



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - DEBIO**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**RICARDO MENDES GONÇALVES**

**ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES PLATAFORMAS DIAGNÓSTICAS**  
**BASEADAS EM PGL-1 EM ÁREA DE HIPERENDEMIAS DA HANSENÍASE**

**SÃO LUÍS**

**2020**

**RICARDO MENDES GONÇALVES**

**ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES PLATAFORMAS DIAGNÓSTICAS  
BASEADAS EM PGL-1 EM ÁREA DE HIPERENDEMIAS DA HANSENÍASE**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mayara Ingrid Sousa Lima

Coorientadora: Bsc. Emily Caroline dos Santos Moraes

**SÃO LUÍS  
2020**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Gonçalves, Ricardo Mendes.

Análise comparativa de diferentes plataformas diagnósticas baseadas em pgl-1 em área de hiperendemia da hanseníase / Ricardo Mendes Gonçalves. - 2019.

39 f.

Coorientador(a): Emilly Caroline dos Santos Moraes.

Orientador(a): Mayara Ingrid Sousa Lima.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão, 2019.

1. ELISA. 2. Hanseníase. 3. Imunodiagnóstico. 4. Imunossensores. 5. Sorologia. I. Santos Moraes, Emilly Caroline dos. II. Sousa Lima, Mayara Ingrid. III. Título.

**RICARDO MENDES GONÇALVES**

**ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES PLATAFORMAS DIAGNÓSTICAS  
BASEADOS EM PGL-1 EM ÁREA DE HIPERENDEMIA DA HANSENÍASE**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mayara Ingrid Sousa Lima - Orientadora  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Paulo Roberto Brasil De Oliveira Marques - 1<sup>o</sup> Examinador  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dorlene Maria Cardoso de Aquino  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall Agnol  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Paulina Andrea Viana de Carvalho  
Instituto Federal do Maranhão -IFMA

*Dedico este trabalho à mulher  
mais maravilhosa deste mundo, a  
minha maior fonte de inspiração e  
determinação! Muito obrigado por  
todo o incentivo, mãe!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família por todo apoio que tenho recebido para alcançar meus objetivos. Agradeço especialmente a minha mãe Josinete, a pessoa que mais amo neste mundo, a minha maior fonte de motivação. A minha irmã Kelly pela contribuição com meu deslocamento diário para a universidade, sem a qual minha graduação seria bem mais difícil. Ao meu pai Rogério, que sempre me ajudou quando eu precisei, e aos meus irmãos Karine, Kairon e Rivers.

Às minhas orientadoras professoras Mayara Ingrid de Sousa Lima e Emilly Caroline Moraes Silva, cujos nomes são tão extensos quanto o carinho e admiração que tenho pelas duas. Um agradecimento especial à professora Mayara por todas as oportunidades de crescimento acadêmico que recebi nesses vários anos que passei no laboratório. Sou grato por tudo, até pelas broncas.

Aos amigos do nosso grupo de pesquisa (Biogen), aos que já alçaram voos para pós-graduação fora e aos que ainda estão aqui comigo nos preparativos para decolar para esse mundão. Momentos muito bons na minha graduação só foram possíveis graças ao nosso convívio.

Ao LabGeM, minha segunda casa, onde passei pelo menos 3/4 do meu tempo nos últimos dias. Local onde me sinto bem trabalhando e onde pude aprender muito como profissional. Aos coordenadores do laboratório, professores Mayara Lima, Silma Pereira, Hivana Dall’Agnol e Leonardo Dall’Agnol. A todos os meus amigos que tive um enorme prazer em conhecer trabalhando no LabGeM.

Um agradecimento muito especial à Maria Santana (Santinha para os íntimos), que sempre foi muito mais que uma técnica de laboratório, uma verdadeira mãe de laboratório. Agradeço pelo carinho, pelos lanches da tarde, pelas longas conversas.

À Patrícia Valéria e à Vera Maciel, que também sempre se mostraram dispostas a ajudar quando eu precisei.

À Dra. Rita Vidigal, por todo apoio dado aos nossos trabalhos. Um grande exemplo de médica, dedicada, comprometida com o que se propõe a fazer! Agradeço também pela amizade e pelas oportunidades!

À Paulina Carvalho pelo suporte na eletroquímica, sem a qual trabalhar com sensores se tornaria algo ainda mais complicado.

A todos os pacientes e seus respectivos familiares que toparam participar do projeto.

Aos meus amigos biólogos que direta ou indiretamente me incentivaram muito na decisão de cursar Ciências Biológicas (Mariza Bandeira, Rômulo Sampaio e Igor Mendes).

Às meninas do GB3 (Amanda, Iolanda, Malena e Milene), pela companhia até altas horas no laboratório, pelos almoços colaborativos e muito animados que não alimentavam somente nossos corpos, mas também nutria nossa auto-estima. Não tem como passar um segundo triste perto de vocês.

Aos meus amigos Larissa Silva (vulgo Laredna), Thayres, Fabrício, Fernanda, Robson, Juliana, Thaynara, Diana, Tayhana, Luís, Raphisa e Tayane, galerinha maravilhosa que tem a capacidade de recarregar parte das minhas energias com apenas um abraço. Agradeço muito pela amizade de vocês!

Ao meu grande amigo Rodrigo Santos, pelas longas e proveitosas conversas, uma das pessoas mais inteligentes que eu conheço.

Ao programa de educação tutorial, no qual passei dois longos anos em um constante processo de aprendizagem,

À FAPEMA pelo financiamento do projeto e à UFMA pela bolsa.

## SUMÁRIO

<b>1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>19</b>
<b>Artigo a ser submetido à revista Clinical Infectious Disease .....</b>	<b>25</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>26</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>27</b>
<b>2. Materiais e Métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>3. Resultados .....</b>	<b>29</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>30</b>
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>32</b>
<b>Referências.....</b>	<b>32</b>
<b>Anexo 1. Lista de figuras do artigo.....</b>	<b>35</b>
<b>Anexo 2. Normas da revista Clinical Infectious Disease .....</b>	<b>41</b>

## 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A hanseníase é uma doença descrita inicialmente pelo pesquisador Gerhard Armauer Hansen, no ano de 1873, porém é conhecida desde a antiguidade com citações de textos bíblicos que a denominavam como lepra, datadas há mais de 2000 anos, em Jerusalém (MATHESON et al., 2009). Contudo questiona-se o uso do termo como uma denominação genérica a um conjunto de dermatites que, ao longo do tempo, foram classificadas como outras doenças (CURI, 2010).

Hoje, embora com menos frequência, a hanseníase continua sendo confundida com outras enfermidades, visto que se trata de uma doença espectral, na qual algumas formas clínicas ainda representam um desafio para as equipes de saúde, pois apresenta sinais e sintomas de difícil compreensão, e os exames atualmente utilizados não possuem uma sensibilidade adequada à elucidação desses casos (KUNDAKCI; ERDEN, 2019).

O *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) é o agente etiológico da hanseníase, e as características desse patógeno contribuem para dificuldade no controle da doença. Trata-se de um bacilo gram-positivo, álcool ácido resistente (BAAR), pertencente à ordem Actinomycetales e família Mycobacteriaceae. Ele mede 1 de a 8µm de comprimento e 0,3µm de diâmetro, disposto no hospedeiro de forma isolada ou formando agrupamentos característicos chamados globias, unidos por uma substância chamada gleia. O tempo de replicação desse bacilo é lento, podendo durar até 14 dias e ocorre por divisão binária, prioritariamente dentro de macrófagos ou células de *Schwann*. Por haver uma predileção por áreas mais frias, em torno de 30°C, torna-se mais comum encontrar uma maior quantidade de bacilos nas orelhas e extremidades dos membros (EICHELMANN et al., 2013).

A partir da publicação do sequenciamento do genoma do *M. leprae*, em 2001, estudos revelaram que essa micobactéria sofreu um processo de evolução reducional, resultando na perda de aproximadamente 2.000 genes, muitos dos quais estavam relacionados a vias metabólicas importantes, o que explica o comportamento desse patógeno como parasita intracelular obrigatório (COLE et al, 2001). Por esse motivo, ainda não há relatos na literatura do sucesso no cultivo do *M. leprae in vitro*. Os modelos de cultivo *in vivo* do bacilo de Hansen, por sua vez, apresentam restrições, sendo o tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) ou camundongos suscetíveis a única forma de cultivo do patógeno, os únicos modelos animais, o

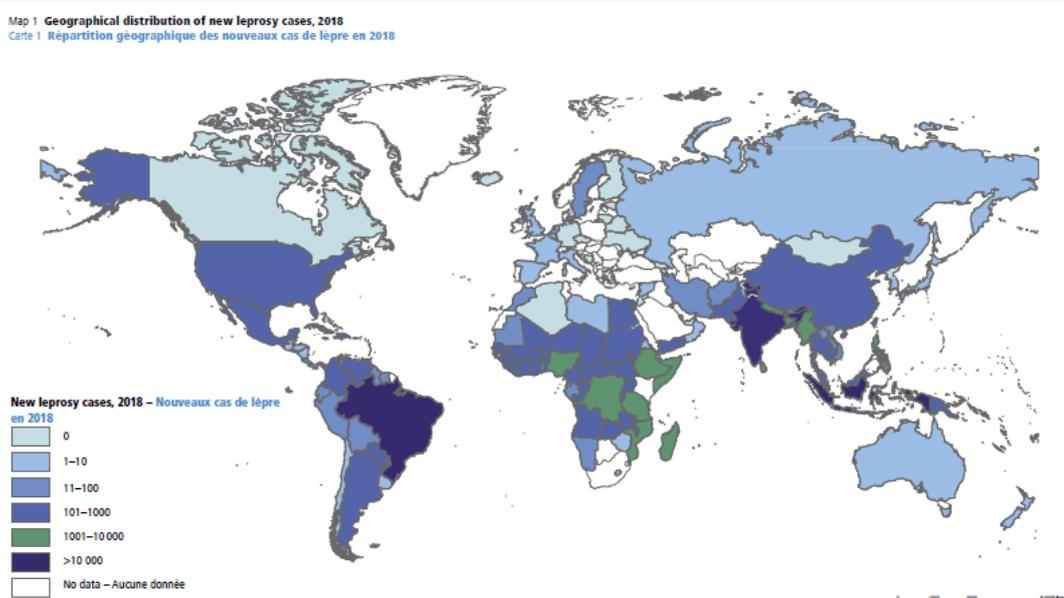
que dificulta estudos envolvidos com o entendimento da hanseníase e, conseqüentemente, o controle da doença (EICHELMANN et al., 2013).

A transmissão do *M. leprae* é uma das características da doença que não está completamente elucidada, entretanto, sabe-se que ocorre principalmente por meio das vias aéreas superiores (BRATSCHI et al., 2015). O adoecimento, entretanto, é uma resposta ao contato próximo e prolongado entre indivíduos infectados não tratados e pessoas suscetíveis à infecção, após um período de incubação que varia de 2 a 7 anos (PATROCINIO et al., 2005; JOB et al., 2008). Esses indivíduos são referidos como contatos domiciliares (HC) e possuem até 8 vezes mais chances de adoecerem (VIJAYAKUMARAN et al., 1998). Contudo, embora o bacilo seja considerado de alta infectividade, apresenta baixa patogenicidade, visto que apenas 10% dos infectados chegam a apresentar os sintomas da doença (GOULART e GOULART, 2009).

É importante ressaltar que, além de pessoas doentes, HCs podem atuar na rede de transmissão do *M. leprae*, visto que em suas mucosas orais são geralmente encontradas grandes quantidades do bacilo (PATROCÍNIO et al., 2005; NAVES et al., 2009). Desse modo, a importância da investigação de HCs não se resume apenas à possibilidade de um diagnóstico precoce, mas também pelo fato dessas pessoas serem potenciais vetores do bacilo de Hansen, como já relatado em pesquisas com *swuab* nasal (RAMAPRASAD *et al.*, 1997; WIT et al., 1993; BAKKER et al., 2006; PONTES et al., 2008;). Além disso, regiões endêmicas para hanseníase apresentam um número pequeno de casos multibacilares (MB) (importantes fontes de *M. leprae*), reforçando que doentes de hanseníase não são os únicos transmissores do bacilo, pois muitos casos novos não relatam um histórico de proximidade com outros pacientes (ARAÚJO et al 2012).

Do ponto de vista epidemiológico, em 2018, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), foram detectados 208.619 novos casos de hanseníase no mundo, com uma redução de 1,2% com relação ao ano anterior (211.009 notificações) (GLOBAL LEPROSY, 2019). Nesse cenário, o Brasil ocupa o segundo lugar no mundo na prevalência da doença, atrás apenas da Índia. No continente americano, o país é o detentor do primeiro lugar no número de novos casos, no qual das 30.957 notificações, 28.660 foram registradas no território brasileiro (WHO, 2019) (Figura 01).

No Brasil, a distribuição dos casos de hanseníase ocorre de forma bastante heterogênea. Nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, os estados do Mato Grosso, Maranhão e Tocantins, hiperendêmicos para hanseníase, possuem os maiores coeficientes de detecção da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). No Maranhão, por exemplo, segundo dados de 2018, 3.115 novos casos foram registrados, colocando o estado segundo lugar no *ranking* nacional e em primeiro, no Nordeste, em número de novos casos, além de uma taxa de detecção de 4,91 casos para cada 10 mil habitantes (SINAN/SVS-MS, 2019). Esses dados epidemiológicos reforçam a importância da aplicação de estratégias que favoreçam um diagnóstico rápido, capaz de atingir um amplo espectro populacional.



**Figura 1.** Mapa mundial de novos casos de hanseníase em 2018. Disponível em: <http://www.who.int/lep/epidemiology/en>.

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico-epidemiológico e tem relação com fatores como história, condições de vida do indivíduo e exame dermatoneurológico. Esse exame busca identificar sinais cardinais da doença, que são lesões na pele com alteração de percepção sensorial, danos neurais com ou sem espessamento de nervos, associados a alterações sensitivas, motoras e/ou autonômicas (BRASIL, 2016).

Trata-se de uma doença espectral, cuja classificação leva em consideração aspectos imunológicos, histopatológicos e a carga bacilar, que estão relacionados diretamente com a resposta imune do hospedeiro frente ao patógeno. Em um dos polos, têm-se a forma tuberculoide (TT), com uma resposta imune celular acentuada e pequena quantidade de bacilos, enquanto que no polo oposto, representado pela forma virchowiana (VV), há uma

anergia na resposta imune mediada por células fagocíticas, porém com alta produção de anticorpos, os quais são ineficientes no combate ao *M. leprae*. Entre estas, tem-se as formas intermediárias: dimorfa-tuberculoide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (VV), que compartilham características das formas polares (RIDLEY E JOPLING, 1966). Ocorre ainda a classificação indeterminada (I), um estágio precoce doença que, dependendo da resistência do hospedeiro, podendo migrar para outras formas da hanseníase ou evoluir para a cura espontânea, o que acontece na maioria dos casos (ARAUJO, 2003).

A hanseníase também pode ser classificada operacionalmente com base no número de lesões e/ou índice baciloscópio. Desse modo, classifica-se como multibacilar (MB) aqueles pacientes com mais de cinco lesões ou baciloscopia positiva, e o grupo dos paucibacilares (PB) é representado por indivíduos com até cinco lesões ou baciloscopia negativa (LEPROSY, 1988).

Embora pouco eficiente para o controle epidemiológico da doença, essa classificação tem seu valor, uma vez que a identificação de pacientes MB pode representar a interrupção de uma parcela da transmissão de bacilos para pessoas sadias (REECE et al., 2006). Contudo, outros exames são necessários para assegurar um diagnóstico compatível com as manifestações clínicas do paciente, por mais discretas que estas sejam.

Testes que dependem de análises laboratoriais microscópicas ainda são mais comuns na rotina do diagnóstico de hanseníase. Dentre estes, a baciloscopia de esfregaço intradérmico é uma técnica que faz parte dos critérios diagnósticos definidos pela OMS e possibilita classificar pacientes em PB e MB, com a pesquisa de bacilos por meio da técnica de Ziel-Nilsen. A partir dela, é possível obter respostas como viabilidade do bacilo e carga bacilar, que expressa em escala logarítmica variável de 0 a 6 (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Essa técnica, entretanto, possui sensibilidade variável, necessitando de um mínimo de 100.000 bacilos por grama de tecido para detecção por microscopia (VAN BRAKEL et al, 2005; CAVALCANTI et al., 2012). Estudo realizado por Cavalcante e colaboradores (2012) mostrou que de um total de 1.213 pacientes, apenas 360 (29,7%) indivíduos positivaram para o teste. Van Brakel e colaboradores (2005) relataram uma coorte de 303 pacientes MB, do quais apenas 36,3% foram positivos para baciloscopia.

Outro exame utilizado na prática clínica no diagnóstico da hanseníase tem base histopatológica, para o qual se utiliza biopsias de pele ou do ramo sensitivo dos nervos periféricos, permitindo detectar o bacilo por meio de coloração pela técnica de Wade ou Fite-Faraco, além de caracterizar o processo inflamatório local (RIDLEY; JOPLING, 1966; LASTÓRIA; ABREU, 2014). No entanto, esse método compartilha a baixa sensibilidade com a baciloscopia de esfregado intradérmico e há controvérsias sobre a eficácia da microscopia na identificação dos bacilos nessas amostras (HARDAS; LELE, 1981).

A introdermorreação de Mitsuda é um teste realizado com inoculação intradérmica de cepas inativadas do bacilo. Após um período de 4 semanas, em casos positivos, pode ser observada uma pápula de 5mm ou mais (MITSUDA, 1953). Embora seja possível avaliar a resposta imune do doente, visto que a positividade diminui em direção ao polo virchowiano, este exame não tem valor diagnóstico (EICHELMANN et al., 2013).

Diante da dificuldade no diagnóstico de pacientes que possuem sinais incipientes da hanseníase, pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento de protocolos baseados em reação da cadeia da polimerase (PCR), com a qual, principalmente PCR em tempo real (qPCR), é possível detectar o bacilo em pequenas quantidades com alta especificidade. Truman e colaboradores (2008) relataram um limiar de detecção da ordem de 10fg de DNA a partir de amostras purificadas dessa molécula, o que corresponde a 3 genomas de *M. leprae*. Em condições semelhantes à realidade de amostras clínicas, o número mínimo de bacilos foi de 300, um valor ainda muito abaixo dos 10.000 para baciloscopia.

Vários trabalhos têm sido realizados com amostras de diferentes naturezas, como soro, saliva, linfa, fragmentos de biopsia de pele e *swab* bucal, com sensibilidade hábil para o diagnóstico inclusive de pacientes PB (SANTOS *et al.*, 1993; ALMEIDA et al., 2004; WIT et al., 1993; PATROCINIO et al., 2005; MARTINEZ et al., 2009; RUDEEANEKSIN *et al.*, 2008). Estudos realizados com amostras de biopsia de pele, por exemplo, mostram uma positividade para o teste de até 100% em casos MB e 79,2%, nas formas PB (MARTINEZ et al., 2006; RUDEEANEKSIN et al., 2008). Entretanto, esses procedimentos carecem de investimentos na faixa que ainda não faz parte da realidade das principais locais afetados pela hanseníase, dificultando, portanto, o emprego em larga escala.

Nesse sentido, faz-se necessário a utilização de testes complementares que favoreçam um diagnóstico mais acurado, com alta sensibilidade e especificidade e que possam auxiliar

no diagnóstico precoce da hanseníase, com aplicação em um largo espectro populacional. Assim, destaca-se a padronização de testes capazes de revelar casos subclínicos e monitorar contatos domiciliares. Desse modo, a utilização antígenos específicos do *M. leprae* tem se mostrado relevantes para aplicação em testes sorológicos (LIMA, 2015).

Os testes sorológicos podem ser utilizados para avaliação da produção de anticorpos contra antígenos específicos do *M. leprae* dosados no soro a partir da coleta de sangue periférico, o que representa um método pouco invasivo para obtenção de amostras biológicas. Esses testes contam com a vantagem de favorecer um diagnóstico e, conseqüentemente, um tratamento precoce de hanseníase, prevenindo sequelas e ajudando no controle da doença (DUTHIE et al, 2008). Pacientes MB costumam positivar para o teste, e a titulação de anticorpos contra antígenos do bacilos geralmente é maior à medida que há uma deslocamento para o polo VV (SCHURING et. al, 2006).

Um arsenal de diferentes antígenos já foi e continua sendo testado para aprimorar a eficiência do teste sorológico para identificar novos casos e acompanhar o desempenho do tratamento de hanseníase. Dentre estes, destaca-se o glicolípido fenólico 1 (PGL-1) (Figura 02), um dos primeiros antígenos do bacilo a ser isolado, sendo considerado o principal glicolípido presente na parede celular do *M. leprae*. Pacientes MB geralmente produzem grandes quantidades de IgM anti-PGL-1, e este anticorpo possui uma correlação positiva com a carga bacilar do paciente (SPENCER; BRENNAN, 2011; CHO et al., 1983; BURGESS, 1988; ZENHA et al., 2009).

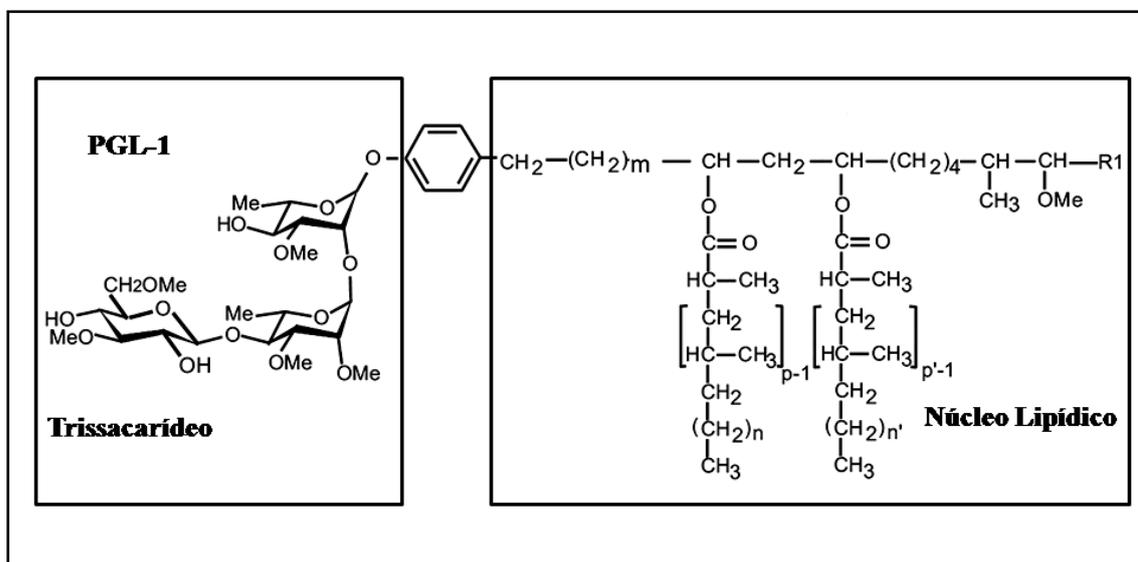


Figura 3. Estrutura molecular do PGL-1. Fonte: adaptado de Acosta et al., 2018.

A comprovação da antigenicidade e especificidade do PGL-1 favoreceu uma notória evolução na pesquisa em hanseníase, com ampla exploração no diagnóstico sorológico (PAYNE et al., 1982; MOURA, 2008). Já foi relatada uma eficiente diferenciação entre as classes operacionais PB e MB (VAN DER VLIET et al., 1996). Silva e colaboradores (2007) corroboraram com os trabalhos que mostram a diferenciação entre as classificações e relataram também uma diminuição nos níveis antigênicos ao longo do tratamento, por meio do monitoramento de anticorpos pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ensaio de imunoabsorção enzimática).

Desse modo, a utilização de PGL-1 como antígeno para o ensaio de ELISA e teste de fluxo lateral ML-Flow (*Mycobacterium leprae-flow*), possui larga aplicabilidade, incluindo monitoramento de HCs. Contudo, a obtenção desse antígeno ainda enfrenta obstáculos devido à dificuldade no cultivo do bacilo.

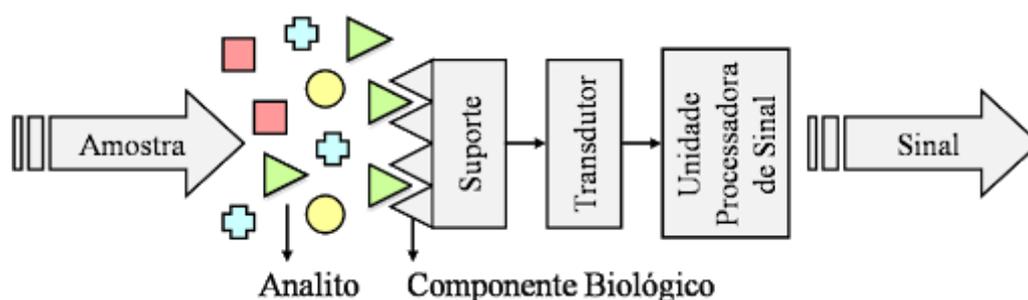
Com a finalidade de contornar esse problema, estudos têm canalizado esforços para descoberta de novos antígenos que possam ser utilizados no diagnóstico da hanseníase (BOBOSHA et al, 2014; GELUK et al, 2012; GELUK et al, 2009; DUTHIE et al, 2008). Assim, técnicas pós-genômicas possibilitaram, desse modo, o cumprimento desses objetivos a partir de sequências gênicas do *M. leprae* a fim de identificar peptídeos ou proteínas com potencial para o diagnóstico das diferentes formas clínicas da hanseníase.

As proteínas recombinantes ML0405 e ML2331, por exemplo, exibiram sensibilidade elevada para detecção de casos de hanseníase quando testados em uma população do Brasil (FABRI et al, 2016). Uma proteína quimérica (LID-1) foi desenvolvida a partir da fusão de dos genes ML0405 e ML2331, a qual se mostrou mais sensível que as proteínas originais isoladas. Epítomos do PGL-1 e LID-1 também foram conjugados para formação de LID-NDO, com intuito de produzir um teste ainda mais sensível, porém essa qualidade varia de acordo com a origem geográfica do paciente (AMORIM, et al.,2016).

Com a técnica de *phage display*, tornou-se possível desenvolver peptídeos que mimetizam antígenos naturais do bacilo. Essa técnica permite a identificação e caracterização de peptídeos pela afinidade com outras moléculas, como, por exemplo, anticorpos. Para isso, sequências randômicas de DNA podem ser clonadas em fagos que vão expressar os peptídeos de interesse no capsídeo. Assim, é possível selecionar moléculas específicas a partir de alvos imobilizados, como anticorpos de pacientes de hanseníase (BLANK et al, 1999).

Nesse sentido, foi possível selecionar, entre outros antígenos, uma versão mimética do PGL-1, o PGL-1-M3R, que se mostrou promissor para o diagnóstico de hanseníase, com especificidade de 100% e sensibilidade de 89,11% quando testado em amostras sorológicas por meio da técnica de ELISA (MORAES, 2017). Esse peptídeo também pode ser acoplado a outras plataformas ainda mais sensíveis a fim de garantir uma ferramenta capaz de detectar as diferentes formas da hanseníase, como os biossensores.

Os biossensores são conhecidos pela simplicidade, alta sensibilidade e confiabilidade, gerando respostas rápidas com instrumentação de baixo custo (PERIASAMY et al, 2009). Eles são sistemas característicos por combinar a atividade seletiva de um elemento de reconhecimento biológico, sensível a um analito de interesse, e um transdutor, que converte o sinal biológico em elétrico, podendo, portanto, ser utilizado para analisar diferenças de concentração do analito (Figura 03). Esses dispositivos possuem classificações baseadas no método de transdução, podendo ser óptico, acústico, termométrico ou eletroquímico (HULANICKI; GLAB, 1991; DESHPANDET; AMALNERKAR, 1993).



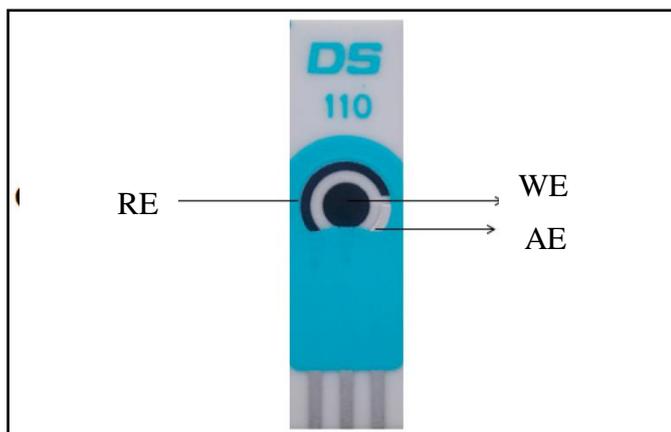
**Figura 4.** Representação esquemática de um biossensor com os componentes necessários para o funcionamento do sistema. Fonte: Sociedade Brasileira de Química. Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br>.

Os biossensores eletroquímicos são os mais comuns e estudados para o uso em análises clínicas e são baseados no preparo de eletrodos modificados com materiais biológicos. Eles são ainda agrupados em potenciométricos e condutimétricos, impedanciométricos ou amperométricos, variando de acordo com forma de obtenção dos resultados. No biossensor amperométrico, por exemplo, há uma transferência de elétrons após a aplicação de uma diferença de potencial, induzindo, desse modo, processos redox (SCHUHMANN et al., 2000; CASTILHO, 2003).

Na prática clínica, há uma busca por métodos analíticos que aliem praticidade e simplicidade para auxiliar no diagnóstico de doenças (MALECKA et al., 2016). Os eletrodos

impressos de carbono (*screen-printed carbonelectrodes* - SPCE) são adequados a essa realidade. Eles são produzidos em placas de cerâmica ou policloreto de vinila (PVC), recobertos por camadas de tinta de carbono e material isolante, compondo um dispositivo dividido em três partes: um eletrodo de trabalho (WE), um eletrodo de referência (RE) e um eletrodo auxiliar (AE) (KARUNAKARAN et al., 2015) (Figura 4). O eletrodo de trabalho pode ainda ser modificado com compostos diversos, como grafeno, por exemplo, a com intuito de ampliar a resolução do sistema (WANG et al., 2014).

O grafeno pode ser visualizado como uma folha plana de átomos de carbono unidos por ligações  $Sp^2$  densamente compactadas, possuindo uma espessura extremamente delgada, unidos em uma estrutura hexagonal. Esse alótropo de carbono e seus derivados têm despertado grande interesse na construção de sensores eletroquímicos devido a suas propriedades estruturais, elétricas, químicas, ópticas, mecânicas, isso somado a grande superfície de contato, o que favorece o aumento da sensibilidade desses dispositivos analíticos (XU et al., 2011; LIU et al., 2012).



**Figura 4.** Esquema de um eletrodo impresso de carbono (SPCE) comercializado pela empresa DropSens. Destaca-se seus principais componentes: eletrodo de trabalho (WE), eletrodo de referência (RE) e eletrodo auxiliar (AE).

Os elementos de reconhecimento biológico utilizados para modificar os sensores podem ser os mais variados, como anticorpos (LI et al., 2015), enzimas (DAS et al., 2016), peptídeos (WANG et al., 2016) e fragmentos de DNA (KUMAR et al., 2012) e RNA (FRANCO et al., 2015). Eissa e colaboradores (2012), por exemplo, desenvolveram um biossensor a partir de SPCE modificado com grafeno para determinação de  $\beta$ -lactoglobulina, o qual apresentou limite de detecção de  $0,85 \text{ pg mL}^{-1}$ .

Os biossensores baseados em peptídeos, por sua vez, têm crescido devido a vantagens

como maior estabilidade em comparação com proteínas maiores, além de outras moléculas mais complexas como anticorpos. Yang, J. et al. (2014) aplicaram um heptapeptídeo flanqueado na construção de um biossensor para detecção de bisfenol A, com um limite de detecção de  $1 \text{ nmol}^{-1}$ . Liu et al. (2016) desenvolveram um biossensor baseado em peptídeo para detecção de bactérias patogênicas, capaz de diferenciar, inclusive, as vivas das mortas, com um limite de detecção de  $10^2 \text{ CFU mL}^{-1}$ . Para detecção de anticorpos anti-peptídeos citrulinados, Villa et al. (2011) desenvolveram um biossensor amperométrico modificado com um peptídeo quimérico sintético para diagnóstico de artrite reumatoide a partir de amostras sorológicas. Recentemente, Neto et al. (2019), desenvolveram um biossensor fotoeletroquímico modificado com PGL-1-M3R para detecção do *M. leprae*, capaz de diferenciar entre amostras positivas e negativas.

Diante do exposto, nota-se a importância da adoção estratégias mais eficientes no controle da hanseníase. Isso inclui a utilização de peptídeos que mimetizam antígenos sintéticos, na rotina clínica da hanseníase. Esses peptídeos, quando acoplados a plataformas mais sensíveis, podem fornecer um dispositivo de baixo custo e fácil manuseio que se mostra útil para realização de um *screening* em regiões endêmicas para doença. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo realizar uma análise comparativa de diferentes plataformas diagnósticas baseadas em Glicolípido Fenólico 1 (PGL-1) em área de hiperendemia da hanseníase, a fim de reforçar a importância do uso de peptídeos miméticos no diagnóstico da hanseníase.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Analisar comparativamente diferentes plataformas de diagnóstico baseadas em PGL-1 em uma área de hiperendemia da hanseníase.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Comparar resultados de ELISA baseados no PLG-1 nativo e mimético;
- Desenvolver um biossensor para o PGL-1 nativo;
- Comparar os resultados do biossensor baseados em PLG-1 nativo e mimético.

## REFERÊNCIAS

ACOSTA, C. C. D. et al. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR $\gamma$  cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 7, p. e1007151, 2018.

ALMEIDA, E. C. et, al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v.99, p. 509-511, 2004.

AMORIM, F.M. et al. Identifying Leprosy and Those at Risk of Developing Leprosy by Detection of Antibodies against LID-1 and LID NDO. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 9, p. e0004934, 2016.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, pg. 373-382, 2003.

ARAÚJO, S. et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 55-9, Dec 2012. ISSN 1678 8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283454> >.

BAKKER, M. I et al. Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. **Lepr.Rev.** 77, 48-61, 2006.

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.

BOBOSHA, K. et al. Field-evaluation of a new lateral flow assay for detection of cellular and humoral immunity against *Mycobacterium leprae*. **Plos One**, v. 8, n. 5, p.1 11, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria GM/MS nº 149**, de 3 de fevereiro de 2016. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Eliminação da Hanseníase como Problema de Saúde Pública, com a finalidade de orientar os gestores e os profissionais dos serviços de saúde. [Brasília], 2016. Disponível em: <<https://central3.to.gov.br/arquivo/297694/>> Acesso em: 15 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Hanseníase no Brasil: dados e indicadores epidemiológicos selecionados. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Indicadores de Vigilância em Saúde descritos segundo a variável raça/cor, Brasil. **Boletim Epidemiológico**. Volume 49. Nº 4. 2018.

BRATSCHI, M. W. et al. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. **Lepr Rev**, v. 86, n. 2, p. 142-55, Jun 2015. ISSN 0305-7518. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26502685> >.

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/> >.

CASTILHO, T.J. Desenvolvimento e avaliação de um biossensor amperométrico à base de peroxidase para determinação de neurotransmissores. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2003.

CAVALCANTI, A. A. et al. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 5, p. 616-9, Oct 2012. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152346> >.

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/> >.

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

CURI, L. M. Excluir, isolar e conviver: um estudo sobre a lepra e a hanseníase no Brasil. 394f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas-**Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2010.

DAS, P. et al. Biosensors and Bioelectronics Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 386–397, 2016.

DESHPANDET, M.V.; AMALNERKAR, D.P. Biosensors prepared from electrochemically synthesized conducting polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 18, n. 4, p. 623-649, 1993.

DUTHIE, M. S. et al. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 11, p. 1659-65, 2008.

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

EISSA, S. et al. Electrochemical immunosensor for the milk allergen  $\beta$ - lactoglobulin based on electrografting of organic film on graphene modified screen-printed carbon electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 38, n. 1, p. 308-313, 2012.

FABRI, A. C. O. C et al. Integrative literature review of the reported uses of serological tests in leprosy management. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.49, p.158-164, 2016. ISSN 0037-8682. 2016.

FRANCO, R. et al. Gold Nanoparticles for DNA/RNA-Based Diagnostics. **Handbook of Nanoparticles**, p. 1–25, 2015.

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).

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).

GOULART, L. R.; GOULART, I. M. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. **Arch Dermatol Res**, v. 301, n. 2, p. 123-37, Feb 2009.

HARDAS, U., LELE, V. Evaluation of fluorescence microscopy for detection of *M. leprae*. **Leprosy in India**. New Delhi, V. 53(2), p. 273-277, 1981.

HULANICKI, A.; GLAB, S., INGMAN, F. Chemical Sensors-definition and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 1247, 1991.

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: p.518–521, 2008.

KARUNAKARAN, C.; RAJKUMAR, R.; BHARGAVA, K. Introduction to Biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 1-68, 2015.

KUMAR, A.; DASH, S. K.; SHARMA, D. P. DNA Based Biosensors for Detection of Pathogens. In: **Plant Fungal Disease Management**, v. 54, p. 31–35, 2012.

KUNDAKCI, N.; ERDEN, C. Leprosy: A great imitator. **Clinics in Dermatology**, v. 37, p. 200-2012, 2019.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. 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=S03650596201400020m=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S03650596201400020m=iso)>.

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>>.

LI, Y. et al. Electrochemical determination of trace lead(II) with enhanced sensitivity and selectivity by three-dimensional nanoporous gold leaf and self-assembled homocysteine monolayer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 758, n. October, p. 78–84, 2015.

LIU, X. et al. Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria. **Biosensors & bioelectronics**, v.80, p. 9-16, 2016.

LIMA, M. I. S. Desenvolvimento de peptídeos miméticos de antígenos de *M. leprae* e implicações no diagnóstico e prognóstico da hanseníase. Tese de doutorado, Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 20015.

LIU, Y.; DONG, X.; CHEN, P. Biological and chemical sensors based on graphene materials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2283-2307, 2012.

MALECKA, K. et al. Electrochemical genosensor based on disc and screen printed gold electrodes for detection of specific DNA and RNA sequences derived from Avian Influenza Virus H5N1. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 290-297, 2016.

MARTINEZ, A. N. et, al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. **J.Clin.Microbiol**, v. 47, p. 2124-2130, 2009.

MARTINEZ, A. N., et, al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **J.Clin.Microbiol**, 44, 3154-3159, 2006.

MATHESON, C. D. et al. Molecular exploration of the first-century Tomb of the Shroud in Akeldama, Jerusalem. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8319, Dec 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016819>>.

MITSUUDA, K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. **Tulane University Press**, 1953.

MORAES, E. C. S. **Validação de peptídeos recombinantes miméticos para o imunodiagnóstico da hanseníase em área hiperendêmica**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

MORGADO DE ABREU, M. A. et al. *Mycobacterium leprae* is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 1, p. 59-64, Jan 2014. ISSN 1469-0691. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23473290> >.

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](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000700004&nrm=iso) >.

NAVES, M.M.; PATROCINIO, L.G.; PATROCINIO, J.A.; MOTA, F.M.N.; SOUZA, A.D.; FLEURY, R.N. et al. Contribution of nasal biopsy to leprosy diagnosis. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v.23, n.2, p.177-180, 2009.

NETO, S. Y. et al. Immunodiagnostic of leprosy exploiting a photoelectrochemical platform based on a recombinant peptide mimetic of a *Mycobacterium leprae* antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 143, p. 111625, 2019.

PATROCÍNIO, L.G.; GOULART, I.M.B.; GOULART, L.R.; PATROCÍNIO, J.A.; FERREIRA, F.R.; FLEURY, R.N. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.44, p.311-316, 2005.

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).

PERIASAMY, A. P.; UMASANKAR, Y.; CHEN, Shen-Ming. Nanomaterials - Acetylcholinesterase Enzyme Matrices for Organophosphorus Pesticides Electrochemical Sensors: A Review. **Sensors**, v.9, p.4034-4055, mai 2009.

PONTES, A. R., ALMEIDA, M., XAVIER, M. B., QUARESMA, J. A., YASSUI, E. A. [Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nasal swab]. **Rev.Bras.Enferm**, v. 61, p. 734-737, 2008.

RAMAPRASAD, P. et al., Transmission and protection in leprosy: indication of the role of mucosal immunity. **Leprosy Review**, v. 68, p 301-315, 1997.

REECE, S. T. et al. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, p. 333-340, 2006.

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.

RUDEEANEKSIN, J., et, al. Light Cycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **Med.Microbiol**, v54, p. 263-270, 2008.

SANTOS, A. R., DE MIRANDA, A. B., SARNO, E. N., SUFFYS, P. N., DEGRAVE, W. M. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. **Med.Microbiol**, v. 39, p. 298-304, 1993.

SCHUHMANN, W.; ZIMMERMANN et, al.. Electron-transfer pathways between redox enzymes and electrode surfaces : reagentless biosensors based on thiol-monolayer-bound and polypyrrole-entrapped enzymes. **Faraday Discussion**, v. 116, p. 245-255, 2000.

SCHURING, R. P. et al. Association between anti-pGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. **Lepr Rev**, v. 77, n. 4, p. 343-55, Dec 2006. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17343221>>.

SILVA, E. A. et al. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment and reactions. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 12, p. 1450-8, Dec. 2007.

SINAN/SVS/MS. Taxa de detecção geral de casos novos da hanseníase nos estados do Brasil. 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/13/Registro-ativo-numero-e-percentual-por-estados-e-regioes-Brasil-2017>>.

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>>.

TRUMAN, R. W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. **PLoS.Negl.Trop.Dis.** v.2, p. 328, 2008

VAN BRAKEL, W. H. et al. The INFIR Cohort Study: investigating prediction, detection and pathogenesis of neuropathy and reactions in leprosy. Methods and baseline results of a cohort of multibacillary leprosy patients in north India. **Lepr Rev**, v. 76, n. 1, p. 14-34, Mar 2005. ISSN 0305-7518. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15881033>>.

VAN DER VLIET, G.M. et al. Use of NASBA RNA amplification for detection of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies from untreated and treated leprosy patients. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases.** v. 64, n.4, p. 396-403, Dec. 1996.

VIJAYAKUMARAN, P. et al. Does MDT arrest transmission of leprosy to household contacts? **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.66, p.125-130,1998.

VILLA, M. G. et al. Carbon nanotube composite peptide-based biosensors as putative diagnostic tools for rheumatoid arthritis. **Biosensors & bioelectronics**, v. 27, n. 1, p. 113-118, 2011.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic acids research**, v. 44, n. November 2015, p. D1087–D1093, 2016.

WANG, Z. et al. Electrochemical determination of lead and cadmium in rice by a disposable bismuth/electrochemically reduced graphene/ionic liquid composite modified screen-printed electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 199, p. 7-14, 2014.

WHO. Global leprosy update, 2018; reducing disease burden due to leprosy. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 93, n. 35, p. 445-446, August 2019. ISSN 0049-8114 (Print) 0049-8114 (Linking).

WIT, M. Y., DOUGLAS, J. T., MCFADDEN, J., KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. **J.Clin.Microbiol.** 31, 502-506, 1993.

XU, Y. et al. Electronic transport in monolayer graphene with extreme physical deformation: ab initio density functional calculation. **Nanotechnology**, v. 22, p. 1-4, 2011.

YANG, J.; KIM, S. E.; CHO, M.; YOO, I. K.; CHOE, W. S.; LEE, Y. Highly sensitive and selective determination of bisphenol-A using peptide-modified gold electrode. **Biosensors & bioelectronics**, v. 61, p. 38-44, 2014.

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. 968-972, Oct 2009. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking).

1 Artigo a ser submetido à revista *Clinical Infectious Disease*

2

3 **Efetividade de moléculas nativa e mimética do PGL-1 de**  
4 ***Mycobacterium leprae* em imunoenaios e biossensor eletroquímico**

5 Ricardo M. Gonçalves<sup>1</sup>, Rita C. V. Carvalho<sup>2</sup>, Isabela M. B. Goulart<sup>3</sup>, Luís R. G. Filho<sup>3,4</sup>,  
6 Emilly C. S. Moraes<sup>1</sup>, Mayara I. S. Lima<sup>1</sup>.

7 <sup>1</sup>Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia. Centro de  
8 Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão,  
9 Brasil.

10 <sup>2</sup>Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão, Brasil.

11 <sup>3</sup>Centro Nacional de Referência para Hanseníase e Dermatologia Sanitária, Hospital das  
12 Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas  
13 Gerais, Brasil.

14 <sup>4</sup>Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais,  
15 Brasil.

16 **Autor correspondente:** Mayara I. S. Lima; e-mail: mayaingrid@yahoo.com.br; telefone:  
17 (+55) 98 982900596

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28 **Resumo**

29 O diagnóstico de hanseníase ainda é um grande desafio para os profissionais de saúde,  
30 especialmente diante de casos com sinais e sintomas incipientes da doença. Desse modo, nota-  
31 se a importância do desenvolvimento de ferramentas diagnósticas cada vez mais sensíveis, e  
32 as plataformas imunológicas podem cumprir bem esse papel. Neste trabalho, foram realizadas  
33 análises comparativas entre o PGL-1 nativo e uma versão sintética (PGL-1 M3R) como  
34 sondas em ensaios de ELISA, e uma plataforma de biossensor eletroquímico com a molécula  
35 nativa foi desenvolvida e comparada a uma produzida a partir de um antígeno sintético.  
36 Inicialmente, os antígenos foram testados paralelamente pela técnica de ELISA em amostras  
37 sorológicas de 277 indivíduos agrupados entre pacientes, contato domiciliares e controles  
38 endêmicos, para detecção de IgM anti-PGL-1. O biossensor foi desenvolvido utilizando  
39 eletrodos impressos (DropSens®) modificados com grafeno e quitosana, para seguida  
40 imobilização dos antígenos. *Pools* de amostras sorológicas de indivíduos doentes e saudáveis  
41 foram analisados por meio de voltametria cíclica. Os resultados de ELISA mostraram que  
42 ambos as versões utilizadas do PGL-1 se comportaram de acordo com o perfil clínico de cada  
43 grupo, contudo peptídeo mimético apresentou respostas mais acentuadas. Quando comparada  
44 a resposta dos antígenos com amostras de pacientes virgens de tratamento nos imunoensaios,  
45 obteve-se uma concordância considerável (Kappa: 0,683). Na plataforma eletroquímica, os  
46 sensores foram capazes de diferenciar entre indivíduos doentes e saudáveis. No biossensor  
47 construído com PGL-1-M3R foi possível obter uma maior variação entre as duas amostras,  
48 porém o sistema que recebeu a versão nativa também cumpriu com esse objetivo. Assim,  
49 nossos resultados mostram a eficiência desses antígenos na detecção de IgM anti-PGL-1 em  
50 plataformas de ELISA e biossensor, evidenciando a importância do uso dessas moléculas no  
51 diagnóstico de hanseníase.

52 **Palavras-chave:** Hanseníase; Imunossensores; Imunodiagnóstico; Sorologia; ELISA.

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

## 1. Introdução

O *Mycobacterium leprae* possui marcadores moleculares que podem ser utilizados para o desenvolvimento de ferramentas laboratoriais, a fim auxiliar no controle da hanseníase, como indicação e acompanhamento do tratamento, além do monitoramento de contatos domiciliares (HC)<sup>1</sup>. Dentre estes, antígenos específicos do bacilo mostram-se promissores no desenvolvimento de diferentes plataformas para auxiliar no diagnóstico da doença.

O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) foi um dos primeiros antígenos específicos do *M. leprae* a ser isolado e é o principal componente antigênico presente na parede celular desse patógeno. Ele é composto por um trissacarídeo único, o 3,6-di-O-metila- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-di-O-metila- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-O-metila- $\alpha$ -L-ramnopiranosose, no qual o determinante antigênico é a última porção di ou trissacarídica da molécula<sup>2,3</sup>.

Esse antígeno tem sido amplamente utilizado para auxiliar no diagnóstico da hanseníase a partir de amostras sorológicas, uma vez que há uma relação diretamente proporcional entre taxas de IgM anti-PGL-1 e a carga bacilar do paciente, mostrando-se, conseqüentemente, eficiente na diferenciação das classificações operacionais: paucibacilar (PB) ou multibacilar (MB)<sup>4</sup>. Em pacientes do polo virchowiano (VV) observa-se uma positividade que varia entre 80 a 100% e de 30 a 60% tuberculoide (TT)<sup>5</sup>. Além disso, a titulação de IgM anti-PGL-1 tende a diminuir logo após as primeiras doses da poliquimioterapia (PQT)<sup>6,7</sup>.

Desse modo, nota-se a ampla aplicabilidade do PGL-1 em estratégias de combate à hanseníase, entretanto, a obtenção desse antígeno de forma nativa ainda enfrenta sérias barreiras, pois o bacilo não cresce em meios artificiais e o cultivo *in vivo* necessita de grandes adequações técnicas<sup>8</sup>.

Alternativamente, versões sintéticas do PGL-1 têm sido produzidas. O antígeno ND-O, por exemplo, é um açúcar quimicamente sintetizado que se comporta de forma semelhante ao antígeno nativo na detecção de IgM anti-PGL-1<sup>10</sup>. Em outros trabalhos, o epítipo do PGL-1 foi fundido com a proteína LID-1 (LID-ND-O), com o objetivo de produzir testes ainda mais sensíveis, visto que esta também é capaz de identificar anticorpos específicos do bacilo<sup>11</sup>.

Além dessas moléculas sintéticas de PGL-1, uma alternativa é utilização de componentes proteicos, como peptídeos, que mimetizam funcionalmente a molécula nativa. O PGL-1M3R, por exemplo, é um peptídeo com esse padrão, desenvolvido por técnicas moleculares, com potencial para utilização em imunoenaios no diagnóstico da hanseníase por ELISA<sup>12</sup>, ou ainda ser imobilizados em sensores biológicos.

Os biossensores são dispositivos analíticos que incorporam um elemento biológico a um sistema transdutor físico-químico, proporcionando análises seletivas em dispositivos miniaturizados<sup>14</sup>. Além disso, apresentam versatilidade com incorporação de diferentes biomoléculas, como anticorpos, enzimas, peptídeos, tendo, portanto, despertado um crescente interesse para aplicações clínicas<sup>15,16</sup>. Recentemente, Neto et al. (2019)<sup>13</sup>, desenvolveram um biossensor fotoeletroquímico modificado com PGL-1-M3R para detecção do *M. leprae*, capaz de diferenciar entre amostras positivas e negativas, evidenciando a importância dessa ferramenta para o diagnóstico da hanseníase.

Dessa forma, comparamos a efetividade da molécula nativa e do peptídeo mimético PGL-1M3R, sendo utilizados como antígenos em duas diferentes plataformas de diagnóstico, imunoenaios enzimáticos e sensores biológicos, para reforçar a utilidade dessas moléculas no diagnóstico complementar da hanseníase.

## 119 2. Materiais e Métodos

### 120 2.1. Amostras biológicas e antígenos

121 Para os testes, foram utilizadas amostras sorológicas de indivíduos do Maranhão,  
122 Brasil, disponíveis no biorrepositório do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da  
123 Universidade Federal do Maranhão. Para os imunoenaios de ELISA, fez-se o uso de  
124 amostras de 277 indivíduos, agrupados em pacientes (77), contatos domiciliares (CD) (150) e  
125 controles endêmicos (CE) (50). Os pacientes foram agrupados pela classificação de Ridley e  
126 Jopling (1966) e estratificados de acordo com alguns aspectos clínicos: virgens de tratamento  
127 (VT), em tratamento (T), pós-cura (PC) e diagnóstico negativo (DN). Para os ensaios com  
128 sensores, foram utilizadas 5 amostras de pacientes de hanseníase com a forma MB e 5 de CE.

129 O PGL-1 nativo foi gentilmente doado pela empresa BEI Resources MTA  
130 (<https://www.beiresources.org/>). O peptídeo mimético, denominado PGL-1M3R, foi  
131 quimicamente sintetizado por uma empresa especializada (Peptide 2.0 Inc., USA).

### 132 2.2. Ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA)

#### 133 2.2.1. ELISA para detecção de IgM anti-PGL-1

134 Placas Nunc™ MaxiSorp™ foram sensibilizadas com PGL-1, na concentração de 0,01  
135  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , diluído em etanol absoluto e aguardou-se o álcool evaporar por completo, seguido da  
136 etapa de bloqueio com albumina de soro bovino (BSA) 1%. Após as placas serem lavadas  
137 com PBS (tampão fosfato salino) pH 7.4, receberam amostras de soro diluídas em BSA 1%,  
138 na concentração de 1:100. Para detecção indireta de anticorpos IgM anti-PGL-1, foram  
139 utilizados anticorpos secundários anti-IgM marcados com peroxidase (Sigma-Aldrich). A  
140 etapa de revelação ocorreu com Ortofenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),  
141 e a reação foi parada com ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). As leituras foram realizadas em  
142 espectrofotômetro Biochrom EZ Read 400® com filtro de 492nm.

143 Os imunoenaios realizados com PGL-1-M3R seguiram basicamente os mesmos  
144 passos realizados com a molécula nativa. Porém, o antígeno foi diluído na concentração de 1  
145  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.6) 1M, com incubação *overnight*. Por fim, o  
146 BSA foi preparado a 5% e as lavagens ocorreram com PBS tween (0,05%).

### 147 2.3. Biossensores

148 Foram utilizados eletrodos impressos de carbono (SPCE) da DropSens® (ref. DRP-  
149 010), contendo um eletrodo de trabalho (ET) e eletrodo de auxiliar (EA) de carbono, e um  
150 eletrodo de referência (ER) de prata. O potenciostato utilizado para realização das varreduras  
151 foi o EmStat Blue da PalmSens® com conector para eletrodo impresso.

#### 152 2.3.1. Limpeza dos eletrodos e construção dos biossensores

153 Inicialmente, os SPCEs foram eletroquimicamente limpos por voltametria cíclica (VC)  
154 em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5M, com a faixa de potencial -0,8 a +0,8V e velocidade de varredura  
155 de  $0,05\text{V s}^{-1}$ . Para funcionalização da superfície do ET, foi gotejada uma solução de grafeno  
156 (GR) e quitosana (QT). O GR (1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) foi diluído N,N-Dimetilformamida [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH],  
157 e a QT (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) em ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH). As duas soluções foram misturadas e  
158 sonicadas por meia hora. Após isso, 3 $\mu\text{L}$  da suspensão de GR-QT foi gotejada sobre a  
159 superfície do ET e aguardou-se secar, obtendo-se o SPCE/GR-QT. SPCE/GR-QT distintos  
160 foram biologicamente modificados com os antígenos (PGL-1- nativo ou PGL-1-M3R) na  
161 concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Foram realizadas varreduras por VC, com os mesmos parâmetros  
162 eletroquímicos acima citados, para análise do comportamento da corrente em cada etapa.

### 164 2.3.2. Incubação com amostras sorológicas

165 Os *pools* de amostras sorológicas (CE ou MB), diluídas em tampão fosfato 0,1M (pH  
166 7.4), na proporção de 1:100, e foram incubadas com os distintos biossensores por 30 minutos  
167 em temperatura ambiente. Os eletrodos modificados com PGL-1 nativo foram lavados com  
168 PBS pH 7.4, enquanto que os que receberam PGL-1-M3R, a lavagem foi realizada com PBS  
169 tween 0,1 % pH 7.4. Assim como após cada modificação para análise do comportamento do  
170 eletrodo em cada etapa, os sistemas completos (incubados com *pools* de amostras sorológicas)  
171 foram lidos por VC nos mesmos parâmetros eletroquímicos utilizados na limpeza  
172 eletroquímica.

173

### 174 2.4. Análise Estatística

175 As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism software versão 8.0  
176 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A determinação do *cut off* foi feita por análise da  
177 curva ROC incluindo dados de sensibilidade e especificidade, considerando os grupos de  
178 pacientes e de CE. Os gráficos para visualização dos resultados eletroquímicos foram gerados  
179 no Software PSTrace® 5.3 para Windows, fornecido pela PalmSens® e editados no software  
180 Origin® 8.5.

## 181 3. Resultados

182 A Figura 01 apresenta os resultados dos imunoenaios de ELISA comparando a  
183 reatividade dos dois antígenos para cada paciente. Os indivíduos foram agrupados por formas  
184 clínicas, e os resultados foram comparados com a média dos CEs. Observa-se nesse gráfico  
185 um comportamento semelhante, na maioria dos indivíduos, para os dois antígenos, com  
186 reatividade que segue o padrão da literatura para cada forma clínica, ou seja, menor no polo  
187 tuberculoide e uma tendência de aumento até o polo virchowiano (VV). Nota-se também que,  
188 conforme um valor de absorvância aumenta para o PGL-1 nativo, há também um aumento da  
189 reatividade para o antígeno mimético, porém, de forma mais acentuada.

190 Na comparação dos pacientes por aspectos clínicos (Figura 02), fica ainda mais  
191 evidente que a resposta a ambos os antígenos (nativo e mimético) está de acordo com formas  
192 clínicas dos pacientes. Nos pacientes VT, nota-se um aumento na quantidade de anticorpos  
193 IgM anti-PGL-1 à medida que há uma migração para o polo VV. Os indivíduos em  
194 tratamento, os que receberam alta médica e os que negativaram para o diagnóstico de  
195 hanseníase, por sua vez, apresentaram titulações de anticorpos com valores próximos aos dos  
196 CE. Esse comportamento de maneira geral é semelhante para os dois antígenos.

197 Os contatos domiciliares (Figura 3) observados individualmente também apresentaram  
198 resultados com perfis semelhantes para os dois antígenos. Porém, vale ressaltar que houve  
199 discordância em 12 dos 50 contatos avaliados (Tabela 01).

200 Na tabela 1, estão apresentados os resultados de concordância entre os dois ensaios,  
201 onde para os pacientes VT e em T a concordância é moderada, entretanto a concordância  
202 entre CD e pacientes no PC é aceitável ou leve, respectivamente. Isso indica que podem  
203 existir contatos infectados e que positivaram para um dos ensaios ou pacientes clinicamente  
204 curados que ainda apresentam anticorpos circulantes.

205 Quanto aos resultados relacionados ao desenvolvimento de sensores biológicos,  
206 inicialmente apresenta-se os perfis eletroquímicos da limpeza e avaliação da estabilidade dos  
207 SPCEs, em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 4). Percebe-se uma diminuição dos picos de oxidação  
208 (de +31.472  $\mu$ A para +26.054  $\mu$ A) do ciclo 1 para o 2, que mantêm uma estabilidade nos  
209 ciclos seguintes, e um deslocamento desse pico para um potencial mais catódico pode ser  
210 observado (de +0.308V para +0.292V).

211 A figura 5A mostra o processo inicial da construção do sensor, na qual se pode  
212 visualizar a resposta do SPCE antes e após a modificação com GR e QT, com realização de  
213 varreduras por VC com solução de ferro/ferricianeto de potássio com KCl. Nota-se um  
214 aumento acentuado nos picos oxidação (de +112 $\mu$ A para +307 $\mu$ A) no SPCE/GR-QT. Na  
215 figura 5B, tem-se sucessivos ciclos realizados no eletrodo modificado, onde se observa uma  
216 estabilidade nas respostas logo após o terceiro ciclo.

217 Seguindo essas etapas, construiu-se um biossensor com PGL-1 nativo como elemento  
218 de reconhecimento biológico (Figura 6A). Verifica-se que houve uma diminuição no pico de  
219 oxidação após a incubação do SPCE/GR-QT com o antígeno (+270  $\mu$ A para +223  $\mu$ A).  
220 Quando o SPCE/GR-QT/PGL-1-Nat foi incubado com as amostras biológicas, *pools* de soros  
221 CE e VV, a queda no de oxidação foi de 35% e 50%, respectivamente.

222 Na construção do biossensor com PGL-1-M3R (Figura 6B), houve um decréscimo  
223 mínimo no pico de oxidação quando o SPCE/GR-QT foi modificado com o antígeno (de +306  
224  $\mu$ A para +304  $\mu$ A). Após a incubação do SPCE/GR-QT/PGL-1-M3R com amostras  
225 biológicas, os *pools* de soros CE e VV condicionaram quedas nos picos de oxidação de 31.4%  
226 e 41.9%, respectivamente.

227 Quanto à reprodutibilidade dos testes, as figuras 6C e 6D mostram, respectivamente, o  
228 comportamento da corrente em triplicatas com PGL-1nativo e mimético. A figura 7 mostra a  
229 variação na corrente de oxidação com base na média dos valores das triplicatas. Observa-se  
230 que houve diferença significativa entre *pool* de soro MB e CE para os dois antígenos ( $p =$   
231 0.0064 para o PGL-1 nativo e  $p < 0.0001$  para o antígeno sintético). Na comparação entre  
232 antígenos, ocorreu diferença apenas entre biossensores incubados com *pool* de soro MB ( $p =$   
233 0.0154).

#### 234 4. Discussão

235 A hanseníase ainda afeta milhares de pessoas no mundo, principalmente em regiões  
236 carentes de investimento em saúde pública<sup>17</sup>, e o desenvolvimento de ferramentas que aliem  
237 robustez e acessibilidade ao diagnóstico, podem favorecer o controle dessa doença mesmo em  
238 um cenário econômico desfavorável<sup>18</sup>.

239 Os testes sorológicos para o diagnóstico de hanseníase com a utilização de PGL-1 já  
240 são uma realidade desde a década de 1980, porém com o passar dos anos a necessidade de  
241 desenvolver antígenos sintéticos alternativos à molécula nativa tornou-se urgente e  
242 necessário<sup>19</sup>.

243 Neste trabalho, foram utilizados o PGL-1 nativo e um peptídeo mimético a este  
244 glicolípídeo, em imunoenaios de ELISA e biossensor, para detenção de IgM anti-PGL1 em  
245 amostras sorológicas, no intuito de validar o uso dessa molécula sintética no  
246 imunodiagnóstico da hanseníase, bem como desenvolver novas plataformas de diagnóstico  
247 rápido.

248 Os resultados da utilização dos PGL-1-M3R em imunoenaios apresentaram perfis  
249 semelhantes aos obtidos com a versão nativa desse antígeno para as diferentes formas e  
250 quadros clínicos dos pacientes. Os pacientes com formas MBs virgens de tratamento, por  
251 exemplo, apresentaram as maiores titulações de anticorpos IgM anti-PGL-1 para as duas  
252 moléculas. Esses comportamento já era esperado, uma vez que há uma acentuada resposta  
253 humoral, com um aumento considerável dos índices de anticorpos circulantes nesses  
254 pacientes, enquanto que para os indivíduos PBs, os antígenos foram menos reativos para  
255 ambos os testes de ELISA, que é justificável pela intensa resposta imune celular, onde a  
256 atividade fagocítica controla o crescimento do bacilo<sup>20</sup>.

257 Quanto à baixa reatividade nos imunoenaios de ELISA com amostras de pacientes em  
258 tratamento e daqueles que estavam de alta médica, esse padrão é observado uma vez que há  
259 uma redução gradual dos níveis de anticorpos específicos com a poliquimioterapia. Dentro

260 destes grupos, os pacientes positivos para os testes podem representar casos de recidiva,  
261 resistência ao tratamento ou reinfecção<sup>21, 22</sup>, reforçando que os dois antígenos testados neste  
262 trabalho podem ser utilizados no monitoramento de indivíduos em tratamento e pós-alta.

263 No grupo dos indivíduos com diagnóstico negativo e dos contatos domiciliares, a  
264 positividade observada para ambos os testes por ELISA é um indicativo que pode estar  
265 ocorrendo infecções subclínicas e que essas pessoas precisam ser monitoradas, pois  
266 apresentam chances aumentadas em até 8 vezes de adoecer<sup>20</sup>.

267 Quando comparada a reatividade dos antígenos, nota-se que o PGL-1-M3R reage com  
268 mais intensidade para maioria das amostras. Esse resultado pode ser explicado por haver  
269 diferenças na estrutura e composição das moléculas. O PGL-1 nativo é composto por um  
270 trissacarídeo ligado a um núcleo lipídico<sup>2,3</sup> e é utilizado em menor concentração (0,01  
271  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), de modo que seja possível diferenciar as amostras pelas formas clínicas. O antígeno  
272 sintético, no entrando, é um peptídeo de 22 resíduos de aminoácidos, possui um tamanho  
273 reduzido, dois epítomos e é utilizado em uma concentração 100 vezes maior ( $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )<sup>12</sup>. Desse  
274 modo, há um maior número de sítios ativos para formação de imunocomplexos, porém,  
275 mantendo a discriminação entre as formas clínicas dos pacientes.

276 Na construção das plataformas eletroquímicas, os eletrodos foram inicialmente limpos  
277 com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para remoção de possíveis contaminantes que poderiam vir a influenciar nos  
278 resultados após a montagem do sistema e para assegurar uma melhor reprodutibilidade dos  
279 resultados com o biossensor produzido. Como no primeiro ciclo houve uma diminuição na  
280 intensidade de corrente, isso pode ser um indicativo que possíveis contaminantes foram  
281 removidos.

282 A modificação com grafeno e quitosana alterou consideravelmente a intensidade das  
283 correntes de pico. Isso foi possível devido a propriedades intrínsecas do grafeno como  
284 condutibilidade elétrica e grande área superficial, o que favoreceu um aumento substancial na  
285 superfície do eletrodo de trabalho, mantendo as propriedades elétricas do carbono<sup>21,22</sup>. A  
286 quitosana, por sua vez, não contribui para o aumento do sinal de corrente, porém, é conhecida  
287 por melhorar a adsorção do antígeno na superfície de eletrodos. Esse carboidrato, além de  
288 possuir grupos amina, favorecendo, por exemplo, interação com grupos hidroxila dos  
289 antígenos, forma uma matriz porosa com capacidade, inclusive, de imobilização de grandes  
290 moléculas como enzimas<sup>23,24</sup>.

291 Após a modificação biológica com os antígenos, é possível observar que houve um  
292 decréscimo mais acentuado nas correntes de pico do eletrodo que recebeu o PGL-1 nativo,  
293 enquanto que o antígeno mimético proporcionou uma alteração pouco perceptível. Isso  
294 demonstra que a imobilização do PGL-1-M3R causou menos alterações na estrutura do  
295 eletrodo, com menor prejuízo à transferência eletrônica. A complexidade e o tamanho do  
296 antígeno nativo pode ser a resposta para uma redução no pico de oxidação por meio de  
297 repulsão eletrostática do íon  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . Os lipídeos, por exemplo, são conhecidos por suas  
298 propriedades de isolamento elétrico<sup>25</sup>.

299 Quando os biossensores foram incubados com *pool* de amostras sorológicas,  
300 observou-se o mesmo padrão de resposta para os dois antígenos, com uma maior queda do  
301 sinal analítico quando em contato com amostras de pacientes MB. Esse comportamento do  
302 sistema é justificável pela interação antígeno-anticorpo, que é mantida por ligações de  
303 hidrogênio, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e/ou de van der Waals<sup>26</sup>.

304 Com relação desempenho dos sensores, observa-se uma discriminação mais  
305 substancial no eletrodo modificado com PGL-1-M3R, mesmo os dois sistemas tendo recebido  
306 a mesma concentração antigênica ( $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Esta observação está relacionada ao tamanho das  
307 moléculas e, portanto, à disponibilidade de epítomos disponíveis. Desse modo, enquanto que a  
308 molécula nativa é relativamente grande e ocupa individualmente mais espaços na superfície

309 do eletrodo, o antígeno mimético ocupa uma área menor, portanto disponibiliza mais sítios de  
310 ligação para os anticorpos, o que torna esse sistema mais sensível.

311 No caso dos sistemas que receberam *pool* de soro de CE, a diminuição no pico de  
312 oxidação com relação aos eletrodos que não receberam nenhuma amostra, é um indicativo que  
313 o soro, ainda que de pessoas saudáveis, contenha moléculas que podem estar interagindo com  
314 a superfície do WE, visto que o sistema foi montado na ausência de moléculas de bloqueio  
315 como albumina de soro bovino (BSA), formando uma camada extra que diminui a difusão de  
316 íons  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . No entanto, os anticorpos específicos presentes nas amostras positivas são  
317 mais eficientes nesse aspecto, uma vez que foi possível fazer uma discriminação entre  
318 amostras positivas e negativas pelo monitoramento do pico de oxidação do íon  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ .

319

## 320 5. Conclusões

321 Nossos resultados apontam que comparativamente não há diferenças substanciais no  
322 comportamento do antígeno sintético em relação ao PGL-1 nativo, podendo este substituir a  
323 molécula nativa no imunodiagnóstico da hanseníase, uma vez que pode ser acoplado em  
324 diferentes plataformas gerando respostas de acordo com o perfil clínico do paciente. Dessa  
325 forma, o PGL1-M3R é um marcador promissor, principalmente na construção de sensores,  
326 pois alia a praticidade e robustez dos imunossensores com a facilidade da síntese química  
327 deste antígeno. Vale ressaltar também, o pioneirismo do trabalho em desenvolver um sensor  
328 utilizando a molécula nativa, com propriedades químicas complexas e que ainda tem  
329 importantes aplicações clínicas.

330

## 331 Referências

332 1. Patrocínio, L. G., Goulart, I. M. B., Goulart, L. R., Patrocínio, J. A., Ferreira, F. R., &  
333 Fleury, R. N. (2005). Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the  
334 polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 44(3), 311-316.

335 2. Hunter, S. W., Fujiwara, T., & Brennan, P. J. (1982). Structure and antigenicity of the  
336 major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *Journal of Biological*  
337 *Chemistry*, 257(24), 15072-15078.

338 3. Young, D. B., Dissanayake, S., Miller, R. A., Khanolkar, S. R., & Buchanan, T. M. (1984).  
339 Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species-specific glycolipid  
340 of *Mycobacterium leprae*. *Journal of Infectious Diseases*, 149(6), 870-873.

341 4. Van Der Velden, V. H. (2007) Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-  
342 inflammatory potential in asthma. *Mediators of Inflammation*, 42(7), 229-37-1998.

343 5. Parkash, O., Kumar, A., Pandey, R., Nigam, A., & Girdhar, B. K. (2008). Performance of a  
344 lateral flow test for the detection of leprosy patients in India. *Journal of medical*  
345 *microbiology*, 57(1), 130-132.

346 6. Douglas, J. T., Steven, L. M., Fajardo, T., Cellona, R. V., & Madarang, M. G. (1988). The  
347 effects of chemotherapy on antibody levels in lepromatous patients. *Leprosy review*, 59(2),  
348 127-135.

349 7. Silva, E. A., Iyer, A., Ura, S., Lauris, J. R., Naafs, B., Das, P. K., & Vilani-Moreno, F.  
350 (2007). Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive

- 351 protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment and reactions. *Tropical*  
352 *Medicine & International Health*, 12(12), 1450-1458.
- 353 8. Eichelmann, K., González, S. G., Salas-Alanis, J. C., & Ocampo-Candiani, J. (2013).  
354 Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas*  
355 *Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 104(7), 554-563.
- 356 9. Chatterjee, D., & Khoo, K. H. (1998). Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary  
357 lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology*, 8(2), 113-120.
- 358 10. Spencer, J. S., & Brennan, P. J. (2011). The role of Mycobacterium leprae phenolic  
359 glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Leprosy*  
360 *review*, 82(4), 344.
- 361 11. Duthie, M. S., Balagon, M. F., Maghanoy, A., Orcullo, F. M., Cang, M., Dias, R. F., ... &  
362 Reed, S. G. (2014). Rapid quantitative serological test for detection of infection with  
363 Mycobacterium leprae, the causative agent of leprosy. *Journal of clinical microbiology*, 52(2),  
364 613-619.
- 365 12. Moraes, E. C. S. (2017). *Validação de peptídeos recombinantes miméticos para o*  
366 *imunodiagnóstico da hanseníase em área hiperendêmica*. São Luís: Universidade Federal do  
367 Maranhão.
- 368 13. Neto, S. Y., Lima, M. I. S., Pereira, S. R. F., Goulart, L. R., Luz, R. D. C. S., & Damos, F.  
369 S. (2019). Immunodiagnostic of leprosy exploiting a photoelectrochemical platform based on  
370 a recombinant peptide mimetic of a Mycobacterium leprae antigen. *Biosensors and*  
371 *Bioelectronics*, 143, 111625.
- 372 14. Periasamy, A. P., Umasankar, Y., & Chen, S. M. (2009). Nanomaterials-  
373 acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical  
374 sensors: a review. *Sensors*, 9(6), 4034-4055.
- 375 15. Liu, M., Zhang, C., & Liu, F. (2015). Understanding wax screen-printing: a novel  
376 patterning process for microfluidic cloth-based analytical devices. *Analytica chimica*  
377 *acta*, 891, 234-246.
- 378 16. Das, P., Das, M., Chinnadayala, S. R., Singha, I. M., & Goswami, P. (2016). Recent  
379 advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor  
380 applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 386-397.
- 381 17. World Health Organization, 2017. Wkly. Epidemiol. Rec. 94, 389-411.  
382 <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326775/WER9435-36-en-fr.pdf?ua=1>.
- 383 18. Alban, S. M., de Moura, J. F., Thomaz-Soccol, V., Sékula, S. B., Alvarenga, L. M., Mira,  
384 M. T., & Minozzo, J. C. (2014). Phage display and synthetic peptides as promising  
385 biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. *PLoS One*, 9(8).
- 386 19. Silva, E. A., Rosa, P. S., Belone, A. F. F., Coelho, N. M. B., Ura, S., & Tomimori, J.  
387 (2017). Serodiagnosis of leprosy and follow-up of household contacts using a commercial  
388 rapid test containing ND-O/LID-1 antigens. *Lepr Rev*, 88(2), 174-183.

389 20. Barreto, J. G., De Souza Guimarães, L., Leao, M. R. N., Ferreira, D. V. G., De Araujo  
390 Lima, R. A., & Salgado, C. G. (2011). Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases:  
391 household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian  
392 Amazon. *Leprosy review*, 82(4), 358.

393 21. Cho, S. N., Yanagihara, D. L., Hunter, S. W., Gelber, R. H., & Brennan, P. J. (1983).  
394 Serological specificity of phenolic glycolipid I from Mycobacterium leprae and use in  
395 serodiagnosis of leprosy. *Infection and Immunity*, 41(3), 1077-1083.

396 22. Duthie, M. S., Balagon, M. F., Maghanoy, A., Orcullo, F. M., Cang, M., Dias, R. F., ... &  
397 Reed, S. G. (2014). Rapid quantitative serological test for detection of infection with  
398 Mycobacterium leprae, the causative agent of leprosy. *Journal of clinical microbiology*, 52(2),  
399 613-619.

400 23. Geim, A. K., & Novoselov, K. S. (2010). The rise of graphene. In *Nanoscience and*  
401 *technology: a collection of reviews from nature journals* (pp. 11-19).

402 23. Shao, Y., Wang, J., Wu, H., Liu, J., Aksay, I. A., & Lin, Y. (2010). Graphene based  
403 electrochemical sensors and biosensors: a review. *Electroanalysis: An International Journal*  
404 *Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 22(10), 1027-1036.

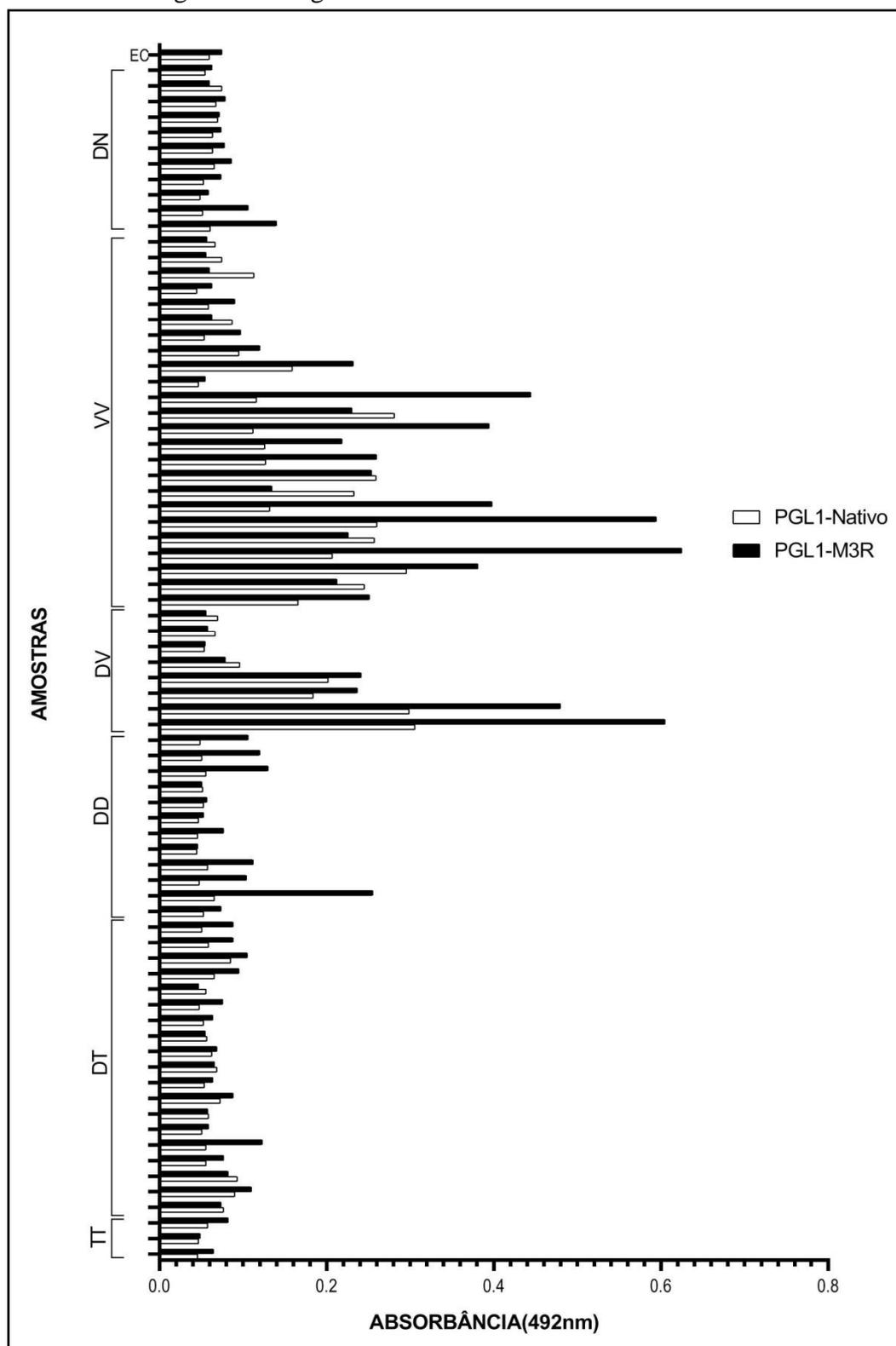
405 24 Yang, Y. M., Wang, J. W., & Tan, R. X. (2004). Immobilization of glucose oxidase on  
406 chitosan-SiO<sub>2</sub> gel. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(2), 126-131.

407 25. Zou, Y., Xiang, C., Sun, L. X., & Xu, F. (2008). Glucose biosensor based on  
408 electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme  
409 with chitosan-SiO<sub>2</sub> sol-gel. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(7), 1010-1016.

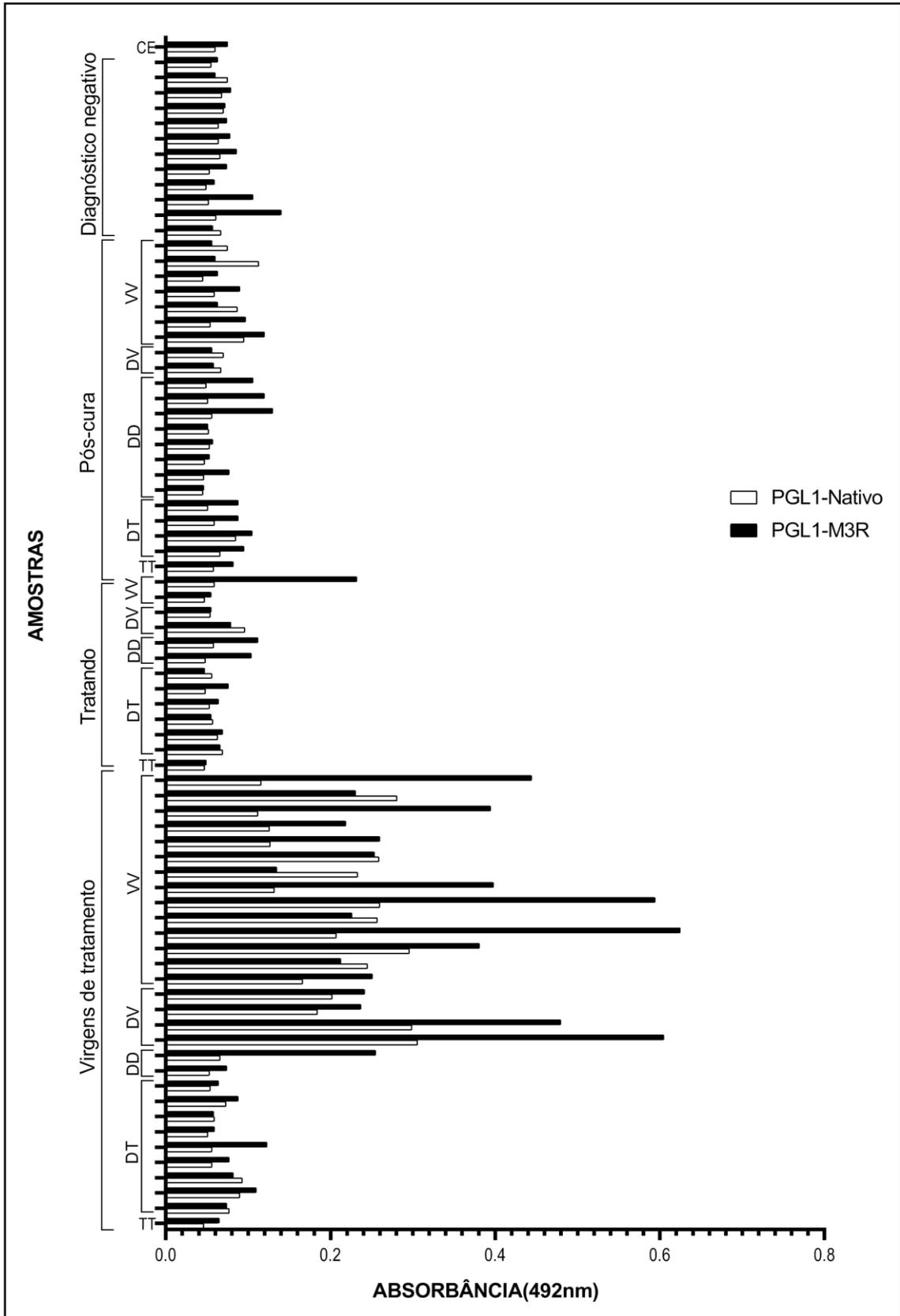
410 26. Tien, H. T., & Ottova, A. (2003). The bilayer lipid membrane (BLM) under electrical  
411 fields. *IEEE transactions on dielectrics and electrical insulation*, 10(5), 717-727.

412 27. MacCallum, R. M., Martin, A. C., & Thornton, J. M. (1996). Antibody-antigen  
413 interactions: contact analysis and binding site topography. *Journal of molecular*  
414 *biology*, 262(5), 732-745.

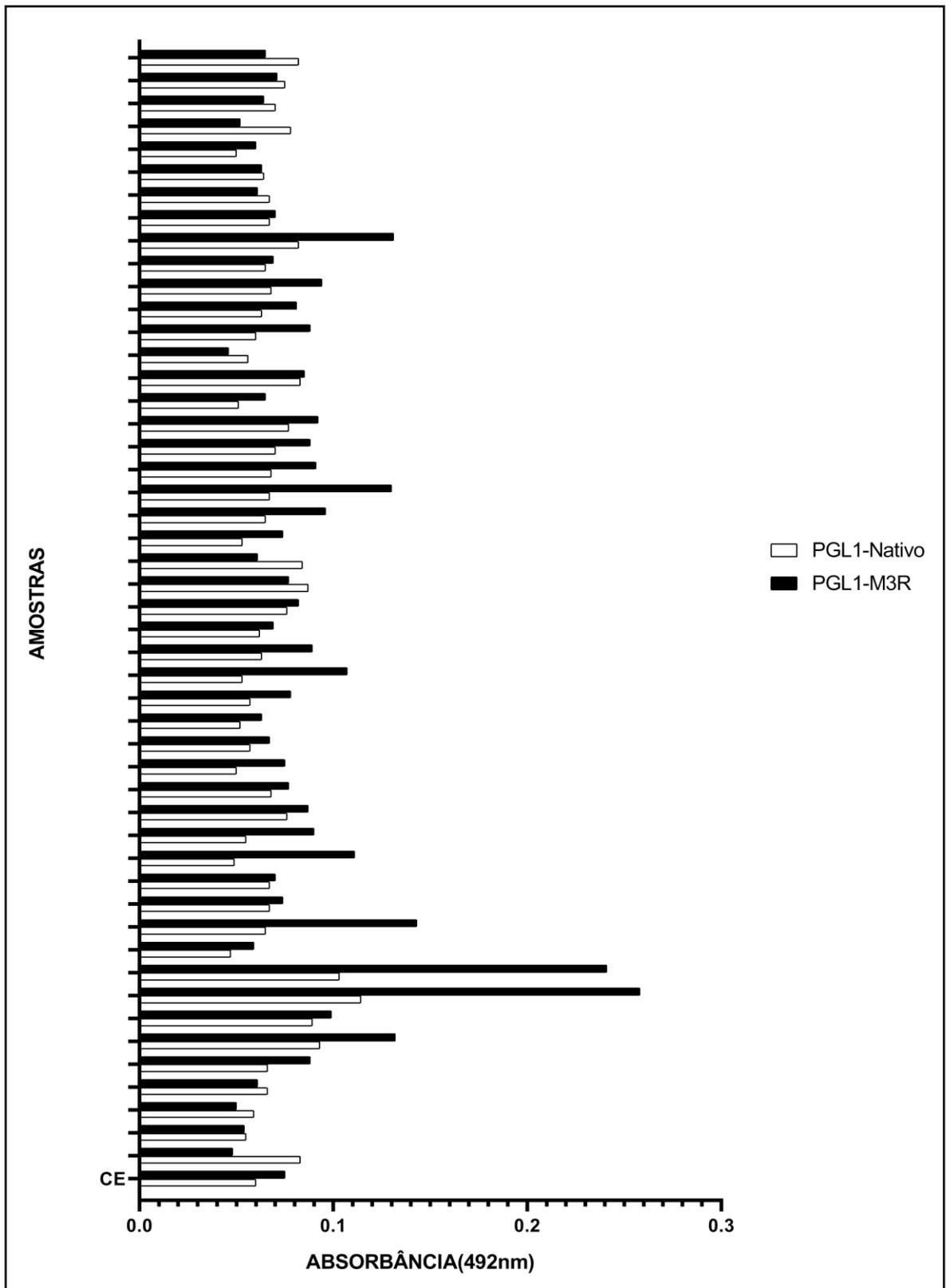
415  
416  
417  
418



421 **Figura1.**Gráfico comparativo entre o uso do PGL-1 nativo e PGL-1-M3R em imunoenaios de ELISA com  
422 estratificação por formas clínicas. Controle endêmico (CE); tuberculoide (TT); dimorfo-tuberculoide (DT);  
423 dimorfo-dimorfo (DD); dimorfo-virchowiano (DV); virchowiano(VV).



425 **Figura 2.**Gráfico comparativo entre o uso do PGL-1 nativo e PGL-1-M3R em imunoenaios de ELISA com  
 426 estratificação por formas e aspectos clínicos. Controle endêmico (CE); tuberculose (TT); dimorfo-tuberculose  
 427 (DT); dimorfo-dimorfo (DD); dimorfo-virchowiano (DV); virchowiano (VV).



429  
 430  
 431  
 432  
 433  
 434  
 435

**Figura3.** Gráfico comparativo entre o uso do PGL-1 nativo e PGL-1-M3R em imunoenaios de ELISA com amostras de contatos domiciliares (CD).

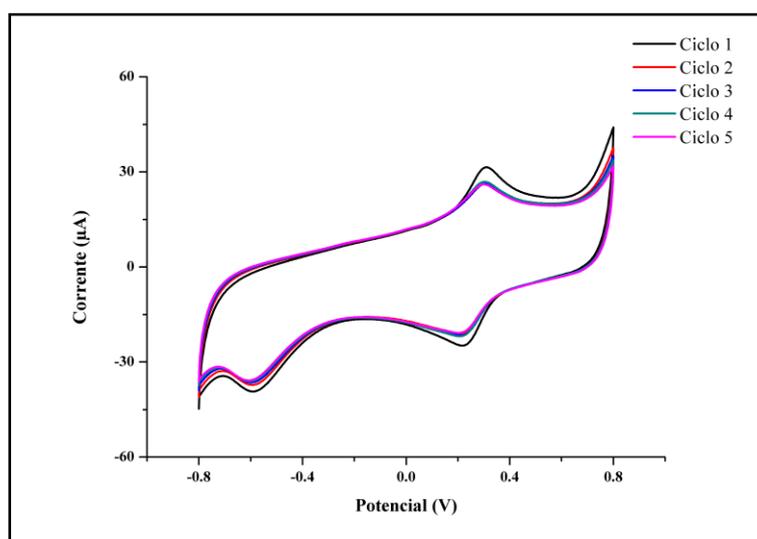
436  
437

**Tabela 1.** Níveis de concordância entre teste de ELISA com PGL1-Nativo versus ELISA para anti-PGL-1-M3R

	PGL1-M3R					Kappa	IC	Concordância
	AC	+/+	+/-	-/+	-/-			
<b>PGL-1 nativo</b>	VT	19	2	2	7	0.683	0,393 a 0,972	Considerável
	T	1	1	1	10	0.409	0,344 a 1,162	Moderada
	PC	1	3	2	15	0.146	-0,507 a 0,799	Leve
	CD	6	9	3	32	0.355	-0,037 a 0,673	Aceitável

439 IC (Intervalo de Confiança); AC (Aspectos Clínicos); VT (Virgem de Tratamento); T (Tratando); PC (Pós-cura);  
440 CD (Contato Domiciliar).  
441

442



443

444

445

446

447

448

449

450

451

**Figura 4.** Voltamogramas cíclicos obtidos sobre a superfície do SPCE a partir da limpeza eletroquímica em  
453 solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M, com faixa de potencial de -0,8 a 0,8 V e 0,05 Vs<sup>-1</sup>.

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

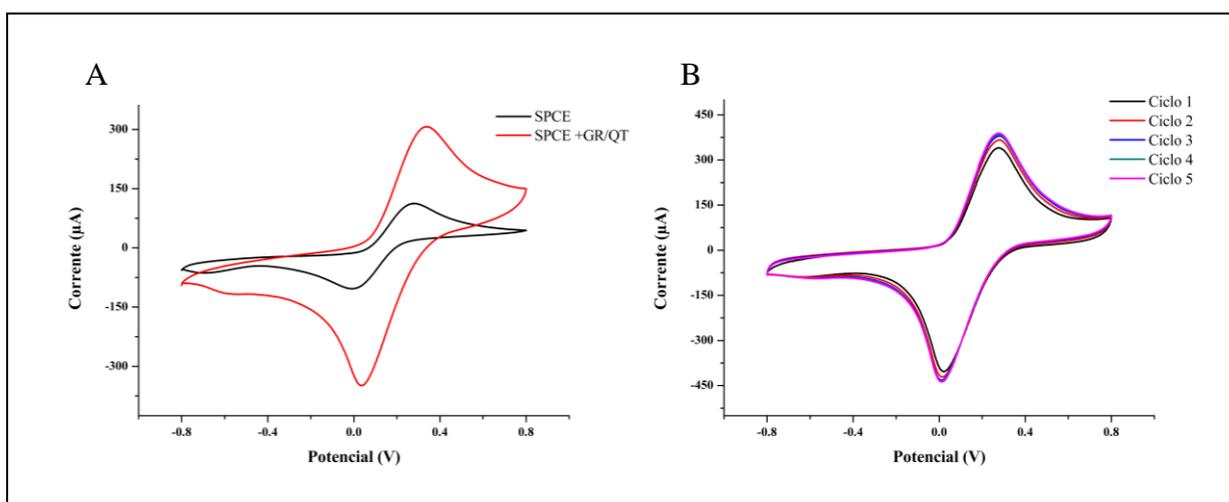
464

465

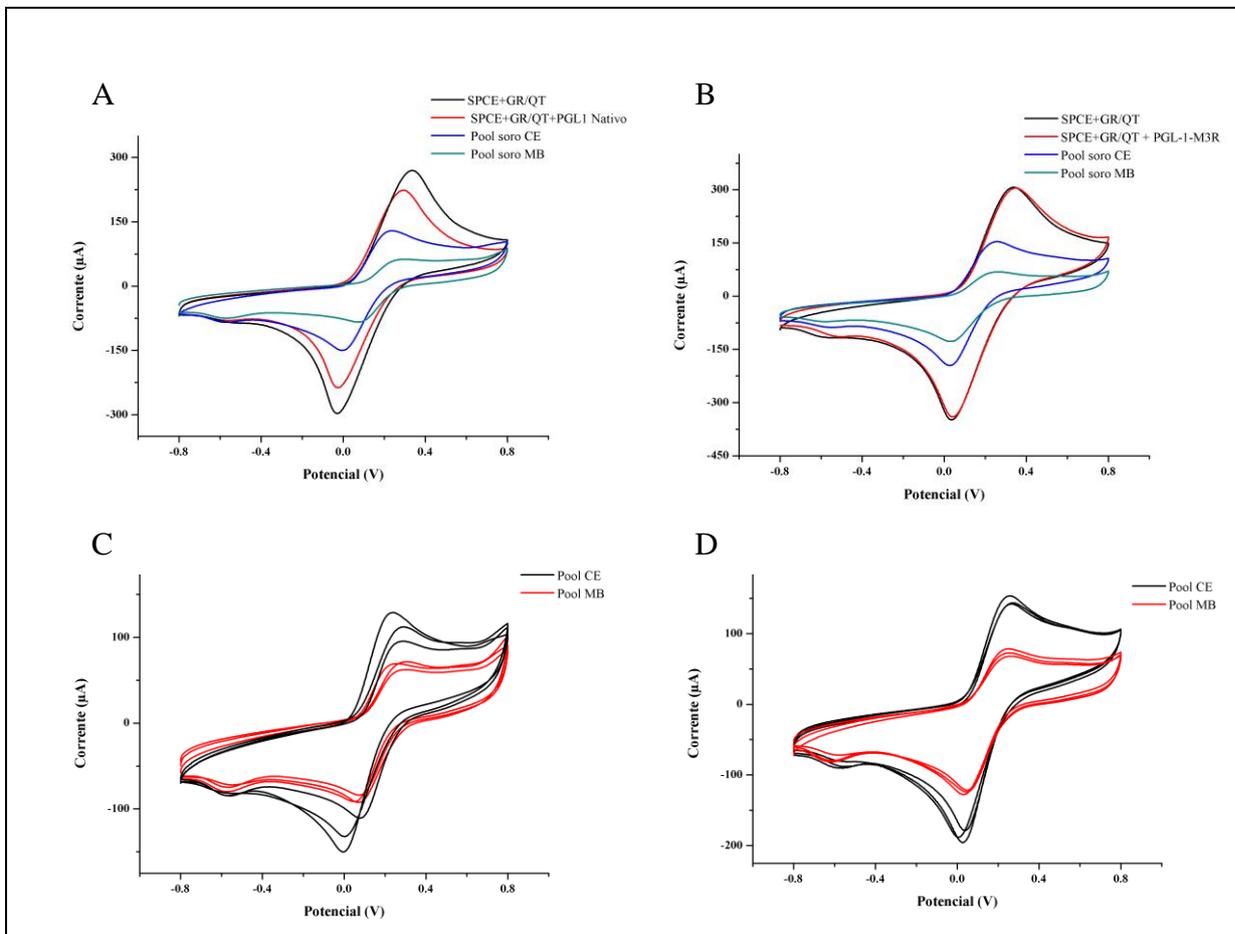
466

467

468

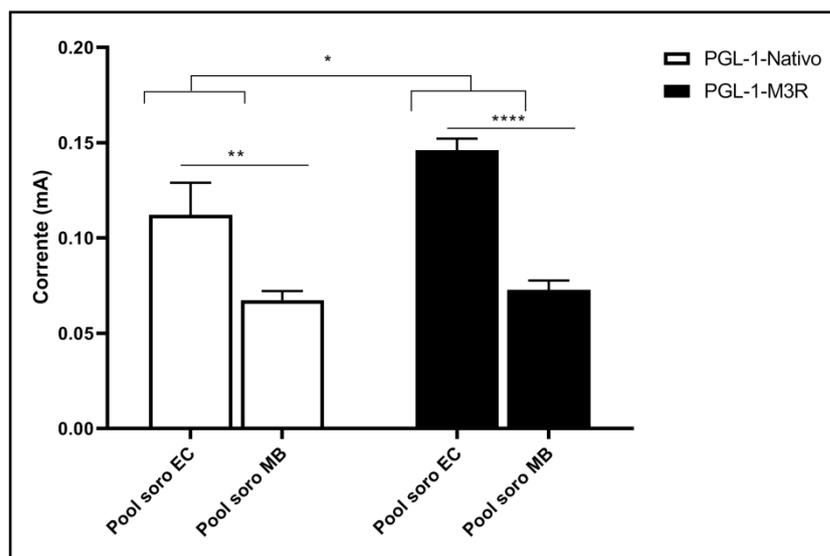


**Figura 5.** Voltamogramas cíclicos obtidos sobre a superfície do SPCE com solução de ferro/ferricianeto de  
470 potássio (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) e KCl (1 mmol L<sup>-1</sup>), com faixa de potencial de -0,8 a 0,8 V e 0,05 Vs<sup>-1</sup>. (A) SPCE antes  
471 e após modificação com grafeno e quitosana. (B) Resposta eletroquímica do sensor com cinco ciclos sucessivos  
472 de VC após modificação com GR/QT.  
473



474 **Figura 6.** Voltamogramas cíclicos obtidos sobre a superfície do SPCE com solução de ferro/ferricianeto de  
 475 potássio (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) e KCl (1 mmol L<sup>-1</sup>). Em (A) e (B) tem-se a variação da corrente após as etapas de  
 476 construção do biossensor e seguido da incubação com pool de soro de indivíduos multibacilares (MB) e  
 477 controles sadios (EC); (C) e (D) mostram, em triplicatas, o comportamento dos sensores modificados com PGL-  
 478 1 nativo e PGL-1-M3R, respectivamente, após incubação com amostras de soro.

479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500



**Figura 7.** Histograma comparando os valores das médias dos picos de corrente de oxidação entre os pools de amostras soro EC e MB e entre os antígenos. Os valores foram obtidos por voltametria cíclica com solução de solução de ferro/ferricianeto de potássio (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) e KCl (1 mmol L<sup>-1</sup>). ANOVA \*p = 0.0154; \*\*p = 0.0064; \*\*\*\*p < 0.0001.

503

## 504 **ARTICLE TYPES**

505 Papers may be submitted in the following categories. The editors reserve the right to change the  
506 category for consistency with *CID* style.

### 507 **Major Articles**

508 Report clinically relevant investigations or observations within *CID*'s scope of interests.

509 **Formatguide:**

510 • Word limit: 3000 words (excluding the abstract and references).

511 • Key points should be summarized on the title page in 40-words or less.

512 • References: 40 or less.

513 • Abstract: Up to 250 words, structured using the headings Background, Methods, Results and  
514 Conclusions.

515 • Tables/Figures: Data in the text should not be repeated extensively in tables or figures.

516 *Oxford University Press is a department of the University of Oxford. It furthers the University's objective of excellence in*  
517 *research, scholarship, and education by publishing worldwide*

**OXFORD**

518 UNIVERSITY PRESS

519 Copyright © 2018 Oxford University Press    [Cookie Policy](#)

520 [Accessibility](#)    [Get Adobe Reader](#)

521

522

523