556-6811/1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1595311/> >.
- 129 GEVORKIAN, G. et al. Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. **Biochemical Journal**, v. 387, n. Pt 2, p. 411-417, 04/0507/02/received10/29/revised11/24/accepted 2005. ISSN 0264-6021/1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1134969/> >.
- 130 BARENHOLZ, A. et al. A peptide mimetic of the mycobacterial mannosylated lipoarabinomannan: characterization and potential applications. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 5, p. 579-86, May 2007. ISSN 0022-2615 (Print)0022-2615 (Linking).
- 131 YANG, H. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* based on H37Rv binding peptides using surface functionalized magnetic microspheres coupled with quantum dots - a

- nano detection method for Mycobacterium tuberculosis. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 77-88, 2015. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking).
- ¹³² MARSTON, E. L. et al. Newly characterized species-specific immunogenic Chlamydomonas pneumoniae peptide reactive with murine monoclonal and human serum antibodies. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 2, p. 446-52, Mar 2002. ISSN 1071-412X (Print)1071-412X (Linking).
- ¹³³ MANHANI, M. N. et al. Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 6, p. 322-9, Jun 2011. ISSN 1365-3024 (Electronic)0141-9838 (Linking).
- ¹³⁴ TAN, W. S.; HO, K. L. Phage display creates innovative applications to combat hepatitis B virus. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 33, p. 11650-70, Sep 7 2014. ISSN 2219-2840 (Electronic)1007-9327 (Linking).
- ¹³⁵ ZHOU, M. et al. Identification of a new epitope for HIV-neutralizing antibodies in the gp41 membrane proximal external region by an Env-tailored phage display library. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 2, p. 499-509, Feb 2013. ISSN 1521-4141 (Electronic)0014-2980 (Linking).
- ¹³⁶ SANTOS, P. S. et al. Functional Epitope Core Motif of the *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a and Its Incorporation onto Bioelectrodes for Antibody Detection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33045, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033045 >.
- ¹³⁷ BERGER, S.; BANNANTINE, J. P.; GRIFFIN, J. F. Autoreactive antibodies are present in sheep with Johne's disease and cross-react with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis antigens. **Microbes Infect**, v. 9, n. 8, p. 963-70, Jul 2007. ISSN 1286-4579 (Print)1286-4579 (Linking).
- ¹³⁸ LIM, B. N. et al. Principles and application of antibody libraries for infectious diseases. **Biotechnol Lett**, v. 36, n. 12, p. 2381-92, Dec 2014. ISSN 1573-6776 (Electronic)0141-5492 (Linking).
- ¹³⁹ FERRARA, F. et al. Using phage and yeast display to select hundreds of monoclonal antibodies: application to antigen 85, a tuberculosis biomarker. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49535, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)1932-6203 (Linking).
- ¹⁴⁰ ZHANG, J. L. et al. Screening and evaluation of human single-chain fragment variable antibody against hepatitis B virus surface antigen. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 5, n. 2, p. 237-41, May 2006. ISSN 1499-3872 (Print).
- ¹⁴¹ HOE, L. N.; WAN, K. L.; NATHAN, S. Construction and characterization of recombinant single-chain variable fragment antibodies against Toxoplasma gondii MIC2 protein. **Parasitology**, v. 131, n. Pt 6, p. 759-68, Dec 2005. ISSN 0031-1820 (Print)0031-1820 (Linking).
- ¹⁴² LUNDQUIST, R. et al. Human recombinant antibodies against Plasmodium falciparum merozoite surface protein 3 cloned from peripheral blood leukocytes of individuals with

immunity to malaria demonstrate antiparasitic properties. **Infect Immun**, v. 74, n. 6, p. 3222-31, Jun 2006. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).

- ¹⁴³ MORELAND, N. J. et al. Phage display approaches for the isolation of monoclonal antibodies against dengue virus envelope domain III from human and mouse derived libraries. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 3, p. 2618-35, 2012. ISSN 1422-0067 (Electronic)1422-0067 (Linking).
- ¹⁴⁴ DUAN, T. et al. Human Monoclonal Fab Antibodies Against West Nile Virus and its Neutralizing Activity Analyzed in Vitro and in Vivo. **J Antivir Antiretrovir**, v. 1, n. 1, p. 36-42, Nov 1 2009. ISSN 1948-5964 (Print).
- ¹⁴⁵ UCHTENHAGEN, H. et al. Boosting of HIV-1 neutralizing antibody responses by a distally related retroviral envelope protein. **J Immunol**, v. 192, n. 12, p. 5802-12, Jun 15 2014. ISSN 1550-6606 (Electronic)0022-1767 (Linking).
- ¹⁴⁶ PLEASS, R. J.; HOLDER, A. A. Opinion: antibody-based therapies for malaria. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 11, p. 893-9, Nov 2005. ISSN 1740-1526 (Print)1740-1526 (Linking).
- ¹⁴⁷ BALU, S. et al. A novel human IgA monoclonal antibody protects against tuberculosis. **J Immunol**, v. 186, n. 5, p. 3113-9, Mar 1 2011. ISSN 1550-6606 (Electronic)0022-1767 (Linking).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver peptídeos miméticos de antígenos do *M. leprae* e validar os mesmos como biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico da hanseníase.

Objetivos Específicos

1. Obter um peptídeo mimético ao PGL-1 nativo e validá-lo no diagnóstico da hanseníase;
2. Desenvolver uma plataforma diagnóstica utilizando o PGL-1 mimético para construir um imunossensor por ressonância plasmônica de superfície;
3. Produzir anticorpos scFv contra o PGL-1 mimético e confirmar se este reconhece o alvo;
4. Obter peptídeos miméticos de antígenos do *M. leprae* reativos com IgG e validá-los no diagnóstico e prognóstico da hanseníase;
5. Avaliar se os peptídeos miméticos obtidos são reativos com IgA;
6. Produzir anticorpos monoclonais scFv contra os peptídeos miméticos a fim de mapear antígenos nativos do *M. leprae*;
7. Comparar os peptídeos miméticos com outros alvos por bioinformática.

JUSTIFICATIVA

O diagnóstico precoce da hanseníase representa uma contribuição importante para diminuir a incidência da doença. Para isso é fundamental o desenvolvimento de novas plataformas, que incluam o mapeamento de antígenos com potencial para o imunodiagnóstico. Nesse contexto, destaca-se a padronização de testes que possam revelar os casos subclínicos e permitam o acompanhamento de contatos domiciliares, importantes para o entendimento do perfil epidemiológico da hanseníase. Para isso, a utilização de antígenos específicos do *M. leprae*, que possam ser utilizados em testes sorológicos, tem sido alvo de pesquisas.

O PGL-1 é um importante antígeno que tem sido padronizado em centros de referência para auxiliar no diagnóstico da Hanseníase, especialmente na classificação operacional e monitoramento de contatos. Diante da grande importância dessa molécula existe a restrição da obtenção da mesma em larga escala de forma a ser utilizada em um maior número de investigações em todas as regiões do Brasil. Nesse sentido, nosso trabalho produziu um peptídeo sintético mimético ao PGL-1, desenvolvendo uma plataforma biofotônica que trás contribuições importantes para o diagnóstico da hanseníase, com aplicações reais no SUS. Essa molécula sintética ao PGL-1 tem o mesmo comportamento biológico da molécula nativa e a grande vantagem da facilidade de obtenção em quantidade necessária para o uso em larga escala. Esse peptídeo foi padronizado para imunoenaios de ELISA que podem ser disponibilizados em toda rede de laboratórios do Sistema Único de Saúde em um protocolo de aproximadamente seis horas para o resultado final, com a possibilidade de detecção de anticorpos do tipo IgG e IgM. Além disso, utilizando como antígeno a molécula sintética ao PGL-1, foi desenvolvida uma plataforma nanobiotecnológica, com a construção de um imunossensor, que trás uma perspectiva muito promissora para serem implantados de forma simples em qualquer região do país.

Esse protótipo de plataforma apresenta grande sensibilidade e especificidade, com potencial para distinguir todas as formas clínicas da hanseníase, portanto teria uma aplicação adicional para o SUS, o que representa um avanço frente aos testes convencionais, que normalmente apenas discriminam indivíduos paucibacilares e multibacilares. Essa plataforma também apresenta como novidade a quantificação em tempo real, o que possibilita a determinação de valores de referência e o fácil entendimento clínico.

Também na perspectiva diagnóstica é importante mapear outros antígenos do *M. leprae* que possam complementar ou até serem mais eficientes que o PGL-1. Nesse sentido, algumas proteínas como as de choque térmico podem ser utilizados para este fim. De forma, a serem reconhecidas tanto por anticorpos do tipo IgG ou IgA.

As plataformas para detecção de IgA são bem promissoras, pois utilizam amostras menos invasivas, no caso a saliva. Já é reconhecido que a cavidade oral representa a primeira barreira de contato do *M. leprae* com o hospedeiro, e que neste ambiente há produção de IgA. Assim, peptídeos miméticos de proteínas do patógeno que possam detectar anticorpos são eficientes para complementar o diagnóstico da hanseníase e representam uma importante ferramenta a ser explorada futuramente na prática clínica.

CAPÍTULO II

(Desenvolvimento de uma plataforma biofotônica baseada em peptídeos miméticos de PGL-1 para o diagnóstico da hanseníase.)

Revista: *Clinical Infectious Diseases*

Título: Desenvolvimento de uma plataforma biofotônica baseada em peptídeos miméticos de PGL-1 para o diagnóstico da hanseníase.

Resumo:

Introdução. O PGL-1 é um glicolípido abundante na parede celular de *M. leprae* e tem sido amplamente utilizado na classificação operacional da hanseníase, podendo ser aplicado para diferenciar pacientes paucibacilares e multibacilares, bem como monitorar infecção subclínica em contatos. Contudo, a forma de obtenção natural desse antígeno é insuficiente para o uso na prática clínica. Dessa forma, nosso objetivo foi produzir peptídeos miméticos ao PGL-1 que apresentem características e função semelhantes ao glicolípido nativo, os quais serão explorados em novas plataformas diagnósticas.

Métodos. Para obtenção dos peptídeos utilizamos a tecnologia *phage display* (PD) tendo como alvo um anticorpo monoclonal anti-PGL-1, CS-38. A partir dos cinco peptídeos miméticos obtidos, produzimos uma molécula sintetizada quimicamente (PGL1-M3), que foi validada por ELISA e imunosensor baseado em Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) em soros de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares. Por meio de engenharia reversa, um anticorpo scFv anti-PGL1 mimético também foi selecionado por PD, e validado por ELISA e imuno-histoquímica, afim de confirmar se o PGL-1 nativo é de fato o alvo deste anticorpo.

Resultados. Na dosagem de IgM nas diferentes formas clínicas da hanseníase, o PGL1-M3 sintético apresentou sensibilidade de 89,11% e especificidade de 100,00%. A positividade encontrada em pacientes tuberculóides (TT: 34,3%), lepromatosos (LL: 100,0%) e contatos domiciliares (HC: 22,5%) foram similares ao observado para o PGL1 nativo. O imunosensor também conseguiu

diferenciar todas as formas clínicas de hanseníase ($p < 0,05$), sendo uma importante plataforma diagnóstica com 100% de acurácia. Interessantemente, na detecção de IgG encontrou-se positividade de 60% para TT e 39% para HC. O scFv anti-PGL1-M3 reconheceu o PGL nativo e referendou o peptídeo mimético detectando com precisão o *M. leprae* na imuno-histoquímica.

Conclusão. O peptídeo mimético ao PGL-1 (PGL1-M3) foi utilizado de maneira eficaz em uma nova plataforma biofotônica baseada em SPR para o diagnóstico da hanseníase, e apresenta-se com grande potencial para se tornar uma solução diagnóstica de alta precisão.

Palavras Chave. Glicolípido fenólico; *phage display*; *M. leprae*; Ressonância Plasmônica de Superfície.

INTRODUÇÃO

O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) é um dos principais componentes da parede celular do *M. leprae*[1]. Possui importante papel na patogênese e diagnóstico da hanseníase[2], tendo como determinante antigênico o trissacarídeo da molécula[3]. A presença de anticorpos anti-PGL-1 tem sido correlacionada com o espectro clínico da doença, índice baciloscópico (IB)[4], monitoramento de contatos domiciliares [5-7] e sucesso da poliquimioterapia[2].

Apesar de sua importância, a obtenção do PGL-1 nativo é restrita ao crescimento do *M. leprae* em tatus[8] e camundongos[9], pela inabilidade natural desse patógeno crescer *in vitro*[10]. Dessa forma, a disponibilidade desse antígeno para prática clínica é limitada, abrindo oportunidades para o uso de antígenos sintéticos como ND-O-HSA e ND-O-BSA (dissacarídeos)[11] e NT-P-BSA (trissacarídeo)[12] como alternativa ao PGL1 nativo. Uma possibilidade promissora é a utilização de peptídeos miméticos que apresentem um comportamento similar ao antígeno natural não proteico, embora esta estratégia ainda não tenha sido realizada com sucesso. Peptídeos

miméticos ao PGL-1 foram obtidos, porém não foi comprovada a eficácia dos mesmos para o diagnóstico sorológico da hanseníase[10], daí a necessidade de utilizar novas estratégias.

A tecnologia *phage display* tem sido amplamente utilizada para identificar ligantes de uma infinidade de moléculas[13], como peptídeos e anticorpos. Assim, é possível obter pequenos peptídeos que imitam antígenos, pelo menos em um epítipo particular[14] ou desenvolver biomarcadores utilizando fragmentos de anticorpos Fab (*fragment antigen-binding*) ou ScFv (*single-chain variable fragment*) [15-17].

Uma das grandes vantagens dos peptídeos ou anticorpos obtidos por *phage display* é a flexibilidade de serem utilizados em diferentes plataformas diagnósticas, desde imunoenaios convencionais como ELISA[18], até plataformas nanobiotecnológicas que envolvem imunossensores baseados no princípio da ressonância plasmônica de superfície (SPR) [19].

Imunossensores exploram a capacidade de um anticorpo em reconhecer seu antígeno com alta afinidade e podem ser construídos utilizando a transdução de sinal óptico por SPR, através de um feixe luminoso que atravessa um prisma e alcança uma superfície metálica[20, 21]. Estes imunossensores representam um grande avanço para a construção de plataformas de diagnóstico, permitindo uma análise em tempo real, quantitativa e muito mais sensível que os imunoenaios convencionais[22].

Nesse trabalho, apresentamos um peptídeo mimético do PGL-1 obtido por *phage display*, que foi sintetizado quimicamente e apresentou o mesmo potencial diagnóstico na hanseníase. A validação do peptídeo mimético foi feita tanto por ensaios diretos com soros de uma população de região endêmica, bem como por engenharia reversa, que inclui a produção de um anticorpo scFv anti-PGL-1 mimético com diversos ensaios biológicos confirmatórios.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Todos os pacientes e contatos, bem como os controles negativos, foram recrutados conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo nº 449/10, e termos de consentimento livre e esclarecido foram obtidos de todos. Os pacientes com hanseníase foram classificados segundo Ridley & Jopling (1966)[23] em tuberculóide (TT), *borderline*-tuberculóide (BT), *borderline-borderline* (BB), *borderline*-lepromatoso (BL) e lepromatoso (LL). Para cada forma clínica foram utilizadas amostras de 20 a 35 indivíduos, de acordo com cada ensaio. Todos foram submetidos a um protocolo clínico-laboratorial para diagnóstico e classificação da hanseníase, que inclui realização do teste intradérmico de Mitsuda, ELISA anti-PGL-1 nativo, índice baciloscópico de esfregaço cutâneo e biopsia de lesões de pele para exame histopatológico. Também foram utilizadas 90 amostras de contatos domiciliares (HC) devidamente acompanhados, verificando-se o número de cicatriz vacinal pelo BCG-ID, o resultado do ELISA anti-PGL-1 nativo e do teste de Mitsuda.

Amostras sorológicas de recém-nascidos (n=10), sem histórico materno de hanseníase ou de ser contactante, foram os controles verdadeiros. Para os testes de especificidade utilizou-se soros de pacientes com comprovação clínica e laboratorial de leishmaniose visceral (n=10) e tuberculose pulmonar (n=10).

Phage display de peptídeos

Para realização da técnica foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-PGL1, purificado de camundongos (mAb CS-48) cedido pelo Dr. John Spencer e Dr. Patrick Brennan (Colorado State University/USA).

No primeiro ciclo de *biopanning* a biblioteca de fagos Ph.D.-C7C™ (New England BioLabs® Inc.), na ordem de $1,2 \times 10^{10}$, foi colocada em contato com anticorpos anti-PGL1 (500ng) imobilizados

numa resina de agarose específica (rProtein G Agarose, Invitrogen Life Technologies) previamente bloqueada com PBS-BSA 5%, conforme protocolo descrito por Barbas et al (2001)[24]. Nos próximos dois ciclos os fagos utilizados eram os amplificados do ciclo anterior.

Em cada ciclo de seleção, os fagos ligados ao anticorpo foram eluídos com tampão glicina (0,2M pH 2,2), amplificados e titulados em cultura de *Escherichia coli* ER2738. Os fagos selecionados, obtidos do 3º ciclo não amplificado, foram usados para extração e posterior sequenciamento do DNA utilizando o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing juntamente com primer-96 gIII (Biolabs) no sequenciador MegaBace™ 1000 (GE Healthcare).

Bioinformática e *design* de peptídeos

A dedução *in silico* das sequências de aminoácidos foi realizada pela ferramenta *online* Expasy Translate Tool[25]. No *software* I-TASSER[26] foi feita a modelagem do peptídeo sintético e as estruturas moleculares obtidas foram visualizadas e modificadas no PyMOL 1.5.0.4[27].

Após a dedução da sequência de aminoácidos dos peptídeos expressos na superfície dos fagos realizou-se síntese química comercial dos motivos proteicos (Peptide 2.0) com *design* específico. Para o *design* da molécula sintética utilizamos a estratégia de unir todas as sequências obtidas em um único peptídeo, no qual cada motivo proteico foi intercalado com um espaçador que continha os aminoácidos PPGGGPP. O espaçador com duas prolinas em cada uma das bordas foi desenhado estrategicamente para promover a formação de uma estrutura secundária, aproximando os motivos e favorecendo uma maior reatividade da molécula.

ELISA para validação de peptídeos

Os ensaios de ELISA foram realizados em placas Nunc™ MaxiSorp™ sensibilizadas com 1µg do peptídeo sintético e bloqueadas com PBS-BSA 5%. Os soros de todos os indivíduos testados foram utilizados numa concentração de 1:100. O anticorpo secundário foi anti-IgM ou anti-IgG humana com peroxidase (Sigma-Aldrich) de acordo com o experimento específico.

Para detecção de IgM foram avaliados 90 contatos e 142 pacientes, distribuídos nas formas clínicas TT (35), BT (32), BB (20), BL (20), LL (35). Para detecção de IgG, avaliou-se 10 pacientes de cada forma clínica e 55 contatos.

Ressonância Plasmônica de Superfície

Os ensaios de SPR foram realizados no equipamento SPR Autolab SPRINGER e PGSTAT. Para isso, o peptídeo (0,03 µg/mL) foi imobilizado em um filme polimérico Poly(3-hydroxybenzoic acid) 2,5mM (3-HBA) depositado sobre o eletrodo de ouro através da técnica de Voltametria Cíclica aplicada pelo Autolab PGSTAT. A superfície foi bloqueada com PBS-BSA 0,25% e os soros diluídos 1:100 foram disponibilizados nos sensores e avaliados no equipamento. Parte dos experimentos também foi realizado no equipamento Biacore X (GE Healthcare), seguindo basicamente os mesmos passos do protocolo citado diretamente em polímero de ouro.

Para padronização da técnica foram utilizados *pools* de soros dos pacientes, contatos e recém-nascidos. Posteriormente, os testes individuais foram realizados com amostras de cinco pacientes para cada forma clínica.

Phage display de Anticorpos

A seleção de anticorpos ligantes ao peptídeo sintético que mimetiza o PGL-1 foi realizada utilizando uma biblioteca de scFV fusionada a proteína PIII[28] e de acordo com o protocolo descrito por Barbas et al, 2001[24].

A biblioteca combinatória de scFv, obtida de um *pool* de RNAs de indivíduos não infectados, com diversidade de 2×10^8 , foi amplificada com o auxílio do fago *helper* e devidamente titulada. Para o *biopanning*, placas foram sensibilizadas com 1µg do peptídeo sintético e bloqueadas com TBS-BSA 3%. A biblioteca amplificada (7×10^9) foi colocada em contato com o peptídeo por 1h a 37°C. Após sucessivas lavagens, os fagos ligantes foram eluídos com glicina (0,2M pH 2,2).

Os fagos eluídos foram amplificados em *E. coli* XL1-Blue para extração do plasmídeo que também contém o DNA viral. A extração foi feita com o Kit Miniprep (Qiagen-27106), seguido da eletroporação em *E. coli* TOP-10 F' eletrocompetente. As bactérias transformadas foram plaqueadas e cada colônia foi inoculada em placas *deepwell* contendo meio SB e 2% (v/v) de glicose 2M para obtenção do scFv solúvel. A indução da expressão do ScFv na bactéria foi realizada com 2,5 mM de IPTG (Sigma-I6758). O sobrenadante contendo as moléculas de scFv na forma solúvel foi estocado para ser utilizado em ensaios ELISA.

A partir da obtenção do scFv mais reativo, todos os ensaios foram realizados com o anticorpo purificado em coluna de afinidade de Níquel (HisTrap HP 5ml; GE Healthcare) no HPLC (ÄKTApurifier; GE Healthcare) e concentrado por liofilização.

ELISA para validação de anticorpos

Inicialmente, realizou-se um ensaio ELISA para detectar quais anticorpos haviam sido expressos. Para isso, a placa foi sensibilizada com o sobrenadante que continha o scFv solúvel e bloqueada com PBS-BSA 5%. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-HA com peroxidase (1:2500).

Após a análise do ensaio ELISA de expressão, realizou-se um novo ensaio para detectar a interação com o alvo. A placa foi sensibilizada com 1µg do peptídeo sintético e bloqueada com PBS-BSA 5%. O sobrenadante contendo o scFv foi colocado em contato com a placa, seguido dos mesmos passos utilizados no ELISA anterior.

Após a seleção do scFv mais reativo, outros ensaios de ELISA contra alvos específicos foram realizados, incluindo o PGL-1 nativo, sonicado total do *M. leprae*, extrato proteico total de *L. chagasi* e *M. tuberculosis*. Para estes ensaios o scFv foi purificado e concentrado à 265,8 µg/mL.

Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos foram obtidos de biópsias de pele de pacientes com hanseníase. A montagem dos blocos foi realizada por congelamento utilizando Tissue Tec OCT compound (Sakura) e nitrogênio líquido. Após os cortes, as lâminas foram fixadas em formol 10%. O bloqueio da fosfatase endógena foi realizado com ácido acético 5% e dos sítios inespecíficos com soro de cabra normal 2,5%. A incubação com anticorpo primário scfv puro (265,8 µg/mL) foi realizada *overnight*. Como anticorpo secundário utilizou-se anti-His (GE Healthcare) 1:200 e ainda um anticorpo terciário anti-mouse biotinilado (Jackson Lab 115.065.003) 1:300. As lâminas foram então incubadas com complexo AB+Fosfatase alcalina (1:100) e reveladas com fast red naftol. A contra coloração foi feita com Hemaxotilina de Harris.

Coloração de Ziehl-Neelsen

As lâminas foram coradas com solução fucsina fenicada de Ziehl Neelsen e descoradas com solução álcool ácido (ácido clorídrico fumegante e etanol 95%). A contra coloração foi realizada com azul de metileno.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad prism versão 6. Para comparação entre grupos amostrais foi utilizada Two-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. A determinação de *cutoff* foi feita por análise de curva ROC, inserindo os cálculos de sensibilidade e especificidade e considerando dois grupos, pacientes de todas as formas clínicas da hanseníase e como controles as amostras de recém-nascidos. Para o cálculo do Índice Elisa, o valor da absorbância original foi dividido pelo *cutoff* pré-estabelecido, sendo considerado positivo indivíduos com Índice Elisa superior a 1,0. Foi também utilizado uma análise de regressão linear para comparação entre diferentes testes.

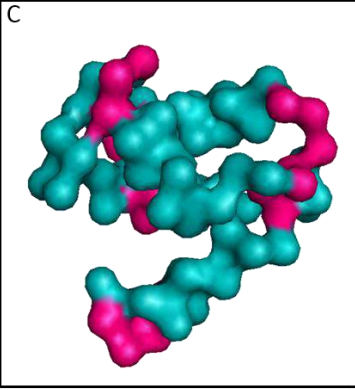
RESULTADOS

A Figura 1A apresenta as sequências de aminoácidos dos peptídeos presentes nos seis diferentes fagos selecionados pelo *biopanning*. A molécula denominada PGL1-M3 é, portanto um peptídeo quimérico construído utilizando as seis sequências intercaladas por espaçadores (Figura 1B). O PGL1-M3 é uma molécula com regiões hidrofóbicas (Figura 1C), dessa forma apresenta características químicas semelhantes ao PGL-1 nativo e também adquire uma conformação tridimensional (Figura 1D) pela presença dos espaçadores e de alguns aminoácidos.

A	Phage	Sequence	Frequency (n)
	P1	HWMLPED	8
	P2	HWFLWDG	1
	P3	HWCLWDG	1
	P4	HWMLPGG	1
	P5	SMSRYGG	1
	P6	SSPIWPS	1

B	Peptide	Design
	PGL1-M3	NH3-P1-PPGGGPP-P2-PPGGGPP-P3-PPGGGPP-P4-PPGGGPP-P5-PPGGGPP-P6-CONH2

C



D

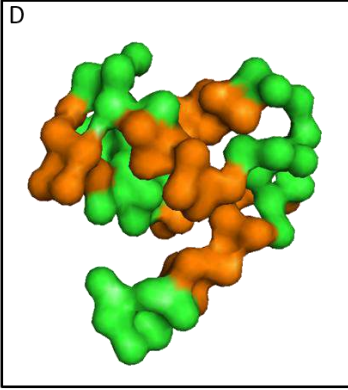


Figura 1: Sequências e design dos peptídeos. A, sequências dos peptídeos no fago com suas respectivas frequências. *n* (número de clones). B, design do peptídeo quimérico PGL1-M3. C e D, estrutura tridimensional do peptídeo PGL1-M3. Rosa (regiões hidrofóbicas), marrom (espaçadores) e verde (sequências do peptídeo).

A dosagem de anticorpos do tipo IgM revelou que o PGL1-M3 apresenta uma sensibilidade de 89,11% e especificidade de 100% (Figura 2B), considerando uma curva ROC com área de 0,9777 (Figura 2C). Quando se avaliou a positividade considerando todas as formas clínicas da hanseníase foi encontrado essencialmente o mesmo comportamento esperado ao se utilizar o PGL-1 nativo, um aumento nos níveis de anticorpos à medida que se aproxima do polo lepromatoso (Figura 2A e 2B). Isso é reforçado quando se correlaciona o PGL1-M3 com o PGL-1 nativo, onde os resultados demonstram uma forte correlação entre os dois, com R^2 de 0,8016 (Figura 2D). No grupo dos

contatos domiciliares a positividade foi de 22,5% em comparação com 12,8% do PGL-1 nativo (Figura 2B).

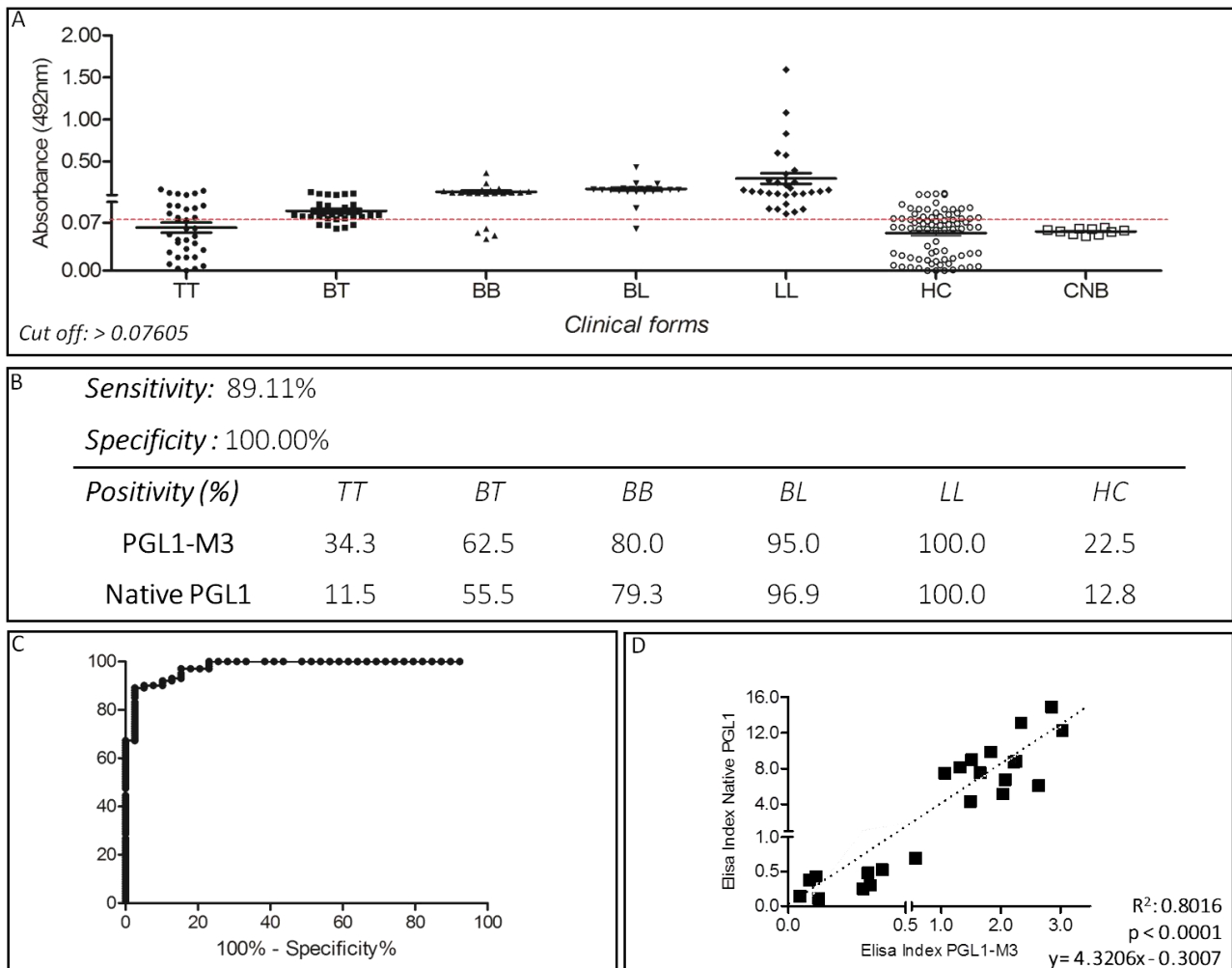


Figura 2: Detecção de anticorpos IgM por ELISA usando o antígeno PGL1-M3. A, gráfico de reatividade do PGL1-M3 com pacientes das diferentes formas clínicas, contatos e recém-nascidos. B, sensibilidade, especificidade e positividade por forma clínica. C, curva ROC. D, correlação linear entre Índice ELISA no PGL1 nativo e Índice ELISA no PGL1-M3. TT (tuberculóide), BT (*borderline*-tuberculóide), BB (*borderline*-*borderline*), BL (*borderline*-lepromatoso) e LL (lepromatoso), HC (contatos domiciliares), CNB (controle de recém-nascido). No quadro D temos que pacientes positivos são aqueles com Índice Elisa (Valor da Absorbância/ *cut off*) maior que 1.

A Figura 3A apresenta a reatividade do PGL1-M3 frente aos soros de pacientes com Leishmaniose visceral (VL) e Tuberculose (TB), a fim de avaliar possibilidade de reação cruzada com essas doenças. Quando comparado aos pacientes lepromatosos à média da absorbância dos

pacientes com VL e TB é duas vezes menor, estando abaixo do valor de corte. O mesmo comportamento foi encontrado para o PGL-1 nativo (Figura 3B).

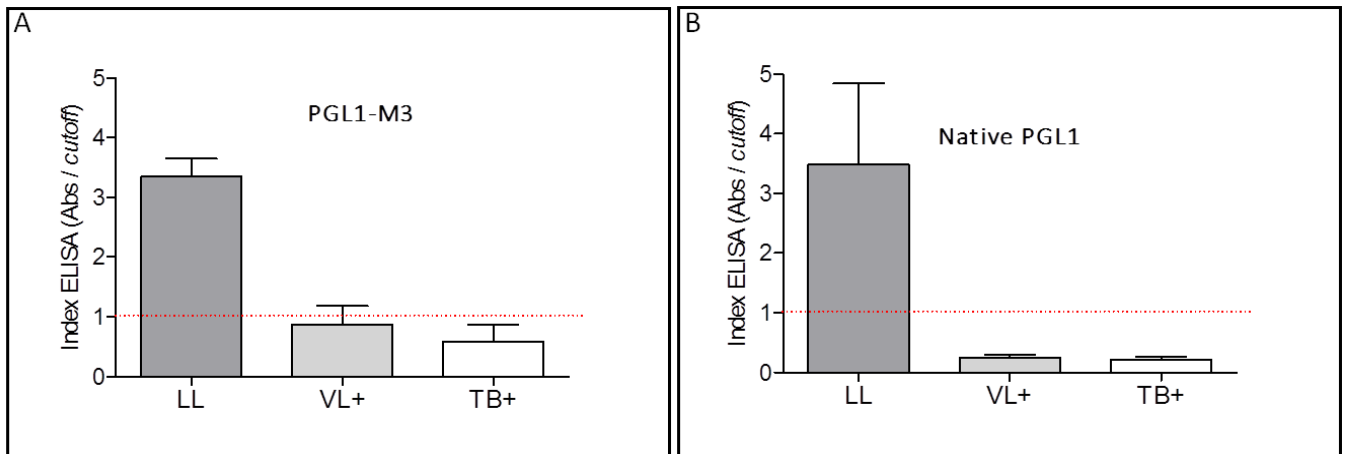


Figura 3: Detecção de anticorpos IgM em pacientes com Leishmaniose visceral e Tuberculose utilizando os antígenos PGL1-M3 e PGL-1 nativo. LL (lepromatoso); VL+ (positivo para Leishmaniose visceral); TB+ (positivo para Tuberculose). Pacientes positivos são aqueles com Índice Elisa (Valor da Absorbância/ *cut off*) maior que 1 (acima da linha vermelha)

Utilizando o PGL1-M3 também foi possível dosar anticorpos do tipo IgG. Na forma clínica TT a positividade foi de 60.0% e em LL de 100.0% (Figura 4A e 4C), com comportamento similar do que é encontrado para IgM, ou seja um aumento gradativo dos níveis de IgG quanto mais próximo do polo LL. A curva ROC com área 0,8977 (Figura 4B) reforça a boa sensibilidade e especificidade do peptídeo, especialmente nas formas multibacilares (MB).

Nos contatos a positividade de IgG anti-PGL1-M3 foi de 39,0%. Ressaltando, que este peptídeo teve maior reatividade em tuberculóides em comparação a dosagem de IgM anti-PGL-1 nativo (11,5%).

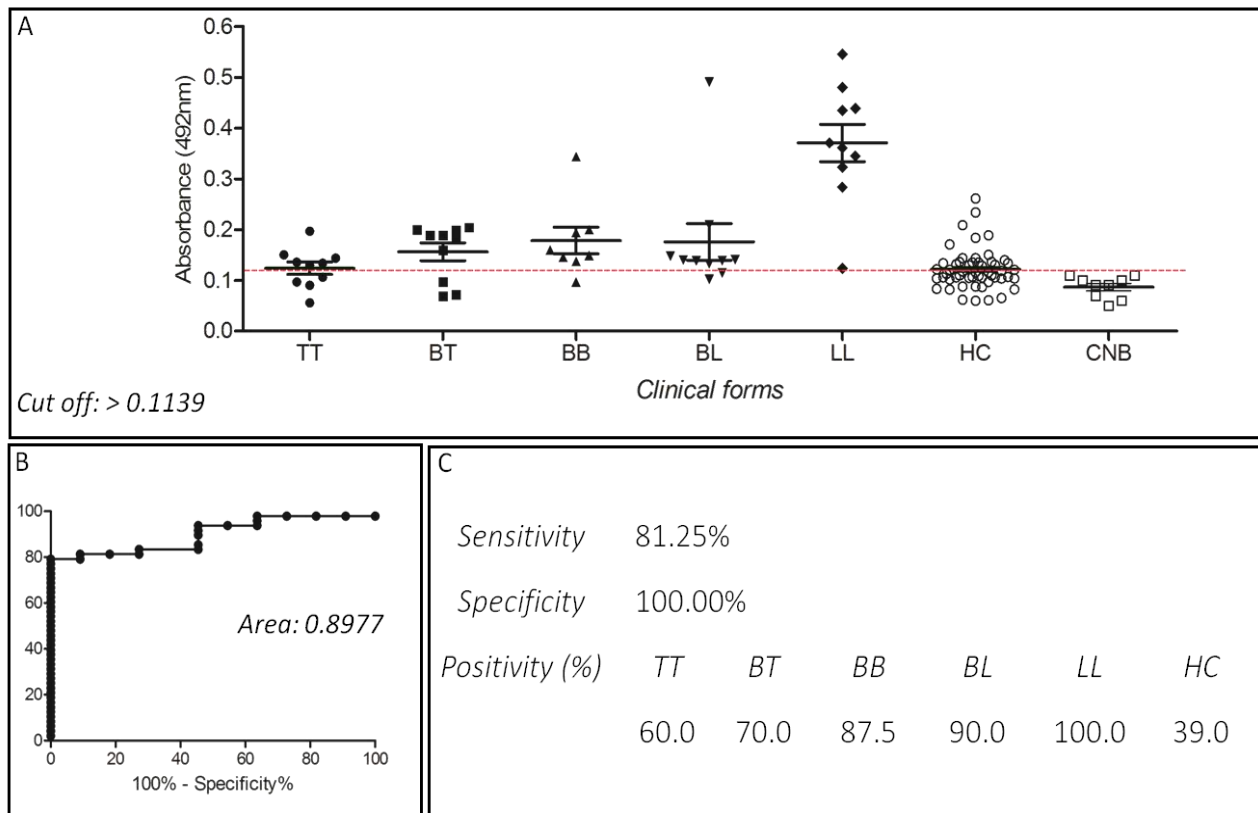


Figura 4: Detecção de anticorpos IgG utilizando PGL1-M3. A, gráfico de reatividade do PGL1-M3 com pacientes das diferentes formas clínicas, contatos e recém-nascidos. B, curva ROC. C, sensibilidade, especificidade e positividade por forma clínica.

Para melhorar a eficiência do diagnóstico foi construído, com o PGL1-M3, um biossensor por SPR. Os resultados evidenciaram variação significativa no ângulo de SPR (Figura 5A), mostrando excelente sensibilidade da técnica para detecção da interação antígeno (PGL1-M3)-anticorpo de pacientes. Através dessa técnica foi possível distinguir todas as formas clínicas da hanseníase, especialmente os paucibacilares (Figura 5C a 5G). E transformar as variações angulares em valores absolutos (Figura 5B).

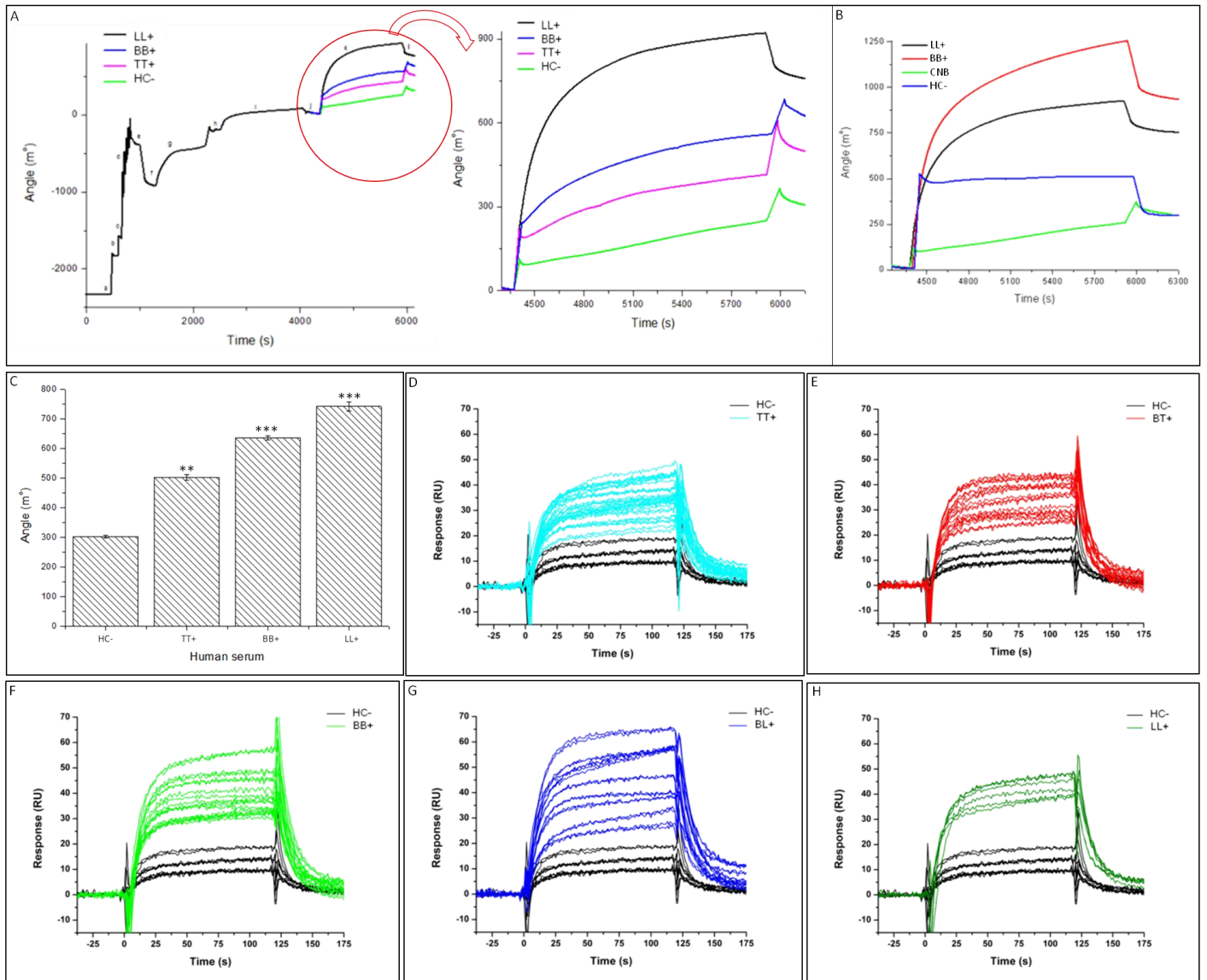


Figura 5: Interação antígeno-anticorpo em pacientes com hanseníase por SPR. A e B, sensorgrama mostra associação entre PGL1-M3 e anticorpos de contatos (HC), pacientes tuberculóides (TT), *borderline-borderline* (BB), lepromatosos (LL) e controles recém-nascidos (CNB). O gráfico mostra o tempo (s) e a variação angular (m°). C, gráfico de barra mostrando a quantificação absoluta da variação angular. ** $p < 0,05$ e *** $p < 0,01$. D, E, F, G, H sensorgrama comparando a reatividade de cada forma clínica com controle negativo (HC-).

Para confirmação que o PGL1-M3 é realmente um peptídeo que mimetiza as funções do PGL-1 nativo foi produzido um anticorpo scFv anti-PGL1-M3. Dos 30 clones bacterianos que foram transformados a fim de expressarem um anticorpo scFv específico, apenas o clone G1 conseguiu produzir o anticorpo de forma significativa (Figura 6A). Foi demonstrado também que o anti-PGL1-M3 G1 reconhece o alvo de forma expressiva ($p < 0,001$) em relação aos outros anticorpos expressos (Figura 6B).

O scFv anti-PGL1-M3 G1 reconhece não só o PGL1-M3 de forma significativa ($p < 0,001$), como também o PGL-1 nativo ($p < 0,005$) e um sonicado celular total do *M. leprae* ($p < 0,001$). O anticorpo não apresentou interação significativa com extratos proteicos de *L. chagasi* e *M. tuberculosis* (Figura 6C), comprovando que o mesmo é específico para reconhecer o PGL1 do *M. leprae*. Na estrutura do PGL-1 tem-se que o determinante antigênico é o trissacarídeo presente na molécula. A Figura 6D comprova que o scFv produzido reconhece a molécula sintética ND-O-HSA (dissacarídeo natural-octil-HSA).

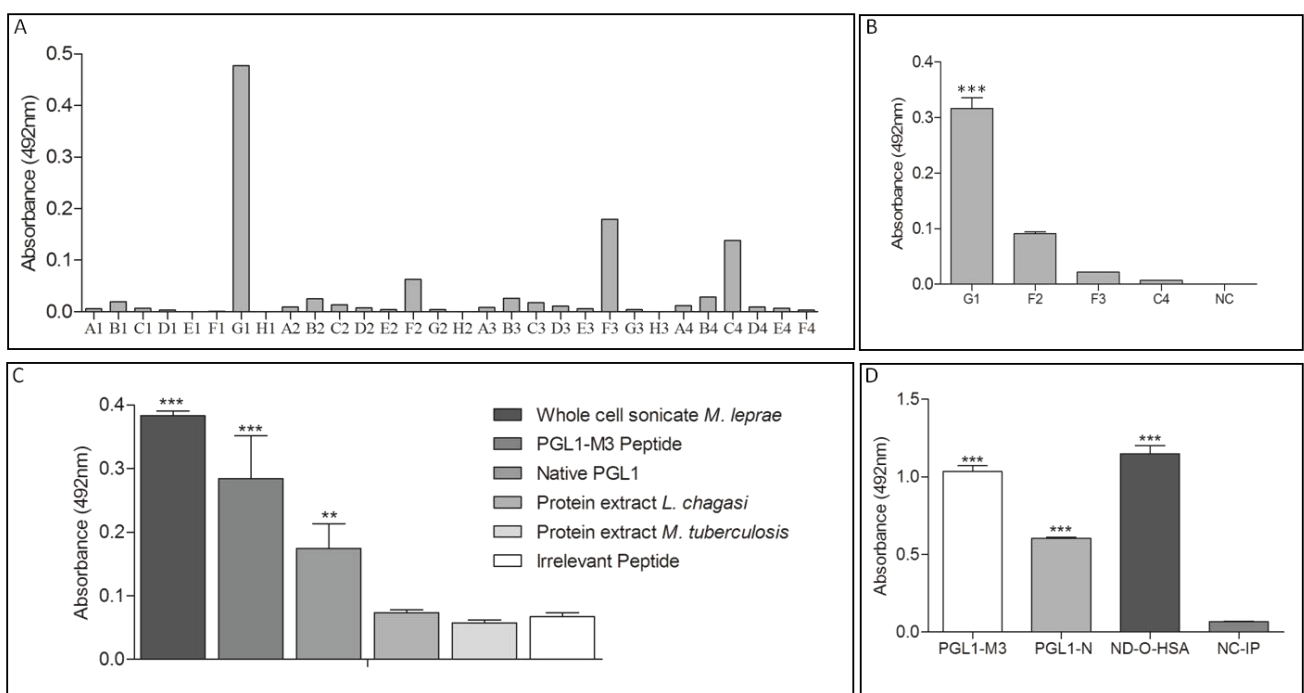


Figura 6: Anticorpo scFv anti-PGL1-M3. A, anticorpos scFv expressos em *E. coli top-10*. B, anticorpos expressos que reconhecem o PGL1-M3. C e D, interação do anti-PGL1-M3 com diferentes antígenos. PGL1-N (PGL-1 nativo); ND-O-HAS (dissacarídeo natural octil HSA); NC-IP (controle negativo/peptídeo irrelevante). ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

A figura 7 apresenta os resultados da imuno-histoquímica realizada em biopsias de pele de um paciente lepromatoso, onde a presença do bacilo foi confirmada pela coloração de Ziehl-Neelsen (Figura 7A). O resultado demonstrou que houve marcação no tecido deste paciente (Figura 7B), comprovando que o anticorpo reconheceu o *M. leprae*. O controle da reação (corte do paciente LL sem scFv primário) foi negativo (Figura 7C).

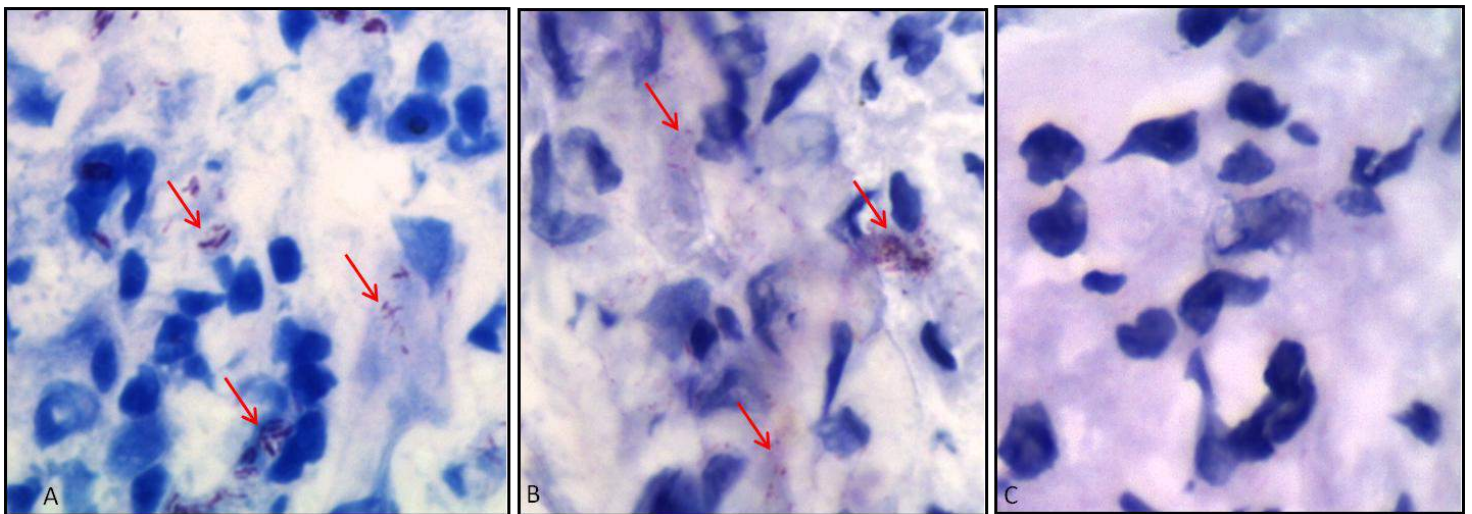


Figura 7: Imuno-histoquímica de biopsias de pele utilizando o scFV anti-PGL1-M3. A, identificação do *M. leprae* utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen. B, marcação positiva do anti-PGL1-M3. C, controle da reação sem scFv. As setas vermelhas indicam as áreas com marcação.

DISCUSSÃO

O nosso trabalho produziu um peptídeo mimético ao PGL-1, desenvolvendo uma plataforma biofotônica que trás contribuições importantes para o diagnóstico da hanseníase.

O PGL-1 é um importante antígeno do *M. leprae*, representando até 3% do peso total do bacilo[29] e seu papel como marcador sorológico já foi descrito na literatura[30]. Os níveis de PGL-1 se correlacionam com IB, sendo altamente detectado em pacientes multicilíares[31]. Além, do PGL1 ter um importante papel no monitoramento do tratamento poliquimioterápico[2]. Em contatos, tem sido utilizado como marcador de infecção subclínica[3, 5-7].

O uso do PGL-1 na prática clínica tem sido cada vez maior devido a sua importância, porém existe uma problemática em torno da capacidade de produção da molécula nativa em larga escala. Diante dessa dificuldade, surge como alternativa a produção de peptídeos miméticos que consigam desempenhar as mesmas funções naturais do PGL-1 nativo. A primeira e única tentativa de obter peptídeos miméticos ao PGL-1 por *phage display* foi sem sucesso e mostrou-se ineficaz para o diagnóstico sorológico da hanseníase[10] talvez por ter sido usado um anticorpo sem a devida confirmação de especificidade ao alvo.

O potencial diagnóstico do peptídeo mimético encontrado nesse estudo pode ser explicado inicialmente pelas características químicas da molécula produzida. As regiões hidrofóbicas encontradas no peptídeo PGL1-M3 estariam mimetizando as estruturas lipídicas do PGL-1, esse tipo de característica foi relatada para um peptídeo mimético do antígeno AMA1 de *Plasmodium falciparum*, que também possui um sulco hidrofóbico[32]. A inserção de prolínas nos espaçadores do PGL1-M3, foi fundamental para que esta molécula adquirisse uma estrutura conformacional, importante para interação antígeno e anticorpo. Esse aminoácido possui um anel saturado que favorece uma ligação peptídica forte, o que garante uma preferência conformacional[33].

Assim, estamos diante de uma estrutura proteica que funcionalmente age como um glicolípido. Muitos trabalhos também relatam peptídeos biologicamente ativos mimetizando estruturas lipídicas[34, 35]; inclusive LAM (lipoarabinomanana) de *M. tuberculosis*[36] e outros peptídeos obtidos por *phage display* também miméticos de LAM[37].

A positividade do PGL1-M3, quando detectou-se IgM, nas formas clínicas BB, BL e LL (80, 95 e 100%) segue os mesmos padrões relatados na literatura quanto ao PGL-1 nativo[6]. Resumidamente, o PGL-1 nativo apresentou soropositividade para MB de 78%, variando de 51,2% a 97,4%[30] e nos testes com os derivados sintéticos, a soropositividade para MBs foi de 76,36% para o ND-O-HSA ELISA[3], 97,4% para o NT-P-BSA ML-Flow [38] e 87,2%[39], corroborando os nossos achados com o PGL1-M3 de 92,5%.

Para o grupo PB, observa-se na literatura uma variação da soropositividade de 9% a 31,82%[3, 6, 39, 40] no ELISA PGL-1 nativo, enquanto que o PGL1-M3 apresentou positividade de 34,3% para TT, muito próximo do encontrado para o ND-O-HSA ELISA[3] e ML-Flow HSA[38]. O PGL1-M3 também mostrou-se um importante marcador de infecção, pois detectou 22,5% dos contatos, um índice igual ou maior do que tem sido encontrado na literatura para ELISA PGL-1 nativo, que é de até 10% a 25%[5, 6, 41].

Os ensaios ELISA sinalizaram a grande eficiência do PGL1-M3 melhorando sensivelmente o desempenho com o desenvolvimento de um biossensor utilizando a tecnologia biofotônica SPR, que representa uma grande inovação na utilização do PGL1-M3 como plataforma diagnóstica. O SPR combina a seletividade do reconhecimento molecular de biomoléculas e a alta sensibilidade do transdutor de sinal[42], e como resultado obtém-se uma análise em tempo real muito mais sensível que os imunoenaios convencionais[43]. Por isso, foi possível detectar anticorpos utilizando quantidades mínimas do peptídeo (0,03 µg) e ainda diferenciar claramente todas as formas clínicas da hanseníase com resultados muito promissores. A versatilidade desse tipo de

plataforma tem permitido avaliar a interação de peptídeos miméticos com micobactérias[22], construir imunossensores para hepatites[44], detectar proteínas de saliva[45] e ainda caracterizar a ligação de proteínas humanas com glicoproteínas do *M. leprae*[19]. Uma outra vantagem dessa plataforma é a possibilidade de transformar as variações angulares em valores absolutos, de simples compreensão na prática clínica.

Além da detecção de IgM, o PGL1-M3 também detectou IgG nos pacientes com hanseníase, especialmente em TT (60%), o que poderia estar correlacionado com a resposta celular presente nesse grupo. Trabalho anterior demonstrou que níveis de IgG eram detectados pelo PGL-1 nativo, sendo IgG3 encontrada em pacientes LL com eritema nodoso lepromatoso[46]. IgG1 anti-MSE (sonicado do extrato de *M. leprae*) também foi encontrada com níveis mais elevados em pacientes LL[47], o que poderia justificar a detecção pelo PGL1-M3 de IgG em 100% desse grupo. Enquanto, IgG2 e IgG4 anti-GroES foram mais encontradas em pacientes TT[48]. Dessa forma, acreditamos que IgG1 e IgG3 estariam relacionadas com a disseminação da doença e por isso mais presentes nas formas multibacilares, enquanto IgG2 e IgG4 com o controle, daí a relação com a resposta imune celular. Essa hipótese está fundamentada no mecanismo por trás da *up*-regulação de anticorpos mediada pela IgG2, que regula o aumento da apresentação de anticorpos para células T CD4+, pelos receptores FcγR+ das células apresentadoras de antígenos[49].

Nos contatos a positividade foi de 39%, semelhante ao que ocorre com outros antígenos como LID-1, ML0405 e ML2331[50]. Esses dados, reforçam que a dosagem dessa imunoglobulina é importante para demonstrar exposição mais antiga ao bacilo[51].

Para confirmar se o PGL1-M3 é de fato mimético do PGL-1 nativo, realizamos a engenharia reversa do processo de seleção, ou seja, produzimos um anticorpo contra o peptídeo mimético e verificamos se este anticorpo monoclonal tipo scFv reconheceria a molécula nativa. O uso de *phage display* com bibliotecas scFv é uma poderosa ferramenta para a descoberta de ligantes

específicos e para validar plataformas diagnósticas [14], como para tuberculose [15] e malária [16]. O scFv produzido interagiu não somente com o PGL-1 nativo, como também com antígeno sintético ND-O-HSA, indicando que a interação ocorre na região antigênica do PGL-1, que é única e específica do *M. leprae* [2], corroborando os resultados do mimetismo do peptídeo PGL1-M3 ao PGL-1, tanto na região lipídica quanto no trissacarídeo dessa molécula.

Os dados da imuno-histoquímica confirmam que o anticorpo ScFv reconheceu o *M. leprae* em biopsias de pele, como foi demonstrado o bacilo com anti-PGL-1 monoclonal em amostras de nervo[52]. Vale salientar que a utilização de frações de anticorpos produzidos por *phage display* tem sido descritos na literatura em ensaios de imuno-histoquímica [17, 28, 53].

O presente trabalho apresenta uma proteína quimérica constituída por múltiplos epítomos miméticos ao PGL-1 nativo do *M. leprae*, com validação química e biológica, e com grande potencial de aplicação em imunoenaios convencionais e imunossensores para o diagnóstico da hanseníase, podendo substituir o PGL-1 nativo, inclusive na classificação operacional. Mais importante ainda foi a sua utilização em plataforma biofotônica, que permitiu a detecção em 100% dos pacientes, indicando que novos sensores podem contribuir para um diagnóstico mais eficaz e nas políticas públicas de saúde.

REFERENCIAS

1. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell* **2000**; 103:511-24.
2. Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Leprosy review* **2011**; 82:344-57.
3. Lobato J, Costa MP, Reis Ede M, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Leprosy review* **2011**; 82:389-401.
4. Schuring RP, Moet FJ, Pahan D, Richardus JH, Oskam L. Association between anti-pGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. *Leprosy review* **2006**; 77:343-55.
5. Bazan-Furini R, Motta ACF, Simão JCL, et al. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2011**; 106:536-40.
6. Araújo S, Lobato J, Reis ÉdM, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2012**; 107:55-9.
7. Cabral PBe, Júnior JEC, Macedo ACd, et al. Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal *Mycobacterium leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy. *International Journal of Infectious Diseases* **2013**; 17:e1005-e10.
8. Kirchheimer WF, Storrs EE. 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. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* **1971**; 39:693-702.
9. Levy L, Ji B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Leprosy review* **2006**; 77:5-24.
10. Youn JH, Myung H-J, Liav A, et al. Production and characterization of peptide mimotopes of phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **2004**; 41:51-7.
11. 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 disaccharide-octyl-neoglycoprotein. *Carbohydrate research* **1986**; 156:39-56.
12. Fujiwara T, Izumi S. Synthesis of the Neoglycoconjugates of Phenolic Glycolipid-related Trisaccharides for the Serodiagnosis of Leprosy. *Agricultural and Biological Chemistry* **1987**; 51:2539-47.
13. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, NY)* **1985**; 228:1315-7.
14. Goulart LR, Vieira CU, Freschi AP, et al. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. *Critical reviews in immunology* **2010**; 30:201-22.
15. Fuchs M, Kämpfer S, Helmsing S, et al. Novel human recombinant antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B. *BMC Biotechnology* **2014**; 14:68-.
16. Leow CH, Jones M, Cheng Q, Mahler S, McCarthy J. Production and characterization of specific monoclonal antibodies binding the *Plasmodium falciparum* diagnostic biomarker, histidine-rich protein 2. *Malaria Journal* **2014**; 13:277-.
17. Araujo TG, Paiva CE, Rocha RM, et al. A novel highly reactive Fab antibody for breast cancer tissue diagnostics and staging also discriminates a subset of good prognostic triple-negative breast cancers. *Cancer letters* **2014**; 343:275-85.
18. Rojas G, Tundidor Y, Infante YC. High throughput functional epitope mapping: revisiting phage display platform to scan target antigen surface. *mAbs* **2014**; 6:1368-76.
19. Kim HJ, Brennan PJ, Heaslip D, Udey MC, Modlin RL, Belisle JT. Carbohydrate-Dependent Binding of Langerin to SodC, a Cell Wall Glycoprotein of *Mycobacterium leprae*. *Journal of bacteriology* **2015**; 197:615-25.

20. Periasamy AP, Umasankar Y, Chen SM. Nanomaterials - acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors: a review. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2009**; 9:4034-55.
21. Kretschmann E. The determination of the optical constants of metals by excitation of surface plasmons. **1971**.
22. Ngubane NAC, Gresh L, Ioerger TR, et al. High-Throughput Sequencing Enhanced Phage Display Identifies Peptides That Bind Mycobacteria. *PLoS ONE* **2013**; 8:e77844.
23. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* **1966**; 34:255-73.
24. Barbas CF. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2001**.
25. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research* **2003**; 31:3784-8.
26. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Meth* **2015**; 12:7-8.
27. Schrodinger, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*, **2010**.
28. Carneiro AP, Reis CF, Morari EC, et al. A putative OTU domain-containing protein 1 deubiquitinating enzyme is differentially expressed in thyroid cancer and identifies less-aggressive tumours. *Br J Cancer* **2014**; 111:551-8.
29. Gaylord H, Brennan PJ. Leprosy and the leprosy bacillus: recent developments in characterization of antigens and immunology of the disease. *Annual review of microbiology* **1987**; 41:645-75.
30. Moura RSd, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2008**; 41:11-8.
31. Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infection and immunity* **1983**; 41:1077-83.
32. Alam A. Bioinformatic Identification of Peptidomimetic-Based Inhibitors against *Plasmodium falciparum* Antigen AMA1. *Malaria Research and Treatment* **2014**; 2014:8.
33. Lin YJ, Chang CH, Horng JC. The impact of 4-thiaproline on polyproline conformation. *The journal of physical chemistry B* **2014**; 118:10813-20.
34. Eggink L, Hooper JK. A biologically active peptide mimetic of N-acetylgalactosamine/galactose. *BMC Research Notes* **2009**; 2:23.
35. Reddy ST, Navab M, Anantharamaiah GM, Fogelman AM. Apolipoprotein A-I mimetics. *Current Opinion in Lipidology* **2014**; 25:304-8.
36. Barenholz A, Hovav AH, Fishman Y, Rahav G, Gershoni JM, Bercovier H. A peptide mimetic of the mycobacterial mannosylated lipoarabinomannan: characterization and potential applications. *Journal of medical microbiology* **2007**; 56:579-86.
37. Sharma A, Saha A, Bhattacharjee S, Majumdar S, Das Gupta SK. Specific and randomly derived immunoactive peptide mimotopes of mycobacterial antigens. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **2006**; 13:1143-54.
38. Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, et al. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. *Journal of Clinical Microbiology* **2003**; 41:1991-5.
39. Moura RS, Penna GO, Fujiwara T, et al. Evaluation of a rapid serological test for leprosy classification using human serum albumin as the antigen carrier. *Journal of immunological methods* **2014**; 412:35-41.
40. Hungria EM, Oliveira RM, Souza AL, et al. Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2012**; 107 Suppl 1:104-11.
41. Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate J, Manrique-Hernández R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2008**; 103:332-6.
42. Kumbhat S, Sharma K, Gehlot R, Solanki A, Joshi V. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2010**; 52:255-9.

43. Robinson GA. Optical immunosensing systems--meeting the market needs. *Biosensors & bioelectronics* **1991**; 6:183-91.
44. Villiers MB, Cortay JC, Cortes S, et al. Protein/peptide arrays to detect anti-Delta genotype 1, 6, 8 specific antibodies among Hepatitis D Virus infected patients by surface plasmon resonance imaging. *J Clin Microbiol* **2015**.
45. Musso J, Buchmann W, Gonnet F, et al. Biomarkers probed in saliva by surface plasmon resonance imaging coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in array format. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2015**; 407:1285-94.
46. Beuria MK, Parkash O, Joshi B, Mohanty KK, Katoch K, Sengupta U. Levels of IgG subclasses in active and inactive cases in the disease spectrum of leprosy. *International archives of allergy and immunology* **1998**; 115:61-6.
47. Dhandayuthapani S, Izumi S, Anandan D, Bhatia VN. Specificity of IgG subclass antibodies in different clinical manifestations of leprosy. *Clinical and experimental immunology* **1992**; 88:253-7.
48. Hussain R, Shahid F, Zafar S, Dojki M, Dockrell HM. 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* **2004**; 111:462-71.
49. Getahun A, Dahlstrom J, Wernersson S, Heyman B. IgG2a-mediated enhancement of antibody and T cell responses and its relation to inhibitory and activating Fc gamma receptors. *Journal of immunology* **2004**; 172:5269-76.
50. Duthie MS, Hay MN, Rada EM, et al. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **2011**; 30:1257-65.
51. De Paschale M, Clerici P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World Journal of Virology* **2012**; 1:31-43.
52. Ferreira Medeiros M, Jardim MR, Vital RT, et al. An attempt to improve pure neural leprosy diagnosis using immunohistochemistry tests in peripheral nerve biopsy specimens. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology* : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry **2014**; 22:222-30.
53. Sun M, Shi H, Liu C, Liu J, Liu X, Sun Y. Construction and evaluation of a novel humanized HER2-specific chimeric receptor. *Breast Cancer Research* : BCR **2014**; 16:R61-R.

CAPÍTULO III

(Peptídeos Miméticos que reconhecem IgG/IgA com potencial para o diagnóstico e prognóstico da hanseníase)

Revista: *Plos neglected tropical diseases*

Título: Peptídeos Miméticos que reconhecem IgG/IgA com potencial para o diagnóstico e prognóstico da hanseníase

Resumo

Introdução

O diagnóstico precoce da hanseníase representa uma importante ferramenta para diminuir a incidência da doença, especialmente em países endêmicos como o Brasil. Para isso é fundamental o desenvolvimento de novas plataformas, que incluam o mapeamento de antígenos com potencial para o imunodiagnóstico. Nesse trabalho visamos identificar peptídeos que mimetizam antígenos do *M. leprae* e que sejam promissores como marcadores imunológicos, tanto para detecção de IgG no soro quanto IgA na saliva.

Metodologia

Para identificar os peptídeos imunorreativos foi utilizada a tecnologia de *phage display* tendo como alvo IgG purificada. Os fagos obtidos foram validados por imunoenaios ELISA e aqueles mais reativos foram selecionados. Os peptídeos foram sintetizados e validados por bioinformática e ELISA para detecção de IgG (soro) e IgA (soro e saliva) de pacientes e contatos domiciliares (HC). Para caracterizar o(s) antígeno(s) nativo(s), anticorpos scFv foram selecionados contra os peptídeos sintéticos por *phage display* para imunocaptura dos antígenos nativos e análise por espectrometria de massas.

Resultados

Três peptídeos fusionados aos fagos foram selecionados com base na maior reatividade no soro de pacientes. Os peptídeos foram sintetizados quimicamente e nomeados MPML11, MPML12 e MPML14. A análise de bioinformática revelou que ambos poderiam mimetizar as proteínas GroEL e GroES. O MPML11 apresentou positividade de 52,2% em tuberculóides (TT), 35% em HC e naqueles pacientes com reação tipo 2, conferindo um *odds ratio*=8,25. Os peptídeos MPML12 e MPML14 apresentaram um comportamento muito similar ao PGL1, tendo 100% e 92,85% de positividade em lepromatosos (LL), respectivamente. Interessantemente, detectou-se a presença de IgA nos soros dos pacientes, especialmente nos multibacilares (MBs), que também apresentaram altos níveis de IgA na saliva, assim como naqueles HCs com casos índices MBs.

Conclusão

Os peptídeos MPML11, MPML12 e MPML14 são marcadores promissores para o diagnóstico e prognóstico da hanseníase. MPML11 pode contribuir no diagnóstico de casos paucibacilares e no prognóstico para reação tipo 2. Já MPML12 e MPM14 detectam IgG e IgA, especialmente nas formas MBs, e podem ser importantes no monitoramento de HC.

Sumário do Autor

A hanseníase é uma doença que acomete milhares de pessoas em países endêmicos, como Bangladesh, Índia, Etiópia e Brasil, por isso representa um grave problema de saúde pública, especialmente por que muitos dos indivíduos acometidos, por falta de um diagnóstico precoce, acabam tendo graves incapacidades físicas. Para diminuir o número de casos, é necessário romper com o ciclo de transmissão, que perpassa por identificar indivíduos com infecção subclínica que ainda não desenvolveram a doença, mas são participantes ativos da cadeia epidemiológica. Por isso, é fundamental o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas que atendam as necessidades emergenciais para o controle da hanseníase. Nesse trabalho, objetivamos identificar moléculas a serem utilizadas na detecção de anticorpos como ferramentas diagnósticas. Desenvolvemos e caracterizamos três peptídeos que imitam antígenos específicos do bacilo causador da hanseníase, os quais podem ser utilizados no diagnóstico sorológico com alta sensibilidade e especificidade. Para isso, utilizamos tecnologias modernas e eficientes para descobrir novas moléculas, utilizando plataformas simplificadas que podem ser aplicadas em qualquer centro de referência em regiões endêmicas, melhorando assim a qualidade do diagnóstico e contribuindo para aumentar a cobertura do mesmo. Como consequência essas ferramentas devem auxiliar na diminuição do número de casos da doença, atendendo as metas da Organização Mundial de Saúde.

Introdução

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, dermatoneurológica e incapacitante, que tem como agente causal o *Mycobacterium leprae*[1]. Mesmo com o esforço mundial para eliminar essa doença como um problema de saúde pública[2], o Brasil ainda ocupa o segundo lugar no mundo em número de casos[3]. Nesse sentido, a Organização Mundial de Saúde definiu como estratégia global a redução na incidência de casos novos como prioridade[4], evidenciando a importância do diagnóstico precoce, que visa diminuir a transmissão da doença na comunidade[5], o que inclui diagnosticar corretamente os casos com suspeita da doença e identificar infecção subclínica.

Os testes imunológicos complementares, que incluem a utilização de uma série de antígenos do *M.leprae*, tem representado uma importante ferramenta no diagnóstico da hanseníase. Os antígenos PGL-1 (glicolípido fenólico 1)[6] e seus derivados sintéticos, como ND-O-BSA e NT-O-BSA[7,8], LAM (lipoarabinomanana)[9] e várias proteínas recombinantes, como ML0405 e ML2331[10] são utilizados em imunoensaio ELISA[11] e em testes de fluxo lateral[12], que também incluem plataforma semi-quantitativa acoplada a *smartphone*[13].

Além desses antígenos, é possível utilizar peptídeos miméticos como biomarcadores, por serem pequenas moléculas, de fácil obtenção e síntese, que conseguem imitar antígenos naturais de diferentes patógenos[14], mantendo a especificidade e reatividade dos mesmos.

A tecnologia *phage display*[15] tornou-se uma metodologia largamente utilizada para seleção de peptídeos e anticorpos, representando uma alternativa promissora frente às formas clássicas de identificar proteínas imunogênicas em diferentes patógenos[16], além de ser uma técnica poderosa que seleciona peptídeos com domínios de ligação específicos[17]. Por essa característica, esses peptídeos conseguem detectar anticorpos circulantes formando um complexo antígeno-anticorpo[18] como plataforma diagnóstica.

Antígenos que detectam anticorpos IgG e IgA têm sido muito importantes na hanseníase. A detecção de IgG no soro tem sido relacionada como marcador de prognóstico[19], e também na classificação das formas multibacilares[10]. E a detecção de IgA na saliva tem sido descrita em pacientes multibacilares[20], e representa uma abordagem bastante promissora pela utilização de uma amostra menos invasiva[21].

A utilização de peptídeos miméticos que pudessem identificar comunicantes suscetíveis entre os contatos domiciliares, diferenciando portadores saudáveis e delimitando grupos-alvo com maior risco de desenvolver a doença, representa uma importante estratégia de prevenção. Além disso, o aprimoramento do diagnóstico da hanseníase poderá auxiliar em uma classificação clínica correta e tratamento adequado, evitando recidivas e controlando novos focos de infecção[22]. Nesse sentido, esse trabalho visa mostrar a utilização de peptídeos miméticos, que detectam IgG e IgA em pacientes e contatos, como ferramenta promissora para o diagnóstico e prognóstico da hanseníase, que podem se adequar às diferentes plataformas imunológicas.

Metodologia

Amostragem

Todos os pacientes e contatos, bem como os controles negativos, foram recrutados conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob o protocolo nº 449/10, e termos de consentimento livre e esclarecido foram obtidos de todos. Os pacientes foram classificados conforme Ridley & Jopling (1966) [23] em tuberculóide (TT), *borderline*-tuberculóide (BT), *borderline-borderline* (BB), *borderline*-lepromatoso (BL) e lepromatoso (LL) foram classificadas conforme Ridley & Jopling (1966) [23] e atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase-CREDESH (Uberlândia, Minas Gerais). Todos os pacientes foram submetidos a um protocolo clínico-laboratorial para diagnóstico

e classificação da hanseníase, que inclui realização dos testes de Mitsuda, ELISA anti-PGL-1, PCR de esfregaço dérmico e índice baciloscópico de esfregaço cutâneo e biopsias das lesões para exame histopatológico. O número de amostras de pacientes teve variação de acordo com cada experimento e será descrito separadamente em cada item.

Também foram utilizadas amostras de contatos domiciliares devidamente acompanhados, observando-se a quantidade de cicatrizes vacinais pelo BCG-ID, e exames, como ELISA, *Orange Life* (NDO-LID®), PCR e reação intradérmica de Mitsuda. Amostras sorológicas de recém-nascidos (n=10), sem histórico materno de hanseníase ou de ser contato, foram os controles negativos verdadeiros. Para os testes de especificidade, utilizou-se soros de pacientes com comprovação clínica e laboratorial de Leishmaniose visceral (n=10), Tuberculose (n=10) e Outras Micobacterioses (n=5).

Phage display de peptídeos

O *biopanning* teve como alvo IgG purificada de pacientes tuberculóides (n=10), lepromatosos (n=10) e um grupo de contatos (n=10) com ELISA PGL-1, ML-Flow, PCR em tempo real para detecção de *M. leprae* em sangue negativos e Mitsuda superior a oito milímetros. A purificação foi realizada utilizando uma resina anti-IgG humana-cadeia γ específica (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante, a partir do *pool* dos soros dos pacientes, conforme a classificação, e contatos selecionados.

Para a seleção dos peptídeos miméticos, utilizou-se uma biblioteca Ph.D.-C7™ (New England BioLabs® Inc.), na qual foram realizadas dois *biopannings*, sendo um com IgG de TT e outro com IgG de LL, utilizando como estratégia um passo subtrativo, onde a biblioteca de fagos era exposta as IgGs purificadas do grupo controle (contatos), seguida de uma seleção positiva, no qual os fagos que não se ligaram eram expostos às IgGs de pacientes TT ou LL.

O *biopanning* líquido ocorreu na mesma resina utilizada para purificação das IgGs, seguindo o protocolo descrito por Barbas et al (2001)[24]. Para isso, os anticorpos purificados (300ng) foram colocados em contato com a biblioteca de fagos (1×10^{10}) no primeiro ciclo e nas seleções subsequentes com partículas de fagos amplificados obtidas no ciclo anterior. A mistura fago-anticorpo foi transferida para o tubo contendo a resina previamente bloqueada (PBS-BSA 5%). Os fagos não ligantes foram removidos por sucessivas lavagens, e os ligantes foram eluídos com glicina (0,2M pH 2,2) nos três primeiros ciclos de seleção, e com Mitsudina (bacilos mortos), eluição competitiva, nos dois últimos.

Em cada ciclo os fagos foram amplificados e titulados em cultura de *Escherichia coli* ER2738. Os fagos selecionados, obtidos do 5º ciclo não amplificado, foram usados para extração e posterior sequenciamento do DNA utilizando o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing juntamente com primer - 96 gIII (Biolabs) em MegaBace™ 1000 (GE Healthcare).

ELISA com os peptídeos expressos nos fagos

Nos ensaios ELISA de pré-validação, utilizou-se *pools* com 10 soros de cada grupo de pacientes TT, LL e HC. As placas de microtitulação (Polysorp™) foram sensibilizadas com anticorpo anti-M13 (1 µg) e bloqueadas com PBS-BSA 5%. Foi então adicionado 50µL/poço de sobrenadante dos fagos, seguidos do *pool* de IgGs diluídos 1:100. A anti-IgG humana (1:5000) com peroxidase foi utilizada como anticorpo secundário para a detecção do imunocomplexo.

Os fagos T04, V06 e V13 foram testados com 40 soros de TT, LL e HC. O procedimento foi o mesmo seguido na pré-validação, com exceção da adição dos fagos purificados (1×10^{10}) e dos soros, onde não foi utilizado *pools*, e sim amostras individuais na diluição de 1:100.

Bioinformática e *design* de peptídeos

A dedução *in silico* das sequências de aminoácidos foi realizada pela ferramenta *online* Expsy Translate Tool[25]. Com a obtenção das sequências dos peptídeos expressos na superfície dos

fagos foi realizada uma síntese química comercial dos mesmos (Peptide 2.0). Para isso foi desenhado seis peptídeos sintéticos diferentes (MPML10 a MPML15), sendo dois para cada sequência dos fagos T04, V06 e V13. O primeiro *design* apresentava duas repetições da sequências originais intercaladas com o espaçador GGGs. E o segundo, além das duas repetições houve o acréscimo de oito aminoácidos da proteína PIII do fago.

No software I-TASSER[26] foi feita a modelagem dos peptídeos sintéticos e as estruturas moleculares obtidas foram visualizadas no PyMOL 1.5.0.4[27]. Para testar o alinhamento entre os peptídeos e estruturas tridimensionais de proteínas foi utilizado o programa Pepsurf[28], sendo as estruturas visualizadas no PyMOL. A modelagem da proteína GroEL de *M. leprae* foi realizada no I-Tasser e a estrutura tridimensional de GroES de *M. tuberculosis*[29] está disponível no PDB[30].

ELISA com os peptídeos sintéticos

Os ensaios ELISA foram realizados em placas Nunc™ MaxiSorp™ sensibilizadas com 1µg dos peptídeos sintéticos (MPML11, MPML12 ou MPML14) e bloqueadas com PBS-BSA 5%. Os soros de todos os indivíduos testados foram utilizados na concentração de 1:100 e a saliva diluída 1:5. O anticorpo secundário foi anti-IgG ou anti-IgA humana com peroxidase (Sigma-Aldrich) de acordo com o experimento específico.

Para os três peptídeos, na detecção de IgG foram avaliados 55 contatos e 135 pacientes, distribuídos nas formas clínicas TT (35), BT (25), BB (22), BL (25), LL (28). Já para IgA, tanto na saliva quanto no soro, avaliou-se 10 pacientes de cada forma clínica e 10 contatos.

Foi realizada uma comparação entre os resultados de ELISA, para detecção de IgG, do MPML12 com resultados do teste *Smart Reader NDO-LID*® realizados previamente no laboratório de hanseníase do CREDESH-UFU, em 5 pacientes multibacilares e 30 contatos, considerando indivíduos positivos aqueles com resultados superior ao *cutoff* de 0,8 que foi calculado pela

análise de curva ROC considerando uma população de pacientes multibacilares e contatos domiciliares atendidos em Uberlândia-MG.

Phage display de Anticorpos

Foram realizados três *biopannings* individuais de anticorpos ligantes aos peptídeos sintéticos MPML11, MPML12 e MPML14, utilizando uma biblioteca de scFV fusionada a proteína PIII[31], de acordo com o protocolo descrito por Barbas et al., 2001[24]. Resumidamente, uma biblioteca combinatorial de scFV, com diversidade de 2×10^8 construída a partir de um indivíduo saudável, foi amplificada com o auxílio do fago *helper* e devidamente titulada. Para os *biopannings*, placas foram sensibilizadas com $1 \mu\text{g}$ dos peptídeos sintéticos e bloqueadas com TBS-BSA 3%. A biblioteca amplificada (7×10^9) foi colocada em contato com os peptídeos por 1h a 37°C . Após sucessivas lavagens, os fagos ligantes foram eluídos com glicina (0,2M pH 2,2).

Os fagos eluídos foram amplificados em *E. coli* XL1-Blue para extração do plasmídeo que também contém o DNA viral. A extração foi feita com o Kit Miniprep (Qiagen-27106), seguido da eletroporação em *E. coli* TOP-10 F' eletrocompetente. As bactérias transformadas foram plaqueadas e cada colônia foi inoculada em placas *deepwell* contendo meio SB e 2% (v/v) de glicose 2M para obtenção do scFv solúvel. A indução da expressão do scFv na bactéria foi realizada com 2,5 mM de IPTG (Sigma-I6758). O sobrenadante contendo as moléculas de scFv na forma solúvel foi estocado para ser utilizado em ensaios ELISA.

A partir da obtenção dos scFv mais reativos contra cada peptídeo, todos os ensaios foram realizados utilizando o anticorpo purificado em coluna de afinidade de Níquel (Histrap HP 5ml, GE Healthcare) no HPLC (ÄKTApurifier-GE Healthcare) e concentrado por liofilização.

ELISA para validação de anticorpos

Inicialmente, foi realizado ensaios ELISA para detectar os anticorpos que foram devidamente expressos. Para isso, a placa foi sensibilizada com o sobrenadante que continha o scFv solúvel e bloqueada com PBS-BSA 5%. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-HA com peroxidase (1:2500).

Com o resultado do ensaio ELISA de expressão, foram realizados novos ensaios para detectar a interação com o alvo. A placa foi sensibilizada com 1 μ g dos peptídeos sintéticos (MPML11; MPML12 e MPML14) e bloqueada com PBS-BSA 5%. O sobrenadante contendo o scFv foi colocado em contato com a placa, seguido dos mesmos passos utilizados no ELISA anterior.

Sequenciamento e Bioinformática dos anticorpos

O sequenciamento das cadeias leve (*primer* mmb4) e pesada (*primer* mmb5) dos anticorpos foi realizado utilizando o kit DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing em MegaBaceTM 1000 (GE Healthcare).

Para a dedução das sequências dos anticorpos anti-MPML11 (A1), anti-MPML12 (E3) e Anti-MPML14 (G2) foi utilizado os programas IgBlast[32] e Vbase2[33]. As sequências obtidas foram submetidas ao software I-Tasser[26] e Kotai Antibody Builder[34] para obtenção da estrutura 3D. Em seguida, com o intuito de validar a afinidade da ligação do anticorpo anti-MPML14 com o peptídeo sintético MPML14 e a proteína GroEL, o software PatchDock[35,36] foi utilizado.

Imunoprecipitação e Espectrometria de Massas para captura da proteína nativa

O anticorpo scFv anti-MPML14 foi acoplado em nanopartículas magnéticas *Ni-charged MagBeads* (GenScript) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em seguida, o extrato proteico total do *M. leprae* (1000 μ g/ml) foi colocado em contato com as nanopartículas contendo o anticorpo de interesse por 1 hora à temperatura ambiente. Após, esse período foi realizada sucessivas lavagens (10x) para remoção das proteínas não ligantes. A obtenção das proteínas

específicas ligadas ao anticorpo foi feita por eluição ácida com glicina (0,2M pH 2,2). A proteína presente no eluato foi então identificada por espectrometria de massas.

As análises de espectrometria foram realizadas por redução e alquilação com DTT e iodoacetamida, digestão enzimática com tripsina e cromatografia líquida em UPLC acoplado a eletrospray Quadrupole-Time of Flight (LC-ESI-Q-TOF). A calibração do equipamento foi realizado para 10ppm de precisão e uma resolução de 9300 para íon m/z 588.8692.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad prism versão 6. A determinação de *cutoff* foi feita por análise de curva ROC, inserindo os cálculos de sensibilidade e especificidade e considerando dois grupos, pacientes de todas as formas clínicas e como controles as amostras de recém-nascidos. Para avaliar as chances de desenvolver a doença ou reação adversa, foi realizada uma análise de contingência utilizando o teste Exato de Fisher com cálculo de *ODDS ratio* e intervalo de confiança.

Resultados

Nos dois *biopanning* foram obtidos 77 clones (*dados não mostrados*), sendo que destes 29 foram utilizados na pré-validação com *pools* de soros, onde os fagos V06, V13 e T04 foram os mais reativos (Figuras 1B e 1C) quando se comparou pacientes e contactantes ($p < 0.001$). Estes apresentaram peptídeos expressos, que tiveram suas sequências de aminoácidos estimadas (Figura 1A). As Figuras 1D e 1E, mostram que os fagos V06 e V13 reagem essencialmente com pacientes virchovianos, já o fago T04 tem uma tendência a reconhecer mais tuberculóides (Figura 1F).

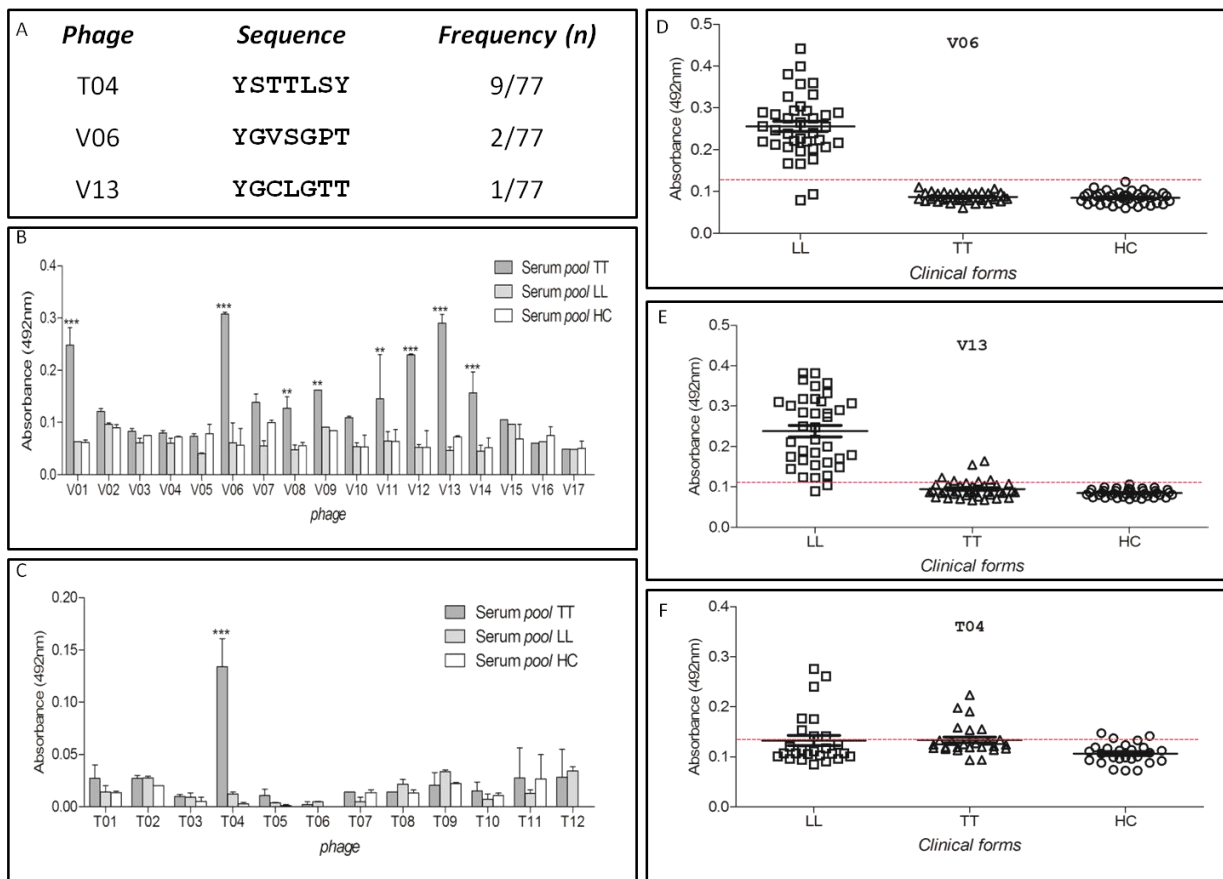


Figura 1: Reatividade dos fagos. A, seqüência e frequência dos peptídeos expressos nos fagos. B e C, pré-validação da reatividade dos fagos testando *pools* de soros de pacientes e contatos. D, E e F, reatividade dos três fagos selecionados na pré-validação testando soros individuais. TT (tuberculóide); LL (lepromatosos); HC (contatos domiciliares).

A partir dos resultados da reatividade dos peptídeos fusionados ao fago, foram desenhados e sintetizados seis peptídeos. O MPML10 e MPML11 referentes ao fago T04 diferem entre si pela adição de uma seqüência de oito aminoácidos da proteína PIII, a mesma estratégia foi utilizada para os peptídeos referentes aos fagos V06 e V13 (Figura 2A).

Os peptídeos MPML10; MPML13 e MPML15 não apresentaram reatividade nos ensaios de ELISA (*dados não mostrados*), por isso foram descartados de análises posteriores. Os peptídeos MPML11, MPML12 e MPML14 apresentaram reatividade significativa e foram selecionados para ensaios posteriores. MPML11 e MPML14 adquiriram uma estrutura conformacional própria em formato globular (Figuras 2B e 2C), enquanto que o MPML12 manteve uma estrutura tridimensional linear (Figura 2D).

A	Phage	Sint. Pep.	Design
T04	MPML10		NH3- YSTTLSYGGGSYSTTLSY -CONH2
	MPML11		NH3- YSTTLSYGGGSYSTTLSYGGGSAETVESCL -CONH2
V06	MPML12		NH3- YGVSGPTGGGSYGVSGPT -CONH2
	MPML13		NH3- YGVSGPTGGGSYGVSGPTAETVESCL -CONH2
V13	MPML14		NH3- YGCLGTTGGGSYGCLGTT -CONH2
	MPML15		NH3- YGCLGTTGGGSYGCLGTTAETVESCL -CONH2

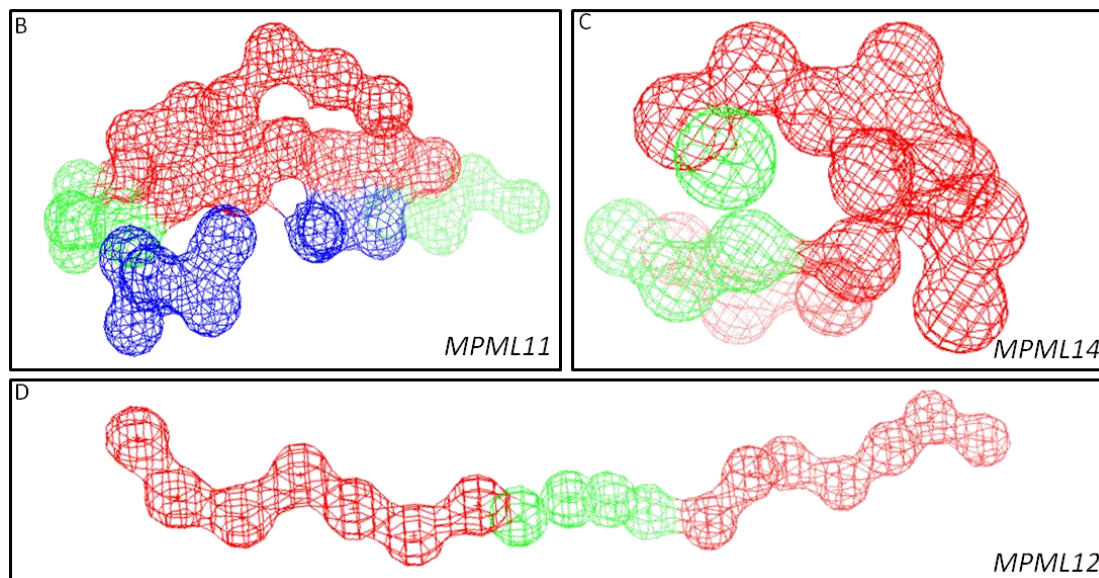


Figura 2: Design e Modelagem dos peptídeos sintéticos. A, sequência dos peptídeos sintéticos construídos a partir do fago. B, C, D, estrutura tridimensional dos peptídeos sintéticos. Em vermelho a sequência do peptídeo; em verde espaçadores; em azul os primeiros oito aminoácidos da proteína PIII do fago.

Os três peptídeos MPML11, MPMP12 e MPML14 alinharam com a proteína GroEL de *M. leprae* em três regiões diferentes da molécula (Figuras 3A, 3B, 3C, 3D), sugerindo que poderiam ser miméticos desta proteína. O alinhamento também ocorreu com a GroES de *M. tuberculosis*, basicamente na mesma região (cadeia A) para os três peptídeos (Figuras 3E, 3F, 3G, 3H).

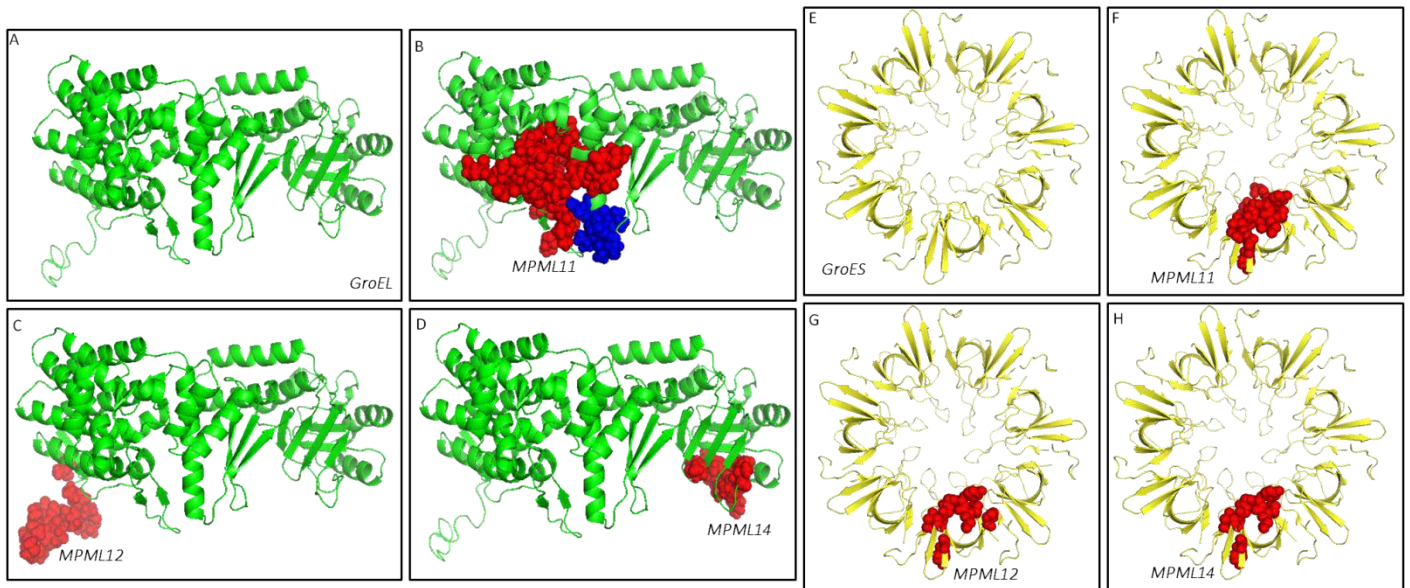


Figura 3: Alinhamento dos peptídeos sintéticos com as proteínas GroES e GroEL. A, B, C e D alinhamento com GroEL de *M. leprae* Br4923. E, F, G, H alinhamento com GroES de *M. tuberculosis*. Em verde GroEL; em amarelo GroES; em vermelho os peptídeos; em azul sequência da proteína PIII do fago.

O peptídeo MPML11, quando avaliou-se a IgG, apresentou uma positividade de 52,2% em TT, 81,9% em LL e 35% em HC, com especificidade de 100%, considerando que a reatividade foi basal para os controles de recém-nascidos (Figura 4A e 4B) e reatividade inferior ao limite do *cutoff* para os pacientes com Leishmaniose Visceral e Tuberculose (Figura 4C).

A positividade para o MPML11 em pacientes multibacilares com reação tipo 2 foi maior que pacientes sem reação (Figura 6), conferindo um *odds ratio* de 8,25 (IC: 1,37 a 49,57). Assim, este peptídeo parece ser um importante marcador de reação.

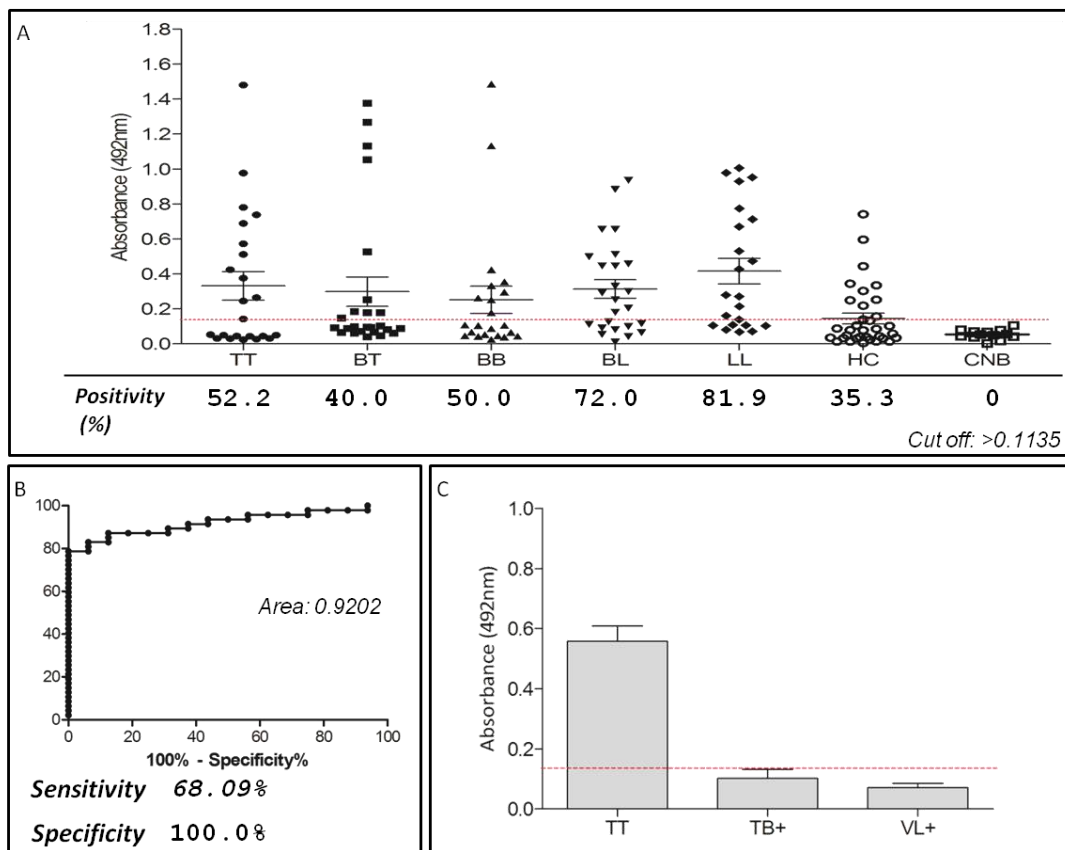


Figura 4: Detecção de anticorpos IgG usando MPML11. A, gráfico de reatividade do MPML11 com pacientes das diferentes formas clínicas, contactos e recém-nascidos. B, sensibilidade, especificidade e positividade por forma clínica. C, detecção de IgG em pacientes com Leishmaniose Visceral (VL+) e Tuberculose (TB+). TT (tuberculóide); BT (*borderline*-tuberculóide); BB (*borderline*-*borderline*); BL (*borderline*-virchoviano); LL (lepromatosos); HC (contactos domiciliares); CNB (controle de recém-nascido).

O peptídeo MPML12 teve um comportamento muito semelhante ao encontrado para outros antígenos do *M. leprae*, como o PGL-1, apresentando maior título de IgG em pacientes multibacilares, com positividade que variou de 11,8% para TT até 100% para LL (Figura 6A), aumentando gradativamente nas formas intermediárias (BT: 48%, BB: 55% e BL: 85,7%), com sensibilidade de 73,40% e especificidade de 100% (Figura 6B). Considerando apenas os pacientes multibacilares, a sensibilidade aumenta para 82,61%. Todos os controles, incluindo recém-nascidos, pacientes com Leishmaniose Visceral, Tuberculose e Outras Micobacterioses foram negativos para este antígeno (Figura 6C). Em contactos a positividade foi de 11,1% (Figura 6A).

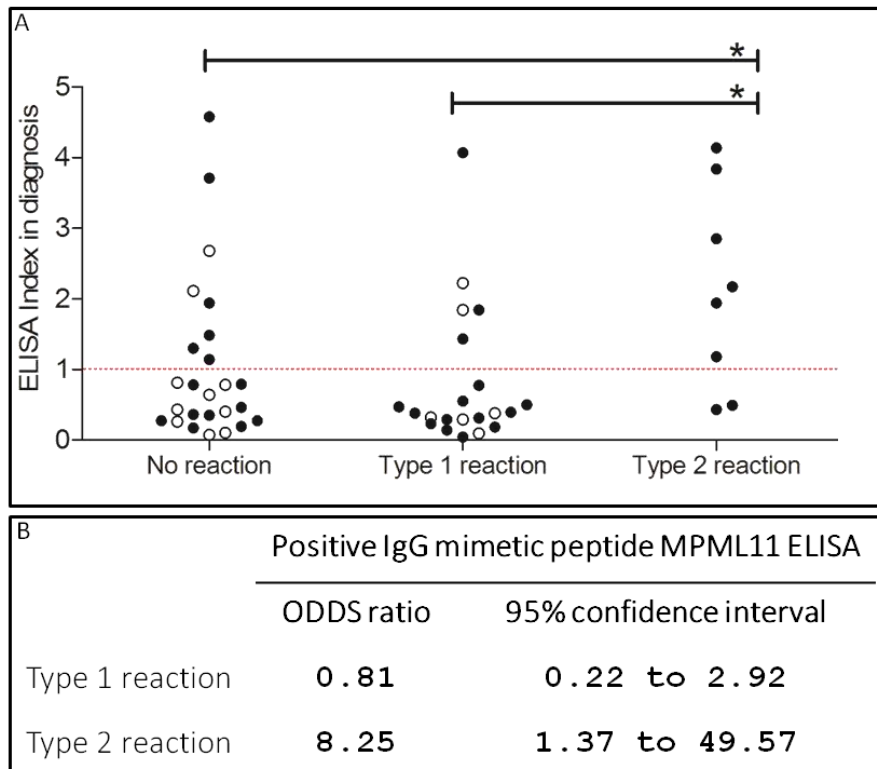


Figura 5: Peptídeo MPML11 e estado reacional. A, gráfico de reatividade de pacientes paucibacilares (círculos brancos) e multibacilares (círculos pretos) que desenvolveram reação tipo 1 ou tipo 2. B, cálculo de chances de risco.

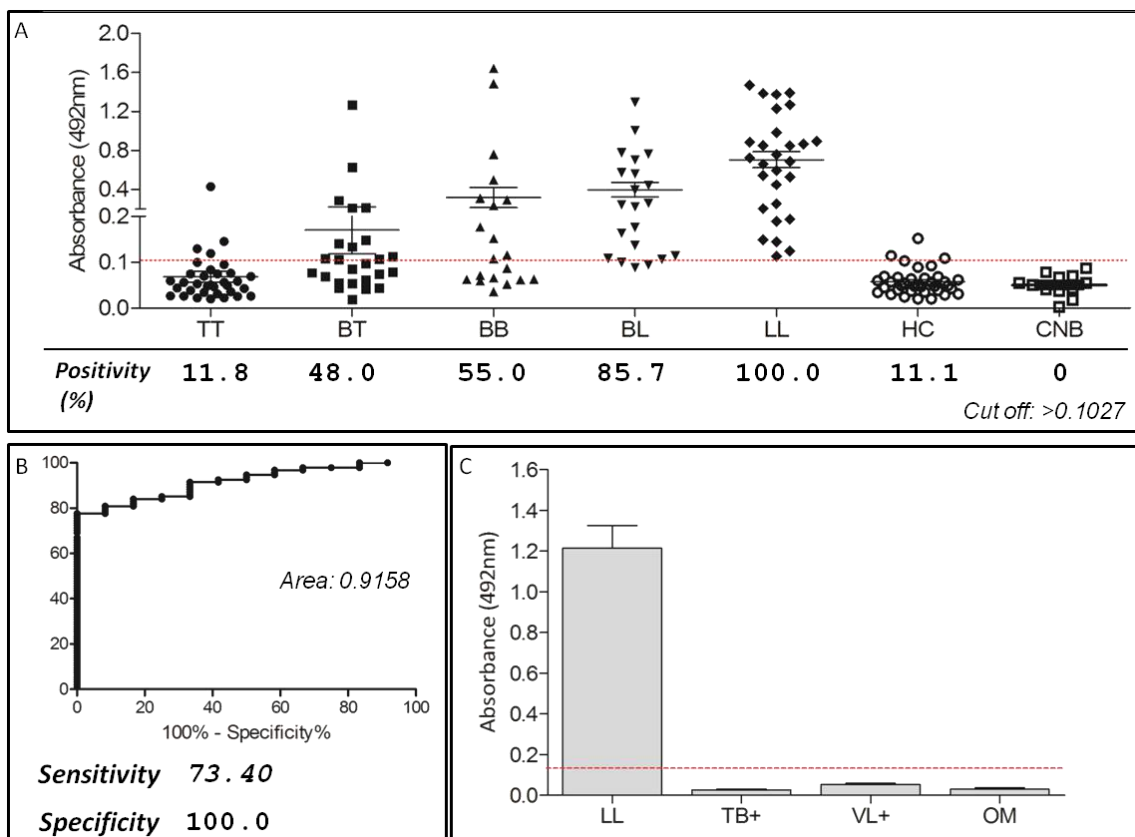


Figura 6: Detecção de anticorpos IgG usando o MPML12. A, gráfico de reatividade do MPML12 com pacientes das diferentes formas clínicas, contactos e recém-nascidos. B, sensibilidade, especificidade e positividade por forma clínica. C, detecção de IgG em pacientes com Leishmaniose Visceral (VL+), Tuberculose (TB+) e Outras Micobacterioses (OM).

A comparação da reatividade do MPML12 com a plataforma *Smart Reader NDO-LID*[®] mostrou uma correlação de 0,7821 ($p < 0,001$) considerando um *cutoff* de 0,1027 para o MPML12 e 0,8 para o *Smart Reader NDO-LID*[®] (Figura 7A). As Figuras 7B e 7C mostram a reatividade do MPML12 e *Smart Reader NDO-LID*[®], respectivamente. O comportamento de ambos são similares, exceto para o grupo HC- que apresentou uma positividade maior (média acima do *cutoff*) para o peptídeo MPML12 (Figura 7C).

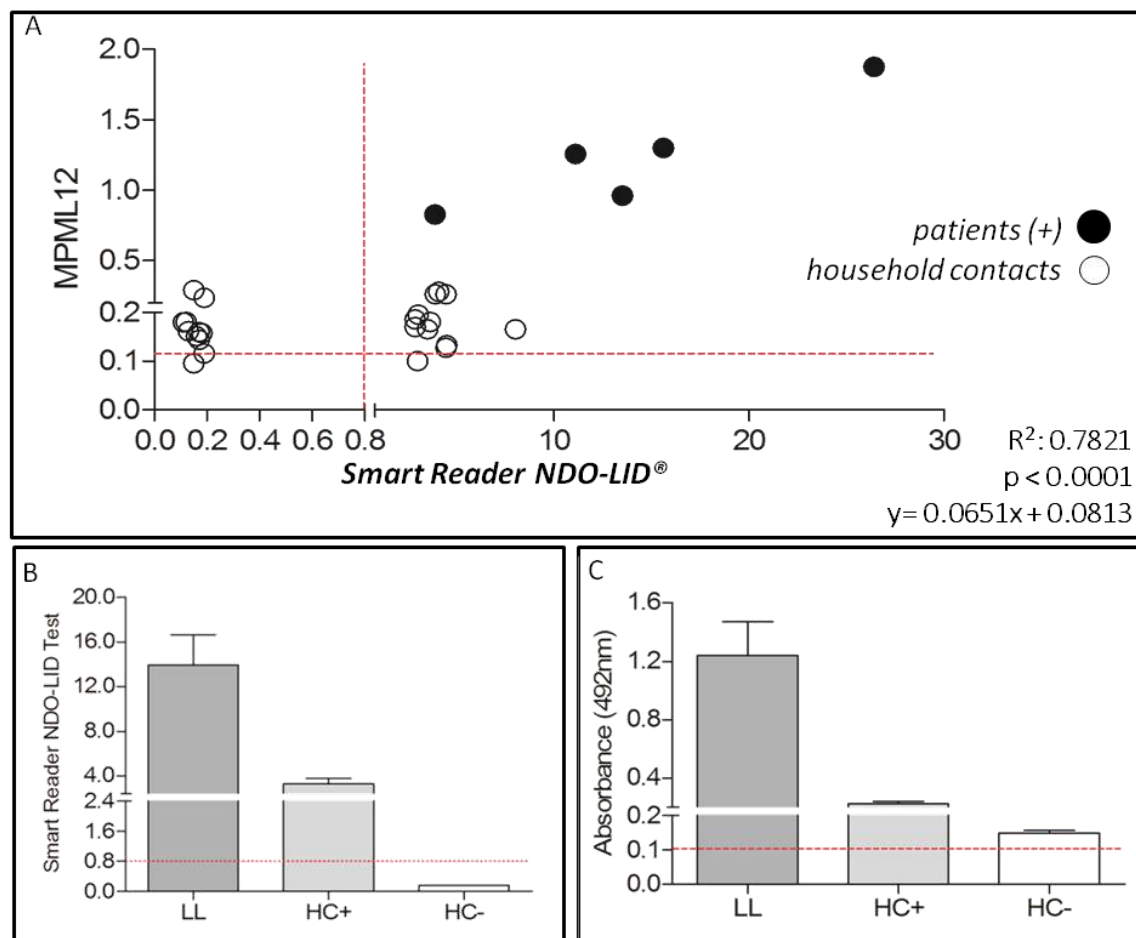


Figura 7: Correlação linear entre MPML12 e *Smart Reader NDO-LID*[®]. A, gráfico de correlação; as linhas em vermelho representam o *cutoff* para MPML12 (0,1027) e *Orange Life* (0,8). B e C, reatividade de contatos para *Smart Reader NDO-LID*[®] e MPML12, respectivamente. LL (lepromatoso); HC+ (contatos positivos no Elisa PGL-1); HC- (contatos negativos no Elisa PGL-1).

O peptídeo MPML14 apresentou um padrão muito parecido com o MPML12, com maiores títulos de IgG nos pacientes multibacilares. Em LL a positividade foi de 92,85%, menor do que a encontrada para MPML12, porém nos grupos TT (20,59%) e BT (72,0%) o MPML14 detectou um

maior número de pacientes (Figura 8A), o que justifica uma positividade de 78,89% (Figura 8B). A reatividade do peptídeo em pacientes com Leishmaniose Visceral, Tuberculose e Outras Micobacterioses foram todas abaixo da linha de *cut off* (Figura 8C), e nos controles de recém-nascidos não houve positividade, apresentando uma especificidade de 100%.

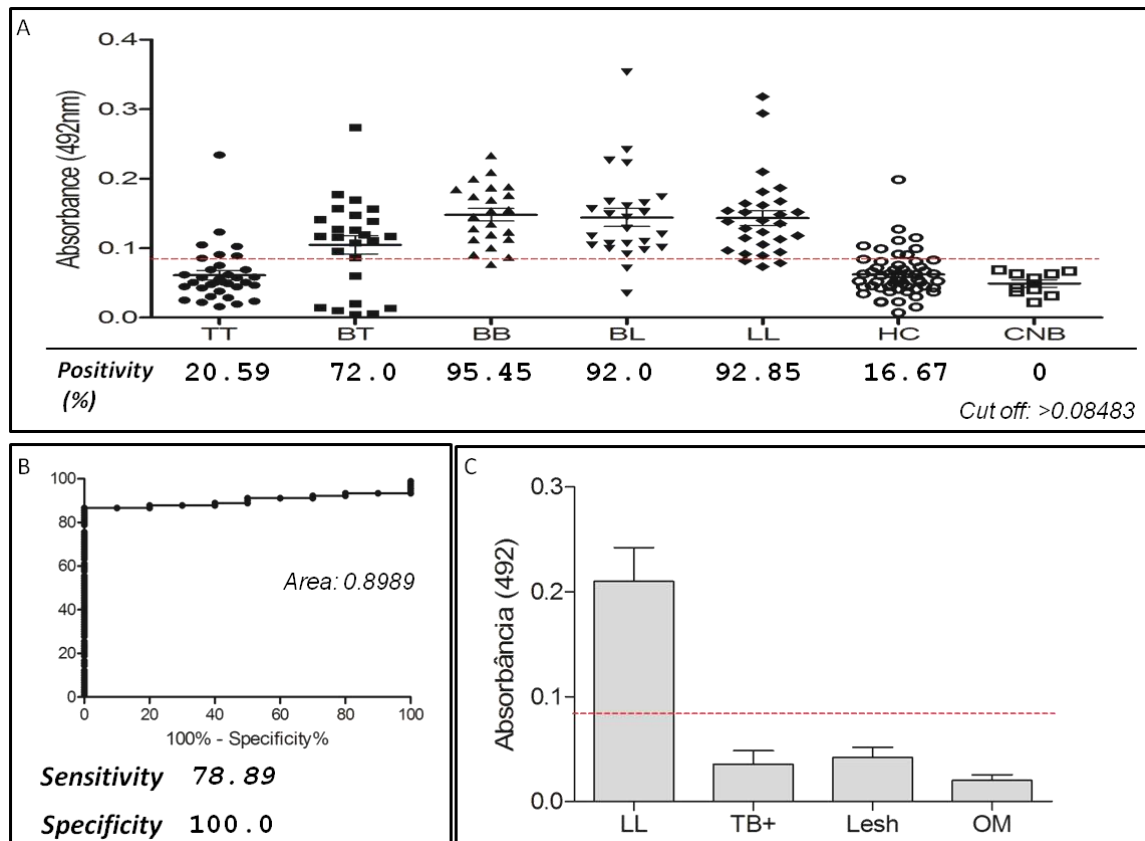


Figura 8: Detecção de anticorpos IgG usando o MPML14. A, gráfico de reatividade do MPML14 com pacientes das diferentes formas clínicas, contactantes e recém-nascidos. B, sensibilidade, especificidade e positividade por forma clínica. C, detecção de IgG em pacientes com Leishmaniose Visceral (VL+) e Tuberculose (TB+) e Outras Micobacterioses (OM).

A detecção de IgA no soro, demonstrou para o MPML11 um comportamento muito variável entre os grupos, sendo os multibacilares os mais reativos (Figura 9A). Já os peptídeos MPML12 e MPML14 apresentaram um aumento gradativo de títulos de IgA à partir polo TT (média abaixo do *cutoff*) em direção ao polo LL, com média três vezes maior acima do *cutoff* (Figuras 9B e 9C). A IgA na saliva foi avaliada, verificou-se um comportamento muito semelhante dos três peptídeos

avaliados, destacando-se particularmente a alta reatividade dos pacientes lepromatosos e dos contatos onde o caso índice é multibacilar (Figuras 9D, 9E, 9F).

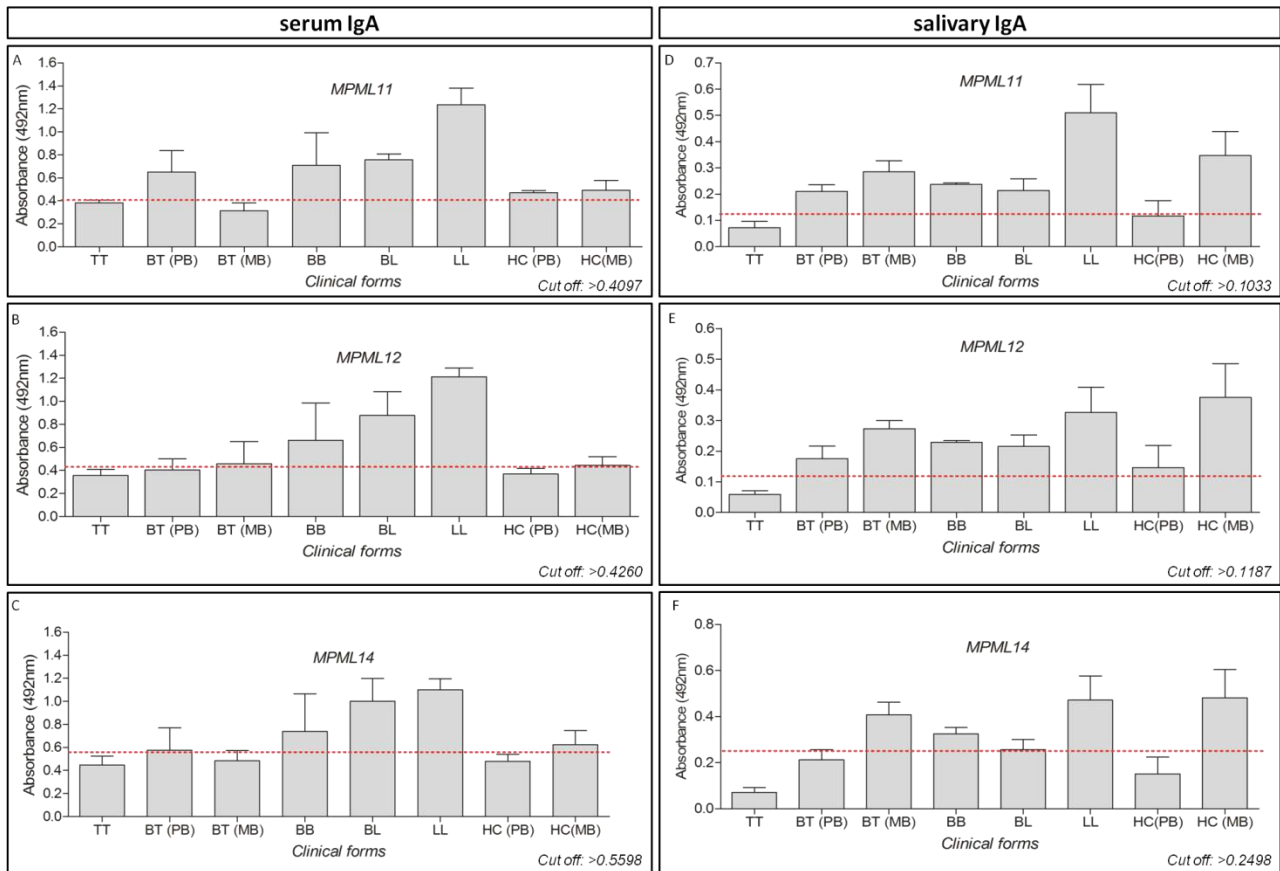


Figura 9: Detecção de anticorpos IgA usando MPML11, MPML12 e MPML14. A e B, detecção de IgA no soro. C e D, detecção de IgA na saliva. TT (tuberculóide); BT (*borderline*-tuberculóide); BB (*borderline*-*borderline*); BL (*borderline*-virchoviano); LL (lepromatosos); HC (contatos domiciliares); PB (paucibacilares); MB (multibacilares).

Para identificar qual antígeno do *M. leprae* os três peptídeos (MPML11, MPML12 e MPML14) eram miméticos, construiu-se anticorpos scFv contra os mesmos. As Figuras 10A, 10C e 10E apresentam os clones de *E. coli top-10* que expressaram scFv específicos para cada peptídeo. Para o anti-MPML11 o anticorpo A1 foi o que mais interagiu com o alvo ($p < 0,001$); no caso do anti-MPML12 e anti-MPML14 mais de um anticorpo expresso interagiu de forma significativa com o alvo, sendo selecionado o mais reativo, no caso E3 ($p < 0,001$) e G2 ($p < 0,001$), respectivamente (Figuras 10B, 10D e 10F).

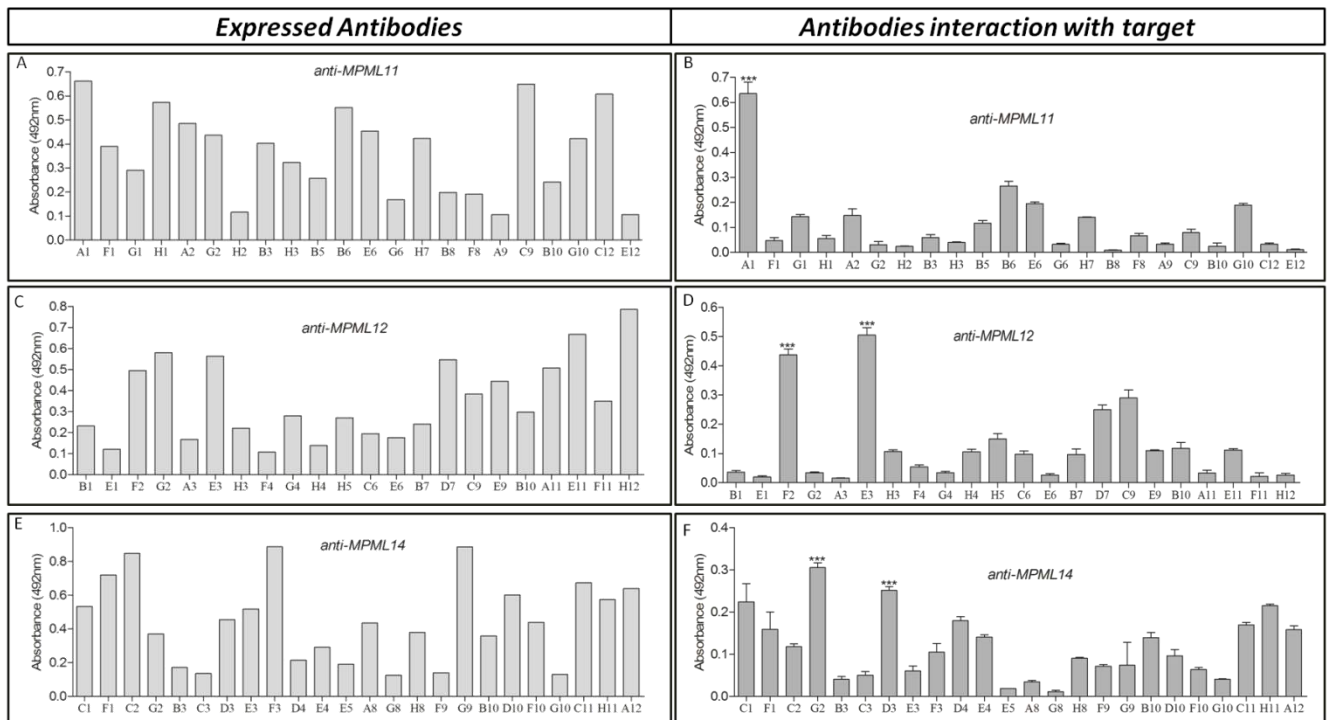


Figura 10: Anticorpos scFv anti-MPML11, anti-MPML12, anti-MPML14. A, C e E anticorpos scFv expressos em *E. coli top-10*. B, D e F anticorpos expressos que reconhecem os peptídeos MPML11, MPML12 e MPML14. *** $p < 0,001$.

A Tabela 11 mostra as sequências das cadeias leve e pesadas dos três scFv selecionados. A análise de bioinformática do anti-MPML14 demonstra que este interage com o peptídeo MPML14, através da região CDR1, CDR3 da cadeia pesada e FR3 da cadeia leve, indicando que existe uma afinidade de ligação entre peptídeo e anticorpo. Além disso, o anti-MPML14, através do CDR1 da cadeia pesada e FR3 da cadeia leve, também apresentou ligação com a região localizada entre o aminoácido 80 a 140 da proteína GroEL de *M. leprae*. Esta região apresenta um domínio equatorial com atividade ATPase, um domínio intermediário e apical envolvido na ligação com substrato.

Tabela 1: Sequências dos anticorpos anti-MPML11; anti-MPML12; anti-MPML14.

Antibody	Sequence
Anti-MPML11 (A1)	ELVMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSSISWLAWYQQKPGRAPKLLIYTASNLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEATYFCQQYKNYPRTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSSVQLVQSGARGEKARGVSEDLLKGFWIHLQLLDRPGCARCPGKAWSGWGSILVTLIPTARPSKARSPSQPTSPSAPPTCSGAPLRADTAMYYCARQSGPKRTMFDPWGQGTLV
Anti-MPML12 (E3)	RARADSIALGVCDPRAEGHLLFWKQLQHRKNYCKLVPAAPRNGPKLLIYSNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKVTVLGGGSGGGGSGGGGSSQVQLQESGPGLVKPSQTLTSLTCTVSGGSISSGGYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGSTDYNPSSLKSRVTISVDTSKNQFSP EADLYDRCGHAVYYCARDTWRQLLWAVVTSGAQGPRSPSH
Anti-MPML14 (G2)	ELALTPQSPVSGSPGQSITISCTGSSRDVGDYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTI SGLQSEDEADYYCSSYAGADNVVVFGGGTELTVLGGGSGGGGSGGGGSCSWLQSGRGVVQPGGSPETVLCVLDISLPLACNWRQSPAKGLEWLAFIWYDGGNIHYADSVKGRFTISKDNSKHTLYLHMSGLRAEDTALYYCARDKGYYSWNWVDFLWGRGTQVIIVSS

■ FR1 ■ CDRs ■ FR2 ■ FR3 ■ FR4 ■ Linker Light Chain + Linker + Hight Chain

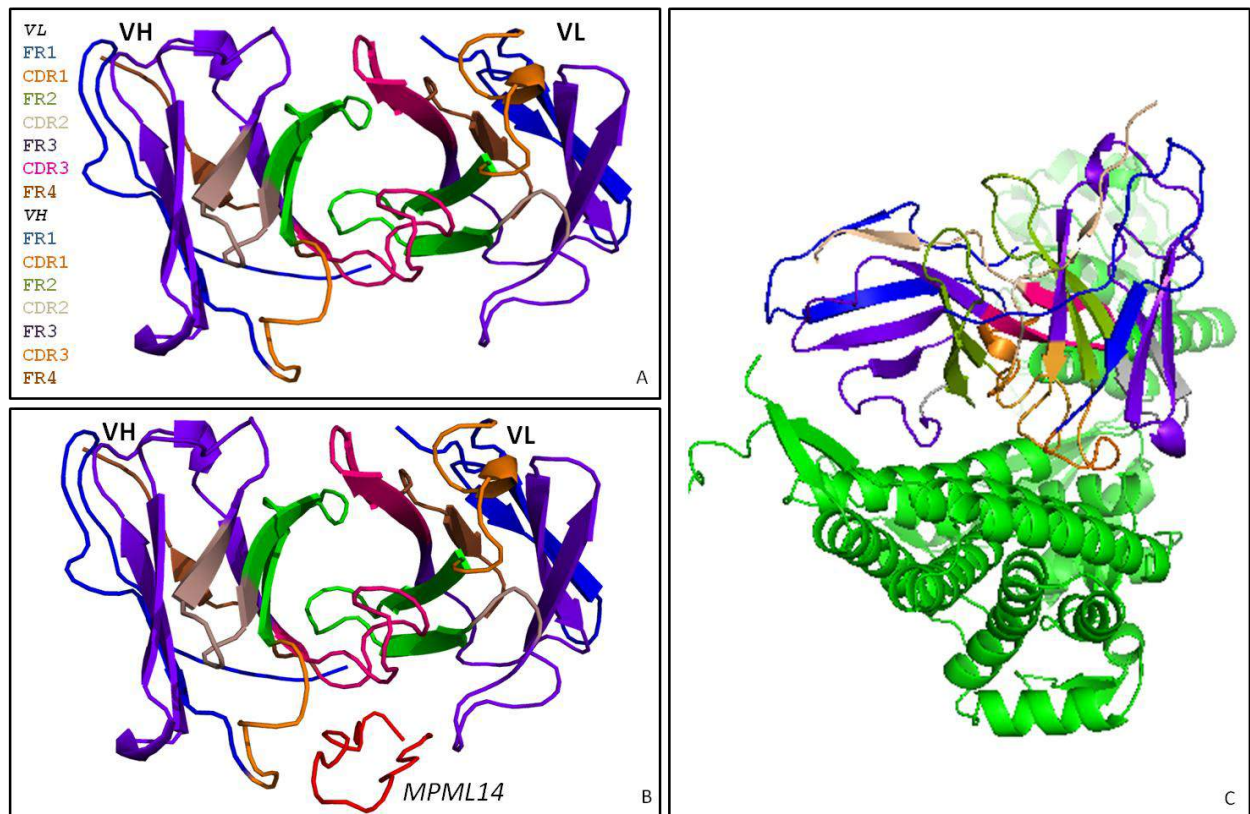


Figura 11: Bioinformática do anti-MPML14. A, estrutura tridimensional do anti-MPML14. B, interação do anti-MPML14 com peptídeo MPML14; interagindo com o peptídeo temos acima em rosa a região CDR3 da cadeia pesada, na lateral esquerda em laranja a CDR1 também da cadeia pesada e na lateral direita em púrpura a região FR3 da cadeia leve. C, interação do anti-MPML14 com GroEL; interagindo com a proteína temos em laranja a região CDR1 da cadeia pesada e em azul do lado esquerdo temos a região FR3 da cadeia leve, ambos próximos aos aminoácidos de 80 a 140 da proteína.

A figura 12 apresenta o resultado da espectrometria de massas confirmando a proteína alvo do *M. leprae* que é reconhecida pelo anticorpo scFv anti-MPML14, no caso uma chaperonina de 60kDa. Esse dado confirma portanto que os peptídeos obtidos por *phage display* são miméticos da proteína de choque térmico de 60kDa. E ressalta também que o anticorpo obtido reconhece de forma específica essa proteína do *M. leprae*.

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
4	470.8004	939.5862	939.5641	0.0222	0	25	8.4	3		K.DLLPLEK.V
14	632.8120	1263.6094	1263.5870	0.0224	0	20	28	1		K.EIELEDPYEK.I
28	765.4091	1528.8036	1528.7886	0.0151	0	23	12	2		K.WGAPTITNDGVSIK.E
34	895.9402	1789.8658	1789.8330	0.0328	0	28	3.3	1	U	K.DETTIVEGAGDTDAIAGR.V
37	909.4916	1816.9686	1816.9822	-0.0135	0	25	6.7	1	U	R.QEAVLEEPYILLVSSK.V
53	701.0209	2100.0409	2100.0487	-0.0078	0	15	54	6	U	R.NLSVGHGLNAATGEYEDLLK.A
57	725.7229	2174.1469	2174.1431	0.0038	1	17	32	1		K.KTDDVAGDGTATTATVLAQALVK.E

Figura 12: Resultado da Espectrometria de Massas. A figura apresenta a sequência dos peptídeos obtidos pelo espectrômetro e o alinhamento com a proteína de 60 kDa do *Mycobacterium leprae*.

Discussão

Nas últimas três décadas, houve uma grande diminuição na prevalência da hanseníase no mundo pelo uso da poliquimioterapia, ainda assim a estratégia global continua sendo a redução de casos novos da doença, especialmente aqueles com grau de incapacidade II [3]. O sucesso dessa estratégia perpassa, pelo desenvolvimento de novas plataformas que permitam diagnóstico e prognóstico precoce, o que inclui novos marcadores de infecção, de monitoramento de contatos e preditores de reação. Nesse sentido, muitos estudos visam encontrar e validar antígenos do *M. leprae* que possam funcionar como marcadores com aplicações diagnósticas [10,37-41].

Peptídeos miméticos surgem como fortes candidatos a biomarcadores, pelo fato dessas pequenas moléculas imitarem antígenos específicos de determinados patógenos, pelo menos em um epítipo particular [14]. Nesse sentido a tecnologia *phage display* é pioneira em selecionar

esses peptídeos [15] e tem provado ser útil na seleção de moléculas específicas que são altamente reativas contra uma variedade de alvos biológicos [42]. O uso de antígenos miméticos para o diagnóstico através da detecção de anticorpos circulantes tem sido relatado para Pneumonia[43], Tuberculose[44], Neurocisticercose[45], Leishmaniose[42], Anaplasmosse[46], Hepatite[47] e para Hanseníase[48,49].

Esse trabalho teve como estratégia utilizar como alvo IgG de pacientes com hanseníase, com a hipótese que os peptídeos selecionados teriam um grande potencial de reconhecer essas imunoglobulinas. A importância da IgG para o diagnóstico da hanseníase tem sido descrita por diversos autores [19,41,50,51].

O sucesso da estratégia ficou evidente com a reatividade dos peptídeos ainda expressos no fago, onde foi possível selecionar aqueles (V06 e V13) que diferenciaram LL e HC de forma clara. E ainda aquele (T04) que era mais reativo em paucibacilares, mesmo apresentando imunoglobulinas específicas em baixa concentração [11], o que justifica a grande variação de reatividade em PB. O fago garante ao peptídeo uma estrutura conformacional adequada, que auxilia na interação antígeno-anticorpo durante o processo de seleção [17].

É importante que durante a síntese química a conformação seja preservada. Uma flexibilidade conformacional pode impedir o desenvolvimento de ligantes, tais como peptídeos ou pequenas moléculas, deixando-as com baixa afinidade de ligação contra seus alvos [52]. Nesse sentido, o *design* dos peptídeos sintéticos procurou propiciar essa conformação, utilizando os espaçadores GGGs, os mesmos encontrados para separar o peptídeo da proteína PIII no fago[24] e uma sequência de aminoácidos da própria PIII, com o intuito de preservar a conformação natural. Além disso, a duplicação da sequência de aminoácidos do peptídeo deve amplificar o local de interação antígeno-anticorpo. A partir dessas estratégias MPML11, MPML12 e MPML14 preservaram a reatividade que havia sido encontrada no fago.

Na tentativa de caracterizar o antígeno natural de *M. leprae* do qual esses peptídeos eram miméticos, a bioinformática demonstrou o alinhamento dos mesmos com as proteínas de choque térmico (HSP) GroEL e GroES. As hsp microbianas têm sido associadas com a geração e indução de resposta imune tipo Th1 [53], sendo candidatas vacinais. Em contrapartida, GroES também induz altos níveis de anticorpos IgG1 em pacientes com hanseníase em todos os espectros da doença [54]. Outro trabalho relatou, que os níveis de IgG total em resposta a GroEL e GroES são significativamente altos em pacientes lepromatosos e baixos nos grupos TT, BT e BB [55]. De fato, essas proteínas estariam relacionadas com a indução de anticorpos do tipo IgG, bem como nossos peptídeos sintéticos.

O MPML11 foi particularmente mais importante no grupo TT (positividade 52,2%) e HC (35,3%). Para LID1 e outros antígenos recombinantes (ML2331, ML0091, ML163) que também detectam IgG o que vemos é uma resposta fraca em paucibacilares [10,19]. O peptídeo MPML11 apresentou reatividade muito parecida com ML0405 que detectou 69% dos PB [10] e 36,5% de HC [19]. Provavelmente, as subclasses IgG2 e IgG4 devem ser as mais encontradas nesses grupos, por estarem mais relacionadas com o controle da doença [54].

A positividade desse peptídeo (MPML11) nos grupos BB (50,0%), BL (72,0) e LL (81,9%) está abaixo do que se encontra na literatura quando se avalia outros antígenos, como o PGL-1 [11,22]. Porém entre os multibacilares, todos que desenvolveram reação tipo II eram positivos para este peptídeo, demonstrando que o mesmo pode ser promissor como marcador de reação. Outro trabalho demonstrou que pacientes com Eritema Nodoso Lepromatoso (ENL), em tratamento com talidomida, tiveram níveis mais elevados de anticorpos IgG1 em comparação com pacientes lepromatosos sem reação. Nestes grupos os níveis de IgM não apresentaram diferenças [56]. Em pacientes com comprometimento da função neural durante a reação também houve aumento de IgG contra PGL-1 e LAM [57].

Os peptídeos miméticos MPML12 e MPML14 apresentaram comportamentos muito semelhantes entre si, com baixa reatividade nos pacientes paucibacilares e um aumento gradativo na quantidade de anticorpos à medida que se aproxima do polo lepromatoso. Essa característica é muito similar àquela encontrada para o antígeno PGL-1 [11] e seus derivados sintéticos ND-O-HSA ELISA[39], NT-P-BSA e NT-P-HSA ML Flow [12,41].

O MPML12 e MPML14 detectaram 100,0% e 92,85%, respectivamente do grupo LL, enquanto LID-1 [19], ML0405 [10], detectam 97,7% e 67,0%, respectivamente dos pacientes multibacilares. Além disso, os dois peptídeos referidos no presente trabalho ainda podem ser utilizados como marcadores de infecção, pois conseguem detectar positividade em contatos (MPML12- 11,1% e MPML14- 16,67%), nesse caso funcionando como um marcador de exposição antiga[58].

O MPML12 apresentou uma correlação positiva ($R^2=0,7821$) com a plataforma *Orange Life* (NDO-LID®). Considerando somente os MB este peptídeo apresenta sensibilidade de 82,61% e especificidade de 100%, enquanto o NDO-LID® apresentou 87,0% e 96,1% de sensibilidade e especificidade, respectivamente [13], o que justifica a boa correlação entre os testes. Enquanto a positividade em HC é 11,1% para o MPML12, no teste NDO-LID® 3,9% dos contatos foram positivos[59].

Além da detecção de IgG, os peptídeos MPML11, MPML12 e MPML14 foram capazes de detectar IgA na saliva e no soros de pacientes e contatos domiciliares. A detecção de IgA no soro, para os três peptídeos, foi mais evidente nas formas BB, BL, LL (média acima do *cutoff*). Apesar de não haver trabalhos que relatem a presença de IgA contra antígenos do *M. leprae*, foi descrito a importância da detecção de IgA no soro para outras micobacterioses, como tuberculose [60], doença pulmonar (MAC-PD) causada pelo complexo *M. avium* [61] e *M. abscessus* (MAB-PD) [62].

A detecção de IgA na saliva tem sido descrita para o antígeno PGL-1 [20,51,63], especialmente para os multibacilares (LL) quando comparados a controles normais [20]. Da mesma maneira,

nosso trabalho também encontrou uma maior quantidade de IgA na saliva dos pacientes lepromatosos (média 3 vezes acima do *cutoff*) para os três peptídeos analisados. O mais interessante foi que essa alta detecção de IgA também foi encontrada nos HC cujo caso índice eram pacientes multibacilares. Nossa hipótese é que esses contatos tem uma pressão de carga bacilar maior e, em consequência produzem mais IgA anti-*M. leprae*, haja vista que a mucosa oral é porta de entrada para transmissão do bacilo [64], sendo este detectado por PCR [21] e Imuno-histoquímica [64]. Resta saber se os contatos com maiores níveis de IgA, tanto no soro quanto na saliva, possuem maior proteção ao bacilo, e por consequência maior resistência ou tolerância.

A aplicação diagnóstica e prognóstica desses peptídeos miméticos na hanseníase nos remete à necessidade de caracterizar o(s) antígeno(s) nativo(s) alvo(s). Nesse sentido, a produção de fragmentos de anticorpos scFv contra os peptídeos MPML11, MPML12 e MPML14 foi a estratégia adotada para mapear a molécula natural. Bibliotecas de fragmentos de anticorpos apresentadas em bacteriófagos tem sido aplicadas no reconhecimento de epítomos [65].

Os anticorpos produzidos anti-MPML11, anti-MPML12 e anti-MPML14 reconheceram os seus respectivos alvos (peptídeos), corroborando o resultado do sequenciamento, no qual os anticorpos produzidos apresentavam as CDRs importantes no reconhecimento antígeno-anticorpo. Bibliotecas sintéticas contêm sequências de CDRs artificiais construídas com o uso de oligonucleotídeos degenerados [66], o que gera a grande diversidade das mesmas.

A bioinformática demonstrou que o anti-MPML14 se liga a uma região imunogênica de GroEL, esse resultado corrobora com a hipótese que o peptídeo MPML14 seja mimético da GroEL, uma vez que também ocorreu um alinhamento do mesmo com essa proteína. Porém, não podemos descartar a hipótese que esses peptídeos, MPML12 e MPML14 sejam miméticos de antígenos não proteicos, como PGL-1, especialmente quando se analisa os resultados da imunoreatividade, onde fica evidente o comportamento similar dessas moléculas. Ensaio de imunocaptura do antígeno

nativo demonstraram que os peptídeos são miméticos da proteína chaperonina de 60kD, dado confirmado pela análise por espectrometria de massas. Esse dados corroboram os resultados obtidos pela bioinformática que já demonstraram alinhamento dos peptídeos com a proteína de choque térmico GroEL de *M. leprae*. Assim, foi possível confirmar tanto por bioinformática quanto por ensaios biológicos que os peptídeos são miméticos de uma proteína imunogênica do *M. leprae* e ainda que o anticorpo MPML14 reage de forma específica com esse alvo.

Conclusão

Os peptídeos miméticos obtidos nesse trabalho são promissores no diagnóstico e prognóstico da hanseníase e devem ser utilizados na detecção de IgG e IgA circulantes em pacientes e contatos domiciliares. O MPML11 foi importante no diagnóstico das formas paucibacilares, no monitoramento de contatos e na predição de reação tipo 2. Os peptídeos MPML12 e MPML14 podem ser utilizados monitoramento de contatos e para o diagnóstico das formas multibacilares, especialmente na saliva.

O uso combinado dos peptídeos obtidos nesse trabalho junto a outros antígenos do *M. leprae* pode aprimorar o diagnóstico da hanseníase e com certeza o MPML11 é o primeiro marcador para prognóstico específico da reação hansênica tipo 2.

Referencias

1. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G (2002) Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 363-375.
2. Alberts CJ, Smith WC, Meima A, Wang L, Richardus JH (2011) Potential effect of the World Health Organization's 2011-2015 global leprosy strategy on the prevalence of grade 2 disability: a trend analysis. *Bull World Health Organ* 89: 487-495.
3. (2014) Global leprosy update, 2013; reducing disease burden. *Wkly Epidemiol Rec* 89: 389-400.
4. Pannikar V (2009) Enhanced global strategy for further reducing the disease burden due to leprosy: 2011-2015. *Lepr Rev* 80: 353-354.
5. (2013) Global leprosy: update on the 2012 situation. *Wkly Epidemiol Rec* 88: 365-379.
6. Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ (1983) Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infection and Immunity* 41: 1077-1083.
7. Chatterjee D, Cho SN, Brennan PJ, Aspinall GO (1986) 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 disaccharide-octyl-neoglycoprotein. *Carbohydr Res* 156: 39-56.
8. Gigg J, Gigg R, Payne S, Conant R (1985) The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. 17. Synthesis of propyl O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3-di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----2)-3-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranoside: the oligosaccharide portion of the major serologically active glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Chem Phys Lipids* 38: 299-307.
9. Chatterjee D, Hunter SW, McNeil M, Brennan PJ (1992) Lipoarabinomannan. Multiglycosylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. *J Biol Chem* 267: 6228-6233.
10. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP, et al. (2007) Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1400-1408.
11. Moura RSd, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S (2008) Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 11-18.
12. Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, et al. (2003) Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1991-1995.
13. Paula Vaz Cardoso L, Dias R, Freitas A, Hungria E, Oliveira R, et al. (2013) Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. *BMC Infectious Diseases* 13: 497.
14. Goulart LR, Vieira CU, Freschi AP, Capparelli FE, Fujimura PT, et al. (2010) Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. *Crit Rev Immunol* 30: 201-222.
15. Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317.
16. Kügler J, Zantow J, Meyer T, Hust M (2013) Oligopeptide M13 Phage Display in Pathogen Research. *Viruses* 5: 2531-2545.
17. Sundell GN, Ivarsson Y (2014) Interaction Analysis through Proteomic Phage Display. *BioMed Research International* 2014: 176172.
18. Germaschewski V, Murray K (1995) Screening a monoclonal antibody with a fusion-phage display library shows a discontinuity in a linear epitope within pres1 of hepatitis B virus. *Journal of Medical Virology* 45: 300-305.
19. Duthie MS, Hay MN, Rada EM, Convit J, Ito L, et al. (2011) Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 1257-1265.

20. Nagao-Dias AT, Almeida TL, Oliveira Mde F, Santos RC, Lima AL, et al. (2007) Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. *Braz J Infect Dis* 11: 215-219.
21. da Silva Martinez T, Nahas AA, Figueira MM, Costa AV, Goncalves MA, et al. (2011) Oral lesion in leprosy: borderline tuberculoid diagnosis based on detection of *Mycobacterium leprae* DNA by qPCR. *Acta Derm Venereol* 91: 704-707.
22. Araújo S, Lobato J, Reis ÉDM, Souza DOB, Gonçalves MA, et al. (2012) Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107: 55-59.
23. Ridley DS, Jopling WH (1966) Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34: 255-273.
24. Barbas CF (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
25. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, et al. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31: 3784-3788.
26. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, et al. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Meth* 12: 7-8.
27. Schrodinger, LLC (2010) *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*.
28. Mayrose I, Shlomi T, Rubinstein ND, Gershoni JM, Ruppin E, et al. (2007) Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. *Nucleic Acids Res* 35: 69-78.
29. Roberts MM, Coker AR, Fossati G, Mascagni P, Coates ARM, et al. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* Chaperonin 10 Heptamers Self-Associate through Their Biologically Active Loops. *Journal of Bacteriology* 185: 4172-4185.
30. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, et al. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28: 235-242.
31. Carneiro AP, Reis CF, Morari EC, Maia YCP, Nascimento R, et al. (2014) A putative OTU domain-containing protein 1 deubiquitinating enzyme is differentially expressed in thyroid cancer and identifies less-aggressive tumours. *Br J Cancer* 111: 551-558.
32. Ye J, Ma N, Madden TL, Ostell JM (2013) IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Res* 41: W34-40.
33. Retter I, Althaus HH, Münch R, Müller W (2005) VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Research* 33: D671-D674.
34. Shirai H, Ikeda K, Yamashita K, Tsuchiya Y, Sarmiento J, et al. (2014) High-resolution modeling of antibody structures by a combination of bioinformatics, expert knowledge, and molecular simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 82: 1624-1635.
35. Duhovny D, Nussinov R, Wolfson H (2002) Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. In: Guigó R, Gusfield D, editors. *Algorithms in Bioinformatics*: Springer Berlin Heidelberg. pp. 185-200.
36. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ (2005) PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Research* 33: W363-W367.
37. Reece ST, Ireton G, Mohamath R, Guderian J, Goto W, et al. (2006) ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 13: 333-340.
38. Geluk A, Spencer JS, Bobosha K, Pessolani MC, Pereira GM, et al. (2009) From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 16: 352-359.
39. Lobato J, Costa MP, Reis Ede M, Goncalves MA, Spencer JS, et al. (2011) Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev* 82: 389-401.
40. Hungria EM, Oliveira RM, Souza AL, Costa MB, Souza VN, et al. (2012) Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107 Suppl 1: 104-111.
41. Moura RS, Penna GO, Fujiwara T, Pontes MA, Cruz R, et al. (2014) Evaluation of a rapid serological test for leprosy classification using human serum albumin as the antigen carrier. *J Immunol Methods* 412: 35-41.

42. Costa LE, Lima MI, Chavez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Martins VT, et al. (2014) Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. *Clin Vaccine Immunol* 21: 96-106.
43. Marston EL, James AV, Parker JT, Hart JC, Brown TM, et al. (2002) Newly characterized species-specific immunogenic *Chlamydomonas reinhardtii* peptide reactive with murine monoclonal and human serum antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 446-452.
44. Yang H, Qin L, Wang Y, Zhang B, Liu Z, et al. (2015) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* based on H37Rv binding peptides using surface functionalized magnetic microspheres coupled with quantum dots - a nano detection method for *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Nanomedicine* 10: 77-88.
45. Manhani MN, Ribeiro VS, Cardoso R, Ueira-Vieira C, Goulart LR, et al. (2011) Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. *Parasite Immunol* 33: 322-329.
46. Santos PS, Nascimento R, Rodrigues LP, Santos FAA, Faria PCB, et al. (2012) Functional Epitope Core Motif of the *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a and Its Incorporation onto Bioelectrodes for Antibody Detection. *PLoS ONE* 7: e33045.
47. Tan WS, Ho KL (2014) Phage display creates innovative applications to combat hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 20: 11650-11670.
48. Alban S, de Moura JF, Minozzo JC, Mira MT, Soccol VT (2013) Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. *BMC Infectious Diseases* 13: 42.
49. Alban SM, de Moura JF, Thomaz-Soccol V, Sékula SB, Alvarenga LM, et al. (2014) Phage Display and Synthetic Peptides as Promising Biotechnological Tools for the Serological Diagnosis of Leprosy. *PLoS ONE* 9: e106222.
50. Beuria MK, Parkash O, Joshi B, Mohanty KK, Katoch K, et al. (1998) Levels of IgG subclasses in active and inactive cases in the disease spectrum of leprosy. *Int Arch Allergy Immunol* 115: 61-66.
51. Cabral PBe, Júnior JEC, Macedo ACd, Alves AR, Gonçalves TB, et al. (2013) Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal *Mycobacterium leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy. *International Journal of Infectious Diseases* 17: e1005-e1010.
52. Chen S, Bertoldo D, Angelini A, Pojer F, Heinis C (2014) Peptide Ligands Stabilized by Small Molecules. *Angewandte Chemie International Edition* 53: 1602-1606.
53. Rha Y-H, Taube C, Haczku A, Joetham A, Takeda K, et al. (2002) Effect of Microbial Heat Shock Proteins on Airway Inflammation and Hyperresponsiveness. *The Journal of Immunology* 169: 5300-5307.
54. Hussain R, Shahid F, Zafar S, Dojki M, Dockrell HM (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: 462-471.
55. Rojas RE, Segal-Eiras A (1996) Immunoglobulin G response against 10-kDa and 65-kDa heat-shock proteins in leprosy patients and their household contacts. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 15: 189-198.
56. Partida-Sanchez S, Favila-Castillo L, Pedraza-Sanchez S, Gomez-Melgar M, Saul A, et al. (1998) IgG antibody subclasses, tumor necrosis factor and IFN-gamma levels in patients with type II lepra reaction on thalidomide treatment. *Int Arch Allergy Immunol* 116: 60-66.
57. 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: e977.
58. De Paschale M, Clerici P (2012) Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World Journal of Virology* 1: 31-43.
59. Duthie MS, Balagon MF, Maghanoy A, Orcullo FM, Cang M, et al. (2014) Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. *J Clin Microbiol* 52: 613-619.
60. Feng X, Yang X, Xiu B, Qie S, Dai Z, et al. (2014) IgG, IgM and IgA antibodies against the novel polyprotein in active tuberculosis. *BMC Infect Dis* 14: 336.

61. Shimizu Y, Takise A, Morita H, Hosomi Y, Kasahara N, et al. (2014) Serum glycopeptidolipid core IgA antibody levels in patients with chest computed tomography features of mycobacterium avium-intracellulare complex pulmonary disease. *J Biol Regul Homeost Agents* 28: 399-405.
62. Jeong BH, Kim SY, Jeon K, Lee SY, Shin SJ, et al. (2013) Serodiagnosis of Mycobacterium avium complex and Mycobacterium abscessus complex pulmonary disease by use of IgA antibodies to glycopeptidolipid core antigen. *J Clin Microbiol* 51: 2747-2749.
63. Kumar A, Parkash O, Girdhar BK (2014) Analysis of Antigens of Mycobacterium leprae by Interaction to Sera IgG, IgM, and IgA Response to Improve Diagnosis of Leprosy. *BioMed Research International* 2014: 10.
64. Morgado de Abreu MA, Roselino AM, Enokihara M, Nonogaki S, Prestes-Carneiro LE, et al. (2014) Mycobacterium leprae is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. *Clin Microbiol Infect* 20: 59-64.
65. Chan CE, Lim AP, MacAry PA, Hanson BJ (2014) The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *Int Immunol* 26: 649-657.
66. Shukra AM, Sridevi NV, Dev C, Kapil M (2014) Production of recombinant antibodies using bacteriophages. *European Journal of Microbiology & Immunology* 4: 91-98.