



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EMILLY CAROLINE DOS SANTOS MORAES

**VALIDAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES MIMÉTICOS PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE EM ÁREA HIPERENDÊMICA**

São Luís

2017

EMILLY CAROLINE DOS SANTOS MORAES

**VALIDAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES MIMÉTICOS PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE EM ÁREA HIPERENDÊMICA**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Mayara Ingrid Sousa Lima

São Luís – MA

2017

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

Moraes, Emilly Caroline dos Santos.

VALIDAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES MIMÉTICOS PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE EM ÁREA HIPERENDÊMICA /
Emilly Caroline dos Santos Moraes. - 2017.

69 f.

Orientador(a): Mayara Ingrid Sousa Lima.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2017.

1. Biomarcadores. 2. Diagnóstico. 3. Maranhão. 4.
Mycobacterium leprae. I. Lima, Mayara Ingrid Sousa. II.
Título.

EMILLY CAROLINE DOS SANTOS MORAES

**VALIDAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES MIMÉTICOS PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE EM ÁREA HIPERENDÊMICA**

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Mayara Ingrid Sousa Lima

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall Agnol

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira

Às mulheres e mestras da minha vida: minha
mãe e minha vó! À Deus, por ser meu grande
amigo e nunca soltar da minha mão.

AGRADECIMENTOS

Aos deuses, divindades, orixás, anjos, santos e a Virgem das Graças, por nunca me abandonarem e sempre cuidarem de mim. Obrigada, Universo, por conspirar a meu favor e me permitir extrair todas as boas vibrações que emanam de ti.

Para começar, eu falo muito e por falar demais, talvez eu me alongue um pouquinho para agradecer a todos que estiveram envolvidos na minha pequena existência e durante esses quatro anos e seis meses de Biologia. Eu tinha um sonho, ou vários, e queria ser e fazer várias coisas diferentes, todas ao mesmo tempo... era uma vontade gigante de abraçar o mundo com as pernas, então eu achava que por isso deveria ser astronauta, eu nem imagina que na Biologia tem muito mais que um mundo de coisas pra fazer e descobrir. Mas eu era uma criança e, ora, de lá eu poderia abraçar o mundo inteiro, mas aí eu cresci e percebi duas pequenas coisas que são muito importantes: (01) eu já tinha um mundo inteiro de gente e amor nas mãos (02) era/é esse mundinho particular que me abraça todos os dias e são para essas pessoas que eu quero escrever agora.

Biologicamente, a palavra resiliência significa conseguir adaptar-se e/ou recuperar o equilíbrio depois de uma situação adversa. Curiosamente, eu já sabia disso bem antes de ir parar na Biologia, porque a minha mãe me ensina isso desde que sou criança. Então, para mim, resiliência também significa minha mãe. Sabe porquê? Resiliente é quando a vida te diz não e você diz sim (exatamente como fez a dona Susi). Resiliente é minha mãe que depois de lutar muito, tem dois filhos formandos e cheios dos bons valores que nos foram ensinados. Mãe, eu não tenho como agradecer e muito menos recompensar tudo que tu fizeste/faz por essa filha mimada.

Obrigada pelo gene da teimosia – que ora faz bem, ora é devastador – do exagero, do cuidado e controle absurdo com as pessoas. Infelizmente o dom de cozinhar bem e fazer crochê eu não herdei, mas tudo bem... obrigada por me ensinar a cuidar de todos, por me fazer ouvir (mesmo quando eu não queria), a valorizar as boas amizades e fazer tudo por elas. Mãe, obrigada por virar amiga e mãe dos meus amigos e de todo mundo que um dia eu levei para casa, pelos remédios, grana, maçãs e biscoitos colocados na minha mochila. Muito obrigada por me fazer herdar os bons conselhos, os ditados, frases de efeito e até aqueles sinaizinhos na pele bem característicos de nós duas. Eu te amo! Por ti, eu criaria frases para sempre, eu cantaria notas de clara

esperança, eu inverteria o princípio da inércia, eu encolheria a Terra e te daria. Te amo, minha vida, muito obrigada por tudo! Isso é por você! E peço que tenha a coragem de confiar em sua criação.

Vó e vô, muito obrigada por cuidarem tão bem da sua “neném” e me acolherem com tanto amor, dedicação e carinho. Obrigada por me ensinarem o sentido do *ohana* – nunca abandonar ou esquecer – e, obrigada por me darem um lar, um ninho. “Pois somos como passarinhos soltos a voar, dispostos a achar um ninho, nem que seja no peito um do outro”. Obrigada, Eldinha, Van e Victória, pelo cuidado, apoio e amor de sempre. Vic, o mundo está melhor desde que você chegou! Aos tios, primos, padrasto e ao meu irmão querido (chato, implicante e meu amorzinho), obrigada por suportarem todas as noites com as luzes da cozinha ligadas enquanto eu estudava; obrigada por fazerem vista grossa para os afazeres domésticos que estavam sempre incompletos e muito obrigada por todo amor e carinho. Obrigada a toda a minha família que acreditou em mim e me ajudou a segurar a barra. Valeu, Yann, você, além de primo, tornou-se um grande amigo e um exemplo de superação. Muito obrigada por dividir a mesa de estudos, a vida, as idas ao Santa Cruz, as pilhas de roupas para dobrar e as alegrias comigo!

A minha orientadora, tutora e amiga, professora Mayara Ingrid, por ter acreditado no meu potencial, confiado em mim e por ter me inserido no mundo dos peptídeos miméticos! Obrigada pelas broncas, risadas, conselhos, páginas e páginas de correção de textos e por todo o carinho! Ah, e também pelas frases de efeito: “eu não vou nem dizer nada” “em que passo tá esse ELISA?” “eu quero gritaaaaar” “ eu tô falando em aramaico?”kkk. Ao LabGeM e todas as maravilhosas amizades cultivadas durante este tempo, todos vocês estão no meu coração! Ao meu grupo de pesquisa, BioGen, por segurarem esse forninho junto comigo e por todo o aprendizado compartilhado durante esses anos. Quando eu penso nessa mono e nesse trabalho, eu lembro dos milhões de testes com Molico a 1%, 2%, 2,5%, dos pequenos roubos das alíquotas de BSA de Dani, do restinho de anticorpo que nós tínhamos e de como eu achava que não ia rolar, mas rolou! Rolou e vocês foram essenciais para a conclusão desse trabalho, então sintam-se parte de tudo isso, afinal de contas, foram muitas batidas de placas dando risada com vocês e muito trabalho para caçar os soros, né?! Raposinha, Meyd, Guga, Marcelo, Jujux, Robson, Ricardo, Andressa, Mayra e a filha caçula do grupo, Lorena, desejo caminhos lindos, cheios de artigos e alegria para vocês. Natália, Meydson e Gustavo, muito obrigada pelo apoio nesse último mês e obrigado por sempre

me fazerem rir com as histórias mais loucas. Ao Hugo (que é filhinho da genética), mas que além de ser meu amigo de turma e coração, sempre me socorre com o word, pipoca, café, risadas e que está sempre disposto a ajudar todas as pessoas, muuuuito obrigada! A Santinha, mãe, amiga, conselheira e melhor técnica desse mundo inteiro, muito obrigada pelo cuidado e carinho comigo.

A todos os pesquisadores que fizeram parte do projeto hanseníase e que com muito esforço e dedicação mapearam pacientes e seus contatos no estado do Maranhão. Especialmente a Jacque, que pacientemente respondeu todas as minhas perguntas sobre dados, prontuários, amostras e planilhas. Além disso, gostaria de agradecer a todas as pessoas que participaram dessa pesquisa, gostaria de dizer que, para nós, vocês representam a esperança de um dia essa doença ter diagnóstico e tratamento mais eficazes, garantindo melhores condições de saúde aos acometidos pela hanseníase.

Gostaria de agradecer imensamente ao Jovens Unidos em Cristo (JUC), onde eu pude experimentar as maiores e melhores experiências da minha vida e de onde eu cultivei grandes corações. Obrigada por todo o *stress*, brigas, lágrimas, macarronadas e amor. Bubuca, Yann, Fran, Val, Danilão, Rodrigo, Joyna, Luís, SEJA INVERNO OU VERÃO, ALEGRA TEU CORAÇÃO, SEREI O TEU ABRIGO. CADA LÁGRIMA QUE CAI, FORTALECE-NOS MAIS! SEMPRE SEREMOS AMIGOS! Muito obrigada também por sempre me tirarem um pouquinho do mundo da Biologia, por não me deixarem surtar e pela companhia nos vários litros de Gaúcho que tomamos juntos!

A eterna Turma da Bagaça – Alana (agora numa versão mamãe superpoderosa), Stephannie e Carol – amigas, obrigada por sempre estarem aqui, independentemente do tempo. Perdoem a loucura que é essa minha vida e todos os encontros que eu faltei. Eu sempre vou amar vocês, suas loucas!

As *Spaces Girls*, melhor grupo de Biologia que o Bacelar Portela já presenciou. Temos vidas e caminhos completamente opostos e mesmo assim a amizade e apoio sempre prevaleceram. Bibica, Giu, Elen Preta, Ali, Japa, Tatá e Ggeyse é um prazer imenso ser amiga de vocês. Muito obrigada pelo apoio!

A minha turminha do amor (2013.1), Lua, Suelma, Jejeba, Yó e Lara, eu sou muito grata por ter vocês na minha vida. Obrigada por nunca me deixarem sozinha, por me darem um bando, pelas viagens, festas, conselhos, brigas, pelas conversas, abraços, biscoitos *Amori* divididos, por dividirem a vida e as suas casas comigo, pelas madrugadas em claro fazendo os trabalhos e estudando para as provas e até por sempre me fazerem chegar atrasadas nas aulas. Cara, não dá para descrever o quanto eu sou

feliz e grata por ter a amizade de vocês, independente de tempo ou distância física nestes últimos períodos.

Ao PET, incluindo a tutora egressa, professora Gisele, pelo cuidado e amor dedicado a esse programa lindo. Com propriedade eu posso dizer que amo o PET e, uma vez petiano, sempre petiano! Aos meus veteranos espetaculares (Mari, Brandão, MarcoSSS, Elias, Thayrex, Diegão, Lianinha, Leonardo e Clarisse) que se tornaram muito mais que colegas de curso; obrigada por todos os revivês da vida e pelas muitas cervejas compartilhadas na mesa do Senzala e na casa da Mari, além, claro, de toda experiência e ensinamento. Elias, Marco e Thayrex, pretinhos do meu coração, vocês são grandes exemplos para mim e eu amo vocês. Espero num futuro próximo que a gente consiga ver o São João sem preocupações, dançar muito bumba-boi e rir da nossa pobreza (me levem pra passear em suas cidades).

Aos pet ovinhos e pet *babys*, obrigada por todas as risadas e momentos juntos; cuidem muito bem do PET, por favor. Aos *jurassicpets* que trilharam essa caminhada comigo, muito obrigada por me ajudarem na construção dessa *infinita highway*, a base de suor, trabalho, viagens, cervejas, *fitdances*, vídeos de conteúdo polêmico (kkkk) e leitura/discussão de muitos artigos. A Daniella e Igor, amigos que ganhei no PET, valeu por todos os sorrisos arrancados de mim, pelas doidices, partilhas e amor depositados na nossa amizade. A Gabi que, junto com Igor, Mairla, Thalita e Thayrex embalam minhas voltas para casa ao som de *Habits – Trying to forget you babe, I fall back down/ Gotta stay high all my life to forget I'm missing you oooooouuuuul, oooooouuuuul!!!!!!*

Ao clubinho do *stress*. Obrigada, Mairla (melhor mal do mundo), Thalita (tão carinhosamente chamada de Dêmo) e Augusto (Recalque)! Mas assim, muito obrigada mesmo! Vocês são um exemplo de que gente chata e com carinha de nada também ama hahaha. Vocês cuidaram de mim, riram de mim (e comigo), aguentaram as *bad*s, as ressacas, as horas e horas falando no whats e as vezes que eu não respondia nada kkk... suportaram quando eu não sabia fazer contas e ouviram as inúmeras reclamações dos mais variados tipos. Partilhamos a vida, os dramas (grandes e pequenos), viajamos, choramos, rimos muito (especialmente dos episódios estrelados por Augusto) gritamos muito, partilhamos os prints e por isso posso dizer: *You're my persons*. Thalita e Mairla, obrigada por perdoarem os nossos (Augusto e eu) ataques nestes últimos meses e por sempre encontrarem tempo e besteiras para nos livrar de todo o *stress* e rotina corrida. Augusto, obrigada pela companhia nos confinamentos aos fins de semana *in the lab*, por não me deixar surtar sozinha e pelas madrugadas partilhando o famigerado: “não vai dar

tempo”. Dêmo, minha personal bioinformata, muito obrigada por essa mãozona que você me deu! Tu é o cara, Thalita! Mairla, eu sei que agora você vai querer fazer um *detox*, mas muito obrigada por tudo, amiga! Eu espero sempre poder contar com vocês, parceiros de curso e de vida!

Ao meu querido amigo, obrigada, Lula, por sempre responder as minhas atividades de química e por estar sempre aqui. Muito obrigada mesmo, especialmente pelos cafés, filmes, por completar as letras de músicas, por me fazer acreditar que eu tenho superpoderes e pelas inúmeras continhas de Ave-Maria... obrigada até pelos apelidos horríveis e toda a zueira característica da nossa grande amizade.

Aos meus professores, mestres e toda a coordenação do Curso de Ciências Biológicas, pelo apoio e carinho com que cuidam de nós e da nossa Bio. Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF), especialmente, Liana, Lílian e Douglas, que gentilmente sempre liam minhas placas de ELISA. Obrigada mesmo, amigos, vocês arrasam! A seu Ivaldo e Maria pelos milhaaaaaaaares de copos de café, mas principalmente pela amizade, atenção, preocupação e carinho que tem comigo. Vocês são incríveis mesmo, muito obrigada por tudo! E a todas as pessoas que trabalham no departamento e que ao longo desses 4 anos e 06 meses, eu pude conviver, seu Magno, dona Ana, Dona Cecília... vocês são personagens muito importantes para todas as pessoas que vivem lá pela Biologia.

Gostaria de pedir perdão se deixei alguém fora dessas linhas, mas afirmo que cada pessoa que passou pela minha vida levou consigo um pedacinho de mim e está presente não só nesse pequeno texto, mas no meu coração.

Em últimas linhas, agradeço ao MEC, pela bolsa concedida ao longo desses anos de PET e a Fundação de Amparo e Apoio a Pesquisa (FAPEMA) pelo financiamento do projeto de pesquisa ao qual este trabalho está vinculado.

Por fim, gostaria de dizer que “resiliente somos nós que encaramos a vida como desafio e não como fardo” e que “é preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”.

“Be unstoppable. Be a force of nature”.

(Cristina Yang – Grey’s anatomy)

“Cada célula, todo fio de cabelo, falando assim parece
exagero... mas se depender de mim, eu vou até o fim”.

(Até o fim – Engenheiros do Hawaii)

RESUMO

O Maranhão é um dos estados brasileiros com maior índice de prevalência e casos novos da hanseníase, sendo considerado uma região hiperendêmica. Nesse sentido, torna-se urgente reduzir o número de casos novos, como estratégia de controle. Isso perpassa pelo desenvolvimento de métodos diagnósticos rápidos e eficientes. Diante disso, têm sido mapeados antígenos do *Mycobacterium leprae* como o PGL-1 (glicolípido fenólico) e proteínas da parede celular como a chaperonina GroEL, que podem ser nativos ou sintéticos. Alternativamente, esses antígenos podem ser mimetizados por peptídeos, que são facilmente sintetizados e acoplados em diferentes plataformas sendo, portanto, uma ferramenta promissora no diagnóstico precoce da hanseníase. Assim, avaliamos o potencial imunodiagnóstico de três peptídeos miméticos, MPML14 (mimético da chaperonina GroEL), PGL1-M3 e PGL1-M3R (miméticos do glicolípido fenólico-1) em amostras de Imperatriz, Açailândia e São Luís, por meio de ensaios de ELISA para a detecção de IgG e IgM em amostras sorológicas e IgA na saliva. Além de, fazer a predição molecular, traçar o perfil de hidrofobicidade destas moléculas e verificar a interação dos peptídeos com anticorpos anti-*M. leprae*. Nossos resultados mostram que os três peptídeos apresentam especificidade de 100% e sensibilidade variando de 68% a 89% quando se considera todas as formas clínicas, porém nos multibacilares virchovianos a sensibilidade foi de 100%. Considerando os paucibacilares do grupo Tuberculóide a positividade variou de 53% a 92%, muito superior ao que está descrito na literatura. O grupo dos contatos domiciliares também apresentam positividade de 35,8% (MPML14), 73% (PGL1-M3) e 80,5% (PGL1-M3R) demonstrando que em região hiperendêmica estes índices são maiores que em outras aéreas devido à alta exposição desse grupo ao bacilo. As análises *in silico* demonstram que esses peptídeos apesar de serem pequenos adquirem uma conformação espacial que justifica a sua imunogenicidade, e a alta hidrofobicidade reforça que estas moléculas são de fato miméticas de lipídeos. Além disso, o atracamento molecular confirma a interação dos peptídeos com anticorpos anti- *M. leprae*. Assim, concluímos que MPML14, PGL1-M3 e PGL1-M3R apresentam um papel promissor na confirmação da classificação dos pacientes com hanseníase, especialmente nas formas paucibacilares em regiões hiperendêmicas e também podem ser utilizados para monitoramento de contatos, podendo substituir os antígenos nativos de difícil obtenção.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*; biomarcadores; diagnóstico; Maranhão.

ABSTRACT

Maranhão is one of the Brazilian states with the highest prevalence rate and new cases number of leprosy, being considered a hyperendemic region. In this sense, it is urgent to reduce the number of new cases as a control strategy. For this purpose, fast and efficient diagnostic methods need to be developed. Therefore, *Mycobacterium leprae* antigens such as PGL-1 (phenolic glycolipid) and cell wall proteins such as GroEL chaperonin, which may be native or synthetic, have been mapped. Alternatively, these antigens can be mimicked by peptides, which are easily synthesized and coupled on different platforms, being a promising tool in the early leprosy diagnosis. Hence, we evaluated the immunodiagnostic potential of three mimetic peptides, MPML14 (GroEL chaperonin mimetic), PGL1-M3 and PGL1-M3R (phenolic-1 glycolipid mimetics) in Imperatriz, Açailândia and São Luís samples through ELISA assays for the detection of IgG and IgM in serological samples and IgA in saliva. Additionally, we performed molecular prediction, traced the hydrophobicity profile of these molecules and verified the interaction of the peptides with anti-*M. leprae* antibodies. Our results show that the three peptides have 100% of specificity and sensitivity ranging from 68% to 89% when considering all clinical forms, but in the multibacillary Lepromatous the sensitivity was 100%. Considering the paucibacillary of the Tuberculoid group, the positivity ranged from 53% to 92%, which is much higher than what is described in the literature. The group of close contacts also presented positivity of 35.8% (MPML14), 73% (PGL1-M3) and 80.5% (PGL1-M3R), demonstrating that in hyperendemic region these rates are higher than in other areas due to high exposure of this group to the bacillus. In silico analyzes show that these peptides, despite being small, acquire a spatial conformation that justifies their immunogenicity, and the high hydrophobicity reinforces that these molecules are in fact mimetics of lipid. In addition, molecular docking confirms the interaction of peptides with anti-*M. leprae* antibodies. Therefore, we conclude that MPML14, PGL1-M3 and PGL1-M3R play a promising role in confirming the classification of patients with leprosy, especially in paucibacillary forms in hyperendemic regions, and can also be used for contact monitoring and replace native antigens that are difficult to obtain.

Key-words: *Mycobacterium leprae*; biomarkers; diagnostic; Maranhão.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Principais moléculas presentes na cápsula do *M. leprae*. Vissa & Brennan, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC138955/> 22
- Figura 2. Mapa mundial da prevalência da hanseníase em 2015. Disponível em: <http://www.who.int/lep/epidemiology/en> 23
- Figura 3. Taxa de prevalência da hanseníase em 2015 nos estados brasileiros. Disponível em: <http://www.portalarquivossaude.gov.br> 23
- Figura 4. Taxa de detecção geral de novos casos de hanseníase em 2015 nos estados brasileiros. Disponível em: <http://www.portalarquivossaude.gov.br> 24
- Figura 5. Estrutura da molécula do PGL-1. Fonte: Adaptado de Tabouret, G et al. *Plos pathogens*, 2010; 6: 1-13. 32
- Figura 6. Sequência, design e perfil de hidrofobicidade do MPML14. Em A, sequência e design tridimensional peptídico. Em B, seu perfil de hidrofobicidade. 42
- Figura 7. Detecção de anticorpos IgG por ELISA utilizando o antígeno MPML14. A – perfil de reatividade do MPML14 em todas as formas clínicas, contatos e controles endêmicos. B – Curva ROC (considerando LL e EC). C – percentual de sensibilidade, especificidade e positividade por forma clínica e em área endêmica. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares). 43
- Figura 8. Detecção de anticorpos IgG por ELISA utilizando o antígeno MPML14. A – reatividade do MPML14 em pacientes e contatos da cidade de Imperatriz. B – reatividade do MPML14 em pacientes e contatos de Açailândia. C – reatividade do MPML14 em pacientes e contatos de São Luís. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares). 43
- Figura 9. Detecção de anticorpos IgA por ELISA utilizando o antígeno MPML14 em pacientes com suspeita de hanseníase e o grupo de controles endêmicos (EC). 45
- Figura 10. Sequência, design e perfil de hidrofobicidade dos peptídeos. Em A, sequência e design tridimensional peptídico PGL1-M3. Em B, perfil de hidrofobicidade do PGL1-M3. 45
- Figura 11. Detecção de anticorpos IgM por ELISA utilizando o antígeno PGL1-M3. A – perfil de reatividade do PGL1-M3 em pacientes de diferentes formas clínicas, contatos e controles endêmicos. B – Curva ROC (considerando LL e EC). C – percentual de sensibilidade, especificidade e positividade por forma clínica e em área endêmica. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares). 46
- Figura 12. Detecção de anticorpos IgM por ELISA utilizando o antígeno PGL1-M3. A – reatividade do PGL1-M3 em pacientes de diferentes formas clínicas e contatos da

cidade de Imperatriz. B – reatividade do PGL1-M3 em pacientes e contatos de Açailândia. C – reatividade do PGL1-M3 em pacientes e contatos de São Luís. D – percentual de positividade por forma clínica e contatos em Imperatriz, Açailândia e São Luís. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares). 47

Figura 13. Sequência, design e perfil de hidrofobicidade dos peptídeos. Em A, sequência e design tridimensional peptídeo PGL1-M3R. Em B, perfil de hidrofobicidade do PGL1-M3R..... 49

Figura 14. Detecção de anticorpos IgM por ELISA utilizando o antígeno PGL1-M3R. A – perfil de reatividade do PGL1-M3R em pacientes de diferentes formas clínicas, contatos e controles endêmicos. B – Curva ROC (considerando Virchovianos e controles endêmicos). C – percentual de sensibilidade, especificidade e positividade por forma clínica e contatos. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares). 49

Figura 15. Detecção de anticorpos IgM por ELISA utilizando o antígeno PGL1-M3R. A – reatividade do PGL1-M3R em pacientes de diferentes formas clínicas e contatos da cidade de Imperatriz. B – reatividade do PGL1-M3R em pacientes e contatos de Açailândia. C – reatividade do PGL1-M3R em pacientes e contatos de São Luís. D – percentual de positividade por forma clínica e contatos em Imperatriz, Açailândia e São Luís. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares). 50

Figura 16. Detecção de anticorpos IgA por ELISA utilizando o antígeno MPML14 em pacientes com suspeita de hanseníase e o grupo de controles endêmicos (EC). 52

Figura 17. Comparação entre PGL1-M3 e PGL1-M3R. Em A, detecção de anticorpos IgM por ELISA PGL1-M3R e, em B – o antígeno PGL1-M3. Em C, a positividade para ambos os peptídeos. Em D e E, a predição in silico do PGL1-M3 e PGL1-M3R, respectivamente. 52

Figura 18. Docking molecular. Em A, sequência do anti-M.leprae, identificação dos FRs, CDRs, cadeias leves e pesadas. Em B, docking molecular do anti-M.leprae com o peptídeo PGL1-M3 Em C, docking molecular do antígeno PGL1-M3R com o anti-M.leprae. LC (cadeia leve); HC (cadeia pesada); FR (regiões framework); CDR (sítios determinantes de complementariedade). 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de amostras utilizadas no estudo, divididas por cidade e forma clínica.	37
Tabela 2. Sequência dos peptídeos que foram utilizados no projeto.....	39
Tabela 3. Níveis de concordância entre teste de ELISA com MPML14 versus ELISA para anti-PGL-1, MLFLOW, PCR swab bucal e baciloscopia.....	44
Tabela 4. Níveis de concordância entre teste de ELISA com PGL1-M3 versus ELISA para anti-PGL-1, MLFLOW, PCR swab bucal e baciloscopia.....	48
Tabela 5. Níveis de concordância entre teste de ELISA com PGL1-M3R versus ELISA para anti-PGL-1, MLFLOW, PCR swab bucal e baciloscopia.....	51
Tabela 6. Níveis de concordância entre teste de ELISA com PGL1-M3 versus PGL1-M3R.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB	Boderline-boderline
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BL	Boderline-lepromatoso
BT	Boderline-tuberculóide
D-BSA	Dissacarídeo-BSA
EC	Controles endêmicos
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
HC	Grupo Contatos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSP	Proteína de choque térmico
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LAM	Lipoarabinomanana
LL	Lepromatoso
LM	Lipomanana
Mb	Megabases
MB	Multibacilar
ML-FLOW	Teste de fluxo lateral para o <i>Mycobacterium leprae</i>
M-O-BSA	Monossacarídeo-octil-BSA
MS	Ministério da Saúde
ND-O-BSA	Dissacarídeo natural-octil-BSA
ND-O-HSA	Natural-octil-HSA
NT-P-BSA	Trissacarídeo natural-fenol-BSA
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Pathogen-associated Molecular Pattern
PB	Paucibacilar
PGL-1	Glicolípídeo fenólico 1
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
TT	Tuberculóide

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 O <i>Mycobacterium leprae</i>	20
1.2 Aspectos Epidemiológicos.....	22
1.3 Transmissão do bacilo	24
1.4 Classificação da hanseníase	26
1.5 Imunologia da hanseníase.....	26
1.6 Diagnóstico da doença: a classe de exames convencionais	28
1.7 A hanseníase e um novo cenário de diagnóstico: tratados de saúde e novas tecnologias	30
1.7.1 PGL-I na sorologia da hanseníase	31
1.7.2 Chaperonina GroEL como proteína imunogênica no diagnóstico da hanseníase	33
1.7.3 Peptídeos miméticos: uma alternativa no diagnóstico da hanseníase.....	33
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3. METODOLOGIA.....	37
3.1 Aspectos éticos e amostras biológicas	37
3.2 Coleta de amostras salivares	38
3.3 Seleção dos participantes para coleta de Saliva.....	38
3.4 Síntese química dos peptídeos	39
3.5 Elisa para teste dos peptídeos sintetizados.....	40
3.6 Validação do teste	40
3.7 Análise por bioinformática	40
3.8 Análise estatística	41
4. RESULTADOS	42
4.1 MPML14: positividade, comparação com testes convencionais e bioinformática.....	42
4.2 PGL1-M3: reatividade, positividade, comparação com testes convencionais e bioinformática.....	45
4.3 PGL1-M3R: reatividade, positividade, comparação com testes convencionais e bioinformática.....	49
4.4 PGL1-M3 e PGL1-M3R: semelhanças e diferenças.....	52

5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 O *Mycobacterium leprae*

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, dermato-neurológica causada pelo *Mycobacterium leprae* (SHEPARD; MCRAE, 1965). A doença acomete pele e nervos periféricos, apresentando como característica a progressão lenta dos sintomas, lesões cutâneas e degeneração neural, podendo gerar incapacidades motoras severas (ROGERS; WALDRON, 1989).

O agente etiológico da hanseníase é um bacilo álcool-ácido resistente – por corar-se em vermelho pela fucsina e não se descorar com solução álcool-ácido – em forma de bastonete (REES; VALENTINE; WONG, 1960). O *M. leprae* foi identificado e primariamente descrito em 1873 por Gerhard Armanuer Hansen (daí a origem do nome hanseníase e/ou bacilo de Hansen), sendo a sua descoberta obtida a partir de observações de bacilos em lesões de indivíduos afetados pela lepra (HANSEN, 1874).

Quanto à taxonomia, o *M. leprae* pertence ao gênero *Mycobacterium*, que engloba espécies como o *Mycobacterium tuberculosis*, *M. ulcerans* e *M. bovis*, representantes de alguns dos agentes microbiológicos mais potentes contra o homem (AHMED et al., 2007). Esse fato é evidenciado pelas espécies de *M. tuberculosis* e o próprio *M. leprae*, que provocam doenças severas e grandes problemas de saúde pública ao redor do mundo (PINHO, 2013). Para além, a adição de outras micobactérias oportunistas constituem a principal causa de morte de hospedeiros imunologicamente deficientes, especialmente indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV) (AHMED et al., 2007). O gênero ainda apresenta particularidades como porção genômica reduzida – tendo o bacilo de Hansen o menor tamanho genômico, apenas 3,27 pares de megabases (Mb), sendo grande parte constituído por genes inativados ou pseudogenes (HAN; SILVA, 2014).

O *M. leprae* apresenta, em relação ao crescimento, um ciclo de duplicação de aproximadamente 14 dias, considerado lento quando comparado a outras bactérias patogênicas (SHEPARD, 1962). Ainda associado às principais características do bacilo, as inúmeras tentativas de cultivo desta micobactéria, reafirmam que ainda não existe um meio de cultivo que permita o crescimento desta espécie (FRANZBLAU, 1989;

LASTORIA; ABREU, 2014). Nesse sentido, há a possibilidade de propagação do bacilo em coelhos e tatus sem que estes desenvolvam sinais clínicos, importantes no isolamento e elucidação de mecanismos das bactérias a partir de estudos bioquímicos e fisiológicos (STORRS, 1971; RIVOIRE et al., 2014). Por conta disso, a rota metabólica do *M. leprae* é muito bem descrita, evidenciando a ausência de diversas vias biossintéticas, apontadas como as principais responsáveis pela sua inabilidade de crescimento *in vitro* (DAFFE; DRAPPER, 1998).

O *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório das células do sistema mononuclear fagocitário e possui a capacidade de invadir o sistema nervoso periférico, através das células de *Schwann* (GOMES et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2007). O tropismo por esse tipo de tecido acontece por meio de uma ligação no domínio G da laminina- α 2, expressa na lâmina basal dos nervos periféricos (SHIMOJI, 1999). Exatamente por esse motivo, a predileção por essas células é a principal característica de dano neural associada à hanseníase, responsável por causar sequelas graves, como a neuropatia periférica, nos pacientes acometidos pela doença (RIDLEY; JOB, 1985; LOBATO, 2011).

Sobre os aspectos morfológicos, o envoltório celular do bacilo é composto por três camadas: a membrana plasmática, a parede celular e a cápsula, onde se encontram o maior número de componentes lipídicos. Esta última, por sua vez, compreende moléculas como a Lipoarabinomanana (LAM), lipomanana, fosfatidilinositol manosídeo, monomicolatos de trealosa (TMN), 1-ftioceroldimicocerosato e, principalmente, o glicolípido fenólico-1 (PGL-1), em maior quantidade (SCOLLARD et al., 2006; BUHRER – SÉKULA, 2008) e ainda, mais recentemente a descoberta de proteínas de choque térmico, associadas a especificidade imunológica (WIKER; TOMAZELA; DE SOUZA, 2011) (Figura 01).

Por esse motivo, uma das principais características do *M. leprae* é a presença de uma gama de moléculas antigênicas, como os glicolípidos que constituem sua parede celular. Atualmente, estudos bioquímicos e genômicos têm-se voltado para a importância do aparato lipídico do bacilo e estima-se que existam 1.604 proteínas ou antígenos localizados em sua cápsula (HOLROYD et al., 2011).

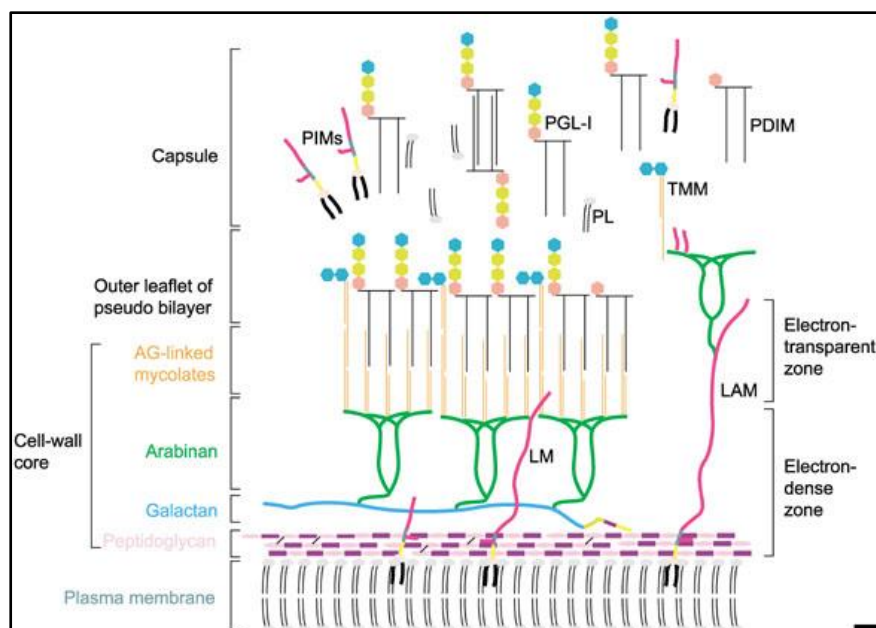


Figura 1. Principais moléculas presentes na cápsula do *M. leprae*. Vissa & Brennan, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC138955/>

1.2 Aspectos Epidemiológicos

Há milênios a hanseníase tem sido documentada em países como Japão, China e Índia (HAN; SILVA, 2014). São detectados cerca de 210.00 novos casos por ano ao redor do mundo (ARAUJO, 2003; BRASIL, 2008). Nesse cenário, Índia, Brasil e Indonésia são os países que lideram as maiores taxas de números de novos casos registrados (GLOBAL LEPROSY, 2013). A alta incidência da doença e a prevalência de novos casos nesses países fez com que a hanseníase fosse classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no grupo das doenças negligenciadas, constituindo um severo problema de saúde pública, acrescentando pontos ao quadro de desigualdades sociais dos países subdesenvolvidos (MATOS et al., 2016).

O Brasil ocupa o segundo lugar no *ranking* mundial de prevalência da hanseníase, sendo a Índia o país com a maior taxa de prevalência da doença (WHO, 2015) (Figura 02). De acordo com os dados epidemiológicos disponibilizados pelo Ministério da Saúde, foram registrados 28.761 novos casos no ano de 2015 (SINAN/SVS-MS, 2016). Embora haja uma diminuição no número de casos detectados, o Brasil não atingiu a proposta de redução dessas taxas para menos de 1 caso para 10.000 habitantes, pois continua apresentando regiões de alta endemicidade (WHO,

2015). A região Nordeste concentra o maior número de novos casos registrados, apresentando 12.848 registros de pacientes com hanseníase no ano de 2015. Esse número é dividido principalmente entre os estados do Maranhão, Bahia e Pernambuco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

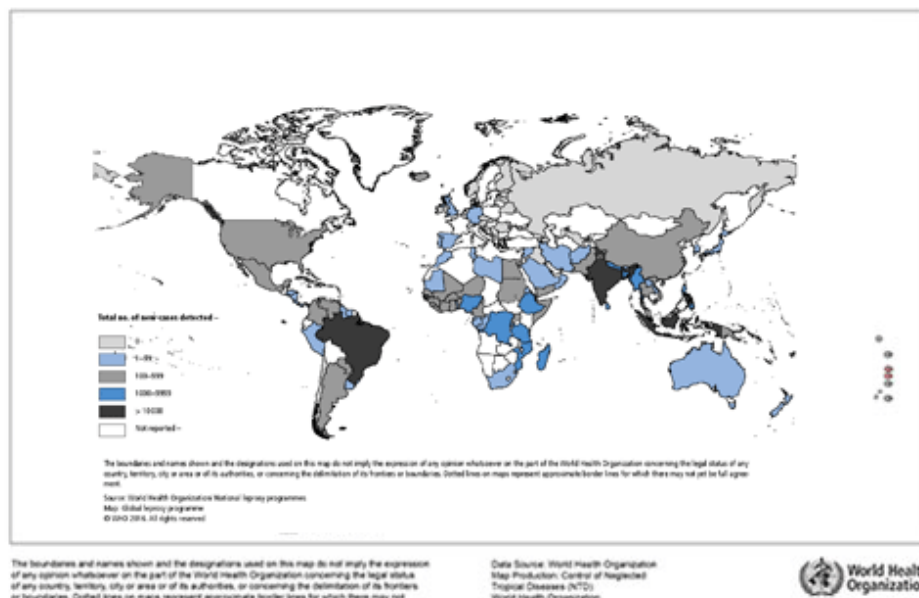


Figura 2. Mapa mundial da prevalência da hanseníase em 2015. Disponível em: <http://www.who.int/lep/epidemiology/en>.

Os dados revelam que o Maranhão possui uma taxa de 3.540 novos casos registrados, distribuídos em uma população de 6.904.241, classificando-o como o estado nordestino com o maior percentual de novos casos. Além disso, o Maranhão permanece como o estado brasileiro com um dos maiores índices de prevalência da doença (3,76) (SINAN/SVS-MS, 2016) (Figura 03).

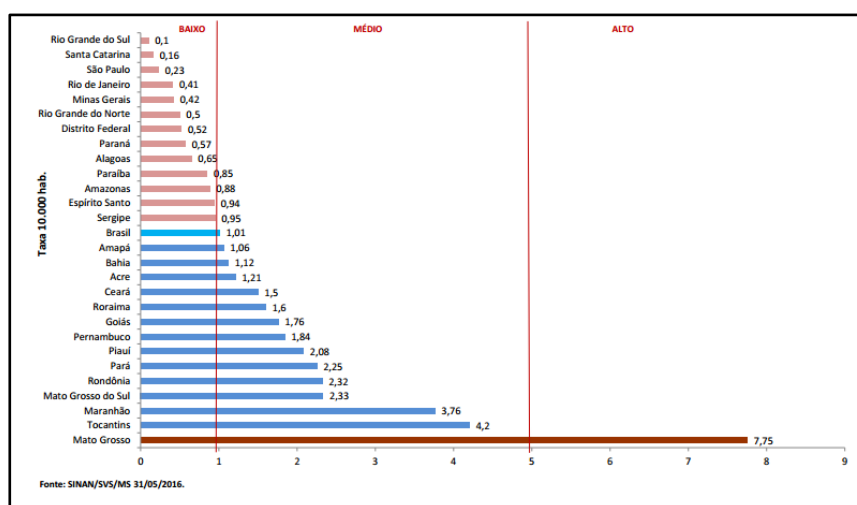


Figura 3. Taxa de prevalência da hanseníase em 2015 nos estados brasileiros. Disponível em: <http://www.portalarquivossaude.gov.br>

No *ranking* nacional, em relação aos números de novos casos detectados, o estado ocupa o terceiro lugar, classificado atrás do Mato Grosso e Tocantins (Figura 04). Por tudo isso, o Maranhão é considerado um estado hiperendêmico, segundo a classificação atual do Ministério da Saúde, compondo o *cluster* 1 de hiperendemia – sendo, os *clusters*, áreas que apresentam maiores riscos de infecção e onde há a maioria dos casos da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

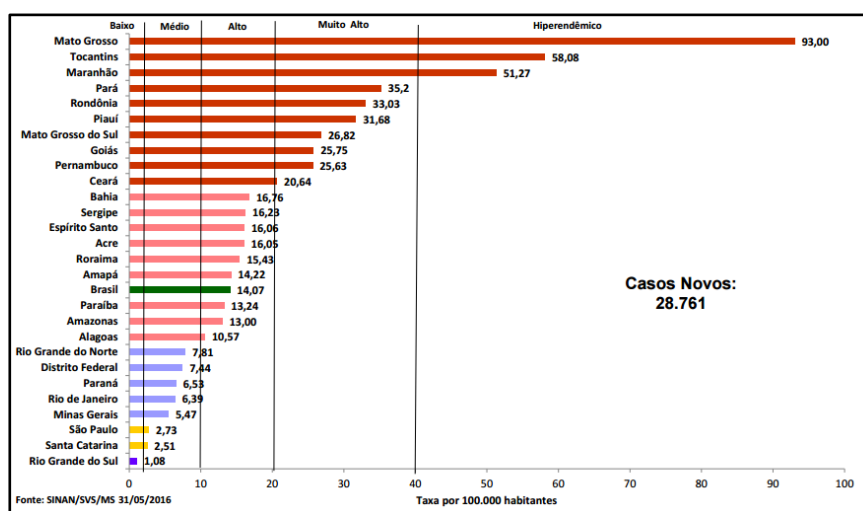


Figura 4. Taxa de detecção geral de novos casos de hanseníase em 2015 nos estados brasileiros. Disponível em: <http://www.portalarquivos.saude.gov.br>

De acordo com a Secretaria de Saúde do Maranhão, as cidades de Imperatriz, Açailândia e São Luís apresentam índices elevados de casos de hanseníase e estão entre os municípios prioritários para tratamento e controle da doença (SES-MA, 2010). Nos anos de 2010, a capital registou 60,1 casos para 100.000 habitantes, e uma taxa de prevalência 91,5 casos por 100.000 habitantes em 2009; enquanto que Imperatriz apresentou, no mesmo ano, um coeficiente de detecção de 137,5 casos para cada 100.000 habitantes (PINHO et al., 2015). Esses dados epidemiológicos reforçam a importância do controle da hanseníase no estado do Maranhão e uma das formas mais efetivas de estratégias de controle consiste em propiciar um diagnóstico rápido e que atinja um amplo espectro populacional.

1.3 Transmissão do bacilo

Apesar de apresentar baixas taxas de patogenicidade, o bacilo possui alto poder de infecção e sua transmissão dá-se por meio do contato prolongado entre indivíduos infectados e pessoas susceptíveis a infecção, também chamados de contatos domiciliares (ROTBERG, 1989; BARRETO, 2014). Dessa forma, as vias aéreas

superiores, mucosa nasal e oral, são as principais formas de transmissão do bacilo (GOULART; PENA; CUNHA, 2002; JOB et al., 2008; MOURA, 2014).

Assim, a liberação do *M. leprae* por indivíduos infectados subclínicamente atuam na dispersão do bacilo, comumente encontrados em *swab* bucal e nasal de contatos domiciliares de pessoas acometidas pela hanseníase na forma multibacilar (YAWALKAR, 2002). Portanto, o espaço domiciliar é importante na transmissão da doença, aumentando a probabilidade de contágio das pessoas que moram no local (MOET et al., 2006).

Assim, o contato domiciliar é um grupo de alto risco e agrupa todos os indivíduos que convivem ou conviveram com o paciente por pelo menos cinco anos (BRASIL, 2009). Além disso, é importante ressaltar que este grupo não está restrito somente aos familiares, como também diversos contatos sociais, classificados como contatos extradomiciliares (MOET et al., 2004).

Consiste na literatura que os contatos de pacientes acometidos pela doença que possuem positividade para o teste de ELISA anti-PGL-1 nativo apresentam o risco aumentado de até seis vezes de desenvolver hanseníase (GOULART et al., 2007; PINHO et al., 2015). E, ainda nesse cenário, existe a probabilidade de contatos saudáveis, porém portadores do *M. leprae* estarem inclusos na rede de transmissão do bacilo, uma vez que sequências de DNA específicas para a espécie foram detectadas em *swab* oral e nasal desses indivíduos (MARTINS et al., 2009; MARTINEZ et al., 2011).

Não existe uma vacina utilizada como medida profilática para a erradicação da doença. No caso dos contatos, o Ministério da Saúde assegura a aplicação da vacina Bacillus Calmette-Guérin (BCG), independente da presença ou ausência de sinais clínicos e da classificação operacional do doente (MS, 2009). Contudo, a vacinação não é capaz de barrar a infecção, mas atua como um agente protetor, melhorando a resposta imunológica do hospedeiro frente ao patógeno (MATOS et al., 1999). Assim, é importante o mapeamento desses contatos, essenciais para o controle e erradicação da hanseníase.

1.4 Classificação da hanseníase

A hanseníase apresenta diagnóstico clínico e baseado em anamnese, por esse motivo a classificação correta da doença é essencialmente importante para o seu diagnóstico e tratamento (SHEPARD; MCRAE, 1968). Atualmente, dois sistemas são utilizados para classificação da doença: o sistema de Ridley e Jopling e uma classificação operacional proposta pela OMS.

O sistema Ridley e Jopling é largamente utilizado e é caracterizado pela divisão dos grupos de pacientes em formas clínicas determinadas: lepromatoso (LL), *borderline*-lepromatoso (BL), *borderline-borderline* (BB), *borderline*-tuberculóide (BT) e tuberculóide (TT). Os grupos são divididos entre as formas polares (TT e LL) e intermediárias (BT, BB e BL), considerando aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos. Há, ainda, o grupo Indeterminado (I), onde os pacientes não demonstram diferenciação hanseníase e, portanto, a doença pode evoluir para cura ou desenvolver aspectos clínicos após o período de incubação (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Como essa classificação necessita de exames clínicos e histopatológicos e nem sempre estes parâmetros estão disponíveis nos hospitais e laboratórios, principalmente nos países onde há baixa disponibilidade de recursos médicos e financeiros (MITSUDA, 1953; PENNA; PEREIRA; MOREIRA, 2002; ARAÚJO, 2003) a Organização Mundial da Saúde desenvolveu uma classificação operacional, de modo que os pacientes são agrupados de acordo com o número de lesões cutâneas na pele. Dessa forma, os indivíduos são considerados paucibacilares (PB) se apresentarem até cinco lesões de pele e/ou baciloscopia negativa e multibacilares (MB) se apresentarem mais que cinco lesões e/ou baciloscopia positiva (LEPROSY, 1988).

Atualmente, o Ministério da Saúde determina que o tratamento quimioterápico é embasado na classificação operacional da hanseníase, importante para determinar que espécies de esquema de tratamento será mais eficaz para os pacientes pauci e multibacilares (PENNA; PEREIRA; MOREIRA, 20012).

1.5 Imunologia da hanseníase

A hanseníase é uma doença espectral, uma vez que as manifestações clínicas estão diretamente relacionadas com a resposta imune do hospedeiro (SCOLLARD et al.,

2006). Grande parte dos indivíduos infectados desenvolvem uma resposta imunológica capaz de destruir os bacilos em pequenas quantidades no organismo. Porém, alguns indivíduos evoluem para os polos extremos da doença, como o lepromatoso ou tuberculoíde (BOBOSHA, 2014).

A imunidade inata é a primeira barreira a infecção pelo *M. leprae*, representada pelo epitélio, secreções e pela excreção da imunoglobulina A (IgA) (LASTÓRIA; ABREU, 2014). O início da resposta acontece por meio dos receptores *Toll-like* (TLRs) da célula do hospedeiro, que são os principais mediadores da resposta inata, responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (BRIGHTBILL, 1999). Além disso, o início da resposta imunológica está atrelado a secreção de interleucina 12/23 (IL 12/23) e a diferenciação dos macrófagos e células dendríticas (PANNIKAR, 1982; KRUTZIK et al., 2005). Os receptores TLRs são ativados pelas lipoproteínas presentes no *M. leprae*, principalmente o heterodímero TLR2-TLR1, responsável pelo início de uma cascata celular direcionada à morte do bacilo (BRIGHTBILL et al., 1999; MENDONÇA, et al., 2008).

A resposta adaptativa também é essencial no combate ao patógeno. As células T, por exemplo, mantêm um papel na resistência contra o *M. leprae* (NATH; SAINI; VALLURI, 2015). As citocinas como IL-2 e IFN- γ são encontradas em lesões de pacientes PB e em baixíssimos níveis em pacientes MB. Enquanto que as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 são mais abundantes em lesões lepromatosas do que nos polos tuberculóides (RIVOIRE et al., 2014). Essas resoluções foram importantes para determinar dois padrões atualmente bem estabelecidos na imunologia da doença (OLIVEIRA, 2007). Se por um lado as citocinas importantes da resposta Th1 estão presentes nos pacientes PB, por outro, as citocinas correspondentes à resposta imune tipo Th2 estão correlacionadas com as lesões MB que apresentam grande quantidade de bacilos circulantes (VERHAGEN et al., 1998). Portanto, dependendo da população de células T haverá mecanismos de defesa ou disseminação da doença, como observado nas formas tuberculóide e virchoviana (FOSS, 1999). É interessante descrever que o perfil das citocinas nos pacientes TT e LL refletem a associação das respostas Th1 e Th2 relacionadas tanto à resistência quanto a susceptibilidade a doença (YAMAMURA, 1991).

Os anticorpos são produzidos contra os antígenos do *M. leprae*, como o PGL-1, LAM e GroES (FOSS, 1997; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; HUSSAIN et al., 2004). A secreção de IgM ocorre pela ação da IL-5 pelas células B na presença de células T (OCHOA et al., 2010). Altos níveis de IgM são detectados nos pacientes com hanseníase LL e nos pacientes onde a resposta humoral é predominante (SIELING; MODLIN, 1994; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; OLIVEIRA et al., 2008). A classe de anticorpos IgG também é predominante em pacientes LL e TT, porém apresentam diferenças entre as subclasses detectadas, onde IgG2 e IgG4 anti-GroES são mais abundantes em pacientes TT e IgG1 e IgG3 em pacientes LL (DHANDAYUTHAPANI et al., 1992; GETAHUN et al., 1998; HUSSAIN et al., 2004). As duas classes de anticorpos são amplamente utilizadas para diagnóstico da doença, pois os anticorpos estão em altas concentrações nos soros dos pacientes do polo lepromatoso.

Consiste na literatura que a produção de anticorpos em pacientes tuberculoides e dimorfos-tuberculoides é semelhante às cargas de anticorpos em contatos domiciliares (QUEIROZ, 2012). Porém, tem sido relatado em estudos que comparam áreas endêmicas e hiperendêmicas que os padrões de titulação humoral podem ser maiores nas infecções subclínicas em áreas com grande número de casos da doença (CUNHA et al., 2012). Assim, a positividade de pacientes paucibacilares originários dessas áreas pode variar, bem como a especificidade e sensibilidade dos testes utilizados (BRITO et al., 2015).

Ainda há uma terceira classe de anticorpos secretados contra o *Mycobacterium leprae*. A IgA apresenta efeito imunorregulador mediado por receptores Fc, expressos em diversas células, tais como neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos e células dendríticas (OCHOA et al., 2010). Além disso, altas concentrações de IgA têm sido detectadas em amostras salivares desses pacientes, demonstrando um aspecto importante para o diagnóstico através de conteúdo salivar (NAGAO-DIAS et al., 2007; CABRAL et al., 2013).

1.6 Diagnóstico da doença: a classe de exames convencionais

O diagnóstico da hanseníase está sob responsabilidade da atenção básica de saúde e é baseado na anamnese do paciente, exame dermatoneurológico com a

finalidade de identificar lesões na epiderme (manchas de cor variável entre vermelhas e hipopigmentadas), áreas com modificações na sensibilidade e comprometimento motor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A classe de exames realizados inclui, especialmente, a análise dos índices de baciloscopia, que permite a classificação operacional dos pacientes. O teste consiste no esfregaço dérmico de sítios, como os lóbulos auriculares (LO), cotovelo (C) e lesões (L) (MS, 2009). O exame apresenta eficácia quando associado a aspectos clínicos. Porém, a baciloscopia é um exame que apresenta baixos índices de sensibilidade, além de necessitar de infraestrutura laboratorial adequada e profissionais capacitados, nem sempre disponível nas regiões hiperendêmicas (ASSOCIATION, 2002).

A Reação de Mitsuda, teste que utiliza uma suspensão de bacilos mortos por calor (lepromina) inoculados de forma intradérmica para analisar a resposta celular tardia dos pacientes. Normalmente, pacientes TT são considerados Mitsuda positivos e LL negativos e, embora o teste possua alto valor prognóstico na avaliação de susceptibilidade às formas lepromatosas da doença, a reação de Mitsuda não possui valor diagnóstico (MITSUDA, 1953).

Diversos testes sorológicos podem ser realizados para diagnosticar a hanseníase, dentre estes, os mais utilizados e bem padronizados são o ELISA e o ML-Flow. Este último foi desenvolvido por Burker-Sékula e colaboradores em 2013 e consiste num teste imunocromatográfico semi-quantitativo capaz de detectar anticorpos da classe IgM anti-PGL-1 (BURKER-SEKULA et al., 2013). A inovação da técnica dá-se pela rapidez de detecção, barateamento de custo, simples manuseio e uso de amostras como soro ou sangue total. A desvantagem consiste na baixa sensibilidade a amostras de pacientes infectados subclínicamente e controle de contatos domiciliares, sendo mais robusto somente para os pacientes multibacilares (COUTIN et al., 2011).

Já o ELISA do anti-PGL-1 consiste num teste quantitativo também baseado na resposta dos anticorpos da classe IgM e, mesmo sendo amplamente utilizado para auxílio no diagnóstico e monitoramento de contatos, o mesmo carece de mão-de-obra laboriosa e equipamentos específicos nem sempre disponíveis. Além disso, é necessário que haja padronização dos índices de positividade das formas clínicas que podem variar intensamente de uma área para outra.

Dentre essas classes de exames há ainda os testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), método capaz de multiplicar sequências próprias do DNA do *M. leprae*. A técnica, além de dispensar uso de cultura, tem sido aplicada para as doenças infecciosas em geral, e pode ser utilizado sangue e *swabs* oral e nasal no procedimento (GOULART & GOULART, 2008).

Também existe a possibilidade de detecção do bacilo pela técnica de PCR em tempo real (TaqMan), que garante confiabilidade maior que os resultados obtidos pela convencional (MARTINEZ et al, 2006). Porém, mesmo com todas as qualidades, esta metodologia permanece somente como ferramenta de pesquisa, principalmente devido ao seu alto custo, que inviabiliza a utilização em larga escala (BANERJEE et al, 2010).

Diante disso, existe a necessidade de utilizar metodologias que sejam capazes de determinar um diagnóstico mais preciso, incluindo sensibilidade e especificidade, atuando na detecção precoce da doença (PINHO, 2013). Portanto, estudos que padronizem testes capazes de revelar casos subclínicos e que permitam o acompanhamento dos contatos domiciliares (HC), são de extrema importância na elucidação do perfil epidemiológico da hanseníase (MOET et al., 2004).

1.7 A hanseníase e um novo cenário de diagnóstico: tratados de saúde e novas tecnologias

Atualmente, o diagnóstico da hanseníase apresenta pouca especificidade e quase nenhuma função prognóstica. Uma das maiores dificuldades da detecção da doença está atrelada ao fato de que a maioria desses marcadores não é capaz de diferenciar as formas clínicas da hanseníase (LIMA, 2015). Diante deste paradigma, o desenvolvimento de novos alvos é necessário para o controle adequado dessa doença.

A partir do diagnóstico rápido e correto é possível se fornecer uma terapêutica precoce, que vai contribuir de forma efetiva para o monitoramento da hanseníase especialmente em regiões hiperendêmicas como o estado do Maranhão, que aglomera grande número de casos e representa uma área estratégica para implementação de novas ferramentas diagnósticas para o monitoramento de contatos domiciliares e indivíduos com infecção subclínica (MS, 2016).

As tecnologias disponíveis na atualidade são laboratoriais, caras e nem sempre precisas, e dependem da devida coleta da amostra (normalmente biópsias invasivas), manuseio, acomodação, transporte e análise em laboratório. Além da necessidade de tempo de resposta demorado, o que dificulta propor estratégias de monitoramento adequados aos programas de saúde pública (WHO, 2016).

Por essa razão, a OMS promulgou em 2016 uma estratégia global para a hanseníase intitulada “Aceleração rumo a um mundo sem hanseníase” em consonância com o *Roadmap for Neglected Tropical Diseases* (Guia das Doenças Negligenciadas). A proposta, que visa controle e erradicação da doença até meados de 2020, tem como pilares o combate à discriminação e preconceito contra doença, promoção da inclusão social, desenvolvimento tecnológico voltado para a detecção precoce da doença antes do surgimento de incapacidades.

Além da redução da transmissão e incapacidades motoras em pacientes pediátricos; detecção eficaz em grupos de riscos localizados em área de hiperendemicidade e planos nacionais que garantam o acompanhamento e exames médicos de contatos intradomiciliares.

Para que esse combate seja eficaz, é necessário o fortalecimento de pesquisas e obtenção de testes sorológicos e salivares competentes e principalmente de baixo custo, facilitando o uso em larga escala. Por esse motivo, o uso de antígenos específicos do *M. leprae* que sejam utilizados em testes sorológicos e salivares, tem sido ponto central de pesquisas.

1.7.1 PGL-1 na sorologia da hanseníase

Muitas pesquisas têm utilizado antígenos naturais do *M. leprae* para o imunodiagnóstico da hanseníase (GELUK et al, 2009). Um exemplo disto é o uso de antígenos específicos como o Glicolípido Fenólico-1 (PLG-1) (ARAUJO, 2003).

O PGL-1 foi um dos primeiros antígenos específicos do *M. leprae* a ser isolado e é o principal glicolípido antigênico do bacilo (HUNTER; BRENNAN, 1981; ARAUJO, 2003). A partir desse aspecto, trabalhos tem demonstrando a ligação do trissacarídeo (uma das extremidades do PGL-1) na predileção do *M. leprae* pelos nervos periféricos (HUNTER; BRENNAN, 1981) (Figura 05).

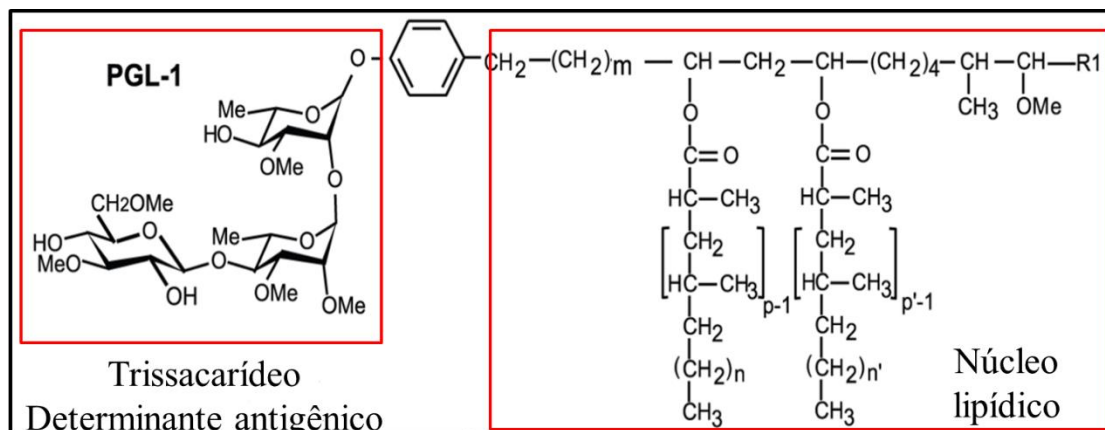


Figura 5. Estrutura da molécula do PGL-1. Fonte: Adaptado de Tabouret, G et al. *Plos pathogens*, 2010; 6: 1-13.

A utilização do PGL-1 como antígeno para o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ensaio de imunoabsorção enzimática) e teste de fluxo lateral ML-Flow (*Mycobacterium leprae-flow*) pode ser confirmado como um método capaz de detectar casos de hanseníase, além da possibilidade de preconização do diagnóstico, visto que os anticorpos refletem ao sinal antigênico de estimulação (BAZAN-FURINI et al., 2011; CABRAL et al., 2013). Esses dados revelam que o glicolípido apresenta diversas aplicações na prática clínica.

Porém, mesmo com a ampla utilização de anticorpos contra o PGL-1 em pacientes virchovianos não tratados, os pacientes paucibacilares naturalmente apresentam baixa concentração de anticorpos. Por esse motivo, alguns desses pacientes apresentam resultados negativos frente ao diagnóstico, mesmo manifestando sinais clínicos positivos (MOET et al., 2004).

Mesmo com a utilidade do PGL-1 nativo, existe uma grande limitação na obtenção da molécula nativa, restrita ao crescimento do *M. leprae* em tatus e camundongos (BUHRER-SÉKULA et al., 2003; MOET et al., 2004). Como alternativa, têm sido produzidas várias moléculas sintéticas como: monossacarídeo-octil-BSA (M-O-BSA), dissacarídeo-BSA (D-BSA), dissacarídeo natural-octil-BSA, natural-octil-HSA (ND-O-BSA e ND-O-HSA), trissacarídeo natural-fenol-BSA (NT-P-BSA) (KIRCHHEIMER; STORRS, 1971; GIGG, et al., 1985), e mais recentemente a possibilidade de utilizar peptídeos miméticos.

1.7.2 Chaperonina GroEL como proteína imunogênica no diagnóstico da hanseníase

A decodificação do genoma do *M. leprae* proporcionou a descoberta de novos antígenos com potencial de diagnóstico como as chaperonas (proteínas de choque), proteínas reguladoras e proteínas transportadoras (OLIVEIRA, 2007). Alguns antígenos da parede do *M. leprae* são pertencentes à família das proteínas de choque térmico (HSP), mostrando-se análogas as proteínas GroEL e GroES (YOUNG, 1990). A proteína GroEL, também chamada de HSP65 ou ML0317, é responsável pelo enovelamento das proteínas e modulação da resposta imune inata e adquirida, sendo classificada como o principal alvo para a resposta imune dos patógenos (YOUNG et al., 1988).

Esses antígenos são produzidos em condições de estresse (WIKER; TOMAZELLA; SOUZA, 2011). Além disso, essas proteínas estão relacionadas à alteração do reconhecimento e à apresentação de antígenos. Alguns estudos têm relatado que a GroEL (ML0317) e GroES (ML0380) são as proteínas mais abundantes no *M. leprae*, sendo reconhecidas por precursores das células T, específicas desse patógeno (MEHRA et al., 1992; WIKER; TOMAZELA; DE SOUZA, 2011).

Devido a correlação entre a produção de IgG em pacientes multibacilares em resposta a essas proteínas, este antígeno demonstra um potencial para diagnóstico da doença (MEHRA et al., 1992; DUTHIE et al., 2011). Além disso, o peptídeo MPML14 é mimético da GroEL, informação confirmada por espectrometria de massas (*dados em publicação*) podendo ser utilizado para detecção da hanseníase em plataformas de imunodiagnóstico.

1.7.3 Peptídeos miméticos: uma alternativa no diagnóstico da hanseníase

As novas ferramentas pós genômicas têm permitido a caracterização de peptídeos e proteínas que podem ser utilizados no sorodiagnóstico. E, diante disso, ferramentas como a bioinformática são de grande valia para o mapeamento dessas moléculas antigênicas, fortalecendo o grupo das proteínas recombinantes e a utilização de peptídeos miméticos a esses antígenos (LIMA, 2011).

Os peptídeos são biomoléculas que contém algumas dezenas de aminoácidos e podem ser facilmente sintetizados, mantendo suas propriedades naturais. Devido a seu

tamanho reduzido, os peptídeos podem ser testados frente a diversos alvos, possibilitando a seleção de peptídeos miméticos específicos contra várias doenças (LIMA, 2015).

A obtenção desses peptídeos miméticos pode ocorrer por meio da tecnologia de *phage display*, que permite a caracterização e identificação de diversos peptídeos frente a várias moléculas, como por exemplo, os anticorpos (BLANK et al, 1999). A técnica é embasada na utilização do bacteriófago M13 que infecta bactérias gram negativas como *E. coli* (RAKONJAC, 2001).

O princípio da técnica consiste na expressão de polipeptídeos na superfície do bacteriófago através da inserção de DNA codificante e, dessa forma, a molécula expressa fica exposta na superfície viral, ligada a uma proteína natural do capsídeo e o DNA armazenado no interior do fago (BARBAS, 2001). Além disso, os fagos específicos são selecionados em alvos imobilizados e podem ser amplificados, caracterizando um método de detecção de moléculas de maneira rápida e eficaz (BENHAR, 2001; KÜGLER et al., 2013).

Os peptídeos miméticos representam novos biomarcadores que podem ter importantes aplicações no diagnóstico da hanseníase, podendo mimetizar antígenos como PGL-1 (YOUN et al, 2004), ou outros antígenos naturais do *M. leprae* (ALBAN et al, 2014), como as proteínas chaperoninas GroEL e GroES. Além disso, a grande vantagem desses peptídeos é a possibilidade de serem sintetizados quimicamente para serem utilizados em diferentes plataformas e utilizando amostras biológicas variadas, como soro, secreções e saliva (BOBOSHA et al., 2014).

Atualmente, o diagnóstico da doença utilizando os peptídeos miméticos em testes sorológicos e salivares são importantes ferramentas para detecção de anticorpos produzidos contra os antígenos específicos do *M. leprae* pelos pacientes com hanseníase (ALBAN et al., 2014).

Esses testes demonstram eficiência e aplicação em técnicas relativamente simples como o imunoensaio de ELISA ou testes de fluxo laterais. Os imunoenaios têm-se tornados cada vez mais rápidos e sensíveis, além de serem amplamente utilizados na pesquisa científica. Entretanto, o método de coleta do soro dos pacientes

ainda é uma técnica invasiva, necessitando de metodologias alternativas e de caráter pouco invasivo (MOURA, 2011).

Diante disso, a utilização da saliva como método de análise para diagnóstico é pertinente em diversos aspectos, principalmente pela facilidade da coleta de material e a quantidade de material que pode ser obtido (LAWRENCE, 2002; YARAT, et al. 2004). Para além, os métodos de coleta salivares representam uma técnica não invasiva, oferecendo menor risco de contaminação para o operador, além de armazenamento simples e de baixo custo. Somado a esses fatores, a utilização da saliva permite a elaboração de aparelhos de instrumentação química para investigações clínicas e laboratoriais (MOURA, et al. 2007).

Diante desses resultados, é importante testar a eficácia desses peptídeos na população Maranhense, por ser uma área de hiperendemia, utilizando imunoenaios de ELISA. A validação desses peptídeos miméticos surge da necessidade de obtenção de novos marcadores imunológicos, bem como da possibilidade de incluí-los na prática clínica de detecção da doença.

Por esses motivos, a estratégia utilizada nesse trabalho visa validar o uso do peptídeo mimético ao PGL-1 (PGL1-M3) e a chaperonina GroEL (MPML14) em amostras sorológicas e salivares de pacientes do Maranhão, região hiperendêmica, uma vez que os mesmos já foram utilizados em uma região endêmica (*dados em publicação*). Aliado a isso, a estratégia ainda inclui o *design in silico* e validação do peptídeo mimético PGL1-M3R, nunca anteriormente utilizado em populações com hanseníase.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar biomarcadores peptídicos no diagnóstico da hanseníase em população hiperendêmica no estado do Maranhão.

2.2 Objetivos específicos

- Validar os peptídeos miméticos (MPML14, PGL1-M3 e PGL1-M3R) em amostras sorológicas de indivíduos da população Maranhense;
- Testar os peptídeos miméticos (MPML14 e PGL1-M3R) em amostras salivares de indivíduos da população Maranhense;
- Comparar os resultados obtidos dos três peptídeos com outros testes laboratoriais como baciloscopia, ML-FLOW, ELISA e PCR convencional;
- Comparar os resultados obtidos dos três peptídeos com os dados clínicos dos pacientes;
- Comparar os resultados obtidos com os peptídeos miméticos (PGL1-M3, MPML14) na população maranhense com a população endêmica de Uberlândia-MG;
- Determinar por bioinformática a estrutura tridimensional do peptídeo PGL1-M3R;
- Comparar a estrutura tridimensional do PGL1-M3R com a do peptídeo PGL1-M3;
- Comparar o região de atracamento molecular do anticorpo anti-*M.leprae* com os peptídeos PGL1-M3R e PGL1-M3.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos e amostras biológicas

As amostras sorológicas de pacientes e contatos saudáveis utilizadas no estudo foram coletadas em projeto anterior (Número de aprovação no comitê de ética: 23115 003005/2009-36). Estas estão disponibilizadas no biorrepositório de amostras do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Maranhão.

Foram utilizadas um total de 383 amostras entre pacientes, contatos domiciliares (HC) e controles endêmicos (EC), provenientes das cidades de Imperatriz, Açailândia e São Luís coletadas entre os anos de 2009 e 2010 (Tabela 01). As amostras salivares também fazem parte do biorrepositório, coletadas no Centro de Saúde do Bairro de Fátima, São Luís -MA.

Os critérios de escolha das amostras de controles endêmicos, consistiam em triagem de pessoas sem qualquer histórico de contato com pacientes com hanseníase, sem histórico de infecções, câncer ou estágio de tratamento de quimioterapia na região da cabeça e pescoço.

Tabela 1. Número de amostras utilizadas no estudo, divididas por cidade e forma clínica.

Cidades	Formas clínicas						Total
	TT	BT	BB	BL	LL	HC	
Imperatriz	26	37	12	14	13	73	175
Açailândia	10	04	14	-	-	73	101
São Luís	09	-	-	04	05	69	87
EC							20

Confirmação do Diagnóstico Clínico

Os pacientes foram diagnosticados e classificados pela equipe médica de acordo com as formas clínicas, segundo Ridley & Joplin, baseados no Índice Baciloscópico de esfregaço dérmico e no número de lesões. Também foi realizada a classificação operacional (paucibacilares e multibacilares) de acordo com o Ministério da Saúde

desses pacientes. Desse modo, as amostras sorológicas utilizadas neste projeto passaram por análise desses parâmetros e foram divididas de acordo com essas classificações.

3.2 Coleta de amostras salivares

A coleta da saliva foi realizada nos indivíduos confortavelmente sentados. Todas as pessoas foram orientadas a não realizar deglutições e não mastigar durante a coleta das amostras. A coleta da saliva foi feita por meio da utilização de rolos cilíndricos de superfície lisa conhecidos pelo nome comercial de “*salivette*”. Estes rolos que medem aproximadamente 1 cm de espessura e 3,5 cm do comprimento foram introduzidos na cavidade bucal e alojados na região sublingual por um período de 5 minutos para absorção da saliva. O material coletado é introduzido em um tubo de ensaio devidamente fechado e identificado.

Depois da amostra devidamente acondicionado, foram realizadas centrifugações de 1 minuto a 3.000 g* para obtenção e alíquota do material, posteriormente mantido a -20° C.

3.3 Seleção dos participantes para coleta de Saliva

Os pacientes suspeitos foram selecionados no ambulatório de referência em hanseníase que atende pacientes encaminhados com diagnóstico de hanseníase para tratamento e monitoramento.

Critérios de inclusão no estudo

Foram incluídas no estudo as amostras salivares de pacientes com suspeita de hanseníase, virgens de tratamento e também de seus contatos domiciliares. Para o Grupo Controle, os participantes não tinham contato com os indivíduos portadores de hanseníase.

Critérios de exclusão no estudo

Os pacientes com infecções glandulares, que estavam ou estiveram sob terapia de radiação de câncer de cabeça e pescoço, condições autoimunes como a Síndrome de Sjögren, metabólicas como o Diabetes Mellitus dos tipos 1 e 2, neurológicas como paralisia cerebral, genéticas como Síndrome de Down foram excluídos da pesquisa. Indivíduos em uso de medicamentos anti-depressivos, anti-histamínicos, anti-

convulsivantes, ansiolíticos, outras drogas comprovadamente xerostômicas e que se recusaram a participar da pesquisa.

Critérios de inclusão de contatos

Todos os indivíduos que foram recrutados e confirmados como contatos diretos daquele paciente, ou seja, que residem na mesma casa ou tem relação muito próxima com o caso índice por qualquer período de tempo.

Critérios de exclusão de contatos

Os pacientes com infecções glandulares, que estavam ou estiveram sob terapia de radiação de câncer de cabeça e pescoço, condições autoimunes como a Síndrome de Sjögren, metabólicas como o Diabetes Mellitus dos tipos 1 e 2, neurológicas como paralisia cerebral, genéticas como Síndrome de Down serão excluídos da pesquisa. Indivíduos em uso de medicamentos anti-depressivos, anti-histamínicos, anti-convulsivantes, ansiolíticos, outras drogas comprovadamente xerostômicas e que se recusaram a fazer da pesquisa.

3.4 Síntese química dos peptídeos

Neste trabalho foram utilizados três peptídeos miméticos obtidos anteriormente por *phage display* e denominados MPML14, PGL1-M3 e PGL1-M3R. Estes foram sintetizados quimicamente por uma empresa especializada no ramo que comercializa esses produtos (*Peptide 2.0*).

Os peptídeos apresentam tamanhos distintos e, além disso, existem diferenças entre os seus espaçadores, sequências de seis ou sete aminoácidos que intercalam suas estruturas (Tabela 02). Por conta disso, esses peptídeos apresentam atividades biológicas singulares, tanto em fatores como reatividade quanto na própria estrutura tridimensional dos mesmos.

Tabela 2. Sequência dos peptídeos que foram utilizados no projeto.

Peptídeo	Sequência
PGL1-M3	NH3-HWMLPGGPPGGGPPHWMLPEDPPGGGPPHWFLWDGPPGGGPPHWCLWDG PPGGGPPSSPIWPSPPGGGPPSMSRYGQ-CONH2
PGL1-M3 R	NH3- HWMLPGGPPGGGPPHWMLPEDPPGGGPPHWFLWDG-CONH2
MPML14	NH3 - YGCLFCTGGGSYGCLFCT-CONH2

3.5 Elisa para teste dos peptídeos sintetizados

Os ensaios de ELISA foram realizados em placas Nunc™ MaxiSorp™ sensibilizadas com 1µg/well do peptídeo sintético e tampão de sensibilização, *overnight* a 4°C e, posteriormente bloqueadas com PBS-BSA 5% por 1 hora a 37°C. Terminado esse tempo, as placas foram lavadas uma vez com PBS *tween* 0,05%.

Os soros de todos os indivíduos testados foram utilizados numa concentração de 1:100, enquanto a saliva foi diluída numa concentração de 1:5 e foram incubados por 1 hora a 37°C e a placa passou por mais um ciclo de lavagem. Os anticorpos secundários foram anti-IgM, anti-IgG ou anti-IgA humana acopladas com peroxidase (*Sigma-Aldrich*) de acordo com o experimento específico, incubados a 37°C por 1 hora. Para o peptídeo MPML14, foi utilizado o anticorpo anti-IgG e para os demais foram utilizados o anticorpo secundário anti-IgM. Nas amostras salivares, o anticorpo utilizado foi o anti-IgA, independente do antígeno.

Após esse processo, foi acrescentado uma solução de Ortofenilenodiamina (OPD) preparada em tampão citrato-fosfato para revelar as placas que passaram por um processo de mudança de coloração. A reação foi interrompida pela adição de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Os resultados foram obtidos com base na leitura de densidade óptica (OD) em espectrofotômetro com filtro de 492nm.

3.6 Validação do teste

Para validação dos ensaios realizamos a comparação entre os resultados obtidos e os resultados de ELISA já existentes para outros antígenos bem padronizados nos testes imunológicos específicos, como PGL-1 nativo. Além disso, os três peptídeos utilizados neste estudo tiveram seus resultados comparados entre si e avaliados com o teste padrão.

3.7 Análise por bioinformática

O servidor *online* I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) foi utilizado para fazer a predição da modelagem dos peptídeos MPML14, PGL1-M3 e PGL1-M3R, bem como do anti-PGL1. Já as estruturas moleculares resultantes foram visualizadas e alteradas no programa pYmol 1.5.0.4 (<https://www.pymol.org/>).

A análise do percentual de hidrofobicidade dos peptídeos foi realizada através da plataforma *online* Peptide 2.0 e posteriormente estas moléculas foram editadas no pYmol 1.5.0.4.

3.8 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados através do *software* GraphPad versão 06. A determinação do *cut off* para os peptídeos foi feita por análise de curva ROC, incluindo cálculos para sensibilidade e especificidade e considerando grupo de pacientes e o grupo de controle endêmico. Além disso, foi realizado uma equação matemática para determinar a positividade dos pacientes para cada peptídeo.

Para medir a comparação entre os testes convencionais e parâmetro clínicos com os dados obtidos nos ensaios com os peptídeos foi utilizado a análise do índice Kappa, segundo Landis & Koch, bem como o teste exato de Fisher para determinação do pvalue.

4. RESULTADOS

4.1 MPML14: positividade, comparação com testes convencionais e bioinformática

Quanto à estrutura tridimensional do MPML14, o mesmo forma uma alça com conformação simples ou primária (Figura 6A) e o perfil de hidrofobicidade mostra que a sua constituição é de caráter 88,89% neutro (Figura 6B). Esta característica reforça que este peptídeo que é mimético de uma proteína neutra.

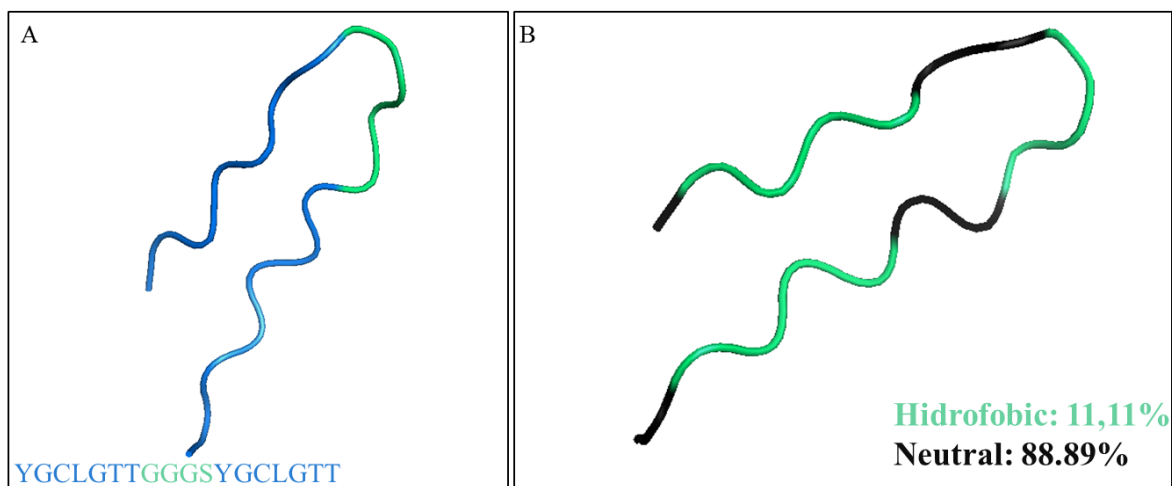


Figura 6. Sequência, design e perfil de hidrofobicidade do MPML14. Em A, sequência e design tridimensional peptídeo. Em B, seu perfil de hidrofobicidade.

O peptídeo MPML14, foi avaliado para a detecção de IgG, apresentando especificidade de 100% e sensibilidade de 68% para todas as formas clínicas (Figuras 7B e 7C). Quanto à positividade, pode-se notar um percentual de 53,3% em TT; 64,3% em BT; 57,7% em BB; 89,5% em BL; 100,0% em LL e 35,8% em HC. No grupo EC a reatividade foi basal e inferior ao *cut off* determinado para o MPML14 de 0,1998 (Figuras 7A e 7C). O percentual de positividade em Tuberculoides é 2,5 vezes maior em área hiperendêmica quando comparado à área endêmica, porém para os multibacilares dos grupos BB e BL esse aumento não foi observado (Figura 7C).

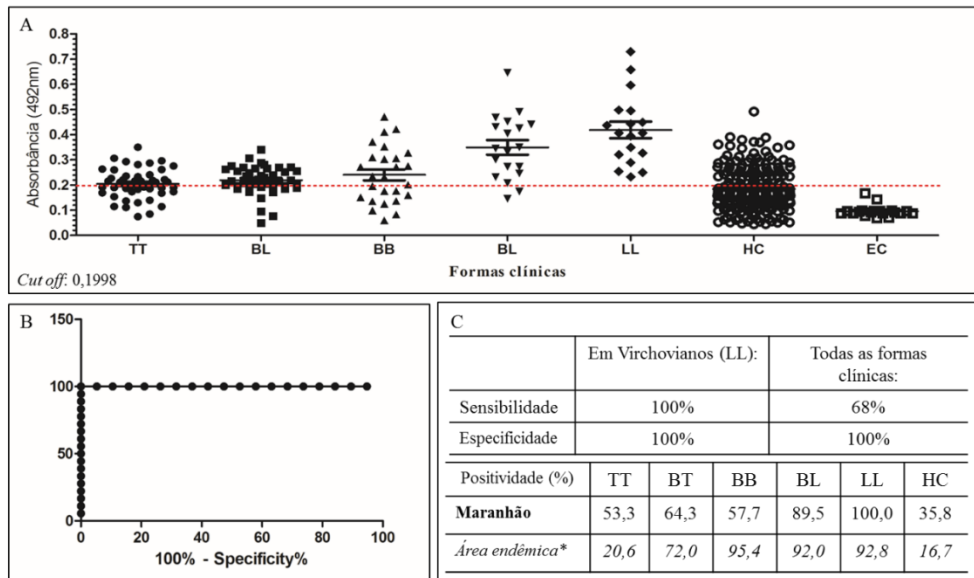


Figura 7. Detecção de anticorpos IgG por ELISA utilizando o antígeno MPML14. A – perfil de reatividade do MPML14 em todas as formas clínicas, contatos e controles endêmicos. B – Curva ROC (considerando LL e EC). C – percentual de sensibilidade, especificidade e positividade por forma clínica e em área endêmica. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares).

Quando estratificado por cidades, identificamos o percentual de positividade em Imperatriz que varia de 76,9% em TT a 100,0% em LL (Figuras 8A, 8D). Para Açailândia e São Luís o grupo TT teve positividade de 30,0% e 11,1%, respectivamente e 100% nos Virchovianos. Nos contatos domiciliares essa positividade 47,9%; 23,3% e 34,8% em Imperatriz, São Luís e Açailândia (Figura 8D).

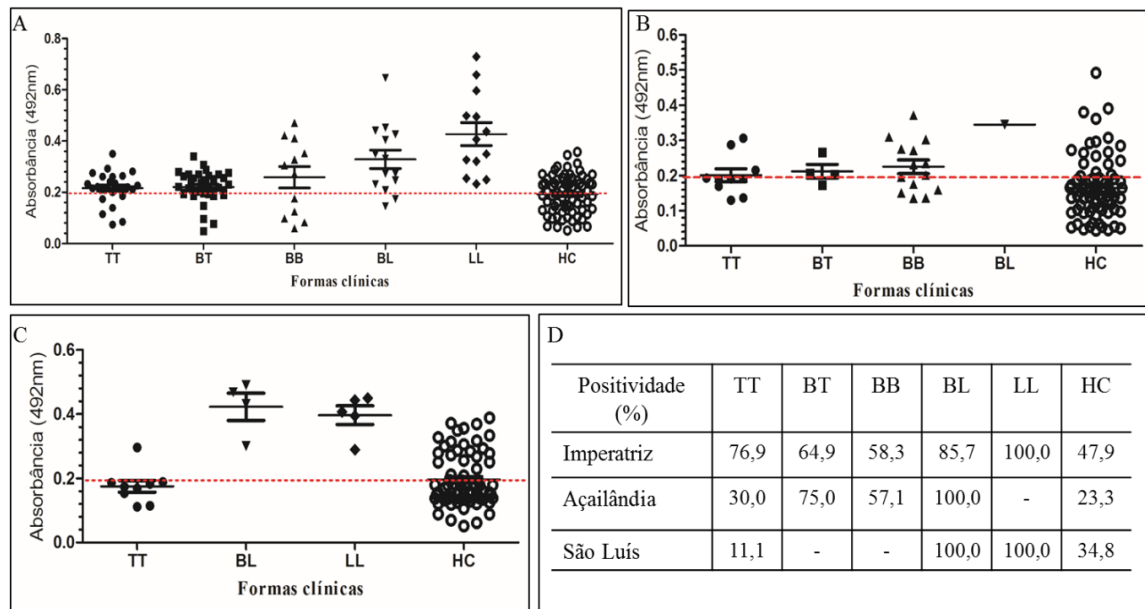


Figura 8. Detecção de anticorpos IgG por ELISA utilizando o antígeno MPML14. A – reatividade do MPML14 em pacientes e contatos da cidade de Imperatriz. B – reatividade do MPML14 em pacientes e contatos de Açailândia. C – reatividade do MPML14 em pacientes e contatos de São Luís. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares).

Na comparação com os testes convencionais, ELISA, MLFLOW, PCR e Baciloscopia a concordância entre ELISA utilizando o PGL1-nativo e o mesmo teste utilizando MPML14 na forma paucibacilar e contatos é mínima (Kappa: 0,062 e 0,053, respectivamente), já para os virchovianos a concordância é substancial (Kappa: 0,642). Considerando, MLFLOW e Baciloscopia a concordância é perfeita apenas para as formas multibacilares do polo LL (Kappa: 1,000). E se considerarmos a PCR de swab bucal a concordância é mínima para todas as formas clínicas avaliadas, uma vez que 149 pacientes foram negativos para PCR e positivos para este imunoenensaio (Tabela 03).

Tabela 3. Níveis de concordância entre teste de ELISA com MPML14 *versus* ELISA para anti-PGL-1, MLFLOW, PCR swab bucal e baciloscopia.

		MPML14				Kappa	IC	Concordância	pvalue*
		+/+	+/-	-/+	-/-				
Anti PGL-1	FC	66	26	85	146	0.282	0.184 a 0.381	Razoável	0.0001
	TT	05	03	19	18	0.062	-0.149 a 0.217	Mínima	
	LL	17	0	1	1	0.642	0.003 a 1.000	Substancial	
	HC	09	10	68	127	0.053	-0.048 a 0.153	Mínima	
MLFLOW	FC	57	19	120	169	0.225	0.141 a 0.308	Razoável	0.0001
	TT	04	03	20	18	0.023	-0,179 a 0,224	Mínima	
	LL	18	0	0	1	1.000	1.000 a 1.000	Perfeita	
	HC	04	02	72	137	0.048	-0.020 a 0.116	Mínima	
PCR SB	FC	27	06	149	182	0.125	0.064 a 0.186	Mínima	0.0001
	TT	05	01	19	20	0.153	-0,029 a 0,334	Mínima	
	LL	10	0	8	1	0.116	-0.102 a 0.334	Mínima	
	HC	02	0	74	139	0.034	-0.012 a 0.080	Mínima	
Índ. Bacilosc.	FC	44	07	124	179	0.232	0.157 a 0.308	Razoável	0.0001
	TT	02	0	22	20	0.076	-0,028 a 0,181	Mínima	
	LL	18	0	0	0	1.000	1.000 a 1.000	Perfeita	
	HC	0	0	77	138	0.016	-0.015 a 0.048	Mínima	

IC (índice de confiança); PCR SB (PCR *swab* bucal); FC (formas clínicas); TT (tuberculoide); LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares).

Para os ensaios de detecção de IgA por meio de saliva, é possível notar uma diferença entre o perfil de reatividade entre os indivíduos com suspeita de hanseníase e o grupo de controles endêmicos (Figura 09).

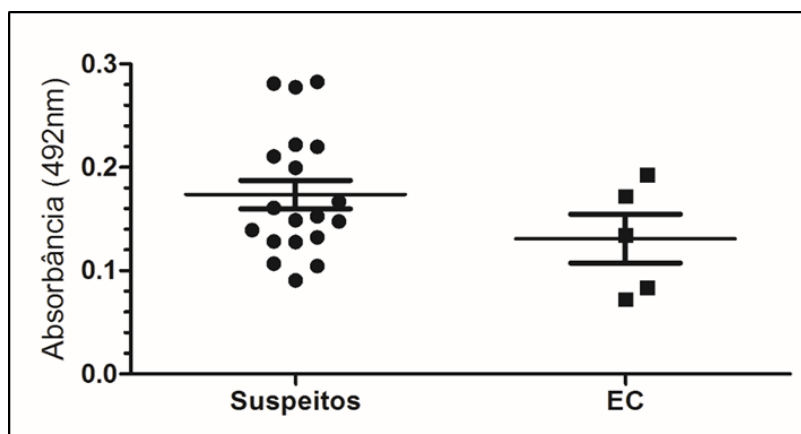


Figura 9. Detecção de anticorpos IgA por ELISA utilizando o antígeno MPML14 em pacientes com suspeita de hanseníase e o grupo de controles endêmicos (EC).

4.2 PGL1-M3: reatividade, positividade, comparação com testes convencionais e bioinformática

A dedução *in silico* do peptídeo PGL1-M3 revelou uma molécula que adquire uma estrutura secundária em forma de hélice (Figura 10A). Sobre o perfil de hidrofobicidade, a sua constituição é de caráter majoritariamente hidrofóbico (51,91%) (Figura 10B). Essa característica reforça que o mesmo é mimético de um lipídeo.

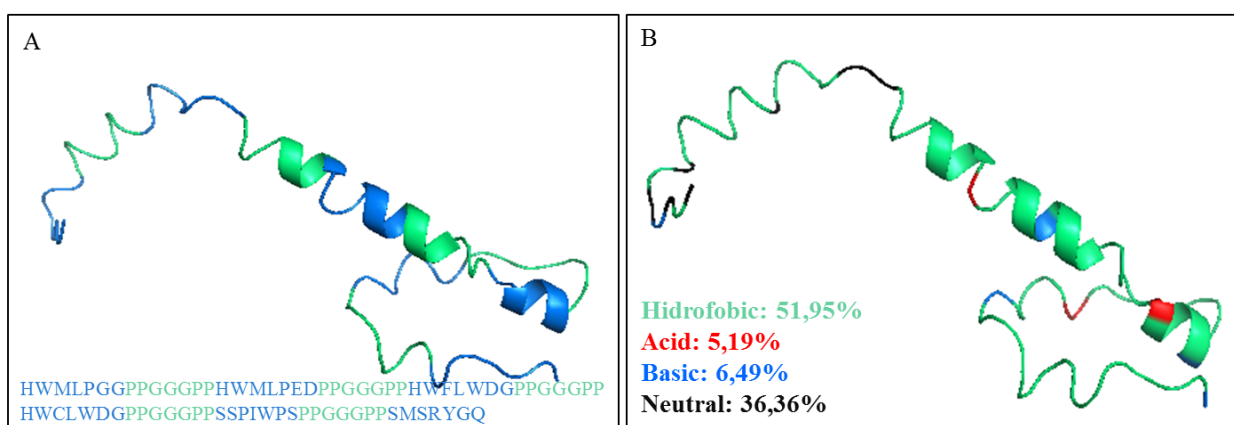


Figura 10. Sequência, design e perfil de hidrofobicidade dos peptídeos. Em A, sequência e design tridimensional peptídeo PGL1-M3. Em B, perfil de hidrofobicidade do PGL1-M3.

O peptídeo PGL1-M3, foi avaliado para a detecção de IgM e apresentou 100% de especificidade e 89,26% de sensibilidade para todas as formas clínicas (Figuras 11B e 11C). Em relação à positividade, pode-se observar um percentual de 82,2% em TT; 90,5% em BT; 88,5% em BB; 73,7% em BL; 100% em LL e 73,0% em HC. Para o grupo EC, a reatividade foi basal considerando um *cut off* de 0,1105 (Figuras 11A e 11C). O comportamento observado quando se compara área endêmica e hiperendêmica é o mesmo observado com o peptídeo MPML14, sendo a principal diferença observada no grupo tuberculoide, com positividade de 34,3% e 82,2%, respectivamente.

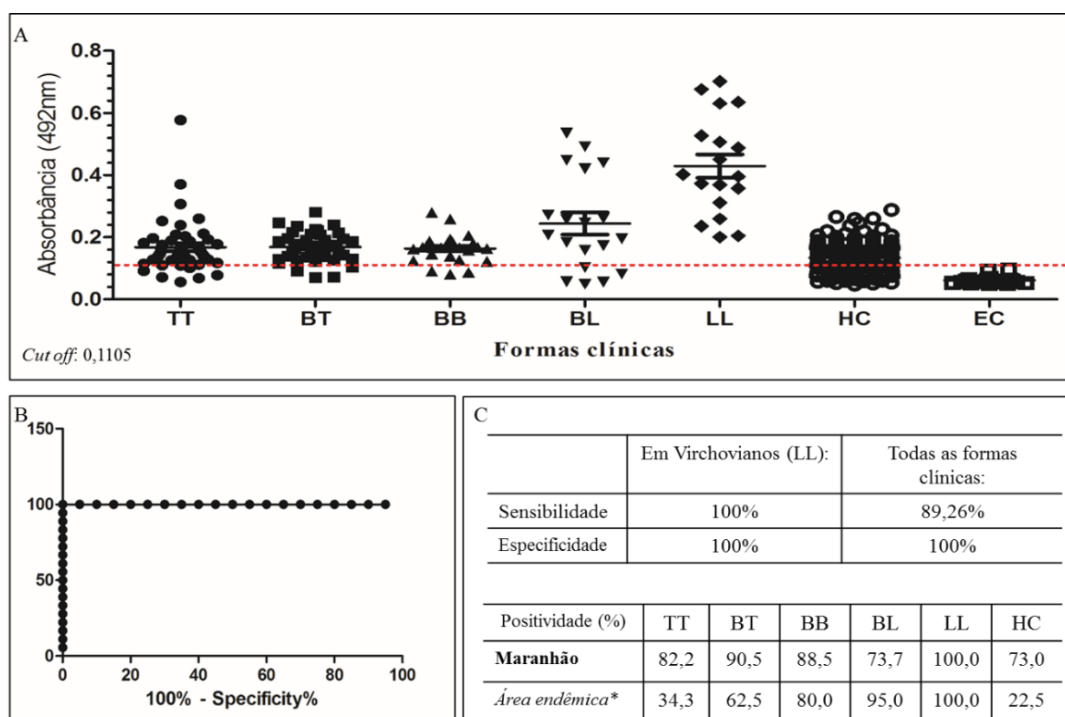


Figura 11. Detecção de anticorpos IgM por ELISA utilizando o antígeno PGL1-M3. A – perfil de reatividade do PGL1-M3 em pacientes de diferentes formas clínicas, contatos e controles endêmicos. B – Curva ROC (considerando LL e EC). C – percentual de sensibilidade, especificidade e positividade por forma clínica e em área endêmica. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares).

Na comparação entre municípios, o percentual de positividade em Imperatriz variou de 92,3% em TT a 100,0% em LL (Figuras 12A, 12D). Nas cidades de Açailândia e São Luís a positividade do grupo Tuberculóide foi de 90,0% e 44,4%, respectivamente e 100% nos Virchovianos. No grupo dos contatos domiciliares, foi observada uma positividade de 69,9% em Imperatriz, 74,0% em Açailândia e 81,2% para São Luís (Figuras 12 B, C e D).

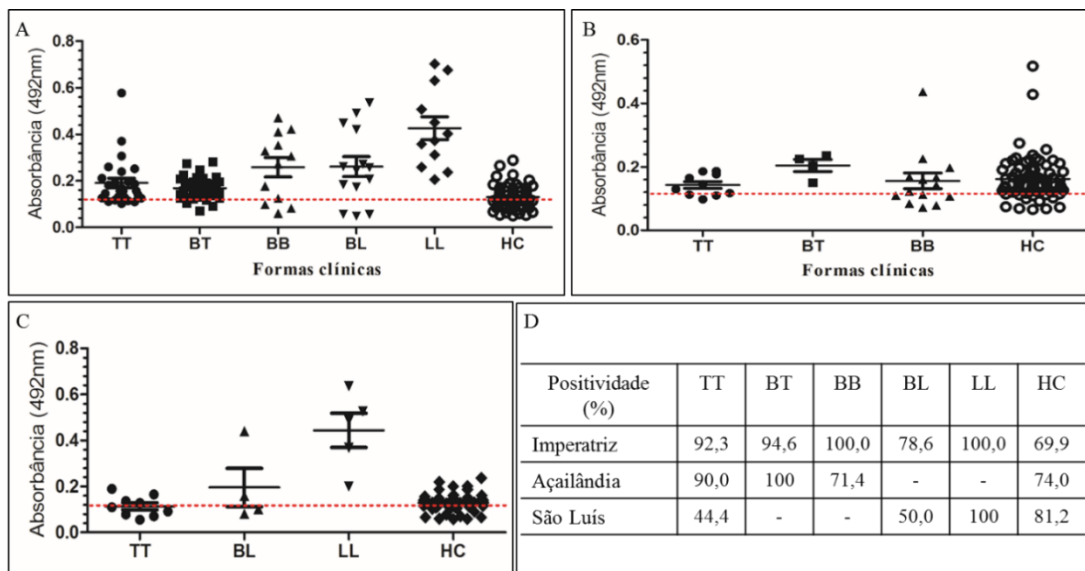


Figura 12. Detecção de anticorpos IgM por ELISA utilizando o antígeno PGL1-M3. A – reatividade do PGL1-M3 em pacientes de diferentes formas clínicas e contatos da cidade de Imperatriz. B – reatividade do PGL1-M3 em pacientes e contatos de Açailândia. C – reatividade do PGL1-M3 em pacientes e contatos de São Luís. D – percentual de positividade por forma clínica e contatos em Imperatriz, Açailândia e São Luís. TT (tuberculóide); BT (boderline-tuberculóide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares).

Na comparação com os testes convencionais, ELISA, MLFLOW, PCR e Baciloscopia, a concordância entre ELISA utilizando o PGL1-nativo e o mesmo teste utilizando PGL1-M3 na forma tuberculóide e para os contatos domiciliares é mínima (Kappa: 0.027 e 0.003, respectivamente), já para os multibacilares, a concordância é substancial (Kappa: 0.642). Ao considerar MLFLOW e Baciloscopia a concordância é perfeita apenas para as formas multibacilares do polo LL (Kappa: 1,000). Ao avaliar a PCR de swab bucal, não foi observado concordância para a forma paucibacilar (Kappa: -0.346) e concordância mínima para a forma multibacilares (Kappa: 0.142), visto que 258 pacientes foram negativos para a PCR e positivos para o teste de ELISA (Tabela 04).

Tabela 4. Níveis de concordância entre teste de ELISA com PGL1-M3 versus ELISA para anti-PGL-1, MLFLOW, PCR swab bucal e baciloscopia.

	PGL1-M3					Kappa	IC	Concordância	pvalue*
	+/+	+/-	-/+	-/-					
Anti PGL-1	FC	78	12	211	64	0.057	-0.006 a 0.108	Mínima	0,0515
	TT	07	01	30	07	0.027	-0.083 a 0.136	Mínima	
	LL	17	0	0	0	0.642	0.003 a 1.000	Substancial	
	HC	15	5	144	51	0.003	-0.046 a 0.051	Mínima	
MLFLOW	FC	68	08	219	70	0.068	0.023 a 0.112	Mínima	0,0112
	TT	06	01	31	07	0.015	-0,090 a 0,120	Mínima	
	LL	18	0	0	1	1.000	1.000 a 1.000	Perfeita	
	HC	05	01	152	57	0.008	-0.016 a 0.032	Mínima	
PCR SB	FC	28	11	258	65	-0.021	-0.061 a 0.018	Não	0,2964
	TT	02	07	35	01	-0.346	-0,604 a -0,088	Não	
	LL	11	0	07	01	0.142	-0.117 a 0.401	Mínima	
	HC	04	0	153	56	0.014	-0.000 a 0.027	Mínima	
Índ. Bacilosc.	FC	43	06	245	72	0.034	-0.001 a 0.069	Mínima	0,1322
	TT	0	01	37	08	-0.044	-0,131 a 0,043	Não	
	LL	18	0	0	0	1.000	1.000 a 1.000	Perfeita	
	HC	0	0	158	57	0.003	-0.003 a 0.010	Mínima	

IC (índice de confiança); PCR SB (PCR swab bucal); FC (formas clínicas); TT (tuberculoide); LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares).

4.3 PGL1-M3R: reatividade, positividade, comparação com testes convencionais e bioinformática

Quanto à estrutura tridimensional do peptídeo, o mesmo adquire formato de alça simples ou primária e o perfil de hidrofobicidade mostra que a sua constituição é de caráter hidrofóbico (57,14%) (Figura 13A e 13B).

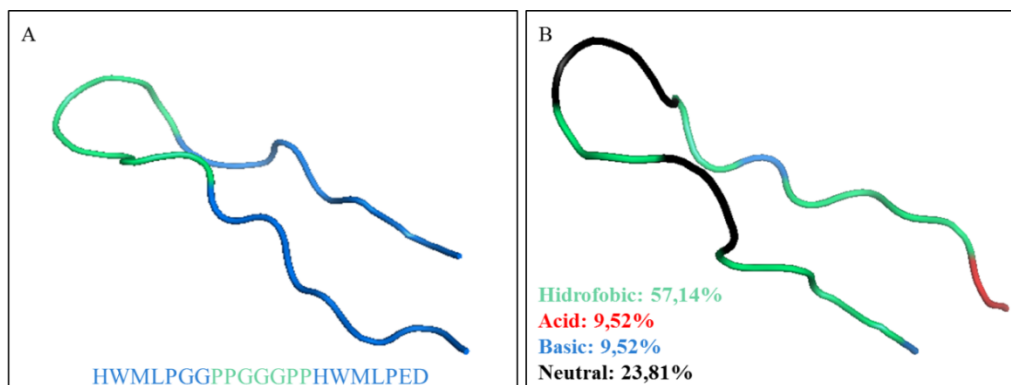


Figura 13. Sequência, design e perfil de hidrofobicidade dos peptídeos. Em A, sequência e design tridimensional peptídeo PGL1-M3R. Em B, perfil de hidrofobicidade do PGL1-M3R.

O peptídeo PGL1-M3R foi avaliado quanto a detecção de IgM, apresentando especificidade 100% e sensibilidade de 86% para todas as formas clínicas (Figuras 14B e 14C). Quanto à positividade, pode-se notar um percentual de 77,8% em TT; 81,0% em BT; 73,1% em BB; 68,4% em BL; 100,0% em LL e 80,5% em HC considerando um *cut off* de 0,1172 (Figuras 14A e 14C).

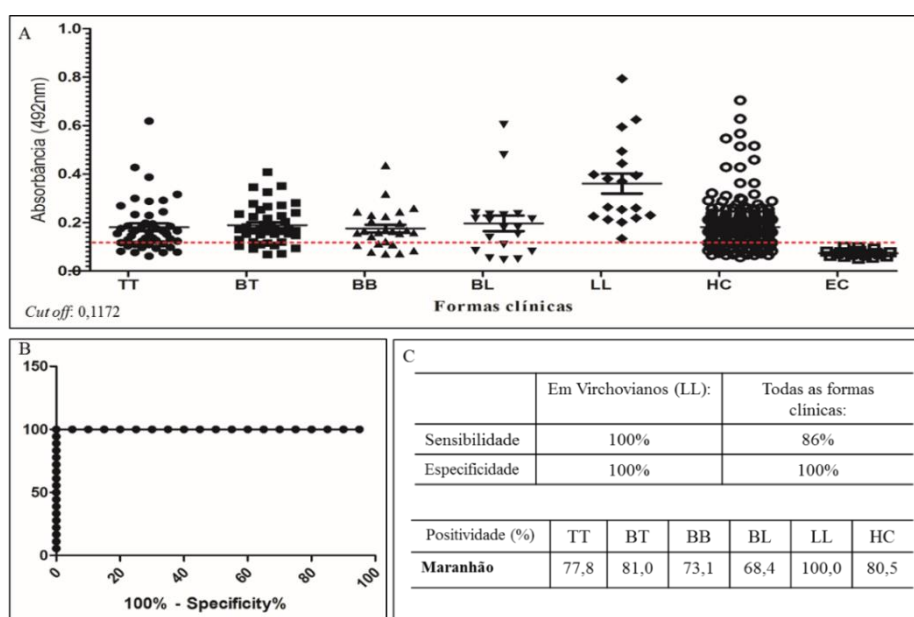


Figura 14. Detecção de anticorpos IgM por ELISA utilizando o antígeno PGL1-M3R. A – perfil de reatividade do PGL1-M3R em pacientes de diferentes formas clínicas, contatos e controles endêmicos. B – Curva ROC (considerando Virchovianos e controles endêmicos). C – percentual de sensibilidade,

especificidade e positividade por forma clínica e contatos. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares).

A divisão por cidades mostrou o perfil de positividade em Imperatriz, Açailândia e São Luís de 84,6%; 70,0% e 44,4% em Tuberculóides, respectivamente. Já para os Virchovianos a positividade foi de 100% nas cidades avaliadas (Figuras 15C, 15D).

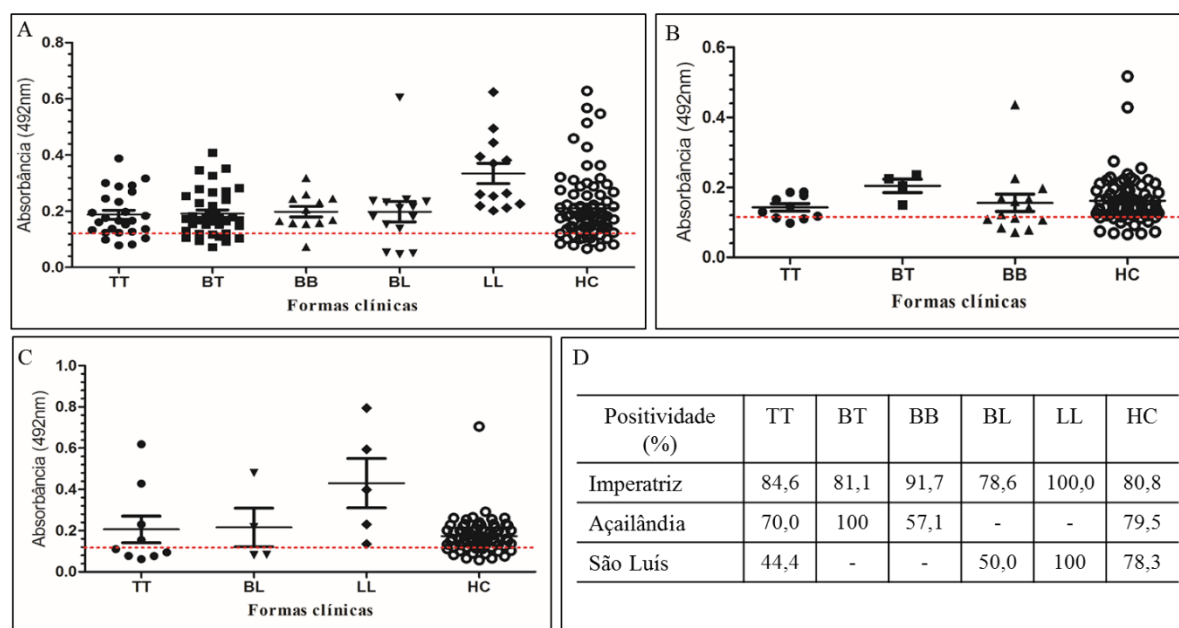


Figura 15. Detecção de anticorpos IgM por ELISA utilizando o antígeno PGL1-M3R. A – reatividade do PGL1-M3R em pacientes de diferentes formas clínicas e contatos da cidade de Imperatriz. B – reatividade do PGL1-M3R em pacientes e contatos de Açailândia. C – reatividade do PGL1-M3R em pacientes e contatos de São Luís. D – percentual de positividade por forma clínica e contatos em Imperatriz, Açailândia e São Luís. TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline); BL (boderline-virchoviano), LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares).

Na comparação com os testes convencionais ELISA, MLFLOW, PCR e Baciloscopia, foi indicado que: (01) houve concordância substancial para a correlação entre ELISA utilizando o PGL1-nativo e o mesmo teste utilizando PGL1-M3R para os LL (Kappa: 0,6), bem como uma concordância perfeita para o mesmo grupo na correlação com ML-FLOW e índice baciloscópico (Kappa:1). E para PCR de swab bucal a concordância foi mínima ou ausente (Tabela 05).

Tabela 5. Níveis de concordância entre teste de ELISA com PGL1-M3R versus ELISA para anti-PGL-1, MLFLOW, PCR swab bucal e baciloscopia.

	PGL1-M3R								
		+/+	+/-	-/+	-/-	Kappa	IC	Concordância	<i>pvalue*</i>
Anti PGL-1	FC	75	15	216	58	0.026	-0.026 a 0.078	Mínima	0,4481
	TT	07	01	26	11	0.077	-0.055 a 0.210	Mínima	
	LL	17	0	1	0	0.642	0.003 a 1.000	Substancial	
	HC	14	06	159	35	-0.027	-0.075 a 0.021	Sem concord.	
MLFLOW	FC	61	12	229	63	0.024	-0.022 a 0.071	Mínima	0,4183
	TT	06	01	27	11	0.058	-0,067 a 0,183	Mínima	
	LL	18	0	0	1	1.000	1.000 a 1.000	Perfeita	
	HC	02	01	171	41	-0.005	-0.024 a 0.014	Sem concord.	
PCR SB	FC	31	06	258	67	0.011	-0.021 a 0.043	Mínima	0,6670
	TT	05	01	28	11	0.040	-0,078 a 0,157	Mínima	
	LL	11	0	07	01	0.142	-0.117 a 0.401	Mínima	
	HC	03	01	169	39	-0.003	-0.023 a 0.017	Sem concord.	
Índ. Bacilosc.	FC	41	09	248	65	0.009	-0.029 a 0.048	Mínima	0,8500
	TT	01	01	31	11	-0.029	-0,125 a 0,066	Sem concord.	
	LL	18	0	0	0	1.000	1.000 a 1.000	Perfeita	
	HC	0	0	173	41	0.002	-0.002 a 0.007	Mínima	

IC (índice de confiança); PCR SB (PCR swab bucal); FC (formas clínicas); TT (tuberculoide); LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares).

Para os ensaios de detecção de IgA por meio de saliva, é possível notar uma diferença entre o perfil de reatividade entre os pacientes com suspeita de hanseníase e o grupo de controles endêmicos (Figura 16).

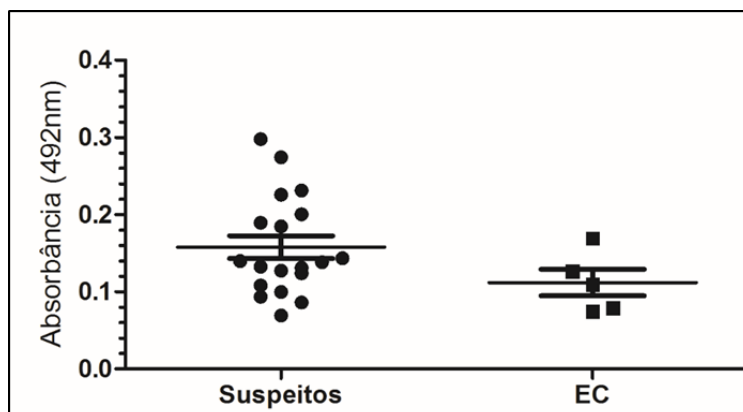


Figura 16. Detecção de anticorpos IgA por ELISA utilizando o antígeno PGL1-M3R em pacientes com suspeita de hanseníase e o grupo de controles endêmicos (EC).

4.4 PGL1-M3 e PGL1-M3R: semelhanças e diferenças

Na comparação entre os peptídeos é possível perceber um padrão de reatividade semelhante quando se compara PGL1-M3 e PGL1-M3R (Figuras 17A, 17B e 17C), com uma redução não significativa no PGL1-M3R. Além disso, a comparação entre os dois testes indicou uma concordância de moderada a perfeita (Tabela 6). Assim, a redução no número de aminoácidos alterou a conformação tridimensional dos peptídeos (Figura 17D e 17E), porém isso não afetou a reatividade de forma significativa.

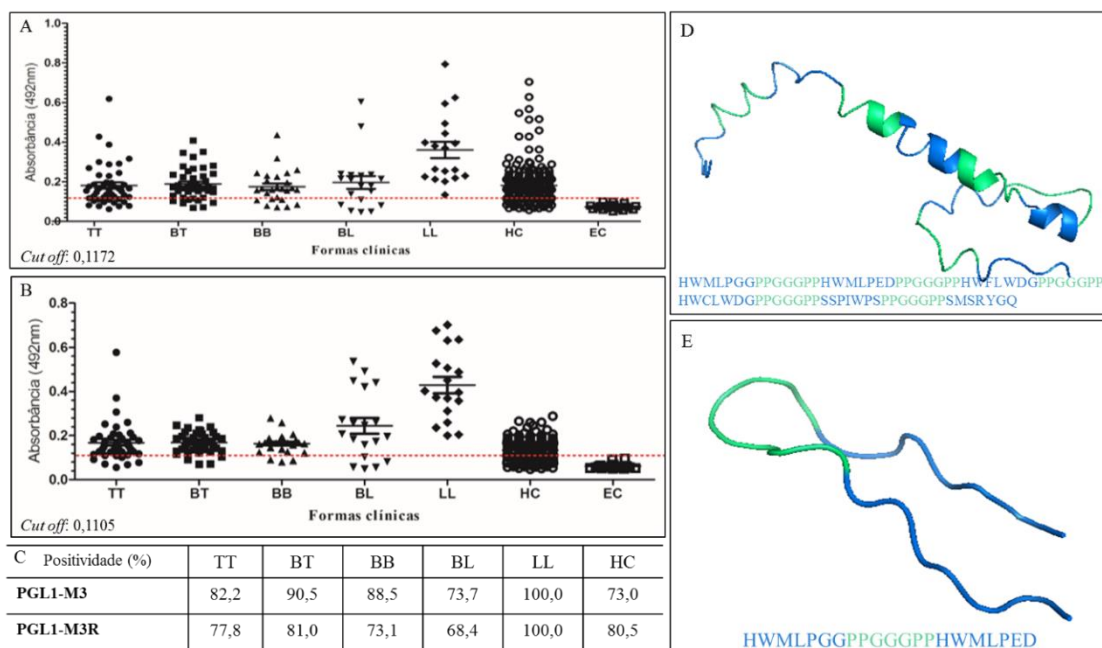


Figura 17. Comparação entre PGL1-M3 e PGL1-M3R. Em A, detecção de anticorpos IgM por ELISA PGL1-M3R e, em B – o antígeno PGL1-M3. Em C, a positividade para ambos os peptídeos. Em D e E, a predição in silico do PGL1-M3 e PGL1-M3R, respectivamente.

Tabela 6. Níveis de concordância entre teste de ELISA com PGL1-M3 versus PGL1-M3R.

ELISA PGL1-M3 x PGL1-M3R								
	+/+	+/-	-/+	-/-	Kappa	IC	Concordância	pvalue*
FC	259	29	34	40	0.451	0.337 a 0.566	Moderada	0.0001
TT	34	05	01	07	0.623	0.355 a 0.891	Substancial	0.0001
BT	32	06	02	05	0.236	-0.127 a 0.600	Razoável	0,0061
BB	19	04	0	03	0.523	0.145 a 0.901	Moderada	0,0135
BL	13	01	0	05	0.872	0.631 a 1.000	Perfeita	0,0005
LL	18	0	0	1	1.000	1.000 a 1.000	Perfeita	0,0526
HC	143	18	31	23	0.341	0.196 a 0.487	Razoável	0.0001

IC (índice de confiança); FC (formas clínicas); TT (tuberculoide); BT (boderline-tuberculoide); BB (boderline-boderline) BL (boderline-virchoviano) LL (virchoviano), HC (contatos domiciliares).

Além disso, o atracamento molecular demonstrou que os dois peptídeos são reconhecidos pelo anticorpo anti-*M.leprae*, confirmando *in silico* que estes representam regiões de epítomos (Figura 18). O peptídeo PGL1-M3 interage com partes de FR1, FR3 e diretamente com a CDR1, enquanto em PGL1-M3R essa interação é mais discreta (Figura 18).

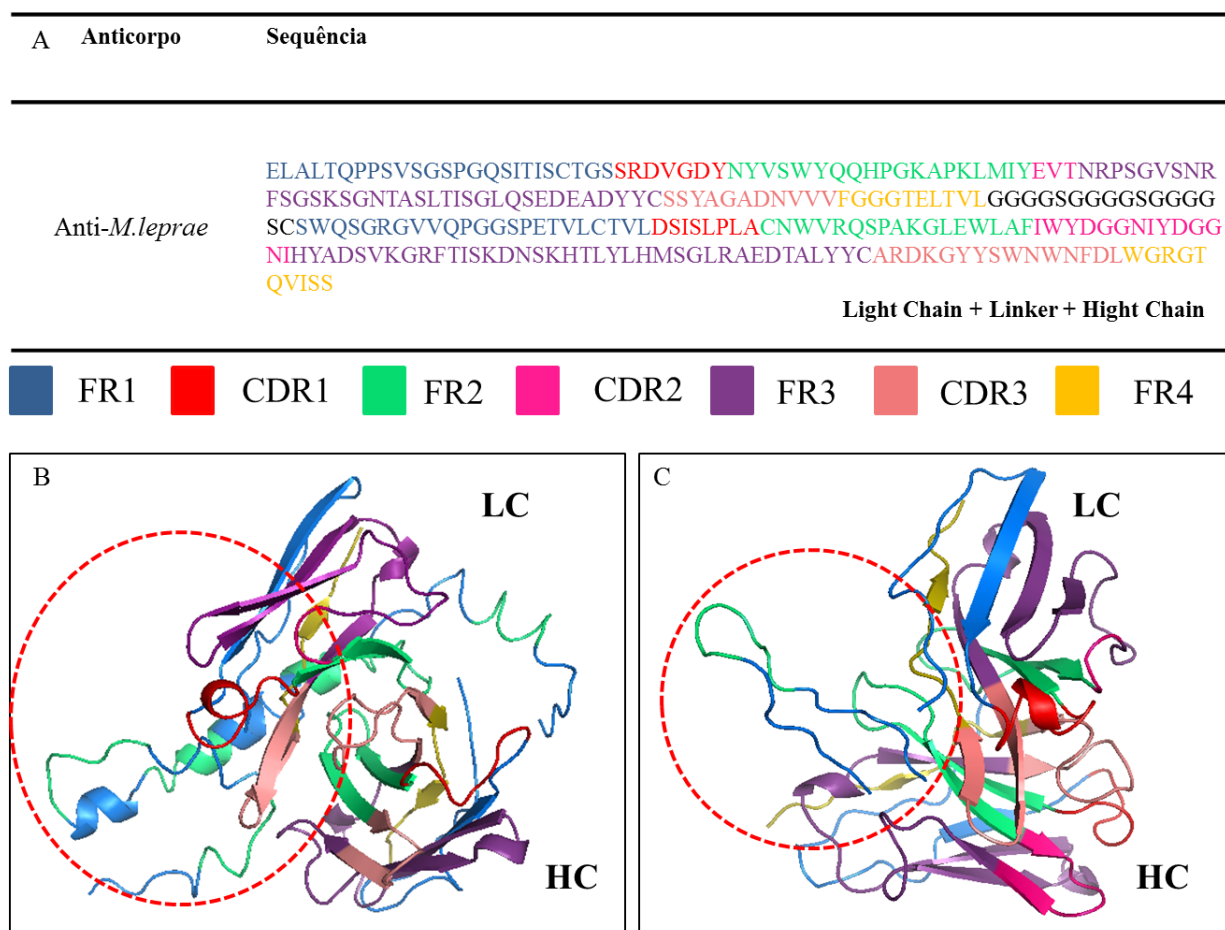


Figura 18. *Docking* molecular. Em A, sequência do anti-*M.leprae*, identificação dos FRs, CDRs, cadeias leves e pesadas. Em B, *docking* molecular do anti-*M.leprae* com o peptídeo PGL1-M3. Em C, *docking* molecular do antígeno PGL1-M3R com o anti-*M.leprae*. LC (cadeia leve); HC (cadeia pesada); FR (regiões *framework*); CDR (sítios determinantes de complementariedade).

5. DISCUSSÃO

A hanseníase ainda está entre as doenças negligenciadas com forte impacto epidemiológico e, mesmo após a diminuição dos novos casos e queda nas taxas de prevalência da doença, ainda é considerada um grave problema de saúde pública (GILLINI, et al., 2017). Classicamente, a doença apresenta dificuldades na classificação das formas clínicas associados a controvérsias quanto a detecção clínica e laboratorial que dificultam o diagnóstico preciso e eficaz e, por consequência, afetam o tratamento desses pacientes (RIDLEY; JOPLIN, 1966; MARGARIDO; RIVITTI, 2009).

Frente a esta problemática, o surgimento de novas tecnologias e plataformas de diagnóstico tem ajudado na detecção precoce da doença, além do monitoramento dos contatos e de marcadores que sejam capazes de prever as reações hansênicas (LIMA, 2015). Assim, é necessário estudar e validar antígenos específicos para o *M. leprae* que funcionem como estratégias de diagnóstico.

Nesse cenário, os peptídeos miméticos apresentam uma relevância e potencial consideráveis, visto que podem atuar em diversas plataformas de detecção, além de garantirem grande especificidade e sensibilidade, já que simulam a ação de componentes naturais do patógeno por apenas um epítipo específico (GOULART et al., 2010). Para além, esses mesmos peptídeos podem ser produzidos em larga escala barateando o custo dos métodos de diagnóstico da hanseníase, processo já relatado em outras doenças como a Tuberculose, por exemplo (SUNDELL; IVARSSON, 2014; FENG et al., 2014).

A literatura apresenta a importância da detecção de classes de anticorpos IgG e IgM no soro dos e IgA na saliva como estratégia complementar no diagnóstico (NAGAO-DIAS et al. 2007; CABRAL, et al., 2013). Assim, a estratégia do nosso trabalho consistiu em validar o uso de peptídeos miméticos no imunodiagnóstico, com pioneirismo, em uma região hiperendêmica na detecção dessas classes de anticorpos circulantes.

Para o MPML14 foi possível determinar sensibilidade de 68% considerando todas as formas clínicas e especificidade de 100%. Os índices de positividade mostraram que o peptídeo foi bastante eficaz na detecção das formas paucibacilares (53,3% em TT). Por isso, esse resultado é bastante promissor, uma vez que estas formas clínicas apresentam dificuldades para o diagnóstico por apresentarem taxas de anticorpos circulantes menores que nas formas multibacilares (MARTINS et al., 2012). Quando comparado os índices de positividade encontrados no Maranhão com uma área endêmica, é possível notar maiores taxas de casos positivos em todas as formas clínicas – exceto nos BB – bem como nos contatos domiciliares. Esse fato é explicado pelo comportamento de populações hiperendêmicas produzirem maiores taxas de anticorpos contra o patógeno, uma vez que estão mais expostas ao mesmo (MATOS et al., 1999; QUEIROZ, 2012). Além de apresentarem a possibilidade de contato maior e prolongado com pacientes ou pessoas que apresentam e transmitem o bacilo sem necessariamente manifestar reações e sinais da doença (FRADE et al., 2017).

No caso dos pacientes do grupo BB a positividade reduzida pode ser explicada pela instabilidade desta forma clínica, que pode evoluir para a forma mais grave ou regredir para o polo tuberculóide até a cura e controle natural do patógeno pelo organismo (RIDLEY; JOPLIN, 1966). Como observado por diversos autores, há uma plasticidade elevada das respostas celulares e humorais neste grupo, tendo casos de pacientes extremamente responsivos até não responsivos (QUEIROZ, 2012). Na análise dos casos destes pacientes, em particular, notamos muitas características peculiares e com grande flutuação, como o número de lesões, presença ou não de quadros reacionais e grau de incapacidade que variam abruptamente, o que constituem um sério problema na classificação correta da doença.

A estratificação do grupo por cidades demonstrou que São Luís e Imperatriz apresentaram uma detecção de 100% para os casos virchovianos, e todos os locais estudados tiveram taxas que variaram de 23 a 43% no índice de positividade dos contatos domiciliares. Na triagem das amostras, buscamos selecionar homoganeamente, contatos domiciliares que apresentam casos índices tanto pauci quanto multibacilares, pois foi descrito por Martins e colaboradores (2012) que os títulos de anticorpos nos contatos multibacilares variam de acordo com a classificação do caso índice. Em alguns casos, esses contatos, já apresentavam lesões e índices de ELISA para o PGL1 nativo positivos e Mitsuda negativo ou no limiar entre o que seria classificado ou não como um

doente. Por isso, acreditamos que é possível que existam casos de contatos que estão evoluindo para aparecimento de sinais clínicos da doença. Esses dados, por sua vez, reforçam ainda mais a importância de testes simples, porém eficazes para a detecção precoce e mesmo nas fases iniciais do contato com o bacilo.

Nos ensaios para dosagem de IgA utilizando o peptídeo, foi possível notar uma diferença visível na titulação de anticorpos entre os indivíduos suspeitos e o grupo de controle endêmico, mesmo com um tamanho amostral ainda muito pequeno e heterogêneo. Este fato demonstra que nestes casos o MPML14 também pode ser utilizado com um biomarcador na saliva, corroborando com estudos que apontam para o potencial de imunodiagnóstico por meio de saliva (NAGAO-DIAS et al., 2007).

O segundo peptídeo testado, assim como o MPML14, apresentou especificidade de 100% para todas as formas clínicas e uma sensibilidade ainda maior que o primeiro, sendo 89,26%. Quanto a positividade, determinamos um percentual ainda maior para as formas clínicas e contatos que no MPML14, tanto no grupo de pacientes e contatos domiciliares sendo considerados de maneira geral ou estratificado por cidades. Repetindo o mesmo comportamento do peptídeo anterior, o percentual de positividade para os contatos também foi bastante elevado (73,0%). Meima e colaboradores (2004), também reafirmam que em áreas hiperendêmicas essas taxas podem aumentar consideravelmente, variando de 6 a 8 vezes mais que o esperado.

No caso de contatos domiciliares, estudos de Pinho e colaboradores (2015) mostram que uma grande parcela da população maranhense não apresenta sinais da vacina BCG, fator que pode ser considerado como um dos pontos que contribuem com o aumento dos índices de positividade encontrados no estado. Além disso, a taxa elevada de positividade do grupo seja resultado de um número subestimado de infectados subclínicamente que estejam classificados somente como contatos domiciliares como relatado por Hacker e colaboradores (2012) e Martinez e colaboradores (2017). O grupo controle endêmico que teve índices baixíssimos de reatividade o que nos permite afirmar que o comportamento sorológico encontrado é realmente verdadeiro.

Para além, estudos no Maranhão descrevem o perfil desse grupo de risco, apontando deficiências e dificuldades na sua classificação e acompanhamento (PEIXOTO et al., 2011; PINHO et al., 2015). Dessa forma, muitos contatos, na verdade,

já sejam pacientes e estejam num processo de maturação da doença e, isso perpassa por uma estratégia de detecção que tenha sido ineficiente nesses indivíduos.

O PGL1-M3R, que é uma versão reduzida do peptídeo PGL1-M3, foi construído nesse formato justamente para avaliar se o tamanho do peptídeo poderia interferir na reatividade do mesmo. Nesse sentido, observou-se que a positividade foi bem semelhante ao peptídeo original, mesmo que relativamente inferior. Esse fato indica que, biologicamente, o comportamento desses peptídeos é bastante parecido, apesar que a predição tridimensional revela diferenças espaciais importantes, que não interferiram de forma significativa na estabilidade na molécula e no reconhecimento da mesma por anticorpos.

No caso dos dois peptídeos PGL1-M3 e PGL1-M3R está evidente um caráter hidrofóbico eminente, que confirma a possibilidade de sequências proteicas mimetizarem antígenos lipídicos. Essa mesma característica foi relatada para um peptídeo mimético do antígeno AMA1 de *Plasmodium falciparum*, que também possui um sulco hidrofóbico (ALAM, 2014).

Os altos índices de positividade para os três peptídeos reforçam que existe uma importante interação entre antígeno - anticorpo, confirmada pelos resultados *in silico*, demonstrando que anticorpos anti-*M. leprae* reconhecem esses peptídeos em regiões antigênicas e, portanto, estes são considerados epítomos miméticos a antígenos naturais do *M. leprae*.

Essa alta positividade para os três peptídeos na forma Tuberculóide, contrasta com os resultados de Baciloscopia e PCR de *swab bucal*, o que justifica a pouca concordância entre os testes. Esse achado é muito valioso, uma vez que os peptídeos estudados nesse trabalho acoplados a plataforma de ELISA são mais promissores que as ferramentas já disponíveis para o diagnóstico da hanseníase. Quando comparamos os resultados do ELISA com PGL1 nativo e os dois peptídeos miméticos fica evidente as diferenças de positividade encontrada, especialmente nas formas paucibacilares. Essas flutuações no perfil de soropositividade de uma população possuem uma forte relação com o *cluster* de endemicidade a que está região é inserida. Estudos posteriores na região norte de São Paulo, Papua Nova Guiné, Jhalda, Índia e Malawi já relatavam percentuais variáveis de positividade em populações e comunidades com maiores índices de casos e prevalência da doença (CHARTEJEE et al., 1976; BAUMGART et

al., 1987; FINE et al., 1988; KRISHNAMURTHY, et al., 1989; BRASIL, et al., 1998; BRASIL et al, 2003).

Assim, os peptídeos avaliados apresentam um grande potencial de serem utilizados como antígenos no imunodiagnóstico da hanseníase em área hiperendêmica, apresentando-se com resultados melhores que os antígenos nativos.

6. CONCLUSÃO

- Os peptídeos MPML14, PGL1-M3 e PGL1-M3R podem ser utilizados para detecção de anticorpos IgG e IgM de pacientes com hanseníase em área hiperendêmica;
- Os peptídeos MPML14, PGL1-M3 e PGL1-M3R podem ser utilizados para monitoramento de contatos em área hiperendêmica;
- Anticorpos anti-IgA contra PGL1 e GroEL foram detectados na saliva de indivíduos suspeitos de hanseníase;
- Os peptídeos PGL1-M3 e PGL1-M3R apresentam reatividade semelhante, mesmo com estruturas tridimensionais diferentes;
- O ELISA utilizando esses peptídeos miméticos mostrou-se uma ferramenta mais sensível e específica que os outros testes laboratoriais, como Baciloscopia, ELISA PGL1 nativo e PCR de *swab bucal*.

REFERÊNCIAS

ALAM A. Bioinformatic Identification of Peptidomimetic-Based Inhibitors against Plasmodium falciparum Antigen AMA1. **Malaria Research and Treatment**, n.8, 2014.

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.

ALVES, E. D; FERREIRA, T. L; FERREIRA I. N. **hanseníase: avanços e desafios**. Núcleo de Estudos em Educação e Promoção da Saúde. Universidade de Brasília-UNB, 2014.

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

ASSOCIATION, I. L. The diagnosis and classification of leprosy. **International Journal of Leprosy** v. 70, n. 1, p. 23-31, 2002.

BARBAS, C. F. **Phage Display: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=V7bwAAAAMAAJ>>.

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> >.

BAUMGART, K. et al. Use of phenolic glycolipid-1 for serodiagnosis of leprosy in a high prevalence village in Papua- New Guinea. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.81, p. 1030-2, 1987.

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=S007402762011000500003&nrm=iso>.

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

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, M. D. S. **Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**: SVS, MS Brasília 2008.

BRASIL, M. T. L. R. F. et al. Anti PGL-1 serology and the risk of leprosy in a highly endemic area in the State of São Paulo, Brazil: four-year follow-up. **Rev Bras Epidemiol.**, n. 6 v.3 p.262–71, 2003.

BRASIL, M. T. L. R. F. et al. Aplicação do teste anti-PGL-1 em localidade com alta endemicidade de hanseníase na região norte do estado de São Paulo. **Hansen Int**, n.23, v.2, p.35-48, 1998.

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732-736, 1999.

BRITO K. K. G. Análise epidemiológica da hanseníase em um estado endêmico do nordeste brasileiro. **Rev Gaúcha Enferm.** v.36, p. 24-30, 2015.

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, 2003.

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.

CHATERJEE, B.R. et al. Acid-fast bacillary positiving in asymptomatic individuals in leprosy endemic villages around JHALDA in West Bengal. **Leprosy. Rev.**, v.48, p.119-31, 1976.

CUNHA, A. Z. S. hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico, tratamento e controle. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7, n.2, p.235-242, 2002.

CUNHA, M. H. C. M. Perfil de anticorpos anti-PGL-1 em indivíduos sadios de áreas endêmicas para a hanseníase do Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, n.3, v.3, p. 41-47, 2012.

DHANDAYUTHAPANI, S. et al. Specificity of IgG subclass antibodies in different clinical manifestations of leprosy. **Clin Exp Immunol**, v. 88, n. 2, p. 253-257, 1992.

DUTHIE, M. S. et al. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2011.

FINE, P.E.M. et al. Seroepidemiological studies of leprosy in Northern Malawii, based on an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic glycoconjugate antigen. **Int. J. Leprosy**, v.6, p. 243-54,1988.

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

FOSS, N. T. hanseníase: aspectos clínicos, morfológicos e terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, V. 75, P. 113-119, 1999.

FRADE, M. A. C. nexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. **Plos One**, p.1-12, 2017.

FRANZBLAU, S. G. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* in the BACTEC 460 system. **Antimicrob Agents Chemother**. 33:2115, 1989.

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.

GILLINI, L. et al. Global practices in regard to implementation of preventive measures for leprosy. **Plos one**, p.1-5, 2017.

Global leprosy update, 2013; reducing disease burden. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 89, n. 36, p. 389-400, 2014.

GOMES, C.C.D. et al. **Perfil clinico-epidemiologico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em um centro de referencia na região nordeste do Brasil**. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2005;80(Supl 3):S283-8.

GOULART, I, M, B.; GOULART, L, R. Leprosy : diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Springer**, p. 269–290, 2008.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, pg. 365-375, 2002.

HAN, X. Y.; SILVA, F. J. On the Age of Leprosy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014.

HANSEN, G. H. A. Investigations concerning the etiology of leprosy. *Journal of Leprosy*, v.46, p.257-332, 1974.

HARKER, M. A. et al. Characteristics of leprosy diagnosed through the surveillance of contacts: a comparison with index cases in Rio de Janeiro, 1987–2010. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **107**, n. 1, p.49–54, 2012.

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.

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. 462-471, 2004.

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.

KRISHNAMURTHY, P., R. A. O. et al. Seroepidemiological study of leprosy in a highly endemic population of South India based on Elisa using synthetic PGL-1. **Int. J. Leprosy**, v.59, p.426-31. 1991.

KRUTZIK, S. R. et al. TRL activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Net Med**, v. 11, n. 6, p. 653-660, 2005.

KÜGLER, J. et al. Oligopeptide M13 phage display in pathogen research. **Viruses**, v. 5, n. 10, p. 2531-2545, 2013.

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>.

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>>.

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.

LIMA, M. I. S. **Seleção e caracterização de peptídeos recombinantes do *Mycobacterium leprae* ligantes à IgG por meio da tecnologia de phage display**. Dissertação de mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, 2001.

LOBATO, J. **Antígenos naturais, recombinantes e sintéticos do *Mycobacterium leprae* e implicações diagnósticas na hanseníase**. Tese de doutorado, Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2011, 130p.

MAGALHÃES, M.C.M; ROJAS, L.I. Diferenciação territorial da hanseníase no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Volume 16 - Nº 2 - abr/jun de 2007. Pg 75 – 84, 2007.

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. **Journal Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3154–3159, 2006.

MARTINEZ, A. N. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **Plos one**, 2014.

MARTINEZ, T. S. et al. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clinical Microbiology and and Infection**, v.17, p. 1653-1658, 2011.

MARTINS, A. C. C. et al. Estudo da mucosa nasal de contatos de hanseníase com positividade para o antígeno glicolípido fenólico1. **ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia**, v.27, p. 101-105, 2009.

MARTINS, M. V. S. B. et al. Pathogen-Specific Epitopes as Epidemiological Tools for Defining the Magnitude of *Mycobacterium leprae* Transmission in Areas Endemic for Leprosy. **Plos One**, 2012.

MATOS, H. J. DE et al. Leprosy New Case Detection Trends and the Future Effect of Preventive Interventions in Pará State , Brazil : A Modelling Study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–10, 2016.

MEHRA, V. et al. A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10-kD heat-shock cognate protein. **J Exp Med**. 175:275, 1992.

MEIMA, A. The future incidence of leprosy: a scenario analysis. **Bulletin of the World Health Organisation**. n. 82, p.373–380, 2004.

MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, p. 343-350, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S03650596200800040m=iso>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. hanseníase no Brasil: dados e indicadores epidemiológicos selecionados. Brasília: Ministério da Saúde. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. hanseníase no Brasil: dados e indicadores epidemiológicos selecionados. Brasília: Ministério da Saúde. 2016

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

MOET, F. J. et al. A study of transmission and a trial of chemoprophylaxis in contacts of leprosy patients: design, methodology and recruitment findings of COLEP. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 376-388, 2004.

MOET, F. J.; PAHAN, D.; SCHURING, R.P.; OSKAM, L.; RICHARDUS, J. H. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. **J Infect Dis**. 193:346, 2006.

MOURA SAB, MEDEIROS AMC, COSTA FRH, MORAES PHD, OLIVEIRA FILHO SA. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**. 2007;7(2):187-94.

MOURA, R. S. **Avaliação de diferentes métodos para a classificação de pacientes e de carreadores de antígenos empregados na sorologia de hanseníase**. 2014. Tese (Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública) – Universidade Federal de Goiás- UFG.

MOURA, R. S. **Otimização e produção do teste rápido para controle da hanseníase (ML Flow)**. 2011. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás- UFG. 121p.

NAGAO-DIAS, A. T. et al. Salivary anti-PGL and IgA titers and sérum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. **Baz J Infect Dis**, v. 11, n. 2, p. 215-219, 2007.

NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenge. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1. p. 90-98, 2015.

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, 2010.

OLIVEIRA, J. D. D. **Identificação e caracterização de peptídeos miméticos dos antígenos de *Mycobacterium leprae* por plahge display**. Tese de doutorado, Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2007, 103p.

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 Bra Med Trop**, v. 41, n. 2, p. 27-33, 2008.

PANNIKAR, V. Enhanced global strategy for further reducing the disease burden due to leprosy: 2011-2015. **Lepr Rev**, v. 80, n.4, p. 353-354, 2009.

PEIXOTO, B. K. S. et al. Epidemiological aspects of leprosy contacts in the in the municipality of São Luís-Ma. **Hansen Int**, v.36, n.1, p.23-30, 2011.

PENNA, G.; PEREIRA, G.; MOREIRA, M. Guia Para o Controle da hanseníase- Cadernos da Atenção Básica nº 10. **Ministério da Saúde, Brasília**, 2002.

PINHO, J. D. **Detecção molecular de *Mycobacterium leprae* em contatos de pacientes com hanseníase em região hiperendêmica no Brasil**. Dissertação de mestrado, Pós graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 2012, 72p.

PINHO, J. D. et al. Presence of *Mycobacterium leprae* DNA and PGL-1 antigen in household contacts of leprosy patients from a hyperendemic area in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, n.14, v.4, p.14479-14487, 2015.

QUEIROZ, M. F. A. **Soroprevalência de testes rápidos (MLFLOW) em casos de hanseníase e contatos intradomiciliares em municípios endêmicos do Pará**. Dissertação de Mestrado, Pós graduação em doenças tropicais, Universidade Federal do Pará, 2012.

RAKONJAC, J. Filamentous Bacteriophages: Biology and Applications. In: (Ed.). **eLS**: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.

REES, R. J.; VALENTINE, R. C.; WONG, P. C. Application of quantitative electronmicroscopy to the study of *Mycobacterium leprae* murium and *M. leprae*. **J Gen Microbiol**. 22:443, 1960.

RIDLEY, D. S.; JOB, C. K. The pathology of leprosy. In: Hastings, R.C. Leprosy. (Medicine in the Tropics Series). Ed. Churchill Livingstone Inc. New York, p.100, 1985.

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.

RIVOIRE, B. L. et al. he challenge of producing skin test antigens with minimal resources suitable for human application against a neglected tropical disease; Leprosy. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 1-11, 2014.

ROTBURG, 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.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**, 2006.

SHEPARD, C. S. C. Multiplication of "*Mycobacterium leprae*" in the foot-pad of the mouse. **Int j lepr**. 30:291, 1962.

SHEPARD, C. S. C.; MCRAE, D. H. A method for counting acid-fast bacteria. **Int Journal Lepr Other Micobact Dis**, V. 36, N. 78, 1968.

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 USA**, v. 96, n. 17, p. 9857- 62, Aug 17, 1999.

SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Regulation of cytokine patterns in Leprosya. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 730, n. 1, p. 42-52, 1994.

STORRS, E. The nine-band armadillo: a model for leprosy and other biomedical research. **Int Journal Leprosy Other Micobact Dis**, v. 39, p.703-714, 1971.

VERHAGEN, C. E. et al. Type 1 and type 2like lesional skin-derived *Mycobacterium leprae* – responsive T cell clones are characterized by coexpression of IFN- γ /TNF- α and IL-4/IL-5/IL-13, respectively. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 2380-2387, 1998.

WHO Global leprosy update, 2014: need for early case detection. **Wkly Epidemiol Rec**, v.90, n. 36, p. 461-476, 2015.

WIKER, H. G.; TOMAZELA, G. G.; DE SOUZA, G. A. A quantitative view on *Mycobacterium leprae* antigens by proteomics. **J Proteomics**, 2011.

World Health Organization. Summary of global update on preventive chemotherapy implementation in 2015. **Weekly Epidemiol Rec**. n.91, v.39, p.441–60, 2016.

YAMAKURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, 1991.

YARAT, A. et al. Salivary thromboplastic activity in diabetics and healthy controls. **Clin Oral Investig**, Berlin, v. 8, n. 1, p.36-39, Mar. 2004.

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.

YOUNG, R. A. et al. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, V. 85, 1988.

YOUNG, R. A. Stress proteins and immunology. **Rev Immunol**, v. 8, 1990.