



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

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DOS ANTÍGENOS DE
Mycobacterium leprae POR PHAGE DISPLAY**

Aluna: Jaqueline Das Dores Dias Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Co-orientador: Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

**UBERLÂNDIA - MG
2007**



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

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DOS ANTÍGENOS DE
Mycobacterium leprae POR PHAGE DISPLAY**

Aluna: Jaqueline Das Dores Dias Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Co-orientador: Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

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

UBERLÂNDIA-MG

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

O48i Oliveira, Jaqueline das Dores Dias, 1976-
Identificação e caracterização de peptídeos miméticos dos antígenos de *Mycobacterium leprae* por phage display / Jaqueline das Dores Dias Oliveira. - 2007.
102 f. : il.

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

1. Hanseníase - Teses. 2. Peptídios - Teses. I. Goulart, Luiz Ricardo.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 616.982.21



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

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DOS ANTÍGENOS DE *Mycobacterium leprae* POR PHAGE DISPLAY

Aluna: Jaqueline Das Dores Dias Oliveira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

Examinadores: **Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart** (Co-orientadora)
Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido
Profa. Dra. Norma Tiraboschi Foss
Profa. Dra. Thereza Liberman Kipnis
Prof. Dr. Foued Salmen Espindola (1^o Suplente)
Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro (2^o Suplente)

Data da Defesa: 22/02/2007

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

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart
(Orientador)

*DEDICO ESTE TRABALHO A
TODOS QUE AMO, EM ESPECIAL
AO MEU MARIDO W. JUNIOR E
AO MEU FILHO CAUÊ!*

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a **Deus**, por tudo de bom que tem realizado em minha vida. Me concedendo saúde, bons amigos e uma família maravilhosa.
- À minha família: meu **pai**; minha **mãe**; meus **irmãos** e **irmãs**; **sobrinhos** e **sobrinhas**; minha **sogra** e meu **sogro** pelo apoio incondicional em todos os momentos necessários.
- Ao meu marido **Waldesse Jr.**, pelas “discussões” científicas e também pela ajuda e compreensão nesse importante momento da minha vida.
- Ao meu filho **Cauê**, que sempre me agraciava com seu sorriso nos momentos de estresse e preocupação com a finalização da tese.
- Ao Prof. **Luiz Ricardo** pela amizade nesses 10 anos de pesquisa e muito aprendizado, pelo otimismo e por sempre acreditar em seus orientandos e pela torcida que todos tenham sucesso. Estamos terminando mais uma jornada!
- À Professora **Isabela Goulart** pela co-orientação e sugestões nesta tese.
- Ao Dr. **Marcelo Brígido**, Dra **Norma Foss** e Dra **Thereza Kipnis**, por aceitarem gentilmente a participar e contribuir neste trabalho como membros da banca examinadora.
- Ao Prof. Dr. **Foued** e Profa. Dra. **Ana Graci**, por aceitarem participar como membros suplentes da banca examinadora.
- Ao grande amigo **Fausto**, pela ajuda incondicional neste trabalho, pelas hospedagens, transporte e paciência com minha ansiedade. Conte comigo sempre, pois contarei com você!
- À amizade e presteza da amiga **Ju Franco**, pela sua enorme, grande e útil ajuda para que esse trabalho fosse executado. Conto com sua amizade hoje e sempre.
- Aos **amigos do laboratório** pelas amizades formadas nesses 10 anos de convívio, muitos já saíram e muitos chegaram, obrigada pelos momentos prazerosos vividos dentro do ambiente laboratório e também fora dele. Nossa vida de pesquisadores foi carimbada neste local e vai ficar marcado pra sempre.
- Prof. Dr. **J. Júnior** pela amizade e sugestões dadas ao trabalho, independente do dia e da hora.
- Aos casais amigos e compadres: **Gilvan** e **Fernanda**, **Marcus** e **Mônica** pelo apoio e incentivo
- Aos “velhos” amigos formados no laboratório: **Warley**, **Wânia**, **Ju São Julião**, **Machaim**, **Walter**, **Fred**, **Lígia**, **Geovana**, **Cícero**, **Elis**, **Jú Meola**, **Nádia**, **Ana**

Cândida, Weruska, Renata, Alexandra, Dri, Guilherme, Andréia, Paula Cristina, Paula Souza, Karina, Ana Paula Freschi, Carlos, Rone.

- E aos novos, que estão iniciando a caminhada ou que tivemos pouco convívio de laboratório: **Taíse, Carla Saba, Rafael, Tati, Flávia, Sílvia, Érika, Luciano Caetano, Thiago, Márcia, Janaína e Ana Paula Carneiro.**

- Ao **Gerson** pela enorme ajuda, pelo apoio e compreensão sempre prestados.

- À **Marlene** pela pessoa maravilhosa e sempre muito atenciosa.

- A todos os **professores do INGEB e da UFU** que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

- Ao **grupo do NEST** (Núcleo de Estudos da Saúde do Tocantins), em especial ao Prof. **Neilton, Vilian, Ana Paula, Núbia, Myrlena e Renata** pela compreensão e apoio no momento final e crucial deste trabalho.

- Ao pró-reitor de pesquisa e pós-graduação da **UFT** (Universidade Federal do Tocantins), **Prof. Dr. Márcio A. Silveira**, pelo estímulo, credibilidade e incentivo.

- À **CAPES e CNPq** pelos apoios financeiros dados desde a minha graduação.

- A **todos** que direta ou indiretamente auxiliaram neste trabalho.

- E por último, porém não menos importante, aos **pacientes de hanseníase**, que mesmo em momentos difíceis, aceitaram contribuir para o progresso da ciência.

MEU MUITO OBRIGADA!!!

*"Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã,
portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e,
principalmente, viver!"*

Dalai Lama

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE AMINOÁCIDOS	ix
LISTA DE TABELAS	x
APRESENTAÇÃO	12
CAPÍTULO I	
Identificação e Caracterização de Peptídeos Miméticos de Antígenos de <i>Mycobacterium leprae</i> Ligantes à Imunoglobulina M.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	18
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	32
DISCUSSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO I.1.....	55
ANEXO I.2.....	57
ANEXO I.3.....	66
ANEXO I.4.....	78
CAPÍTULO II	
Identificação e Caracterização de Mimotopos do Glicolípido Fenólico de <i>Mycobacterium leprae</i>	83
RESUMO.....	84
ABSTRACT.....	85
INTRODUÇÃO.....	86
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	87
RESULTADOS.....	92
DISCUSSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXO II.1.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
aa	Aminoácido
BSA	Soroalbumina bovina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
OD	Densidade óptica
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
g	Grama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	Isopropil α-D-tiogalactosidase
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	<i>Luria Broth</i>
M	Molar
ng	Nanogramas
pb	Pares de bases
TBS	Tampão Tris-HCl e Sódio
TBST	Tampão Tris-HCl e Sódio com Tween 20
PEG	Polietileno Glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D- C7C	Biblioteca contendo 7 peptídeos randômicos
PIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
RELIC	<i>Receptor Ligands Contents</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
pfu	Unidades formadoras de colônias
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α-D-galactosideo

LISTA DE AMINOÁCIDOS

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

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1: Grupo de pacientes com suas respectivas formas clínicas (FC), Classificação Operacional (CO), testes ML-Flow, ELISA, Mitsuda e Índice Baciloscópico (IB). V – Hanseníase Virchoviana; T – Hanseníase Tuberculóide e CI – Contatos Intradomiciliares.

Tabela 2. Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais IgM com eluição em tampão glicina e antígeno específico. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade (título de saída por 90 µL). **Negrito:** fagos para sequenciamento.

Tabela 3: Sequências dos heptapeptídeos imunorreativos contra IgM total de pacientes com hanseníase nas formas clínicas polares e estáveis (V- Virchoviana e T- Tuberculóide), selecionados a partir da eluição com tampão glicina (59 V e 43 T), suas freqüências e índices de antigenicidade.

Tabela 4: Sequências dos heptapeptídeos imunorreativos contra IgM total de pacientes com hanseníase nas formas clínicas polares e estáveis (V- Virchoviana e T- Tuberculóide), selecionados a partir da eluição com Mitsudina (38 V e 28 T), suas freqüências e índices de antigenicidade.

Tabela 5: Agrupamento de sequências consenso entre os heptapeptídeos do grupo T eluídos com antígeno específico de *M. leprae* (Mitsudina) e com tampão Glicina.

Tabela 6: Teste de redução de colônias indicado pelo número de colônias (pfu) formadas a partir da mistura de soro dos grupos contatos intradomiciliares (CI), tuberculóide (T) e virchoviano (V) com quatro diferentes fagótopos e a infecção em *E. coli* ER2738. Como controle do teste, bacterias ER2738 foram infectadas somente com os referidos fagos. A contagem foi realizada pela diluição de fagos a 10^{-8} . A porcentagem de redução das colônias encontra-se em parênteses.

Tabela 7: Freqüência dos aminoácidos para os clones sequenciados a partir do *biopanning* com Tampão Glicina e com Mitsudina. Em azul estão os aminoácidos com maior freqüência dentre todos.

Tabela 8: Alinhamento das proteínas anotadas com mais de três identidades, evidenciando (sublinhado) as possíveis regiões de epítomos das mesmas. Em azul estão os mimotopos gerados do grupo T, em vermelho estão os mimotopos gerados pelo grupo V, sejam eles na sua sequência direta ou reversa e em rosa estão os aminoácidos com mesma propriedade química. Ptn1 a 8 = Proteína 1 a 8.

Capítulo II

Tabela 1. Seleção dos fagos com peptídeos ligantes ao anticorpo monoclonal anti-PGL-1. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade (título de saída por 90 μ L).

Tabela 2: Sequências dos heptapeptídeos imunorreativos contra o anticorpo monoclonal anti-PGL-1 selecionados por *Phage Display*, e suas respectivas frequências e índices de antigenicidade.

Tabela 3: Sequência consenso obtida para os heptapeptídeos imunorreativos contra o anticorpo monoclonal anti-PGL-1 selecionados por *Phage Display*.

Tabela 4: Relação dos grupos funcionais protéicos que apresentaram identidade com os mimotopos imunorreativos contra o anticorpo monoclonal anti-PGL-1. selecionados por *Phage Display*.

Tabela 5: Sororreatividade de IgM Humana de pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares para o Fagótopo 1 (HWMLPED) e o PGL-1 sintético.

APRESENTAÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório com predileção por nervos periféricos e células da epiderme. Esta doença ainda constitui um problema de saúde pública no Brasil, que ocupa o 2º lugar do mundo em número de casos, sendo que a meta da Organização Mundial de Saúde de se ter a taxa de prevalência menor que um caso em cada 10 mil habitantes ainda não foi atingida.

A hanseníase apresenta um espectro clínico bem variado, com duas formas polares e estáveis como hanseníase virchoviana e hanseníase tuberculóide e ainda formas intermediárias caracterizadas como dimorfas, que podem evoluir para um dos extremos ou ainda permanecer como dimorfa. A cura espontânea também pode ocorrer, tudo isso dependendo da relação que é mantida entre patógeno e hospedeiro.

As diferenças clínicas, patológicas e imunológicas da hanseníase são bem contrastantes e estudos realizados com os pólos estáveis e bem caracterizados buscam auxiliar o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença.

A hanseníase virchoviana é caracterizada como multibacilar por apresentar uma alta carga de bacilos nas lesões e os pacientes que a apresentam sofrem uma anergia em resposta mediada por células e são o principal foco de disseminação da doença antes de iniciar o tratamento poliquimioterápico. Pacientes virchovianos apresentam resposta humoral tipo T-2 auxiliar (Th2), onde citocinas auxiliares, supressoras da atividade macrófaga, são eficientes na produção de anticorpos, principalmente IgM anti-PGL-1 (Gicolípido Fenólico-1) e anti-LAM (lipoarabinomana), porém são ineficazes em proteger o indivíduo contra a proliferação do bacilo.

O indivíduo com hanseníase tuberculóide apresenta uma resposta imune mediada por células, havendo liberação de citocinas da população de células T-1 auxiliares (Th1), com alta produção de interferon-gama (IFN- γ) pelas células exterminadoras naturais (NK) e células T auxiliares do tipo CD4, e assim IFN- γ ativa os macrófagos, principal célula apresentadora de antígenos, capaz de

processar e apresentar as frações antigênicas de *M. leprae* em sua superfície para reconhecimento das células T. A resposta imune mediada por células é bastante eficiente na destruição do bacilo e os pacientes tuberculóides e sua forma dimorfa são paucibacilares, com carga bacilar baixa.

A classificação da resposta imune em tipo Th1 ou Th2 é baseada, principalmente, na produção de IFN- γ e de interleucina-4 (IL-4) respectivamente. Vários estudos têm sido feitos no sentido de caracterizar o padrão de citocinas ativadoras e supressoras da atividade macrofágica que são produzidas em cada forma clínica da doença frente a vários tipos de antígenos.

O genoma do *Mycobacterium leprae* e, também, de outras micobactérias foi recentemente elucidado e têm permitido várias análises por bioinformática e também por genômica comparativa. Ambas na tentativa de se encontrar antígenos que são específicos do *M. leprae* e que disparam a resposta celular em todas as formas clínicas da doença, no sentido de se ter uma ferramenta diagnóstica para detecção de casos subclínicos ou até mesmo obter subunidades vacinais para imunização da população no combate à hanseníase.

Diversos antígenos já foram caracterizados e muitos ainda estão por ser elucidados. Entre os que se encontram analisados estão: proteínas reguladoras, de membrana, chaperonas, de transporte, várias com função desconhecida e outras hipotéticas. Não foi encontrado na literatura, até o momento um estudo proteômico em hanseníase utilizando anticorpos policlonais do tipo IgM.

Neste trabalho procurou-se identificar e caracterizar peptídeos miméticos de antígenos de *M. leprae*, ligantes de IgM circulantes, nas formas clínicas polares (Capítulo 1) por *Phage Display*. Contudo, como parte da resposta imune ao *M. leprae* está associada com antígenos não protéicos, fez-se também uma seleção contra o anticorpo monoclonal anti-PGL-1 com a finalidade de identificar peptídeos miméticos ligantes de imunoglobulina M (Capítulo 2). Esta investigação permitiu identificar prováveis alvos biológicos tanto para fins diagnósticos quanto para estudos imunoterapêuticos.

A tecnologia de *phage display* tem apresentado um grande impacto na imunologia, biologia celular, descoberta de medicamentos e de fármacos em geral. Esta técnica permite a obtenção de diferentes peptídeos ou proteínas

imunogênicas, e tem sido utilizada para revelar os diversos tipos de interações que existem entre antígeno–anticorpo, caracterizando epítomos ou determinantes antigênicos bem como parátomos, que são regiões do anticorpo para reconhecimento do antígeno.

A caracterização antigênica da hanseníase frente ao *M. leprae*, se faz necessária para melhor caracterizar o perfil de resposta imune dos pacientes que são acometidos pela doença, uma vez que existem falhas a serem desvendadas sobre a biologia celular associada com a infecção causada pela micobactéria, e a inabilidade de cultivá-la em laboratório dificulta ainda mais os estudos com este organismo.

CAPÍTULO I

Identificação e Caracterização de Peptídeos Miméticos de Antígenos de *Mycobacterium leprae* Ligantes à Imunoglobulina M

RESUMO

A hanseníase apresenta um espectro clínico que varia de uma forte resposta imune mediada por células e controle do crescimento do bacilo *Mycobacterium leprae* no pólo tuberculóide (T), a uma anergia em resposta celular, com alta carga bacteriana, no pólo virchoviano (V). A caracterização do perfil antigênico do bacilo nas formas clínicas se faz necessária para que novos peptídeos recombinantes, mimotopos de antígenos de *M. leprae*, sejam avaliados quanto ao seu potencial imunogênico, para que se tenha um melhor entendimento dos mecanismos de evolução da doença, e para permitir o aprimoramento do diagnóstico, prognóstico e terapêutica. Mimotopos de antígenos de *M. leprae* foram selecionados a partir de uma biblioteca conformacional de heptapeptídeos randômicos expressos em fusão com proteína pIII de fagos M13, utilizando como alvo ligante IgM total purificada de pacientes portadores de hanseníase de ambos os pólos, tuberculóide e virchoviano, e de contatos intradomiciliares sadios. Os peptídeos recombinantes foram selecionados por eluição em tampão glicina (inespecífico) e por eluição com mitsudina (específico). Todos os clones, após análises de bioinformática, foram validados por ensaios imunoenzimáticos e alguns por ensaios de redução de colônias. Na eluição com glicina, o pólo tuberculóide apresentou 24 fagótopos distintos, enquanto que o virchoviano apresentou 14. Já na eluição com mitsudina, foram obtidos apenas 4 fagótopos para pólo virchoviano e 8 para o pólo tuberculóide. Os dois mimotopos mais freqüentes, em ambas as formas clínicas e para as duas eluições foram coincidentes, sendo que os peptídeos LFPAMHQ e VERHPST foram os mais freqüentes no pólo virchoviano e os peptídeos KNPTTGT e ETHPTTR os mais freqüentes no pólo tuberculóide. Os três primeiros peptídeos, dos quatro acima citados, tiveram redução de colônias mais acentuada com soro de pacientes V, e o mimotopo ETHPTTR foi o que apresentou a maior redução com soro de pacientes T. O potencial imunogênico destes mimotopos pode ser útil no desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas para o controle da hanseníase.

Palavras-chave: Imunoglobulina M, peptídeos miméticos, antígenos, *M. leprae*, *Phage display*.

ABSTRACT

Leprosy presents a clinical spectrum that spans from a strong cellular mediated immunity and bacilli growth control of *Mycobacterium leprae* at the tuberculoid pole to a poor T cell immunity with extensive bacterial load at the lepromatous pole. The antigenic profile characterization in both clinical forms is a necessary step for discover and evaluation of recombinant peptides that are mimotopes of *M. leprae* antigens, which may present immunogenic potential, in order to obtain a better understanding of the disease evolution, and allowing the improvement of diagnosis, prognosis and therapeutics. Mimotopes of *M. leprae* antigens were selected from a random heptapeptide conformational library expressed in fusion with the pIII protein of the M13 phage, using as the ligand target the total purified IgM from leprosy patients of clinical forms, tuberculoid (TT) and lepromatous (LL), and a healthy control population. Recombinant peptides were selected by glycine elution (unspecific) and by mitsudin elution (specific). All clones, after bioinformatic analyses, were validated by immunoenzymatic and colony reduction assays. For the glycine selection, the TT pole presented 24 distinct fagotypes, while the LL pole presented only 14 fagotypes. For the mitsudin selection, only 4 fagotypes were obtained in the LL pole, and 8 fagotypes in the TT pole. The two most frequent mimotopes, in both TT and LL poles and in both elution protocols, were coincident. The peptides LFPAMHQ and VERHPST were more frequent in the LL pole, and the peptides KNPTTGT and ETHPTTR were more frequent in the TT pole. The three cited first mimotopes had an accentuated plaque reduction with incubation of sera from LL patients; however, the mimotope ETHPTTR presented the highest reduction with sera from TT patients. The immunogenic potential of these mimotopes may be useful in the development of new diagnostic and therapeutic strategies for leprosy control in the future.

Key-words: Immunoglobulin M, mimotopes, antigens, *M. leprae*, Phage display.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório, com predileção pelas células de Schwann e pelo sistema mononuclear fagocitário. É um bacilo álcool-ácido resistente de multiplicação lenta e não cultivável *in vitro*. Considera-se o homem como o único reservatório natural do bacilo, apesar do relato de animais selvagens naturalmente infectados (tatus, chimpanzés e macacos) e desenvolvendo manifestações semelhantes às da hanseníase virchoviana humana (3, 18, 33).

Em 1966, Ridley e Jopling (28) propuseram um espectro clínico da hanseníase, caracterizando-a em duas formas polares e estáveis, com diferenças evolutivas, clínicas e imunológicas: uma tuberculóide (T) e outra virchoviana (V), e em formas intermediárias como dimorfa tuberculóide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa virchoviana (DV).

A hanseníase caracterizada como indeterminada (HI) é um estágio precoce e instável da doença e, dependendo da resistência do hospedeiro, pode migrar para uma das formas definitivas ou pode até se curar espontaneamente (2).

A capacidade de resposta imunológica pode ser avaliada através da reação de Mitsuda (inoculação intradérmica de suspensão de bacilos mortos pelo calor), que resulta, após 3 ou 4 semanas, em reação positiva com formação de pápula infiltrada, (forma clínica T) ou reação negativa com ausência de alteração cutânea, (forma clínica V). O resultado desta reação associado à carga bacilar (baciloscopia) podem assinalar a potencialidade de resposta imune do paciente (8, 14).

A avaliação da resposta humoral em pacientes V e DV evidencia altos títulos de anticorpos específicos contra o glicolípido fenólico 1 (PGL1), componente da parede celular do *M. leprae*, refletindo a acentuada carga bacilar nesses pacientes. Em tuberculóides os níveis desse anticorpo apresentam-se semelhantes aos dos controles normais (3, 8, 14).

Apesar da produção aumentada de anticorpos específicos contra o bacilo de Hansen nas formas multibacilares, ela é ineficaz para a eliminação dos

bacilos. A defesa é efetuada pela resposta imunológica celular, capaz de fagocitar e destruir os bacilos, mediada por citocinas e mediadores da oxidação como os reativos intermediários do oxigênio (ROI), e do nitrogênio (RNI) fundamentais na destruição bacilar no interior dos macrófagos (3).

Nas lesões tuberculóides há predominância de células T auxiliares CD4⁺, e citocinas Th1 como interleucina 2 (IL-2), interferon gama (IFN- γ), IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-12. Em contraste, nas lesões virchovianas o predomínio é de células T supressoras, CD8⁺ e citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10. A citocina IL-12 estimula diretamente células NK (*Natural Killer*) que passam a produzir IFN- γ , a qual estimula o macrófago e associada à ação de TNF- α atuam incrementando a ativação macrofágica. As citocinas Th2 juntamente com a citocina TGF- β -1 são supressoras da atividade macrofágica (3, 8; 12, 13).

A classificação atual de células T tipo 1 (Th1) ou tipo 2 (Th2) produzidas em resposta ao *M. leprae* é baseada na produção exclusiva ou predominante de IFN- γ ou IL-4, respectivamente. O perfil de secreção restrita de citocinas pode não refletir o complexo papel regulatório das células T *in vivo* (34).

Portanto, dependendo da subpopulação de células T e da atividade macrofágica, haverá predominância de mecanismos de defesa ou de disseminação da doença, expressos clinicamente pelas formas tuberculóide e virchoviana, respectivamente. Na hanseníase V, a produção dos antígenos PGL1 e LAM (lipo arabinomanana) pelo bacilo, no interior do macrófago, favorece o escape à oxidação intramacrofágica, pois estes possuem função supressora da atividade dos macrófagos e favorecem a sua disseminação (8).

Araóz e colaboradores (2) afirmam que a utilidade do teste de Mitsuda é reduzida frente ao resultado negativo em pacientes virchovianos, os quais apresentam a forma mais grave da doença e são caracterizados pela anergia da resposta imune mediada por células. Segundo eles, testes baseados em antígenos protéicos ou peptídicos oferecem maior possibilidade de se identificar pessoas recentemente infectadas ou os casos T e outros pacientes com a doença do tipo dimorfa.

A avaliação da imunogenicidade de 17 proteínas recombinantes em células mononucleares de sangue periférico de 127 brasileiros evidenciou que cinco antígenos (ML0576, ML1989, ML1990, ML2283 e ML2567) induziram de

forma significativa os níveis de IFN- γ em pacientes paucibacilares, pacientes com episódios reacionais e controles sadios, mas não houve indução da citocina na maioria dos pacientes multibacilares, em pacientes com tuberculose ou controles endêmicos. As proteínas identificadas na referida literatura são expressas em relação ao transcriptoma e podem eficientemente ativar as células T de indivíduos expostos ao *M. leprae* (10).

Por outro lado, novos antígenos (ML0405, ML2331 e ML2055), sendo os dois primeiros de função previamente desconhecida e o último uma proteína de membrana, foram identificados por Reece e outros (26), com alta reatividade no soro de pacientes multibacilares V e DV não tratados quando comparados ao soro de controles não endêmicos. Pacientes T e DT não apresentaram reatividade significativa aos mesmos antígenos, no entanto, os autores afirmam que como os pacientes multibacilares representam uma significativa fonte de transmissão, o diagnóstico subclínico e tratamento da doença multibacilar trazem benefícios aos programas de saúde pública (26).

A bioinformática e análise de genômica comparativa foram utilizadas para definir um grupo de 50 potenciais antígenos, sendo que alguns deles parecem ser restritos ao *M. leprae*, classificados como classe I (2). A classe II consiste de genes ortólogos ou parálogos encontrados em outros organismos que não micobactérias, e a classe III correspondem a proteínas que são exportadas ou expostas na superfície da micobactéria. Dentre os 50 possíveis antígenos, 12 tiveram sua imunogenicidade investigada e diversas proteínas das classes II e III reconheceram anticorpos circulantes (2). Duas proteínas da classe II (ML0308 e ML2498), uma proteína hipotética conservada e uma enoil-CoA hidratase, respectivamente, evidenciaram uma imunogenicidade humoral e celular acentuadas, apresentando-se como fortes candidatas para diagnóstico tanto da hanseníase tuberculóide como virchoviana (2).

As proteínas de choque térmico (hsp) ou chaperonas correspondem a um grupo de proteínas altamente conservadas produzidas pelas células eucarióticas e procarióticas em resposta a uma variedade de condições estressantes do meio (27) e são considerados importantes alvos da resposta imune para micobactérias. As proteínas hsp de especial interesse como antígenos são as de 18, 65 e 70 kDa (19; 21, 22).

A identificação e caracterização de antígenos reconhecidos pelas células T são importantes para o desenvolvimento de reagentes diagnósticos específicos e subunidades de vacinas protetoras contra doenças micobacterianas (21).

A técnica de Phage Display tem se apresentado como uma ferramenta muito útil em caracterizações antigênicas e a mesma consiste em um processo seletivo na qual uma biblioteca de peptídeos ou proteínas com as seqüências randomizadas é expressa na superfície da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada resíduo encontra-se no genoma viral. Com isto, é possível a correlação entre cada seqüência da proteína variante e sua respectiva seqüência de DNA, permitindo rápida identificação e caracterização de peptídeos ligantes para uma variedade de moléculas alvo por um processo de seleção *in vitro* chamado *biopanning* (24).

Quanto á imunização contra hanseníase via vacinas, a mesma pode ser do tipo imunoprolifática e imunoterapêutica. A primeira visa restaurar o reconhecimento de antígenos micobacterianos pelas células hospedeiras para promover a resposta do tipo Th1. O objetivo da imunoterapia é inativar os mecanismos que levam à imunopatologia e aumentar os que levam à morte do bacilo. Ainda não existe vacina específica e eficaz para prevenir a hanseníase, no entanto algumas vacinas já foram usadas e exploradas.

As melhores informações sobre vacinação são da Índia, onde vários tipos de vacinas já foram testadas e dois tipos são adotadas: ambas originadas de micobactérias cultiváveis e isoladas de nódulos, uma da variedade ICRC (*Mycobacterium avium* intracelular), originalmente isolada em Mumbai, Índia, e a outra, isolada em New Delhi, também Índia, chamada *Mycobacterium w*. O uso destas vacinas como coadjuvantes no tratamento poliquimioterápico tem sido favorável no sentido de acelerar a regressão clínica, diminuir o tempo de tratamento e promover a positividade no teste de Mitsuda (20).

Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar peptídeos miméticos (mimotopos) funcionais de antígenos do *Mycobacterium leprae* reativos contra IgM total purificada de pacientes com as duas formas clínicas pólo da hanseníase (tuberculóide e virchoviano) por meio de *phage display*.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Pacientes e Controles

Participaram deste estudo 20 pacientes não tratados, sendo 10 com diagnóstico de hanseníase virchoviana (grupo V) e 10 com hanseníase tuberculóide (grupo T), além de 10 contatos intradomiciliares (grupo CI) sadios como grupo controle (Tabela 1). Todos foram atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária com ênfase em Hanseníase (CREDSH), Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU), em suas duas Unidades, Ambulatório Central e Centro de Saúde-Escola (CSE) – Jaraguá. A Tabela 1 apresenta as características clínicas e laboratoriais dos pacientes e contatos intradomiciliares que foram convidados a participar da pesquisa.

Todos os pacientes foram submetidos a um protocolo clínico-laboratorial para o diagnóstico de hanseníase. O diagnóstico histopatológico das biópsias de lesão de pele dos pacientes com hanseníase foi feito segundo a classificação das formas clínicas de Ridley–Jopling. A carga bacilar foi avaliada pela baciloscopia dos esfregaços dérmicos, que são retirados dos lóbulos das orelhas (LD e LE), cotovelos (CD e CE), joelhos (JD e JE) e uma a duas lesões marcadas no diagrama corporal para sua localização (L1 e/ou L2).

O teste intradérmico de Mitsuda foi feito com a finalidade de medir a resposta imune celular do paciente, específica ao *Mycobacterium leprae*. A leitura do teste é feita após quatro semanas, resultando em lesão papulóide infiltrada. Pela Organização Mundial de Saúde (OMS), os resultados do teste de Mitsuda são classificados do seguinte modo: 0-3 mm – negativo ou duvidoso; 4 a 7 mm – positivo fraco; 8 a 10 mm – positivo forte e maior que 10 mm – fortemente positivo.

O teste sorológico pelo ML-Flow (teste do fluxo lateral do *Mycobacterium leprae*) consiste de um teste semiquantitativo realizado em fita (Kit Biomedical Research/Netherlands Leprosy Relief – NLR) aplicado para a detecção do anticorpo anti-PGL-1, específico do *M. leprae*. Sua escala de marcação varia de 0 a 4 cruces, sendo considerados positivos todos os valores

diferentes de 0. A classificação operacional final de pacientes atendidos no CREDSH/HC/UFU considerou que os pacientes com ML-Flow negativo e baciloscopia do esfregaço dérmico negativa eram paucibacilares (PB) e que pacientes com ML-Flow diferente de zero e/ou baciloscopia de esfregaço dérmico positiva eram multibacilares (MB), independente do número de lesões.

Para quantificação dos níveis de anti-PGL-1 foi realizado o método ELISA indireto no Laboratório de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto – USP, sob a coordenação da Dra. Norma T. Foss.

As placas de microtitulação de 96 poços foram incubadas por oito horas com 100 microlitros da solução contendo 250 ng/ml de PGL-1 + BSA, a 4°C. A seguir foram feitas cinco lavagens com PBS-Tween e as placas foram novamente incubadas com 100 microlitros/poço da solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em tampão carbonato-bicarbonato. Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se as lavagens com PBS-Tween e à incubação das placas por 2 horas, a 37°C, com os soros diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (1:50). Novamente os poços foram lavados com PBS-Tween e incubados durante 1 hora a 37°C, com anticorpos anti-IgM humano produzido em cabra e marcados com fosfatase alcalina. Estes anticorpos foram diluídos em PBS contendo 20% de soro de cabra (1:1000). Após novas lavagens com PBS-Tween foi adicionado o substrato 4-nitrophenil-fosfatase-disodium em tampão de talonamina para a enzima conjugada. Seguiu-se o tempo de incubação de 30 minutos para que a reação da enzima pudesse ocorrer e, então, foi adicionado NaOH 3M para bloquear a reação. A leitura foi feita no leitor de ELISA MULTISCAN em 450nm e foi considerada positiva a leitura igual ou superior a 1.

Esta pesquisa foi aprovada pelo parecer N° 099/2003 do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU. Os pacientes que concordaram em participar da pesquisa assinaram um termo de compromisso e estavam conscientes que poderiam desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem que houvesse nenhum prejuízo próprio

Tabela 1: Grupo de pacientes com suas respectivas formas clínicas (FC), Classificação Operacional (CO), testes ML-Flow, ELISA, Mitsuda e Índice Baciloscópico (IB). V – Hanseníase Virchoviana; T – Hanseníase Tuberculóide e CI – Contatos Intradomiciliares.

Grupo	FC	CO	ML-Flow	ELISA	Mitsuda (mm)	IB
V	V	MB	++++	21,5	0	4,3
	V	MB	++++	9,8	0	4,0
	V	MB	++++	9,0	0	5,28
	V	MB	+	19,8	0	3,8
	V	MB	++++	16,8	0	6,0
	V	MB	++++	11,4	0	6,0
	V	MB	++++	21,9	0	5,1
	V	MB	++++	2,5	0	5,8
	V	MB	+++	6,4	0	3,5
	V	MB	++++	2,8	0	5,28
T	T	PB	0	0,3	7	0
	T	PB	0	0,5	6	0
	T	PB	0	1,9	8	0
	T	PB	0	0,3	7	0
	T	PB	0	0,7	12	0
	T	PB	0	0,6	6	0
	T	PB	0	0,7	10	0
	T	PB	0	1,6	7	0
CI sadios	Contato de DD MB		0	0,3	9	0
	Contato de V MB		0	0,2	6	0
	Contato de V MB		0	0,4	5	0
	Contato de DT MB		0	0,3	5	0
	Contato de DT MB		0	0,5	6	0
	Contato de DT PB		0	0,2	5	0
	Contato de DT PB		0	0,3	5	0
	Contato de DT PB		0	0,3	8	0
	Contato de DT PB		0	0,3	6	0
	Contato de T PB		0	0,2	11	0

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular - UFU, utilizando-se soro de sangue periférico dos pacientes com hanseníase e dos contatos intradomiciliares sadios, fazendo um pool das amostras para cada grupo (V, T e CI).

Purificação de Imunoglobulina M (IgM):

A purificação de IgM total para cada grupo, foi realizada em tubos de 1,5 mL utilizando-se 50 µL de uma suspensão salina (pH 7,4) de resina anti-IgM humana - cadeia µ específica (Sigma-Aldrich) com capacidade de ligação de 2mg/ml. Inicialmente a resina foi lavada 4 vezes com 1 mL de TBST 0,1%, sendo

peletizada a cada passo por centrifugação a 4.000 rpm por 1 min. Em seguida 100 µL do pool de soro diluído em 100 µL de TBST 0,1% foram adicionados à resina pré-lavada e incubou-se em temperatura ambiente por 2 horas, misturando ocasionalmente. Após as 2 horas, a resina foi lavada 5 vezes com TBST 0,1 % para remoção de produtos não ligantes, peletizando a resina a cada passo (4000 rpm por 1 min.). As IgMs ligadas à resina foram eluídas com 0,5 mL de Tampão Glicina (0,1 M pH 2,2 1,0 mg/mL BSA) por 10 min em temperatura ambiente e após centrifugação de 4000 rpm por 1 min o sobrenadante foi recuperado e neutralizado com 75 uL de Tris (1,0 M pH 9,1).

A quantificação das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 280 nm e o cálculo da concentração para cada IgM purificada (V, T e CI) foi realizado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de IgM} = \frac{\text{leitura de absorbância a 280 nm}}{11,8}$$

11,8 = Coeficiente de Extinção para IgM a 280 nm

Biopanning Líquido (seleção de fagos)

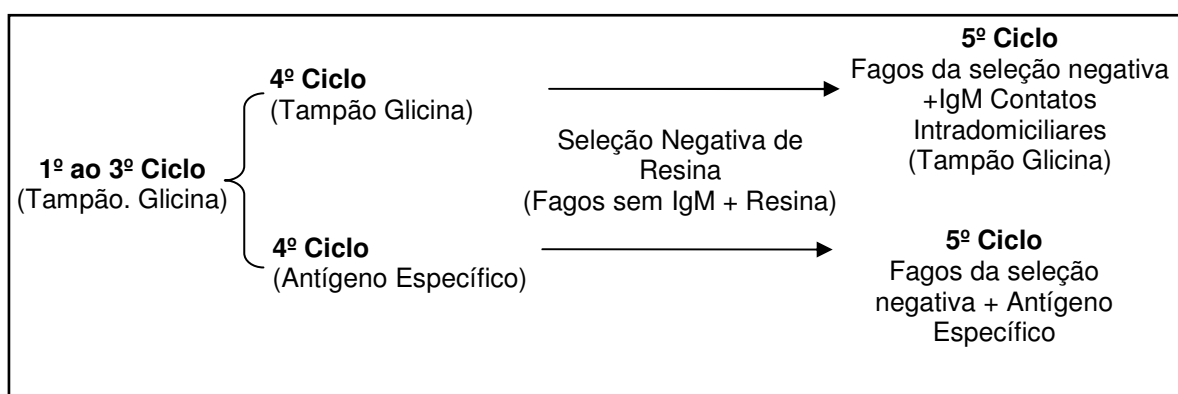
Foi utilizada a biblioteca Ph.D.-C7C (*NEW ENGLAND BioLabs[®] Inc.*) de peptídeos randômicos fusionados à proteína pIII de bacteriófagos filamentosos M13. A biblioteca é composta de 7 aminoácidos randômicos flanqueados por 2 resíduos de cisteína, um de cada lado, seguidos por uma curta seqüência espaçadora Gly-Gly-Gly fusionada à região N-terminal da pIII. Esta biblioteca é do tipo conformacional, gerando uma estrutura secundária devido à posição das cisteínas nas extremidades dos sete aminoácidos.

Foram realizados 5 ciclos de seleção de fagos com anticorpos humanos, IgM total, onde a biblioteca de fagos Ph.D.-C7C foi usada em *biopanning* líquido com resina anti-IgM humana - cadeia µ específica (Sigma-Aldrich), a mesma utilizada para purificação de IgM, de acordo com as instruções do fabricante e o protocolo descrito por Barbas e colaboradores (4).

Primeiramente, 50 µL da resina foi lavada uma vez em TBST (0,1% de Tween) e em seguida bloqueada por 60 minutos a 4°C em tampão de bloqueio (0,1M NaHCO₃ pH8.6, 5.0 mg/ml BSA). Enquanto isso 300 ng de anticorpo

purificado de cada grupo V e T foram incubados, por 20 min. em temperatura ambiente num volume final de 200 μ L de TBST, com $1,2 \times 10^{10}$ pfu da biblioteca de fagos Ph.D.-C7C no primeiro ciclo e nos ciclos subsequentes com partículas de fagos amplificados obtidas de cada ciclo. A resina bloqueada foi lavada quatro vezes com 1,0 mL de TBST. A mistura fago-anticorpo foi transferida para o tubo contendo a resina bloqueada e lavada e incubou-se em temperatura ambiente por 15 minutos, misturando-se ocasionalmente. Os fagos não ligantes foram removidos por dez lavagens com TBST (0,1% Tween-20) no primeiro ciclo de seleção e nos ciclos subsequentes com TBST (0,5% Tween-20). Os fagos ligantes foram eluídos com tampão glicina (0,2M pH 2,2, 1 mg/mL de BSA) até o 3º ciclo e o eluato recuperado foi neutralizado com Tris-HCl 1M, pH 9,1.

A partir do 4º ciclo, os fagos foram eluídos por dois processos, sendo um com tampão glicina, como especificado anteriormente, e o outro com uma suspensão de bacilos mortos pelo calor (12×10^4 bacilos de *M. leprae* em 500 μ L de TBS), fornecida pelo Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru-SP, incubados por 60 minutos com inversões do tubo a cada 5 minutos, à temperatura ambiente (seleção antígeno específica) (Esquema 1). A resina foi precipitada, o sobrenadante recuperado, e pequenas alíquotas do eluato de fagos foram utilizadas para a titulação e o restante foi amplificado.



Esquema 1: Representação do 1º ao 5º ciclo de seleção dos fagos de forma não específica (Tampão Glicina) e específica (Antígeno) por *biopanning* líquido.

Antes de iniciar o 5º ciclo de seleção de fagos, foi realizada uma seleção negativa de resina, onde os fagos amplificados do 4º ciclo foram incubados por 15 min com uma resina bloqueada, na ausência de IgM. Decorrido o tempo, a resina foi precipitada e o sobrenadante recolhido para realização do

último ciclo. A seleção de fagos por eluição com antígeno específico decorreu como citado no 4º ciclo.

Para os fagos recuperados com tampão glicina (eluatos), no 5º ciclo os mesmos foram incubados com IgM purificada do *pool* de contatos intradomiciliares e os fagos que se complexaram com o anticorpo ficaram retidos na resina e os que não se ligaram foram recuperados no sobrenadante (eluato).

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

Titulações

Os eluatos foram submetidos a diluições seriais de 10 vezes em meio LB, sendo diluições de 10^{-1} até 10^{-4} para eluatos não amplificados e diluições de 10^{-8} a 10^{-11} para eluatos amplificados durante a titulação. Cada diluição foi acrescida de 200µL da cultura de ER2738 na fase *mid-log* ($OD_{600} \sim 0,5$) e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As células, após a infecção, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de Agarose Top a 45°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetracilina. Para cada diluição foi confeccionada uma placa.

As placas foram incubadas à 37°C por aproximadamente 14 horas. Após este período, as colônias das placas que se apresentavam azuis e bem individualizadas foram contadas e multiplicou-se cada número pelo fator de diluição de cada placa para obter o título dos fagos.

Amplificação e Purificação de fagos e Extração de DNA em *Deepwell*

Para a extração de DNA dos fagos, colônias azuis provenientes do 5º ciclo de *Biopanning* (eluato não-amplificado), com formatos homogêneos e bem isoladas foram transferidas, utilizando-se palitos de dente autoclavados, para

poços de placas de cultura tipo *Deepwell* contendo 1 mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* ($OD_{600} \sim 0,3$); a cada poço foi adicionada apenas uma colônia de fago. A placa foi, vedada com um adesivo próprio e incubada a 37°C, por 24 horas, sob vigorosa agitação (300 rpm).

No total foram utilizadas 6 placas de cultura, 3 para extração de fagos e 3 para extração de DNA, sendo que em cada conjunto de três, uma foi para fagos provenientes do grupo V e outra para fagos T eluídos com tampão glicina e a terceira foi dividida ao meio para fagos V e T (48 poços para cada) obtidos por seleção antígeno específica durante o processo de *biopanning*.

Para a extração de fagos, as placas foram centrifugadas a 3700 rpm, a 4°C, durante 20 minutos. Aproximadamente 800 µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e acrescentaram-se 160 µL de PEG/NaCl a cada poço e foi precipitado a 4°C por 12 horas. Após esse intervalo, os fagos foram precipitados a 3700 rpm por 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os fagos foram diluídos em 200 µL de PBS 1X.

Para extração de DNA, após a última centrifugação de 1 hora, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 100µL de Tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) ao precipitado de fagos. As placas foram agitadas vigorosamente e, em seguida, 250µL de etanol absoluto foram adicionados. Após uma incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas (3700 rpm, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O precipitado de DNA foi lavado com 500µL de Etanol 70% e recentrifugado. Finalmente, o DNA foi diluído em 20µL de água ultrapura e sua qualidade foi verificada pela corrida eletroforética em gel de Agarose 1% corado com solução de brometo de etídeo (10 mg/mL).

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Foi realizado o teste ELISA das placas para os fagos provenientes do *biopanning* com eluição em tampão glicina para validar a seleção dos fagos a serem seqüenciados. Sensibilizou-se uma placa de microtitulação (*Maxisorp* - *Amersham Biosciences*) com 1µg de anti-IgM/poço em 100µL/poço de tampão

Carbonato/Bicarbonato 0,06M pH 9,6 (1,0M NaHCO₃ e 1,0M Na₂CO₃ anidro), a mesma foi vedada com adesivo e incubado por 2 horas a 37°C. A placa foi lavada por 3 vezes com PBST 0,05% e acrescentaram-se 200µl de solução bloqueio (PBST 0,05% de Tween - BSA 3%) incubando-a por 1 hora a 37°C. Lavou-se novamente a placa por 3 vezes com PBST 0,05%. Incubou-se 1,0 µL de soro sanguíneo (mistura dos 10 pacientes) juntamente com 99,0 µL de solução de bloqueio por 1 hora a 37°C. Lavou-se por 3 vezes com PBST 0,05% e 50 µL de cada fago amplificado e purificado juntamente com 50 µL de solução bloqueio foram acrescentados e foi deixado por 1 hora a 37°C. Lavou-se a placa por 6 vezes com PBST 0,05% e foram adicionados 100µl/poço de anticorpo monoclonal anti-M13 (*Amersham Biosciences*) [1:5000] em solução bloqueio, incubando a placa por 1 hora a 37°C. Lavou-se por mais 6 vezes com PBST 0,05%. Revelou-se com 100µL/poço de tampão citrato-fosfato (0,1M), OPD/Álcool Metílico (10mg/ml) e 1,0µl de H₂O₂ (30%). Interrompeu-se a reação com 10µL/poço de H₂SO₄ (4M) após aproximadamente 15 minutos e efetuou-se a leitura a 492 nm em leitor de microplaca (Flow Titertek Multiskan Plus - USA).

Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada com 500ng de DNA molde dos fagos selecionados, 5pmol do *primer* -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Pré-mix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em um Termociclador de placas (MasterCycler - Eppendorf) nas seguintes condições: 95°C por 20 segundos, 58°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. O amplicons gerados da reação de sequenciamento foram precipitados com 1µL de Acetato de Amônio e Etanol. Foram acrescentados 27,5µL de Etanol absoluto, em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. Adicionaram-se 150µL de Etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 10 minutos, a 4000 rpm. A solução de Etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi centrifugada a 800 rpm, durante um minuto. A placa foi coberta por um papel alumínio e assim ficou

durante cinco minutos para evaporar o Etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos no tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences).

A leitura do seqüenciamento foi realizada em um seqüenciador automático MegaBace 1000 (*Amersham Biosciences*).

Validação de Fagos Reativos

Foi realizado um experimento prévio de validação de fagos utilizando os dois mais frequentes em cada grupo da doença analisado, V e T. Para tal foi realizado o teste de Redução de Colônias proposto por Yang e Shiuan (38), que se baseia na neutralização dos fagos pelo antisoro, impedindo assim a infecção das bactérias pelos fagos.

Os clones/fagótopos foram diluídos (1µL de fago em 9 µL de meio de cultura LB) até o fator de 10^{-8} e 10 uL dessa diluição foram misturados com 2 uL de soro (pool de 5 pacientes para V, T e CI) e incubados por 40 minutos à temperatura ambiente. Após esse intervalo, a mistura fago-soro foi utilizada para infectar 200 µL de cultura de *E. coli* ER2738 em fase *early-log* ($OD_{600} \sim 0,3$) por incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. A cultura foi misturada com 3 mL de agarose TOP (mantida a 45°C em banho-maria) e foi plaqueada em meio LB sólido contendo IPTG/Xgal e incubada a 37°C por aproximadamente 14 horas. As colônias de fagos produzidas na placa foram contadas.

Para controle do teste foi realizado o procedimento de plaqueamento de fagos sem a mistura com o soro para que a redução pudesse ser observada e validada.

Análise de dados pela Bioinformática

A tradução das seqüências de aminoácidos obtidas no sequenciamento foi realizada pelo programa DNA2PRO12. Este programa é designado para tradução de seqüências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs* (Ph.D.-12TM or Ph.D.-C7CTM) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as seqüências inicial e final do vetor. O programa automaticamente

localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na seqüência do inserto (tais como códons inesperados ou erros na seqüência próxima) ([hTp://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx](http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx)).

Os índices de antigenicidade foram determinados para cada heptapeptídeo pelo programa *Protean* (DNASTAR – Lasergene *softwares*), seguindo o índice de James e Wolf.

Seqüências consensos foram encontradas entre alguns peptídeos e estas juntamente com todos os outros que não formaram consensos foram alinhados com seqüências genômicas de *Mycobacterium leprae* publicadas no banco de dados não redundante *GenBank* usando a matriz PAM 30 de “*Search for Short Nearly Exact Matches*” do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - [hTp://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). As seqüências dos heptapeptídeos foram analisadas no sentido direto e reverso

Com relação ao alinhamento realizado com peptídeos obtidos a partir do *biopanning* com seleção antígeno específica, todas as proteínas que apresentaram valores de *score* maior que 13.5 foram anotadas para caracterização do perfil antigênico de IgM anti-proteínas de *M. leprae*. Para o alinhamento realizado com os peptídeos obtidos por seleção não específica, não foi adotado o mesmo critério acima descrito, e sim foram anotadas todas as proteínas obtidas de uma busca por antígenos e potenciais antígenos caracterizados por Araóz (2), Geluk (10), Reece (26) e seus respectivos colaboradores, perfazendo um total de 77 proteínas relatadas na literatura (Anexo I.1) utilizadas como parâmetro de busca entre as proteínas anotadas pelo BLAST. Todas as proteínas em que o nome ou função indicavam ser um antígeno também foram anotadas.

A freqüência de cada aminoácido a partir dos clones seqüenciados para os dois tipos de seleção realizados durante o *biopanning* foi determinada pelo programa AAFREQS ([hTp://relic.bio.anl.gov/aafreqs.aspx](http://relic.bio.anl.gov/aafreqs.aspx)).

RESULTADOS

Purificação de IgM

A resina anti-IgM humana se mostrou eficaz na purificação dos anticorpos do isotipo IgM e apresentaram as seguintes quantificações por espectrofotometria (OD_{280nm}): IgM de pacientes virchovianos (V) com 69,5ng/uL; IgM de pacientes tuberculóides (T) com 49,15 ng/uL e IgM de contatos intradomiciliares (CI) sadios com 62,71 ng/uL.

Ciclos de Seleção dos Fagos:

O enriquecimento dos fagos selecionados durante todo o processo de *biopanning*, que ficaram retidos na agarose, com seus respectivos ciclos pode ser evidenciado na Tabela 2.

Tabela 2. Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais IgM com eluição em tampão glicina e antígeno específico. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade (título de saída por 90 µL). **Negrito:** fagos para sequenciamento.

Ciclos de Seleção	Número de partículas de fagos			
	V		T	
	Entrada	Saída	Entrada	Saída
1º	1,2 x 10 ¹⁰	1,43 x10 ⁴	1,2 x 10 ¹⁰	1,6 x10 ⁴
2º	1,33 x10 ¹⁰	2,0 x10 ⁴	2,8 x10 ¹¹	2,8 x10 ⁵
3º	2,11 x10 ¹¹	3,5 x10 ⁶	5,0 x10 ¹¹	1,43 x10 ⁶
4º Seleção Não Específica	1,13 x10 ¹¹	6,5 x10 ⁵	1,8 x10 ¹²	2,12 x10 ⁷
5º Seleção Não Específica	2,89 x10 ¹¹	1,59 x10¹¹	6,39 x10 ¹¹	1,29 x10¹¹
4º Seleção Antígeno Específica	9,0 x10 ⁹	1,2 x10 ⁴	2,0 x10 ¹⁰	1,14 x10 ⁵
5º Seleção Antígeno Específica	2,0 x10 ¹¹	2,0 x10⁵	2,0 x10 ¹¹	5,0 x10⁴

ELISA

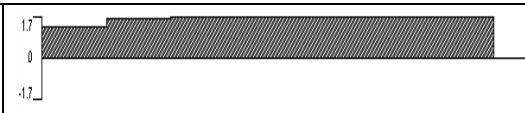

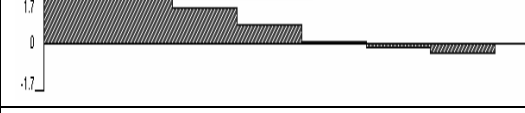
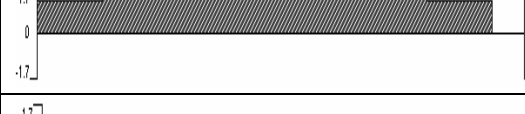
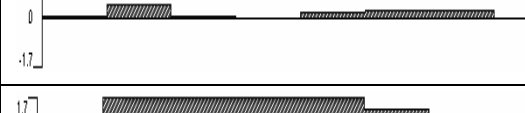
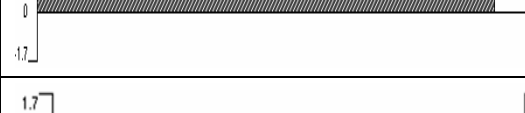
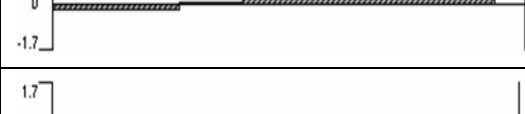

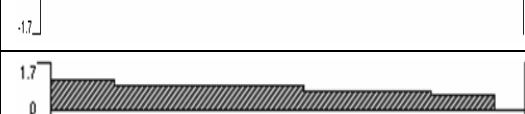
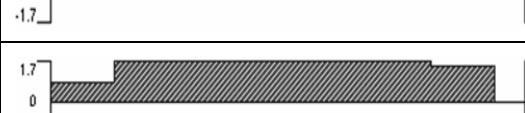
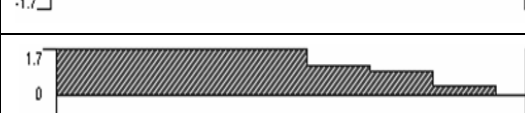
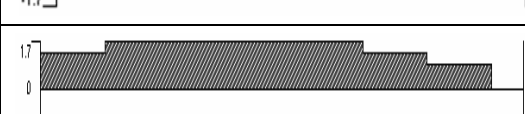


O teste ELISA realizado para seleção dos fagos pré-sequenciamento, utilizando anticorpo IgM purificado e soro de pacientes V, T e CI, não apresentou resultados satisfatórios para a diferenciação e escolha dos clones. Portanto, utilizou-se como parâmetro de escolha de clones leituras que apresentaram OD_{492nm} maior ou igual a 0,02. Dessa forma 145 clones foram sequenciados, sendo 71 para V e 74 para T, na tentativa de evitar a exclusão de clones de interesse imunogênico.

Sequenciamento, Validação e Bioinformática dos Fagótopos:

Do total de DNA de fagos selecionados inespecificamente e seqüenciados, 102 seqüências peptídicas viáveis foram geradas (Tabela 3) pelo programa DNA2PRO12. Quanto aos fagos selecionados de forma antígeno específica, 66 seqüências viáveis foram obtidas a partir de 96 clones (Tabela 4). As seqüências viáveis incluem também as seqüências peptídicas repetidas. As Tabelas 3 e 4 também apresentam o índice de antigenicidade, que é a probabilidade de exposição, para cada heptapeptídeo encontrado, variando na vertical esquerda, de -1,7 à +1,7, sendo que cada aminoácido está representado na horizontal.

Tabela 3: Sequências dos heptapeptídeos imunorreativos contra IgM total de pacientes com hanseníase nas formas clínicas polares e estáveis (V - Virchoviana e T - Tuberculóide), selecionados a partir da eluição com tampão glicina (59 V e 43 T), suas frequências e índices de antigenicidade.

Grupo V			
Clone	Sequência	Frequência	Antigenicidade
1	LFPAMHQ	27	
2	VERHPST	18	
3	NTIIRQS	2	
4	TWSATTM	2	
5	LAPRLMG	1	
6	SINNRWH	1	
7	LSHKGGL	1	
8	QGNRLQM	1	
9	PTTLAHL	1	
10	IPLFNKY	1	
11	HPTLGRW	1	
12	NVFHHHL	1	
13	QQPTNRT	1	

14	VERHPSN	1	
Grupo T			
15	KNPTTGT	17	
16	SSNNHLL	3	
17	ETHPTTR	2	
18	PMHTPTA	1	
19	TESHPST	1	
20	YLPQTKQ	1	
21	HSLSTTL	1	
22	ETHPTTS	1	
23	NPARQLH	1	
24	PSPMKRT	1	
25	KTSPLTN	1	
26	TESHPTT	1	
27	TGQVSVV	1	




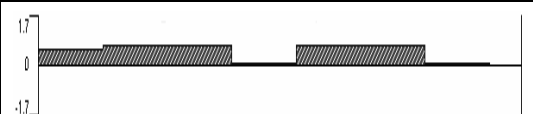
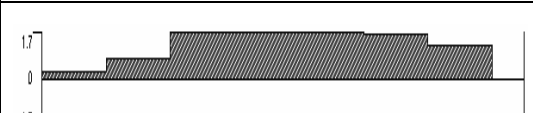
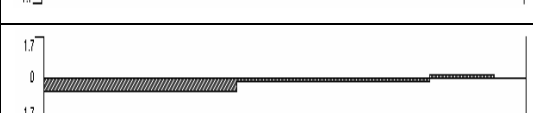
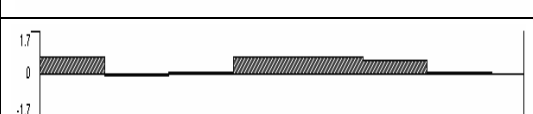
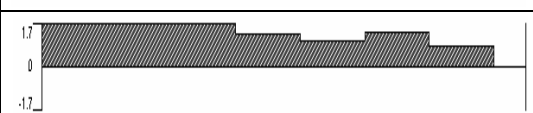
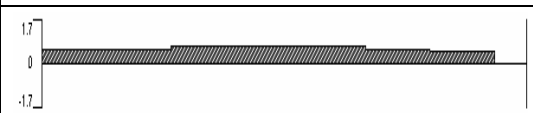

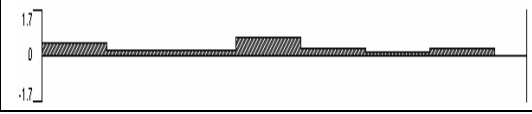





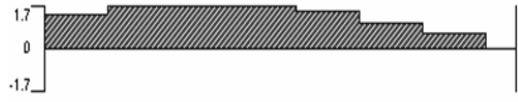
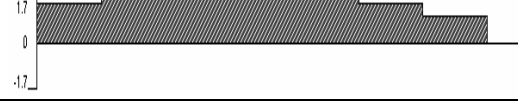




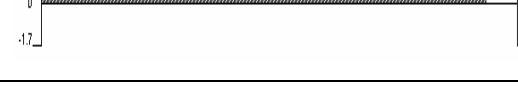
28	SNTSNPK	1	
29	ETHPDDA	1	
30	PTLPAWM	1	
31	LHESHPA	1	
32	PQAPGRL	1	
33	LQVLSGA	1	
34	STKMLPR	1	
35	NYQRSQI	1	
36	SAKLTPS	1	
37	PVIAEHI	1	
38	TQNGWHE	1	

Tabela 4: Sequências dos heptapeptídeos imunorreativos contra IgM total de pacientes com hanseníase nas formas clínicas polares e estáveis (V- Virchoviana e T- Tuberculóide), selecionados a partir da eluição com Mitsudina (38 V e 28 T), suas freqüências e índices de antigenicidade.

Grupo V			
Clone	Sequência	Frequência	Antigenicidade
1	VERHPST	18	
2	LFPAMHQ	27	
3	SIIRWH	1	
4	METHPST	1	
Grupo T			
5	ETHPTTR	11	
6	KNPTTGT	9	
7	RETHPTT	3	
8	TETPHTT	1	
9	KNPTMVT	1	
10	KNPTMGT	1	
11	SLHRFNS	1	
12	PSPLKSS	1	

A Tabela 5 apresenta as possibilidades de sequências consensos formadas para o grupo T.

Tabela 5: Agrupamento de sequências consenso entre os heptapeptídeos do grupo T eluídos com antígeno específico de *M. leprae* (Mitsudina) e com tampão Glicina.

Grupo T: seleção com Tampão Glicina	Grupo T: seleção com Mitsudina	
Consenso 1 E T HPTTR E T HPTTS T E S HPTT T E S HPST E T HPDDA <u>L H E S HPA</u> T E T / S H P T T	Consenso 2 E T HPTTR R E T H P T T <u>T E T H P T T</u> E T H P T T	Consenso 3 K N P T T G T K N P T M G T <u>K N P T M V T</u> K N P T M G T

Quanto aos dados do teste de redução de colônias, adotado em substituição ao teste de ELISA e DOT-BLOT, para os quatro heptapeptídeos que se apresentaram como mais frequentes, sendo dois para o grupo T e dois para V, os mesmos estão apresentados na Tabela 6, consistindo na média do número de unidades formadoras de colônias (pfu) obtida a partir de dois ensaios realizados para os grupos (pool de 5 soros sanguíneos) de CI, V e T.

Tabela 6: Teste de redução de colônias indicado pela média do número de colônias (pfu) obtidas a partir de dois ensaios, com a mistura de soro dos grupos contatos intradomiciliares (CI), tuberculóide (T) e virchoviano (V) com quatro diferentes fagótopos e a infecção em *E. coli* ER2738. Como controle do teste, bactérias ER2738 foram infectadas somente com os referidos fagos. A contagem foi realizada pela diluição de fagos a 10^{-8} . As porcentagens de redução das colônias encontram-se entre parênteses.

Fagótopos	Sem soro	Soro de CI	Soro Pacientes T	Soro Pacientes V
VERHPST	131 (0%)	62 (52,7%)	74 (43,5%)	28 (78,6%)
LFPAMHQ	53 (0%)	36 (32,1%)	26 (50,9%)	9 (83%)
KNPTTGT	385 (0%)	197 (48,8%)	156 (59,5%)	66 (82,8%)
ETHPTTR	159 (0%)	53 (66,7%)	16 (89,9%)	34 (78,6%)

A frequência de cada aminoácido a partir dos clones sequenciados para os dois tipos de seleção realizados durante o *biopanning* foi apresentada pelo programa AAFREQ (Tabela 7). Os aminoácidos mais frequentes foram T, P, S, L e H respectivamente, sendo que quatro deles coincidiram nos dois tipos de seleção.

Tabela 7: Freqüência dos aminoácidos para os clones sequenciados a partir do *biopanning* com Tampão Glicina (seleção não específica) e com Mitsudina (seleção antígeno específica). Em azul estão os aminoácidos com maior freqüência dentre todos.

Eluição com Glicina										Eluição com Mitsudina									
AA	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	Total	Freq.	AA	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	Total	Freq.
A	0	2	2	3	2	0	4	13	0.0489	A	0	0	0	1	0	0	0	1	0.0119
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0000	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0000
D	0	0	0	0	1	1	0	2	0.0075	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0000
E	3	4	1	0	1	0	1	10	0.0376	E	1	4	0	0	0	0	0	5	0.0595
F	0	1	1	1	0	0	0	3	0.0113	F	0	1	0	0	1	0	0	2	0.0238
G	0	2	0	1	3	3	1	10	0.0376	G	0	0	0	0	0	2	0	2	0.0238
H	2	1	5	5	3	5	2	23	0.0865	H	0	0	2	4	0	1	1	8	0.0952
I	1	1	2	1	0	0	2	7	0.0263	I	0	1	1	1	0	0	0	3	0.0357
K	2	0	2	1	1	2	1	9	0.0338	K	3	0	0	0	1	0	0	4	0.0476
L	5	1	3	4	4	2	6	25	0.0940	L	1	1	0	1	0	0	0	3	0.0357
M	0	1	0	2	1	1	3	8	0.0301	M	1	0	0	0	3	0	0	4	0.0476
N	4	2	4	2	3	0	2	17	0.0639	N	0	3	0	0	0	1	0	4	0.0476
P	6	3	6	6	5	4	0	30	0.1128	P	1	0	5	1	4	0	0	11	0.1310
Q	2	4	2	1	1	3	2	15	0.0564	Q	0	0	0	0	0	0	1	1	0.0119
R	0	0	2	4	2	4	2	14	0.0526	R	1	0	1	1	1	0	1	5	0.0595
S	5	4	4	3	3	3	3	25	0.0940	S	2	1	0	0	0	3	2	8	0.0952
T	5	8	3	3	7	7	6	39	0.1466	T	1	1	3	3	2	3	7	20	0.2381
V	2	2	1	1	0	1	1	8	0.0301	V	1	0	0	0	0	1	0	2	0.0238
W	0	1	0	0	1	2	1	5	0.0188	W	0	0	0	0	0	1	0	1	0.0119
X	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0000	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0000
Y	1	1	0	0	0	0	1	3	0.0113	Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0000
266										84									

As anotações obtidas por bioinformática para os mimotopos constam dos Anexos I.2, I.3 e I.4, e a partir deles foi possível verificar que, no grupo V, 26 mimotopos apresentaram identidade com 23 proteínas diferentes, enquanto no grupo T, 73 mimotopos apresentaram identidades com 42 proteínas e em ambos as proteínas são imunogênicas ou potenciais antígenos, sendo que 10 de cada grupo são comuns entre V e T, ou seja, apresentam similaridade com mimotopos dos dois grupos, restando assim 13 e 32 proteínas com mimotopos restritos ao grupo V e T, respectivamente.

A partir das anotações realizadas para todos os fagótopos, eluição antígeno específica (Mitsudina) e não específica (tampão glicina pH 2,2), e a partir da busca realizada por antígenos e potenciais antígenos foi possível inferir possíveis mimotopos para as proteínas que tiveram identidade maior que três peptídeos (Tabela 8).

Tabela 8: Alinhamento das proteínas anotadas com mais de três identidades, evidenciando (sublinhado) as possíveis regiões de epítomos das mesmas. Em azul estão os mimotopos gerados do grupo T, em vermelho estão os mimotopos gerados pelo grupo V, sejam eles na sua sequência direta ou reversa e em rosa estão os aminoácidos com mesma propriedade química. Ptn1 a 8 = Proteína 1 a 8.

Ptn1: PROTEÍNA DA FAMÍLIA PPE - ML1828 - 572 aa – GI: 15827976	
181 dalea	<u>SSdqP SP</u> tapsqspq vqnwlqwlqk igytdfyntl vqplitsltn hpffqgmfsq 240 <u>SSKLP SP</u>
241 fdpwlp slgn	plsflspfni afalgtpm di gsyvg <u>YLSQT</u> fafigadlaa afasgnpvti 300 <u>YLPQT KQ</u>
361 elaglv gvap	pglpsappva avapvvppsm ptlasip <u>TPT</u> <u>MP</u> apaasta pvvtppgppp 420 <u>ATPT HMP</u>
421 vtapps vtga	gvesfgylvg <u>rLPST</u> argvv gtsvrqqssa pdrieapdaa atpqqeqarsr 481 <u>N TLPSTK</u>
481 wrrr	<u>AKVTP</u> f dssgspnpka aptasdqqag tlglagtarq assgpatglv tlnsgtfsds 540 <u>SAKLTPS</u>
541 prap	<u>MLPR</u> tw gadptfcyna adigpaggwd de <u>STKMLPR</u>
Ptn2: PUTATIVE EXPORTED P60 PROTEIN HOMOLOGUE- ML1812 – 479 aa – GI: 15827970	
61 edlgaaiete	eqsvnkamvs vemardnava aehdcevsqq svkdantain aaq <u>HRFDS</u> fa 120 <u>SLHRFNS</u>
121 aatymngpsg	syltatspdd iatataar <u>T LTAS</u> sqavma <u>nLQAR</u> teqv nkesaarlak 180 <u>SPT LKAS HLQRAPN</u>
241 pgmgghgtpp	fgdrwepgsp asagpaggrk wdgwd <u>PTLP</u> q vpsanvpgdp iavinqlgy 300 <u>PTLEFA WM</u>
361 igvpyswggg	naagpsrgid sgagitgfdc sglvlysfag vgirlphysg sqynlg <u>RKIP</u> 420 <u>TRKMP</u>
421 Saqmrrgdvi	fygpggsqhv tiylghgqml eapdiglrvr vapvrts <u>GMT</u> <u>Pyvvryiey</u> 480 <u>SPT TGMT PNK</u>
Ptn3: POSSIBLE TRANSCRIPTIONAL REGULATOR - ML1753 – 1106 aa - GI: 15827939	
301 rrcigdrml	mvlndceyll dvcanvmttl lgacpsltil atsrepigva geviwrvs <u>ML</u> 360 <u>GML</u>
361 <u>SPA</u> deavelf	teraalvqpg fsvtdgnrqi vteicrldg mplaielaaa rirtlsitei 420 <u>RPAL</u>
421 adglddrfrl	ltgartavr rqq <u>TLRAS</u> md wsyalltese ral <u>FRrLS</u> ai sgtfdlkvay 480 <u>SPTLKAS SNFRHLS</u>
1021 ampiddaity	aqrgrgnr <u>Kr PTTG</u> es <u>LTP</u> aehnvirlvs egltdkdiaa rlfvsvrtvh 1080 <u>KN PTTGT MWAPLTP</u>
Ptn4: PROTEÍNA HIPOTÉTICA ML0405 – 394 aa - GI: 15827124	
1 msgafiid	<u>PT LKA</u> ieawhal lgigvpndgg vlysslsffe kalehlaaaf pgdglwgsaa 60 <u>SPT LKAS</u>
121 yiplvgsvms	asiqaqaca amaavsggla yllvqtaiht akfvallar <u>L AHL</u> lasavad 180 <u>PTTL AHL</u>
241 gatsglsqvt	glfgvpglag ssgllsgesl lstenlpsla gvgaglg <u>GS LpQL</u> aqhaa 300 <u>AGS LVQL</u>
301 strqgtrsq	gvsaelsteq fggqqepvsa qsgqmggsq gm <u>GMP</u> ast kskkderkkk 360 <u>TGMTPNK</u>
Ptn5: PROTEÍNA HEAT SHOCK 90, HTPG - ML1623 - 479 aa - 15827855	
1 msaqveqlf	qae <u>ARQL</u> ldl mvhsvysnkd aflrelisna sdaldklrle afrnklddpr 60 <u>NPARQLH</u>
421 hissfasths	dee <u>PTTLA</u> qy vermkgdqqd ifyatgesrq qvm <u>NSPH</u> lea fkakgyevll 480 <u>PTTLAHL NSPHREV</u>
481 ltdpvdevwv	gmapefdgk <u>P LKS</u> vargevd leseektah eaerkeqeqn faglvnlwke 540 <u>PSP LKSS</u>

Tabela 8: Continuação

Ptn6: PUTATIVE TRANSPORTER PROTEIN - ML0397 – 602 aa – GI: 15827122	
181	dfkvindslg hdvgdavlqt vaqrlrsavr pddvvarlgg defivl LRGP lsdmndva 240 LRGP AQP
241	krlhttlse lvvdqltvp gasvgilevr pddrrraadi lrdadsamya aknkkqcav T 300 TRNT
301	PQQ lvpfval ialfvfftaa agakfyapsn llvilqqtvv laivgygmtf vimagsvels 360 PQQ
481	ervatlagvp trgikvaifa icgltaglgg ivlasrlgag TPTA atgfei dviaavvig 540 PMH TPTA
541	tpltgglgrl sgtliga III S mlsngmvfm gvgnaasqii kgimlaaavf vflqrrkigi 600 HWRIII S
Ptn7: POSSÍVEL PROTEÍNA REGULATÓRIA - ML2341 – 732 aa - 15828261	
1	MTTA lvvac gaelrsiakf cdecgspvve aetpaeykqv tvlfadvvgs mdiaavgle 60 MTTASWT
481	elaergvltg ergryacstd vaevcvpatl qatiaaridr lsp PAKQL lv aavigfrfg 540 NPARQLH
601	aaaiearaph svdqhavl IAEH leaagdlh aaygwhmraa awatnqdvra arvswehatk 660 PVIAEHI
661	iadaltaedp hraamciapr trlrcgiawrg RFNS ssgfde vrqlcnatgd kaplavatvg 720 SLH RFNS
Ptn8: SINTASE DE ÁCIDO GRAXO - ML1191 – 3076 aa - GI: 15827605	
421	lla GMP ttv danivaaaaan aghwaelagg gqvteeifan rveqlsglle pgrtyqfnal 480 TGMPNK
961	ewqvnnglsa THST gaqlq vksedqqvvl svpvsngwid ipftlptntv dggallvste 1020 ME THPST
2401	haaqaadea teasevagti aa LPSP prgy tpasphwddl dvdpadlvvi vggaeigpyg 2460 S SKLPSP
2641	atvdafllsag ftpaevmryv hpslvan TMG T gmgggtsiq rlyhssllgr nkpndifqei 2700 KNPTMG T

DISCUSSÃO

A tecnologia de phage display tem sido desenvolvida e aplicada extensivamente nos últimos anos e a biblioteca de peptídeos randômicos apresentados pelos fagos mimetizam epítomos de antígenos (mimotopos), tornando-se uma ferramenta muito importante para os estudos de interações existentes entre antígeno e anticorpo, tornando possível a caracterização de mimotopos com potencial antigênico, auxiliando na elucidação de mecanismos básicos da regulação da resposta imune para diversas doenças como Aids (1), meningite (15), pneumonia (39), malária (11), câncer (23) entre outras doenças humana.

A tecnologia foi empregada com sucesso neste trabalho, uma vez que peptídeos foram caracterizados a partir da afinidade dos parátomos do anticorpo IgM às proteínas PIII da capa protéica dos fagomídeos, mimetizando a interação antígeno – anticorpo que ocorre *in vivo*, permitindo assim a identificação de possíveis mimotopos específicos de *M. leprae*. Os fagomídeos com alta afinidade e especificidade aos parátomos da imunoglobulina foram enriquecidos após alguns ciclos do *biopanning* como pode ser visto na Tabela 2, onde estão apresentados os números de entrada e saída das partículas virais durante os ciclos.

A falta de reatividade entre os clones e o soro humano no ensaio de ELISA de captura realizado, e também no teste de imunobloting (dados não mostrados), dificultou a seleção de fagótopos específicos para cada pólo da doença e dessa forma, não foi possível testar a reatividade de todos os fagótopos e nem as formas clínicas intermediárias da doença. A literatura retrata que ensaios como ELISA, utilizando anticorpos do tipo IgM, frequentemente apresentam baixa reatividade ou sensibilidade devido à interferência de anticorpos IgGs de alta afinidade que podem estar no soro e competir por antígenos ligantes (6; 16, 40).

A alternativa adotada frente aos resultados não satisfatórios dos testes ELISA e Dot-Blot foi o teste de redução de colônias que estima a resposta específica do anticorpo ao mimotopo. O teste aplicado aos fagótopos que se apresentaram com maior frequência entre todos os obtidos, mostrou-se eficiente e

de utilidade na validação de fagótopos reativos, uma vez que a redução foi verificada em relação ao controle. De acordo com a Tabela 6, os fagótopos/mimotopos VERHPST, LFPAMHQ e KNPTTGT sofreram uma redução mais acentuada para o pool de soro V quando comparados aos pools de soro de CI e T, isso é interessante, pois encontrar mimotopos que tenham boa reatividade na hanseníase virchoviana pode levar a uma ferramenta de diagnóstico para tal espectro clínico e deve-se avaliar também a produção de citocinas em resposta a tais frações antigênicas.

Os mimotopos VERHPST e LFPAMHQ foram obtidos do grupo V (Anexo I.2) e o primeiro não apresentou nenhuma similaridade com algum antígeno já descrito e proteínas hipotéticas foram as que apresentaram os maiores valores de *score* nos sentidos direto e reverso do mimotopo (ML1254 e ML0070, respectivamente), podendo ser potenciais antígenos ainda não testados. Para o segundo fagótopo observaram-se valores crescentes na porcentagem de redução de pacientes contatos para pacientes V, e este grupo apresentou o segundo maior valor de redução de colônias entre os quatro fagótopos testados; tendo sido anotada uma proteína hipotética de função desconhecida (ML2264) e apontada como possível antígeno (2) e pertencente a uma classe de antígenos restrito ao *M. leprae* até o momento.

A alta taxa de redução de colônias verificada no soro de pacientes V para o fagótopo KNPTTGT, derivado do grupo T, pode ser explicada pelo fato deste mimotopo apresentar identidade em uma proteína que apresenta similaridade com mimotopos dos dois grupos, V e T, e ainda divide uma região de um possível epítipo com outro mimotopo do grupo V (Ptn 3- Tabela 8).

Para o fagótopo ETHPTTR, cuja sequência perfaz o consenso 1 e 2 da Tabela 5, obteve-se uma maior redução no soro T, podendo ser um mimotopo mais específico para a hanseníase tuberculóide, e a proteína hipotética ML0840 descrita como um potencial antígeno (10) possui identidade com esse consenso e com mais outros dois também do grupo T, evidenciando sua especificidade para este pólo da doença (Anexo I.3 e I.4).

As porcentagens de redução de colônias para soro de CI e T tendem a se aproximarem nos fagótopos analisados, isso pode ser explicado pelo fato de que pacientes com hanseníase tuberculóide e a maioria dos adultos sadios

reagem positivamente ao teste de Mitsuda e conseqüentemente todos apresentam uma resposta celular mediada por células. O ideal seria encontrar mimotopos aptos a caracterizar cada forma clínica da hanseníase e também diferenciá-las dos indivíduos sadios.

Dessa forma, todos os mimotopos encontrados nesse trabalho devem ser validados posteriormente pelo teste de redução de colônias, uma vez que se mostrou bastante eficiente, permitindo uma melhor definição da reatividade específica de fagótopos e anticorpos, e discriminando melhor o comportamento dos mimotopos no espectro clínico da hanseníase.

Um problema e também uma preocupação durante a determinação de clones reativos utilizando soro humano, tanto para ELISA como *Imunobloting* e também para o teste de redução de colônias, é que pode ocorrer uma reatividade cruzada dos clones com IgMs relativas a outros patógenos como *M. tuberculosis*, *M. bovis* e outros que apresentam proteínas, peptídeos e até mesmo regiões antigênicas análogas entre si. Por isso a necessidade de, em análises futuras e em continuidade a este trabalho, uma seleção bastante cuidadosa de mimotopos, via testes laboratoriais, bioinformática e análise de genômica comparativa, que sejam próprios de *M. leprae* e que também sejam aptos a distinguir os diferentes espectros do quadro clínico da doença.

Estes testes laboratoriais poderiam consistir de inoculação de algum mimotopo de interesse em pata de camundongo para estudar o mecanismo de resposta frente ao possível antígeno, como também na confecção de sonda imunológica para o teste de aglutinação em látex (LAT), onde sensores baseados em micro e nanoesferas de látex são usados em ensaios de microimunoaglutinação, úteis na descoberta de anticorpos em microbiologia clínica. Este teste é extremamente rápido e sensível, sendo superior aos métodos convencionais como ELISA e *Western blot* (5, 36).

Verificou-se nas tabelas 3 e 4 que os heptapeptídeos VERHPST e LFPAMHQ do grupo V e ETHPTTR e KNPTTGT do grupo T estão entre os mais frequentes nas duas tabelas, evidenciando concordância entre os dois tipos de eluição. Outra concordância avaliada foi na frequência dos aminoácidos, sendo que os mais frequentes para as duas eluições, específica e não específica, fazem parte das sequências consensos (Tabela 5).

A eluição não específica apresentou um número muito maior de peptídeos, tornando-se necessária a validação dos clones para se restringir o estudo apenas àqueles de interesse. Como nesse trabalho não foi possível a validação de todos os fagótopos por ensaios de redução, realizou-se análises de bioinformática através de uma busca restritiva ao *M. leprae* para anotação das possíveis proteínas antigênicas do bacilo.

Quanto ao índice de antigenicidade (Tabelas 3 e 4), que prediz a probabilidade de exposição para cada heptapeptídeo percebe-se que para o grupo V, 50% dos peptídeos apresentam uma antigenicidade maior que zero na grande maioria dos aminoácidos e que para o grupo T foram 79% (Tabela 3) e 100% (Tabela 4). Isto pode mostrar que além de serem em maior número no grupo T, os mimotopos também apresentam maior probabilidade de estarem na superfície da proteína enovelada e também de serem epítomos prováveis no reconhecimento de anticorpos nas populações de células T.

Os primeiros antígenos purificados e caracterizados imunologicamente compreenderam as proteínas mais abundantes de *M. leprae* como a proteína principal de membrana-1 (MMPL-1), MMPL2, antígenos 85B, fator de alongação Tu (EF-Tu) e GroES, as quais apresentaram sérios problemas de reatividade cruzada com micobactérias patogênicas e não patogênicas (2).

O pólo tuberculóide no presente trabalho evidenciou, por bioinformática, um número muito maior de mimotopos quando comparado ao pólo virchoviano, sugerindo por mais de uma metodologia a capacidade do hospedeiro em processar, apresentar e reconhecer certos tipos de antígenos ou fração antigênica, o que não ocorre na hanseníase V, onde é verificada uma anergia da resposta imune mediada por células, evidenciando a possível falha no processamento, exposição e reconhecimento de antígenos.

O tipo de antígeno micobacteriano expresso por determinadas moléculas do MHC pode ativar preferencialmente diferentes populações de células Th, tendo em vista que fragmentos de proteína hsp70, hsp65 e hsp18 de *M. leprae* associados a determinados haplótipos de HLA-DR são capazes de induzir vigorosa proliferação de células T CD4⁺, característica de pacientes T. Por outro lado, em pacientes V, poucos fragmentos hsp disparam resposta mediada por células T (17).

Esta quiescência do sistema imune de pacientes virchovianos em responder a antígenos mediado por células também foi demonstrada por pesquisadores que trabalharam com a molécula de ativação de sinalização linfocítica (SLAM) em hanseníase e verificaram que as células expressaram a proteína mais fortemente em lesões de pele de pacientes tuberculóides (T) do que virchovianos (V) (9, 25).

Garcia e colaboradores (9) , estimularam células T originadas de sangue periférico de pacientes V e T com extrato de *M. leprae* e verificaram um aumento surpreendente no nível de expressão de SLAM nos pacientes T, enquanto os V mostraram pequena mudança no nível de SLAM após o estímulo. Foi verificado também que as células T expressam SLAM quando estimuladas por *M. tuberculosis*, evidenciando que não são respondedoras somente ao *M. leprae*.

Existe a possibilidade do *M. leprae* ter desenvolvido mecanismos de evasão da resposta imune, explicando a anergia em pacientes com hanseníase V e a permanência do parasita no compartimento fagossomal podendo, assim, estar bloqueando sua maturação para evitar as condições agressivas quando transformado em fagolisossomo (30).

Outro fato que também diferencia o grupo T do V foi a maior antigenicidade predita para os mimotopos do grupo T, onde 83% deles apresentaram antigenicidade maior que zero enquanto apenas 50% dos mimotopos do grupo V apresentaram o índice diferente de zero.

Não se pode descartar a hipótese de que as proteínas encontradas para cada sequência de mimotopo dentro do grupo V (Anexo I.2) sejam antígenos específicos para tal grupo, aumentando assim a lista de proteínas imunogênicas restritas ao pólo virchoviano e a possibilidade de serem utilizadas como uma ferramenta diagnóstica.

De acordo com Araóz e colaboradores (2), as proteínas hipotéticas ML2244, ML0678 e ML1420 são proteínas restritas ao *M. leprae* e neste trabalho as mesmas apresentaram similaridades apenas com mimotopos do grupo V (Anexo I.4). O mesmo ocorre com o precursor do antígeno de 34 KDa e a proteína reguladora ML0824, ambas restritas ao grupo V, sendo que para esta última dois mimotopos apresentaram identidade em regiões distintas da mesma.

Vários tipos de antígenos apresentaram similaridades com mimotopos restritos ao grupo T como ML1828, ML1812, ML0405 (Ptn1, Ptn2 e Ptn4 da Tabela 8), sendo que estas apresentaram quatro ou mais mimotopos com identidades dentro de suas sequências, evidenciando que tais proteínas, presumivelmente, possuem caráter imunogênico, como já descrito na literatura. Outras proteínas como Hsp70, Hsp70A2, chaperona clpB, antígeno de 35 KDa (MMP-I), proteína de secreção da família p60, proteína hipotética ML0840 e outras que apresentaram identidade com dois ou três mimotopos (Anexo I.2 e I.3) também foram restritas ao grupo T e constituem alvos potenciais para investigação.

Proteínas como chaperona GroEL de 60 KDa , hsp90, o antígeno lipoprotéico de 27 KDa, antígeno 85A que constam do Anexo I.4, apresentaram mimotopos dos dois grupos estudados (V e T) em sua estrutura e a descoberta de antígenos que estimulem resposta imune nos dois pólos é de certa forma interessante quando se pensa em desenho de vacinas, pois uma subunidade vacinal deve disparar resposta imune no indivíduo para que a imunização seja efetiva contra todos os espectros clínicos da doença, para ter viabilidade imunoprolifática.

As proteínas *heat shock* (hsp), antígenos imunodominantes de vários microrganismos, inclusive micobactérias, são alvos comuns de reconhecimento de células T e aumentam a reatividade das mesmas. As hsp microbianas tem sido associadas com a geração e indução de resposta imune tipo Th1 (27).

O possível regulador transcricional ML1753 (Ptn3 – Tabela 8) foi relacionado nesta investigação por apresentar 4 mimotopos com identidade em sua sequência, podendo ser um agente imunogênico como a proteína ML2341 (Ptn7 – Tabela 8), também uma possível proteína regulatória já relatada com potencial antigênico (2). Outra proteína regulatória encontrada e que desperta atenção, com 3 mimotopos em sua estrutura, tanto para V como T, é o repressor negativo do operon de chaperonas (ML0624) como grpE, dnaK, dnaJ e GroELs da classe I que pode estar modulando a expressão de chaperonas imunogênicas.

A partir da comparação do genoma de *M. tuberculosis* e *M. leprae* verificou-se uma drástica decomposição e redução gênica neste último, que afeta diversos aspectos do metabolismo, sendo que 40% do genoma se constitui de

pseudogenes (7). A falha do crescimento de *M. leprae in vitro* pode resultar de efeitos combinados da redução e mutações gênicas em diversas áreas metabólicas (35). Mutações são encontradas em genes envolvidos em regulação, em detoxificação, reparo do DNA e transporte ou efluxo de metabólitos como aminoácidos, peptídeos, cátions e ânions. Em geral, pseudogenes são encontrados mais frequentemente em vias degradativas do que em vias sintéticas. Genes para síntese de pequenas moléculas tais como aminoácidos, purinas, pirimidinas e ácidos graxos, e para a síntese de macromoléculas como ribossomos, tRNAs, RNA e proteínas permanecem razoavelmente intactos (35).

Genes que codificam repressores, ativadores, oxidoredutases e oxigenases são afetados com o declínio genômico de *M. leprae* e isso pode estar definindo e diferenciando o padrão de expressão de proteínas imunogênicas (35).

Os motivos pelos quais mais antígenos são apresentados e reconhecidos na hanseníase tuberculóide precisam ser desvendados, pois esse fator juntamente com outros já bem elucidados para hanseníase, como estudo do padrão de citocinas ativadoras e supressoras da atividade macrófágica (13, 14, 31, 32, 37) e também fatores genéticos como o gene receptor de vitamina D (VDR) e o gene da proteína 1 do macrófago (NRAMP-1) relacionados à resistência natural do hospedeiro (30), podem auxiliar no entendimento da variação de resposta imune apresentada nos extremos do espectro clínico da hanseníase.

No campo de desenho de vacinas, os mimotopos caracterizados por phage display têm sido investigados como possíveis componentes de vacinas, como também vários antígenos já bem caracterizados como chaperonas de vários pesos moleculares, proteínas de membrana com poder antigênico e outras.

Este é o primeiro trabalho da literatura que propôs estudar o perfil antigênico de *M. leprae* a partir de soro policlonal de pacientes com hanseníase por phage display, e os resultados aqui revelados vêm auxiliar e complementar a caracterização de antígenos potenciais desta micobactéria conforme a resposta imunológica nos dois pólos da doença, permitindo assim elucidar, em parte, alguns mecanismos da resposta imune na hanseníase.

A continuidade da caracterização e validação de peptídeos recombinantes, provenientes de *phage display*, e que mimetizam os antígenos do *M. leprae*,

poderá ainda fornecer um melhor entendimento da interação patógeno-hospedeiro, bem como a descoberta de novos alvos biológicos que sirvam em estratégias diagnósticas e terapêuticas futuras.

REFERÊNCIAS

- 1- **Agadjanyan, M. G., N. N. Trivedi, S. Kudchodkar, M. BenneT, W. Levine, A. Lin, J. Boyer, D. Levy, K. E. Ugen, J. J. Kim, D. B. Weiner.** 1997. An HIV type 2 DNA vaccine induces cross-reactive immune responses against HIV type 2 and SIV. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **13(18)**:1561-72.
- 2- **Araóz, R, N. Honore, S. Cho, J. P. Kim, S. N. Cho, M. Monot, C. Demangel, P. J. Brennan, S. T. Cole.** 2006. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. *Infect Immun*. **74(1)**:175-82.
- 3- **Araújo, M. G.** 2003. Hanseníase no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36(3)**: 373-382.
- 4- **Barbas, C. F. III, D. R. Burton, J. K. ScoT, G. J. Silverman.** 2001. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Plain View, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 5- **Bhaskar, S., J. N. Banavaliker, M. Hanif.** 2003. Large-scale validation of a latex agglutination test for diagnosis of tuberculosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **39**: 235-239.
- 6- **Champsaur, H., M. FaTal-German, R. Arranhado.** 1988. Sensitivity And specificity of viral immunoglobulin M determination by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 328-332.
- 7- **Cole ST, K. Eiglmeier, J. Parkhill, K. D. James, N. R. Thomson, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, RuTer S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG.** 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. **409**: 1007-1011.
- 8- **Foss, N. T.** 1999. Hanseníase: aspéctos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. **75**: 113-119
- 9- **Garcia, V. E., M. F. Quiroga, M. T. Ochoa, L. Ochoa, V. Pasquinelli, L. Fainboim, L. M. Olivares, R. Valdez, D. O. Sordelli, G. Aversa, R. L. Modlin, P. A. Sieling.** 2001. Signaling lymphocytic activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine paTerns. *J. Immunol.* **167(10)**:5719-24.
- 10- **Geluk, A., M. R. Klein, K. L. Franken, K. E. van Meijgaarden, B. Wieles, K. C. Pereira, S. Buhrer-Sekula, P. R. Klatser, P. J. Brennan, J. S. Spencer, D. L. Williams, M. C. Pessolani, E. P. Sampaio, T. H. OTenhoff.** 2005. Postgenomic approach to identify novel Mycobacterium leprae antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. *Infect Immun*. **73(9)**: 5636-44.

- 11- **Ghosh, A. K., L. A. Moreira, M. Jacobs-Lorena.** 2002. Plasmodium-mosquito interactions, phage display libraries and transgenic mosquitoes impaired for malaria transmission. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **32(10)**:1325-31.
- 12- **Goulart, I. M., F. Figueiredo, T. Coimbra, N. T. Foss.** 1996. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am. J. Pathol.* **148(3)**: 911-7.
- 13- **Goulart, I. M., J. R. Mineo, N. T. Foss.** 2000. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. **122(3)**: 330-4.
- 14- **Goulart, I. M., G. O. Penna, G. Cunha.** 2002. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **35(4)**: 365-75.
- 15- **Grothaus, M. C., N. Srivastava, S. L. Smithson, T. Kieber-Emmons, D. B. Williams, G. M. Carlone, M. A. Westerink.** 2000. Selection of an immunogenic peptide mimic of the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A using a peptide display library. *Vaccine*. **18(13)**:1253-63.
- 16- **Kouzmitcheva, G. A., V. A. Petrenko, G. P. Smith.** 2001. Identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. *Clin Diagn Lab Immunol.* **8(1)**:150-60.
- 17- **Meyer, Cg, J. May, K. Stark.** 1998. Human leukocyte antigens in tuberculosis and leprosy. *Trends in Microbiology.* **6**: 148-154,
- 18- **Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica.** 2002. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde.
- 19- **Mistry, Y., D. B. Young, R. Mukherjee.** 1992. Hsp70 synthesis in Schwann cells in response to heat shock and infection with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* **60(8)**: 3105-10.
- 20- **Moschella, S I.** 2004. An update on diagnosis and treatment of leprosy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **51 (3)**: 417-26.
- 21- **Mustafa, A. S., K. E. Lundin, F. Oftung.** 1993. Human T cells recognize mycobacterial heat shock proteins in the context of multiple HLA-DR molecules: studies with healthy subjects vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* **61(12)**: 5294-301.
- 22- **Mustafa, A. S., K. E. Lundin, R. H. Meloen, T. M. Shinnick, F. Oftung.** 1999. Identification of promiscuous epitopes from the Mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein recognized by human CD4(+) T cells of the *Mycobacterium leprae* memory repertoire. *Infect. Immun.* **67(11)**: 5683-9.

- 23- **Nilsson, F., L. Tarli, F. Viti, D. Neri.** 2000. The use of phage display for the development of tumour targeting agents. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **43(2-3)**: 165-196.
- 24- **Parmley, S. F., G. P. Smith.** 1988. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene.* **73(2)**: 305-18.
- 25- **Quiroga, M. F., G. J. Martinez, V. Pasquinelli, M. A. Costas, M. M. Bracco, A. Malbran, L. M. Olivares, P. A. Sieling, V. E. Garcia.** 2004. Activation of signaling lymphocytic activation molecule triggers a signaling cascade that enhances Th1 responses in human intracellular infection. *J Immunol.* **173(6)**: 4120-9.
- 26- **Reece, S. T., G. Ireton, R. Mohamath, J. Guderian, W. Goto, R. Gelber, N. Groathouse, J. Spencer, P. Brennan, S. G. Reed.** 2006. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol.* **13(3)**:333-40.
- 27- **Rha, Y. H., C. Taube, A. Haczku, A. Joetham, K. Takeda, C. Duez, M. Siegel, M. K. Aydintug, W. K. Born, A. Dakhama, E. W. Gelfand.** 2002. Effect of microbial heat shock proteins on airway inflammation and hyperresponsiveness. *J. Immunol.* **169(9)**: 5300-7.
- 28- **Ridley, D. S., W. H. Jopling.** 1966. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* **34**: 255-273.
- 29- **Roy, S., A. Frodsham, B. Saha, S. K. Hazra, C. G. N. Mascie-Taylor, A. V. S. Hill.** 1999. Association of Vitamin D Receptor genotype with leprosy type. *The Journal of Infectious Diseases.* **179**: 187-191.
- 30- **Schaible, U. E., S. H. Kaufmann.** 2000. CD1 and CD1-restricted T cells in infections with intracellular bacteria. *Trends Microbiol.* **8(9)**:419-25.
- 31- **Scollard, D. M.** 1991. Inside the skin: the local immune and inflammatory milieu in leprosy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* **44**: 17-23.
- 32- **Sieling, P. A., R. L. Modlin.** 1993. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. *Springer Seminars in Immunopathology.* **13**: 413-426.
- 33- **Talhari, S., R. G. Neves.** 1997. *Dermatologia tropical – Hanseníase.* Gráfica Tropical, Manaus.
- 34- **Verhagen, C. E., T. C. T. M. van der Pouw Kraan, A. A. M. Buffing, M. A. Chand, W. R. Faber, L. A. Aarden, P. K. Das.** 1998. Type 1- and Type 2-Like 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,* **160**: 2380-2387.

- 35- **Vissa, V. D., P. J. Brennan.** 2001. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biology*. **2(8)**: 1023.1-1023.8.
- 36- **Xu, X., M. Jin, Z. Yu, H. Li, D. Qiu, Y. Tan, H. Chen.** 2005. Latex Agglutination Test for Monitoring Antibodies to Avian Influenza Virus Subtype H5N1. *Journal of Clinical Microbiolog.* **43(4)**: 1953–55.
- 37- **Yamamura M., K. Uyemura, R. J. Deans, K. Weinberg, T. H. Rea, B. R. Bloom, R. L. Modlin.** 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. **254**: 277-279.
- 38- **Yang, W. J., D. Shiuan.** 2003. Plaque reduction test: an alternative method to assess specific antibody response to pIII-displayed peptide of filamentous phage M13. *J. Immunol. Methods*. **276(1-2)**: 175-83.
- 39- **Yang, W. J., J. F. Lai, K. C. Peng, H. J. Chiang, C. N. Weng, D. Shiuan.** 2005. Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. *J. Immunol. Methods*. **304(1-2)**: 15-29.
- 40- **Zhang, T; C. A. Mauracher, L. A. Mitchell, A. J. Tingle.** 1992. Detection of Rubella Virus-Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA Antibodies by Immunoblot Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr., p. 824-830,

ANEXO I

ANEXO I.1: Relação dos 77 possíveis alvos antigênicos descritos na literatura que foi utilizada para busca nos resultados do Program BLAST.

Proteínas <i>M. leprae</i>	Referência
ML0007	GELUK et al (10)
ML0126	
ML0369	
ML0573	
ML0574	
ML0575	
ML0576	
ML0840	
ML0927	
ML1601	
ML1602	
ML1603	
ML1604	
ML1788	
ML1989	
ML1990	
ML2283	
ML2567	
ML2649	
ML0049	REECE et al (26)
ML0050	
ML0091	
ML0097	
ML0317	
ML0405	
ML1213	
ML1812	
ML2028	
ML2055	
ML2331	
ML2496	
ML2655	
ML0008	
ML0678	
ML0757	
ML0957	
ML1057	
ML1420	
ML1829	
ML1915	
ML1979	
ML2244	
ML2249	
ML2252	
ML2264	
ML0308	
ML0333	
ML0336	
ML0394	
ML0397	

ANEXO I.1: Continuação

ML0398	ARAÓZ et al (2)
ML0447	
ML0458	
ML0578	
ML1419	
ML1553	
ML2177	
ML2341	
ML2346	
ML2498	
ML0376	
ML0410	
ML0466	
ML0568	
ML0842	
ML1053	
ML1055	
ML1056	
ML1182	
ML1795	
ML1828	
ML2088	
ML2242	
ML2531	
ML2532	
ML2534	
ML2667	

ANEXO I.2: Proteínas de *M. leprae* relacionadas aos heptapeptídeos/mimotopos do grupo V com seus respectivos números de acesso no GenBank, identidades, scores, e-values e classificação funcional (projeto genômico *M leprae* disponível em www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/). Anotações em negrito = antígenos ou potenciais antígenos listados no Anexo I.1 e Chaperonas. (+) Aminoácidos com mesma propriedade química; () Ausência de Identidade; (-) Gaps

Heptapeptídeo	Proteína	Número de Acesso - GI	Identidades	Score / e-value	Classificação Funcional
VERPHST (direto)	hypothetical protein ML1254	15827641	V+_HPST	17.6 / 55	Proteína hipotética conservada
	2-isopropylmalate synthase (ML2324)	15828249	ERHP	17.2 / 74	Biossíntese de aminoácidos
	ygrp; B1937_F1_18	466967	VERH	16.8 / 100	Transcriptional regulator of heat shock gene
	72.2 KDa protein	4204747	+RHPS	16.8 / 100	Desconhecida
	hypothetical protein ML0564	15827215	VERH	16.8 / 100	Proteína hipotética conservada
	ribonuclease P (ML2712)	15828469	VERH	16.8 / 100	Degradação de macromoléculas
	hypothetical protein ML2678	15828444	+RHPS	16.8 / 100	Proteína hipotética conservada
	probable two-component system response regulator	15828317	VERH	16.8 / 100	Regulador traducional da ptn regX
	possible membrane protein (ML2595)	15828399	VERH	16.8 / 100	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	heat-inducible transcription repressor (ML0624)	15827254	VERH	16.8 / 100	Processos celulares: chaperonas / <i>heat shock</i>
	hypothetical protein MLCB1450.11	4154044	RHPS	16.3 / 134	Desconhecida
	possible membrane protein (ML0029)	15826890	RHPS	16.3 / 134	Proteína hipotética conservada
	hypothetical protein ML0799	15827348	RHPS	16.3 / 134	Proteína hipotética conservada
	RNA polymerase sigma factor (ML1022)	15827492	RHPS	16.3 / 134	Metabolismo de macromoléculas: Síntese e modificação de RNA e transcrição de DNA
	phosphatidylserine decarboxylase (ML0311)	15827078	RHPS	16.3 / 134	Proteína hipotética conservada
	short chain dehydrogenase (ML1740)	15827935	RHPS	16.3 / 134	Metabolismo energético: oxidoredutases e oxigenases
	u650o	699301	HPST	15.9 / 182	Desconhecida
putative mannose-6-phosphate isomerase (ML0765)	15827331	HPST	15.9 / 182	Degradação de compostos carbônicos	

ANEXO I.2: Continuação

VERPHST (direto)	putative ABC transporter protein, ATP-binding component (ML1726)	15827925	HPST	15.9 / 182	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos
	hypothetical protein ML1249	15827639	HPST	15.9 / 182	Proteína hipotética conservada
	possible amidotransferase (ML1573)	15827825	HPST	15.9 / 182	Outra função: miscelânea de Transferases
	probable glycoproteinase u229e	2145945	VE_HP	15.5 / 245	Peptidase
	putative O-sialoglycoprotein endopeptidase (ML0379)	15827108	VE_HP	15.5 / 245	Degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicopeptídeos
	probable integral membrane protein (ML1988)	15828076	RH_ST	15.1 / 328	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	acetyl/propionyl CoA carboxylase [beta] subunit (ML0731)	15827308	VE-----RHPST	14.6 / 441	Biossíntese de lipídeos: síntese de ácidos graxos e micólicos
	putative TetR-family transcriptional regulator (ML2677)	15828443	RH ST	14.2 / 591	Funções regulatórias: repressores/ ativadores
	hypothetical protein ML0791	15827343	RH_ST	14.2 / 591	Proteína hipotética conservada
	hypothetical protein ML1791	15827952	ER_PS / ER__ST	14.2 / 591 11.7 / 3402	Proteína hipotética conservada
TSPHREV (reverso)	hypothetical protein ML0070	15826915	SPHRE	19.7 / 13	Desconhecida
	hypothetical protein ML2535	15828366	T_PHRE	19.3 / 17	Proteína hipotética conservada
	polyketide synthase (ML2353)	15828269	TSP+RE	18.9 / 23	<i>Polyketide</i> e síntese peptídica não ribossomal
	putative methyltransferase (ML0324)	15827088	SPHR_V	17.2 / 74	Outra função: miscelânea de transferases
	probable exported protein (ML2195)	15828174	PHRE	17.2 / 74	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	hypothetical protein ML1624	15827856	PHRE	17.2 / 74	Proteína hipotética conservada
	hypothetical protein ML1120	15827553	PHRE	17.2 / 74	Proteína hipotética conservada
	hypothetical protein ML0205	15827010	HREV	16.8 / 100	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	putative ABC-transporter transmembrane protein (ML0335)	15827091	HREV	16.8 / 100	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras

ANEXO I.2: Continuação

TSPHREV (reverso)	Transaldolase (ML0582)	15827230	HREV	16.8 / 100	Metabolismo energético: via pentose fosfato
	uridylate kinase (ML1591)	15827835	HREV	16.8 / 100	Reações nucleotídicas/nucleosídicas
	hypothetical protein ML0430	15827137	SPHR	16.3 / 134	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	hypothetical protein ML2698	15828458	SPHR	16.3 / 134	Proteína hipotética conservada
	acyl-CoA synthase (ML2546)	15828369	SPHR	16.3 / 134	Degradação de ácido graxo
	probable integral membrane protein - ML1997	15828085	TSPH	15.9 / 180	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	hypothetical protein B2235_C2_195	2145787	TSPH	15.9 / 180	Desconhecida
	hypothetical protein ML0989	15827471	TSPH	15.9 / 180	Proteína hipotética conservada
	folylpolyglutamate synthase (ML1471)	15827773	TSPH	15.9 / 180	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores:ácido fólico
	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase (ML1679)	15827890	TSPH	15.9 / 180	Biossíntese lipídica
	subI; B1937_F1_11	466966	TS_H_EV	14.6 / 441	Desconhecida
	Putative Cation-transporting P-type ATPase A (ML1987)	15828075	TS_HR_V	14.6 / 441	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras de cátions
	putative sulphate-binding protein (ML0615)	15827252	TS_H_EV	14.6 / 441	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras de ânions
	cation-transporting ATPase (EC 3.6.1.-) ctpA, P-type	7436394	TS_HR_V	14.6 / 441	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos
	polyphosphate glucokinase (ML1023)	15827493	TS_HR	14.2 / 591	Degradação de compostos carbônicos
SIIRWH (direto)	hypothetical protein ML1098	15827541	SIII_WH	21.0 / 5.3	Proteína hipotética conservada
	L518_C3_195	467197	III_WH	18.5 / 31	Desconhecida
	hypothetical protein ML2347	15828263	III_WH	18.5 / 31	Envelope celular: polissacrídeos, lipopolissacarídeos, proteínas e antígenos de superfície
	u1764aa	699186	IIIR	16.8 / 100	Desconhecida

ANEXO I.2: Continuação

SIIIRWH (direto)	putative ABC transporter ATP-binding component (ML0114)	15826947	IIIR	16.8 / 101	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	acyl-CoA synthase (ML2546)	15828369	SIII	15.9 / 180	Degradação de ácido graxo
	hypothetical protein MLCB637.31	2414557	SI_IR--W	14.6 / 434	Desconhecida
	putative acyltransferase	4200256	II-RW	14.6 / 434	Metabolismo lipídico
	probable iron-sulphur-binding reductase (ML2501)	15828353	II-RW	14.6 / 434	Metabolismo energético: oxidoredutases e oxigenases
	conserved integral membrane protein ML2670	15828440	II-RW	14.6 / 434	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	DNA gyrase A subunit	1122296	SI_IR	13.8 / 782	Replicação, recombinação e reparo de DNA
	putative monooxygenase (ML0065)	15826910	SI__RW	13.8 / 782	Metabolismo energético: oxidoredutases e oxigenases
HWRIIS (reverso)	thiamine monophosphate kinase (ML1676)	15827887	WRII	18.9 / 23	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores:tiamina
	low-affinity inorganic phosphate transporter (ML2260)	15828208	WRII	18.9 / 23	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras de ânions
	hypothetical protein ML0126	15826957	WRII	18.9 / 23	Desconhecida
	probable exported protein (ML2195)	15828174	RIII	16.8 / 100	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	hypothetical protein ML0580	15827229	RIII	16.8 / 100	Proteína hipotética conservada
	putative hydrolase (ML2704)	15828462	RIII	16.8 / 100	Degradação de macromoléculas: polissacarídeos, lipopolissacarídeos e fosfolipídeos
	probable aminopeptidase (ML1486)	15827782	WRI+	16.3 / 134	Degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicopeptídeos
	B1620_F2_68	466955	IIIS	15.9 / 180	Desconhecida
	putative transporter protein (ML0397)	15827122	IIIS	15.9 / 180	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras
	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase (ML1655)	15827873	WR_II	15.5 / 241	Biossíntese de lipídeos: síntese de ácidos graxos e micólicos

ANEXO I.2: Continuação

HWRIIS (reverso)	beta-ketoacyl-ACP synthase	3150229	WR_II	15.5 / 241	Biossíntese de lipídeos: síntese de ácidos graxos e micólicos
	hypothetical protein ML2452	15828327	WR_+IS	14.6 / 434	Desconhecida
	hypothetical protein MLCB1779.12c	11356575	WR_ _IS	14.2 / 583	Desconhecida
	hypothetical protein ML2178	15828167	RI_IS	13.8 / 782	Desconhecida
	DNA polymerase III subunit beta (ML0002)	15826867	RI_IS	13.8 / 782	Metabolismo de macromoléculas:replicação, reparo, recombinação e modificação /restrição de DNA
LFPAMHQ (dfireto)	threonyl-tRNA synthetase (ML0456)	15827147	FP_MH	18.0 / 42	Síntese e modificação de macromoléculas: aminoacil tRNA sintase
	dihydropteroate synthase (ML1063)	15827518	PAMH+	17.6 / 56	Bissíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores:ácido fólico
	hypothetical protein MLCB1883.17c	3063881	FPAM	17.6 / 56	Desconhecida
	hypothetical protein ML2566	15828379	FPAM	17.6 / 56	Proteína hipotética conservada
	phosphopantothenoylecysteine synthase/decarboxylase (ML0543)	15827199	PAMH	17.6 / 56	Metabolismo energético: oxidoredutases e oxigenases
	phosphate transport system ABC transporter ML2189	15828171	FPAM	17.6 / 56	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras de ânions
	possible lipoprotein (ML2446)	15828322	FP_+HQ	16.8 / 101	Envelope celular: polissacrídeos, lipopolissacarídeos, proteínas e antígenos de superfície
	membrane-bound component of phosphate transport ML2094	15828131	LF_AM	16.3 / 136	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras de ânions
	unnamed protein product	2959414	LFPA	15.9 / 182	Desconhecida
	putative penicillin-binding protein	2959415	LFPA	15.9 / 182	Envelope celular: Provável proteína ligante de penicilina da membrana externa
	hypothetical protein ML0589	15827235	LFPA	15.9 / 182	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	hypothetical protein ML1300	15827671	LFPA	15.9 / 182	Proteína hipotética conservada
probable binding-protein dependent transport protein ML1123	15827556	LFPA	15.9 / 182	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras de aminoácidos	

ANEXO I.2: Continuação

LFPAMHQ (dfireto)	hypothetical protein ML1939	15828044	LFPA	15.9 / 182	Proteína hipotética conservada
	putative oxidoreductase ML0418	15827130	LFPA	15.9 / 182	Metabolismo energético: oxidorreduções e oxigenases
	probable integral membrane protein (ML1582)	15827830	LF--PAM	15.9 / 182	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	penicillin-binding protein ML2688	15828452	LFPA	15.9 / 182	Envelope celular: Mureína e peptidoglicanos
	leucyl aminopeptidase	2342608	LFPA	15.9 / 182	Aminopeptidase citosólica
	putative ABC transporter ATP-binding protein ML0595	15827241	LF_AM	14.6 / 434	Processo Celular: Proteínas ligantes ou de transporte
	putative membrane-associated serine protease (ML2298)	15828230	LF_AM	14.6 / 434	Degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicopeptídeos
QHMAPFL (reverso)	hypothetical protein ML0192	15827001	MAPFL	20.6 / 7.1	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	methionine aminopeptidase (ML1831)	15827978	HM_PFL	20.6 / 7.1	Degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicopeptídeos
	hypothetical protein ML0152	15826975	QHMA	17.6 / 55	Desconhecida
	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase (ML0911)	15827431	MAPF	17.6 / 55	Envelope celular: Mureína e peptidoglicanos
	possible conserved integral membrane protein ML1338		MAPF	17.6 / 55	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	biotin carboxyl carrier protein	581342	APFL	15.9 / 180	Metabolismo lipídico
	hypothetical protein ML2264	15828211	APFL	15.9 / 180	Desconhecida
	probable membrane transport protein; 46 kDa membrane protein (ML1036)	15827501	APFL	15.9 / 180	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras de ânions
	possible hydrolase (ML1632)	15827861	APFL	15.9 / 180	Envelope celular: polissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas e antígenos de superfície
	hypothetical protein ML0239	15827035	APFL	15.9 / 180	Proteína hipotética conservada
acetyl/propionyl CoA carboxylase [alpha] subunit (ML0726)	15827304	APFL	15.9 / 180	Biossíntese de lipídeos: síntese de ácidos graxos e micólicos	

ANEXO I.2: Continuação

QHMAPFL (reverso)	hypothetical protein ML1488	15827783	M+PF	15.1 / 324	Outra função: miscelânea de transferases
	putative ferredoxin-dependent glutamate synthase (ML0061)	15826907	+_MAP	14.6 / 434	Biossíntese de aminoácidos: família glutamato
	putative UDP-galactopyranose mutase (ML0092)	15826927	QH_AP	14.2 / 583	Envelope celular: Mureína e peptidoglicanos
	succinyl-CoA synthetase alpha subunit (ML0156)	15826979	MA_FL	13.8 / 782	Metabolismo energético: ciclo de Krebs
	hypothetical protein ML0903	15827423	MA_FL	13.8 / 782	Proteína hipotética conservada
	protease IV, signal peptide peptidase ML1839	15827982	M+_FL	13.8 / 782	Degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicopeptídeos
METHPST (direto)	hypothetical protein MLC1351.21c	2065232	MET_PS	19.3 / 17	Desconhecida
	acyl-CoA synthase (ML1346)	15827700	MET_PS	19.3 / 18	Degradação de ácidos graxos
	hypothetical protein ML2463	15828333	ETHP	16.8 / 100	Proteína hipotética conservada
	putative mannose-6-phosphate isomerase (ML0765)	15827331	++_HPST	16.3 / 134	Degradação de compostos carbônicos
	u650o	699301	HPST	15.9 / 180	Desconhecida
	hypothetical protein MLCB458.09c	4539130	HPST	15.9 / 180	Desconhecida
	pksB; L518_F1_1	467198	THPS	15.9 / 180	Metabolismo secundário: biossíntese, transporte e catabolismo
	putative ABC transporter protein, ATP-binding component (ML1726)	15827925	HPST	15.9 / 180	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos
	hypothetical protein ML1249	15827639	HPST	15.9 / 182	Proteína hipotética conservada
	probable ATP-dependent DNA helicase	11267500	THPS	15.9 / 180	Metabolismo de macromoléculas: replicação, reparo, recombinação e modificação /restrição de DNA
	hypothetical protein ML1254	15827641	HPST	15.9 / 180	Proteína hipotética conservada
	indole-3-glycerol-phosphate synthase (ML1271)	15827653	THPS	15.9 / 180	Biossíntese de aminoácidos: família de aminoácidos aromáticos

ANEXO I.2: Continuação

METHPST (direto)	hypothetical protein ML1096	15827540	THPS	15.9 / 180	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	ATP-dependent DNA helicase (ML1671)	15827885	THPS	15.9 / 180	Metabolismo de macromoléculas: replicação, reparo, recombinação e modificação /restrição de DNA
	cystathionine [beta]-synthase (ML2396)	15828289	THPS	15.9 / 180	Biossíntese de aminoácidos: família das serinas
	aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase (ML2551)	15828372	M+TH	15.5 / 241	Outra função: resistência e produção de antibióticos
	putative ABC transporter ATP-binding protein (ML0590)	15827236	M+TH	15.5 / 241	Processo Celular: Proteínas ligantes ou de transporte
	alanyl-tRNA synthetase (ML0512)	15827174	M+TH	15.1 / 324	Síntese e modificação de macromoléculas: Aminoacil tRNA sintase e suas modificações
	cystathionine gamma-synthase (ML2394)	15828287	M_TH_ST	15.1 / 324	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato
	hypothetical protein ML1098	15827541	M+_HP	14.6 / 441	Proteína hipotética conservada
	faTy acid synthase (ML1191)	15827605	TH_ST	14.6 / 441	Biossíntese de lipídeos: síntese de ácidos graxos e micólicos
	B1549_C3_230	466920	ET+PS	14.2 / 591	Desconhecida
	50S ribosomal protein L10 (ML1896)	15828013	M+_HP T	14.2 / 591	Síntese e modificação de macromoléculas: síntese e modificação de proteínas ribossomais
	50S ribosomal protein L13 (ML0364)	15827097	M+_HP	14.2 / 591	Síntese e modificação de macromoléculas: síntese e modificação de proteínas ribossomais
	putative cation-transporting ATPase (ML1987)	15828075	MET__ST	13.8 / 793	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos
	putative amino acid decarboxylase (ML0524)	15827186	TH_ST	13.8 / 793	Degradação de aminas e aminoácidos

ANEXO I.2: Continuação

TSPHTEM (reverso)	probable integral membrane protein (ML1997)	15828085	TSPHT_M	21.8 / 2.9	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	Elongation factor Tu (EF-Tu) (ML1877)	15828004	T+PHTE	19.7 / 13	Síntese e modificação de macromoléculas: modificação e tradução protéica
	phosphopantothenoylcysteine synthase/decarboxylase (ML0543)	15827199	HTEM	18.0 / 41	Metabolismo energético: oxidoredutases e oxigenases
	hypothetical protein ML0607	15827249	PHTE+	17.2 / 74	Proteína hipotética conservada
	possible serine protease (ML1078)	15827528	PHTE+	17.2 / 74	Degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicopeptídeos
	possible exported protein (ML2144)	15828152	PHTE	16.8 / 100	Envelope celular: polissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas e antígenos de superfície
	putative transcription factor (ML0320)	15827084	PHTE	16.8 / 100	Funções regulatórias: repressores/ativadores
	hypothetical protein MLCB637.24c	2414550	TSPH	15.9 / 180	Desconhecida
	hypothetical protein ML0989	15827471	TSPH	15.9 / 180	Proteína hipotética conservada
	folylpolyglutamate synthase (ML1471)	15827773	TSPH	15.9 / 180	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores:ácido fólico
	hypothetical protein B2235_C2_195	2145787	TSPH	15.9 / 180	Desconhecida
	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase (ML1679)	15827890	TSPH	15.9 / 180	Biossíntese lipídica
	tRNA pseudouridine synthase A (ML1955)	15828057	SPHT	15.9 / 180	Síntese e modificação de macromoléculas: transcrição do DNA, síntese e modificação de RNA
	hypothetical protein ML2170	15828162	HT+M	15.5 / 241	Desconhecida
	putative mycocerosic synthase (ML0139)	15826970	SP__EM	13.8 / 782	<i>Polyketide</i> e síntese peptídica não ribossomal
	hypothetical protein ML1536	15827806	TS_HT	13.8 / 782	Proteína hipotética conservada
hypothetical protein ML1921	15828032	TS--PH_+M	13.8 / 782	Proteína hipotética conservada	

ANEXO I.3: Proteínas de *M. leprae* relacionadas aos heptapeptídeos/mimotopos do grupo T com seus respectivos números de acesso no GenBank, identidades, scores e e-values e classificação funcional (projeto genômico *M. leprae* disponível em www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/). Anotações em negrito = antígenos ou potenciais antígenos listados no Anexo I.1 e Chaperonas. (+) Aminoácidos com mesma propriedade química; () Ausência de Identidade; (-) Gaps

Heptapeptídeo	Proteína	Número de Acesso - GI	Identidades	Score / e-value	Classificação Funcional *
Consenso KNPTMG (direto)	putative UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (ML0249)	15827045	KN_T+GT	16.8 / 101	Envelope celular: Mureína e peptidoglicanos
	pantoate-beta-alanine ligase (ML0230)	15827027	PTMG	16.8 / 101	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores:pantotenato
	Cell division protease ftsH homolog (ML0222)	14423720	TMGT	16.3 / 136	Processo celular: divisão celular
	isocitrate dehydrogenase [NADP] (ML2672)	15828442	TMGT	16.3 / 136	Metabolismo energético: ciclo de Krebs
	faTy acid synthase (ML1191)	15827605	TMGT	16.3 / 136	Biossíntese de lipídeos: síntese de ácidos graxos e micólicos
	hypothetical protein ML0154	15826977	TMGT	16.3 / 136	Proteína hipotética conservada
	Putative membrane protein mmpL10 (ML1231)	6225692	TMGT	16.3 / 136	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (ML0735)	15827312	KNPT	15.9 / 182	Purinas, pirimidinas e nucleosídeos e nucleotídeos: biossíntese de ribonucleotídeo purina
	hypothetical protein ML1752	15827938	PT+GT	15.5 / 245	Proteína hipotética conservada
	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (ML1583)	15827831	PT--MGT	15.1 / 328	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores: Menaquinona, PQQ, ubiquinona e outros terpenoides
	probable multidrug resistance pump (ML2084)	15828127	KN_TM	15.1 / 328	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras: efluxo protéico
	hypothetical protein ML0081	15826922	PT+GT	14.6 / 441	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas

ANEXO I.3: Continuação

Consenso KNPTMGT (direto)	3-isopropylmalate dehydrogenase (ML1691)	15827899	NP+M	14.6 / 441	Biossíntese de aminoácidos: síntese de aminoácidos ramificados
	hypothetical protein MLCL536.35c	2398714	PT+GT	14.6 / 441	Desconhecida
	hypothetical protein ML1389	15827724	PT+GT	14.6 / 441	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	polyketide synthase (ML2355)	15828271	+PT_GT	13.8 / 793	<i>Polyketide</i> e síntese peptídica não ribossomal
Consenso TGMPNK (reverso)	hypothetical protein ML0095	15826930	MTPN	17.6 / 56	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	u2266o	699203	GMTP	16.8 / 101	Desconhecida
	u1756y	699114	GMTP	16.8 / 101	Desconhecida
	hypothetical protein ML0405	15827124	GMTP	16.8 / 101	Proteína hipotética conservada
	signal recognition particle (ML1622)	15827854	GMTP	16.8 / 101	Processo celular: secreção protéica e peptídica
	putative exported p60 protein homologue (ML1812)	15827970	GMTP	16.8 / 101	Outra função: Virulência
	faTy acid synthase (ML1191)	15827605	GMTP	16.8 / 101	Biossíntese de lipídeos: síntese de ácidos graxos e micólicos
	hypothetical protein ML2020	15828093	GMTP	16.8 / 101	Proteína hipotética conservada
	sec-independent translocase (ML1079)	15827529	GMTP	16.8 / 101	Envelope celular: polissacrídeos, lipopolissacáridos, proteínas e antígenos de superfície
	B2168_F2_93	467071	TGMT	16.3 / 136	Desconhecida
	probable transmembrane protein (ML2400)	15828290	TGMT	16.3 / 136	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	28 KDa antigen precursor (ML0091)	15826926	TG+TP	15.5 / 245	Envelope celular: polissacrídeos, lipopolissacáridos, proteínas e antígenos de superfície
	hypothetical protein ML1804	15827962	TG+TP	15.5 / 245	Proteína hipotética conservada
possible protease (ML1538)	15827808	TG+TP	14.6 / 441	Degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicopeptídeos	

ANEXO I.3: Continuação

Consenso TGMPNK (reverso)	putative molybdenum cofactor biosynthesis protein (ML0177)	15826990	TG+TP	14.6 / 441	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores: molibdopterin
	Cation-transporting P-type ATPase A (ML1987)	13637888	TGM+----- PN	14.2 / 591	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras de cátions
	iron dependent repressor (ML1013)	15827486	TG+_PN	13.8 / 793	Funções regulatórias: repressores/ativadores
	hypothetical protein ML2604	15828405	MT_NK	13.8 / 793	Proteína hipotética conservada
Consenso ETHPTT (direto)	possible apolipoprotein N-acyltransferase (ML1441)	15827756	THPT	19.3 / 15	Metabolismo de macromoléculas: Síntese e modificação de macromoléculas: tradução e modificação de proteínas
	hypothetical protein ML2463	15828333	ETHP	16.8 / 86	Proteína hipotética conservada
	hypothetical protein MLCL383.25	2222704	HPT	16.3 / 115	Desconhecida
	dihydrolipoamide dehydrogenase (ML2387)	15828281	THPT	16.3 / 115	Metabolismo energético: miscelânea de oxireductases e oxigenases
	putative transferase (ML1715)	15827919	THPT	16.3 / 115	Outra função: miscelânea de Transferases
	possible secreted protein (ML2450)	15828325	THPT	16.3 / 115	Envelope celular: polissacrídeos, lipopolissacáridos, proteínas e antígenos de superfície
	putative secreted protein (ML0643)	15827268	THPT	16.3 / 115	Envelope celular: polissacrídeos, lipopolissacáridos, proteínas e antígenos de superfície
	glycine dehydrogenase (ML2072)	15828118	THPT	16.3 / 115	Metabolismo intermediário central: Geral
	probable anion transporter protein (ML2306)	13093931	THPT	16.3 / 115	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras de ânions
	hypothetical protein ML2687	15828451	+TH_T	15.5 / 207	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
Consenso TTPHTE (reverso)	elongation factor Tu (ML1877)	15828004	TPHTE	22.7 / 1.4	Síntese e modificação de macromoléculas: tradução e modificação de proteínas
	hypothetical protein ML0607	15827249	PHTE	16.8 / 86	Proteína hipotética conservada

ANEXO I.3: Continuação

Consenso TTPHTE (reverso)	possible exported protein (ML2144)	15828152	PHTE	16.8 / 86	Envelope celular: polissacrídeos, lipopolissacarídeos, proteínas e antígenos de superfície
	putative transcription factor (ML0320)	15827084	PHTE	16.8 / 86	Funções regulatórias: repressores/ativadores
	possinble serine protease (ML1078)	15827528	PHTE / TX+TE	16.8 / 86 12.9 / 1207	Degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicopeptídeos
	trx	699188	TP_TE	16.3 / 115	Desconhecida
	B229_C1_175	467110	TPH	16.3 / 115	Desconhecida
	hypothetical protein ML0081	15826922	TPH	16.3 / 115	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	hypothetical protein ML0840	15827371	TPH	16.3 / 115	Desconhecida
	hypothetical protein MLCB2533.03c	4200261	TPHT	16.3 / 115	Desconhecida
	hypothetical protein ML0383	15827112	TPH	16.3 / 115	Proteína hipotética conservada
	hypothetical protein ML1306	15827676	TPHT	16.3 / 115	Proteína hipotética conservada
	u2266d	699214	T_HT	15.1 / 278	Desconhecida
GTP-binding protein Era (ML0631)	15827260	T_HT	14.2 / 500	Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos: miscelânea de reações nucleosídicas e nucleotídicas	
PSPLKSS (direto)	hypothetical protein ML1249	15827639	PSPL_SS	18.9 / 23	Proteína hipotética conservada
	uracil-DNA glycosylase (ML1675)	15827886	PSPL_+S	16.3 / 134	Síntese e modificação de macromoléculas: Replicação do DNA, reparo, recombinação e restrição/modificação

ANEXO I.3: Continuação

PSPLKSS (direto)	putative acyltransferase	4200256	PSPL	16.3 / 134	Desconhecida
	hypothetical protein ML0094	15826929	PSPL	15.5 / 241	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	putative O-sialoglycoprotein endopeptidase (ML0379)	15827108	PSPL	15.5 / 241	Degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicopeptídeos
	hypothetical protein ML1244	15827635	PSPL	15.5 / 241	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	putative mycocerosic synthase (ML0139)	15826970	PSPL	15.5 / 241	Polyketide e síntese peptídica não ribossomal
	putative glycosyl transferase (ML2348)	15828264	PSPL	15.5 / 241	Outra função: miscelânea de Transferases
	conserved integral membrane protein (ML2670)	15828440	PSPL	15.5 / 241	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	tryptophan synthase subunit beta M11272	15827654	PSPL	15.5 / 241	Biossíntese de aminoácidos: família dos aminoácidos aromáticos
	elongation factor EF-2 (ML1878)	15828005	PSPL	15.5 / 241	Metabolismo de macromoléculas: Síntese e modificação de macromoléculas: tradução e modificação de proteínas
	hypothetical protein ML2151	15828154	PSPL	15.5 / 241	Proteína hipotética conservada
	u1740ag	699266	SPLK	15.1 / 324	Desconhecida
	hypothetical protein MLCB373.10	4455697	PLKS	15.1 / 324	Desconhecida
	heat shock protein 90 (ML1623)	15827855	PLKS	15.1 / 324	Processos celulares: chaperonas / heat shock
DNA-directed RNA polymerase beta' subunit (ML1890)	15828009	PLKS	15.1 / 324	Metabolismo de macromoléculas: Síntese e modificação de macromoléculas: Síntese de RNA, modificação de RNA e transcrição do DNA	

ANEXO I.3: Continuação

PSPLKSS (direto)	Hsp70 cofactor (ML2495)	15828349	PLKS	15.1 / 324	Processos celulares: chaperonas / heat shock
	hypothetical protein ML1802	15827960	PSP+_SS	15.1 / 324	Proteína hipotética conservada
	argininosuccinate synthase (ML1412)	15827742	SPLK	15.1 / 324	Biossíntese de aminoácidos: família glutamato
	hypothetical protein ML2537	15828368	S_LKSS	15.1 / 324	Proteína hipotética conservada
	probable helicase, Ski2 subfamily (ML1333)	15827694	PL+SS	14.6 / 434	Metabolismo de macromoléculas: Síntese e modificação de macromoléculas: Replicação do DNA, reparo, recombinação e restrição/modificação
	putative alcohol dehydrogenase (Zn dependent) (ML1784)	15827950	LKSS	14.2 / 583	Metabolismo energético: miscelânea de oxireductases e oxigenases
	hypothetical protein ML0845	15827375	PS_LK	14.2 / 583	Proteína hipotética conservada
	putative nitrite extrusion protein (ML0844)	15827374	LKSS	14.2 / 583	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras de ânions
	u1937b; B1937_F1_4	466974	PS_LK	13.8 / 782	Desconhecida
	hypothetical protein ML0605	15827247	PS_LK	13.8 / 782	Proteína hipotética conservada
SSKLPS (reverso)	hypothetical protein ML0137	15826968	SKLPS	17.6 / 55	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	DNA polymerase III subunits gamma and tau ML2335	15828258	SSKL_+P	16.8 / 100	Metabolismo de macromoléculas: Síntese e modificação de macromoléculas: Replicação do DNA, reparo, recombinação e restrição/modificação
	hypothetical protein MLCL581.20	2193905	LPSP	15.5 / 241	Desconhecida
	biotin carboxyl carrier protein	581342	LPSP	15.5 / 241	Desconhecida

ANEXO I.3: Continuação

SSKLSP (reverso)	traX	699321	LPSP	15.5 / 241	Desconhecida
	putative glycosyl transferase ML2348	15828264	LPSP	15.5 / 241	Outra função: miscelânea de Transferases
	acetyl/propionyl CoA carboxylase [alpha] subunit ML0726	15827304	LPSP	15.5 / 241	Biossíntese de lipídeos: síntese de ácidos graxos e micólicos
	thymidylate kinase ML0772	15827333	LPSP	15.5 / 241	Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos: metabolismo de 2'-deoxirribonucleotídeo
	hypothetical protein ML0591	15827237	SS--KLPS	15.5 / 241	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	hypothetical protein ML2258	15828206	LPSP	15.5 / 241	Proteína hipotética conservada
	faTy acid synthase ML1191	15827605	LPSP	15.5 / 241	Biossíntese de lipídeos: síntese de ácidos graxos e micólicos
	hypothetical protein ML0407	15827126	LPSP	15.5 / 241	Proteína hipotética conservada
	elongation factor EF-2 ML1878	15828005	LPSP	15.5 / 241	Metabolismo de macromoléculas: Síntese e modificação de macromoléculas: tradução e modificação de proteínas
	hypothetical protein ML0569	15827218	LPSP	15.5 / 241	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	preprotein translocase SecY ML1833	15827980	LPSP	15.5 / 241	Processo celular: proteínas e peptídeos de secreção
	hypothetical protein	2370275	SKLP	15.1 / 324	Desconhecida
	phoW	699225	SKLP	15.1 / 324	Desconhecida
	hypothetical protein MLCB1779.38	2326706	SKLP	15.1 / 324	Desconhecida

ANEXO I.3: Continuação

SSKLSP (reverso)	L308_f3_120	467190	SKLP	15.1 / 324	Desconhecida
	hypothetical protein ML1289	15827663	KLPS	15.1 / 324	Proteína hipotética conservada
	phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) (ML2624)	15828418	KLPS / KL_SP	15.1 / 324 11.7 / 3402	Metabolismo intermediário central: Gliconeogênese
	glycerol-3-phosphate acyltransferase (ML1246)	15827637	KLPS	15.1 / 324	Biossíntese de lipídeos: aciltransferase, micoliltransferases e síntese de fosfolpídeos
	hypothetical protein ML1249	15827639	SKLP	15.1 / 324	Proteína hipotética conservada
	hypothetical protein ML1782	15827948	SKLP	15.1 / 324	Proteína hipotética conservada
	hypothetical protein ML1547	15827814	SKLP	15.1 / 324	Proteína hipotética conservada
	pyrroline-5-carboxylate reductase (ML2430)	15828312	SKLP	15.1 / 324	Biossíntese de aminoácidos: família glutamato
	hypothetical protein ML0895	15827416	SKLP	15.1 / 324	Proteína hipotética conservada
	hypothetical protein ML2113	15828135	SKLP	15.1 / 324	Proteína hipotética conservada
	ATP synthase subunit C (ML1144)	15827575	SKLP	15.1 / 324	Metabolismo energético: força próton motriz de ATP
	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit II (ML2211)	15828188	KLPS	15.1 / 324	Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos: biossíntese de purina
	succinate dehydrogenase (ML0697)	15827293	SKLP	15.1 / 324	Metabolismo energético: ciclo de Krebs
	putative TetR-family transcriptional regulator (ML0815)	15827358	SSKL	14.2 / 583	Funções regulatórias: repressores/ativadores
aspartate aminotransferase (ML2502)	15828354	SSKL	14.2 / 583	Biossíntese de aminoácidos: família aspartato	

ANEXO I.3: Continuação

SSKLPSP (reverso)	Cell division protease ftsH homolog (ML0222)	14423720	SSKL	14.2 / 583	Processo celular: divisão celular
	hypothetical protein ML0473	15827155	SSKL	14.2 / 583	VI Desconhecida
	possible conserved membrane protein (ML1667)	15827883	SSKL	14.2 / 583	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	polyketide synthase (ML2355)	15828271	SSKL	14.2 / 583	Polyketide e síntese peptídica não ribossomal
	PPE-family protein (ML1828)	15827976	SS__PSP	13.8 / 782	Família PE e PPE: família PPE
SLHRFNS (direto)	hypothetical protein ML0096	15826931	LHRF_S	17.6 / 55	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	putative exported p60 protein homologue ML1812	15827970	HRF+S	17.6 / 55	Outra: Virulência
	u0247d	467161	LHRF	17.2 / 74	Desconhecida
	probable aminopeptidase ML1486	15827782	LHRF	17.2 / 74	Metabolismo de macromoléculas: degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicoproteínas
	tyrosine recombinase ML1365	15827711	LHRF	17.2 / 74	IS elements, Repeated sequences, and Phage: Phage-related functions
	hypothetical protein ML0152	15826975	LH+FN	17.2 / 74	Desconhecida
	hypothetical protein ML0958	15827458	LHRF	17.2 / 74	Funções relativas a fagos: outras proteínas de membrana
	putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase ML0074	15826919	LHRF	17.2 / 74	Metabolismo intermediário central: Geral
	tryptophanyl-tRNA synthetase ML0686	15827289	RFNS	16.8 / 100	Metabolismo de macromoléculas: síntese e modificação de macromoléculas: sintases aminoacil tRNA e suas modificações

ANEXO I.3: Continuação

SLHRFNS (direto)	conserved large membrane protein ML1231	15827629	SL_RFN	16.8 / 100	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	hypothetical protein MLCB2407.09	3150100	RFNS	16.3 / 134	Desconhecida
	possible regulatory protein ML2341	15828261	RFNS	16.3 / 134	Funções regulatórias: repressores/ativadores
	putative methyltransferase ML0551	15827203	RFNS	16.3 / 134	Outra: miscelânea de transferases
	u1756g	699133	SLHR	15.9 / 180	Desconhecida
	hypothetical protein ML0093	15826928	SLHR	15.9 / 180	Proteína hipotética conservada
	putative hydrolase ML2303	15828235	SLHR	15.9 / 180	Miscelânea de fosfatases, liases e hidrolases
	possible cell division protein ML1629	15827858	SLHR	15.9 / 180	Processo celular: Divisão celular
	succinyl-diaminopimelate desuccinylase ML1059	15827516	SLHR	15.9 / 180	Biossíntese de aminoácidos: família aspartato
	u296m	699361	HRF+	15.1 / 324	Desconhecida
	glucose-1-phosphate thymidyltransferase ML2503	15828355	SL_RF	15.1 / 324	Metabolismo intermediário central: açúcar de ácidos nucleicos
	molybdopterin biosynthesis protein MoeB ML0817	15827360	SL+RF	14.6 / 434	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores: molibdopterin
possible oxidoreductase ML2631	15828422	SL_RF+	13.8 / 782	Metabolismo energético: Miscelânea de oxidoredutases e oxigenases	
SNFRHLS (reverso)	hypothetical protein MLCB2407.16c	3150104	NFRH	17.6 / 55	Desconhecida
	possible conserved integral membrane protein ML1338	15827696	NFRH	17.6 / 55	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas

ANEXO I.3: Continuação

SNFRHLS (reverso)	leucyl-tRNA synthetase ML0032	15826893	NFRH	17.6 / 55	Metabolismo de macromoléculas: síntese e modificação de macromoléculas: sintases aminoacil tRNA e suas modificações
	putative sugar-nucleotide dehydratase ML0204	15827009	FRHL	17.2 / 74	Metabolismo intermediário central: açúcar de ácidos nucleicos
	hypothetical protein ML0116	15826949	FRHL	17.2 / 74	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	alanyl-tRNA synthetase ML0512	15827174	FRHL	17.2 / 74	Metabolismo de macromoléculas: síntese e modificação de macromoléculas: sintases aminoacil tRNA e suas modificações
	hypothetical protein ML2678	15828444	FRHL	17.2 / 74	Proteína hipotética conservada
	probable zinc metalloprotease ML2613	15828409	FRHL	17.2 / 74	Metabolismo de macromoléculas: degradação de macromoléculas: proteínas, peptídeos e glicoproteínas
	hypothetical protein MLCL383.21	2222700	RHLS	15.9 / 180	Desconhecida
	unknown	2076633	SN_R_LS	15.9 / 180	Desconhecida
	tnrA	699140	RHLS	15.9 / 180	Desconhecida
	pksB; L518_F1_1	467198	RHLS	15.9 / 180	Desconhecida
	probable peptide synthase ML1996	15828084	RHLS	15.9 / 180	<i>Polyketide</i> e síntese peptídica não ribossomal
	ferredoxin, ferredoxin-NADP reductase ML2134	15828144	RHLS	15.9 / 180	Metabolismo energético: Respiração: transporte de elétrons
	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (ML1307)	15827677	RHLS	15.9 / 180	Biossíntese de aminoácidos: família do aspartato

ANEXO I.3: Continuação

SNFRHLS (reverso)	possible transcriptional regulator ML1753	15827939	FR_LS	15.1 / 324	Funções regulatórias: repressores/ ativadores
	putative acyltransferase	4200256	+FRH	15.1 / 324	Desconhecida
	hypothetical protein ML0162	15826984	+FRH	15.1 / 324	VI Unknowns
	conserved integral membrane protein (ML2670)	15828440	+FRH	15.1 / 324	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
	alpha-ketoglutarate decarboxylase ML1095	15827539	FR_LS / SN+_HL	13.8 / 782 12.9 / 1408	Metabolismo energético: ciclo TCA

ANEXO I.4: Antígenos ou potenciais antígenos de *M. leprae* relacionadas aos heptapeptídeos/mimotopos, eluídos com tampão glicina, dos grupos V e T com seus respectivos números de acesso no GenBank, identidades, scores, e-values e classificação funcional segundo o projeto genômico *M leprae* disponível em www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/. Anotações em vermelho = mimotopos do grupo T e em azul = mimotopos do grupo V. (+) Aminoácidos com mesma propriedade química; () Ausência de Identidade; (-) Gaps

Heptapeptídeo	Proteína	Número de Acesso - GI	Identidades	Score / e-value	Classificação Funcional
ATPTHMP	PPE-family protein ML1828	15827976	TPT_MP	18.9 / 23	Motivo celular e secreção
YLPQTKQ			YL_QT	15.9 / 180	
NTL PSTK			LPST	15.1 / 324	
STKMLPR			MLPR	17.6 / 55	
SAKLTPS			AK+TP	14.2 / 583	
HLQRAPN	putative exported p60 protein homologue - ML1812	15827970	LQRA	15.5 / 241	Outra função: Virulência
TRKMPSP			RK+PS	15.1 / 324	
PTLPAWM			PTLP	15.9 / 180	
SPTLKAS			TL_AS	12.9 / 1408	
MTTASWT	possible regulatory protein - ML2341	15828261	MTA	16.3 / 134	Funções regulatórias: repressores/ativadores
NPARQLH			PA+QL	15.5 / 241	
PVIAEHI			_IAEH	16.3 / 134	
GMLRPAL	hypothetical protein ML2649	15828429	MLRP	17.6 / 55	Outra
LTTSLSH			LTS	14.6 / 434	
PVIAEHI			PV+AE	16.3 / 134	
TPHTET	hypothetical protein ML0840	15827371	TPH	18.9 / 26	Desconhecida
YLPQTKQ			YL_QT	15.1 / 324	
IHEAIVP			HEAI	16.3 / 67	
HPTLGRW	possible membrane transport protein - ML2667	15828438	HP_LG	15.5 / 241	Processo Celular: proteínas de transporte/ligantes
LGGKHS			LG---GK-HSL	14.2 / 583	
KNPTTGT			_PTG	15.1 / 324	
PTTLAHL	hypothetical protein ML0405	15827124	LAHL	15.5 / 241	Proteína hipotética conservada
AGSLVQL			GSL_QL	15.1 / 324	
SPTLKAS			PTLKA	18.0 / 41	

ANEXO I.4: Continuação

LSHKGGL	chaperonin GroEL, 60 kDa chaperonin - ML0381	15827110	KGGL	14.2 / 583	Processos celulares: chaperonas / heat shock
VSVVQGT			VSV+	15.1 / 324	
SPTLKAS			TLKA	14.6 / 434	
TRNTPQQ	putative transporter protein - ML0397	15827122	TPQQ	16.3 / 134	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras
PMHTPTA			TPTA	15.1 / 324	
LRGPAQP			LRGP	15.5 / 241	
GMLRPAL	secreted antigen 85A, mycolyltransferase - ML2655	15828432	GMLR	16.8 / 100	Biossíntese de lipídeos: sínteses de aciltransferases, micolotransferases e fosfolipídeos
YLPQTKQ			LPQ----TKQ	12.9 / 1408	
YKNFLPI			KN_LP	12.5 / 1890	
NYQRSQI			YQ_SQ	15.1 / 324	
SNTSNPK	molecular chaperone DnaK (Heat shock 70 kDa protein) (HSP70) (70 kDa antigen) - ML2496	15828350	SNST	14.6 / 497	Processos celulares: chaperonas e heat shock
STKMLRP			ST+M	13.4 / 1050	
TPHTET	phosphoenolpyruvate carboxylase - ML0578	15827227	HTET	16.3 / 153	Metabolismo intermediário central: geral
TPHSET			TP_SE	12.9 / 1408	
SNTSNPK	hypothetical protein ML0007	15826872	SNST	14.6 / 497	Envelope celular: proteínas de membrana conservadas
NYQRSQI			RSQI	15.9 / 180	
NSPHREV	heat shock protein 90 - ML1623	15827855	NSPH	16.3 / 134	Processos celulares: chaperonas / heat shock
PTTLAHL			PTLA	18.5 / 31	
ATPTHMP	putative secreted p60-family protein - ML1214	15827616	TPT-----HMP	18.0 / 41	Outras: virulência
PTLPAWM			PTLPA	18.5 / 31	
TQNGWHE	hypothetical protein ML0008	15826873	W_NQ	14.6 / 434	Desconhecida
LHHHFVN	hypothetical protein ML2244	15828199	LH_HF	15.5 / 241	Desconhecida

ANEXO I.4: Continuação

TRNTPQQ	hypothetical protein ML0678	15827285	TR_T_QQ	16.8 / 100	Desconhecida
TRNTPQQ	hypothetical protein ML1915	15828028	TPQQ	16.3 / 134	Desconhecida
WRGLTPH	hypothetical protein ML1420	15827747	_RGLT_H	18.0 / 41	Desconhecida
LGGKHSL	possible enoyl-CoA hydratase - ML2498	15828352	LGGK	14.2 / 583	Síntese de lipídeos: sínteses de ácidos graxos e micólicos
LHALTTP	hypothetical protein ML0376	15827105	LHAL	15.5 / 241	Envelope celular: outras proteínas de membranas
TPHSET	hypothetical protein ML0757	15827323	T_HS	12.9 / 1408	Desconhecida
QKTQPLY	hypothetical protein ML2283	15828223	QK_PL	12.5 / 1890	Desconhecida
HSLSTTL	possible regulatory protein - ML1419	15827746	LST	14.6 / 434	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras
NPARQLH	hypothetical protein ML2346	15828262	NPAR+	16.3 / 134	Desconhecida
HLQRAPN	putative cytochrome p450 - ML2088	15828128	QRAP	15.9 / 180	Enzimas do citocromo P450
KPNSTNS	possible secreted protein - ML2331	15828254	_STNS	14.6 / 434	Envelope celular: polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos, proteínas e antígenos
STKMLRP	PPE-family protein - ML1182	15827599	ST+M	13.4 / 1050	Famílias PE e PPE: família PPE
NYQRSQI	PE-family protein - ML2532	15828364	RSQI	15.9 / 180	Processo Celular: Proteínas ligantes ou transportadoras: proteínas de efluxo
SAKLTPS	putative PE-family protein ML0410	15827127	AKLTP	18.0 / 41	Famílias PE e PPE: subfamília PE
SNTSNPK	heat shock protein 70, hsp70A2	149966	SNST	14.6 / 497	Desconhecida
STKMLRP			ST+M	13.4 / 1050	
KNPTTGT	heat shock protein; Chaperone clpB - ML2490	15828345	NPT	15.9 / 180	Processos celulares: chaperonas / heat shock
LQVLSGA			LQVL_/_QVLS	15.5 / 241; 15.1 / 324	

ANEXO I.4: Continuação

NPARQLH	heat shock protein 90 - ML1623	15827855	ARQL	15.5 / 241	Processos celulares: chaperonas / heat shock
PQAPGRL	putative secreted p60-family protein - ML1214	15827616	PQAP	15.9 / 180	Outras: virulência
QGNRLQM	putative lipoprotein; Lipoprotein IprG precursor (27 kDa lipoprotein) (Antigen P27) - ML0557	15827208	GN_+QM	15.1 / 324	Envelope celular: lipoproteínas (IppA-Ipr0)
IQRQYN			A_LTPS	16.3 / 134	
NPARQLH	Major membrane protein 1 (Major membrane protein I) (MMP-I) (35 kDa antigen)	2498566	ARQL	15.5 / 241	Desconhecida
TRKMPSP	Major membrane protein I (MMP-I) (35 kDa antigen) - ML0841	15827372	KMPS	16.8 / 100	Envelope celular: polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos, proteínas e antígenos
MWAPLTP	immunogenic protein, antigen 84 - ML0922	15827442	PLTP	15.9 / 180	Envelope celular: polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos, proteínas e antígenos
IQRQYN			+QSRQ	16.8 / 100	
IQRQYN	heat shock protein HtpX - ML2278	15828221	SR+Y	13.8 / 782	Processos celulares: chaperonas / heat shock
TWSATTM	heat shock protein chpA	2145820	ATM	16.3 / 134	Desconhecida
LAPRLMG	34 kDa antigen precursor	3647207	APRL	15.5 / 241	Desconhecida
LAPRLMG	34 kDa antigen precursor - ML0158	15826980	APRL	15.5 / 241	Envelope celular: polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos, proteínas e antígenos
MQLRNGQ	fibronectin-binding antigen 85 precursor	7476037	QL+NG	14.6 / 434	Desconhecida
NLTPSTK			TLPS	15.1 / 324	
HPTLGRW	serine-rich antigen (25L) (45 kDa protein) - ML0411	15827128	TLGR	15.1 / 324	Famílias PE e PPE: família PPE
HPTLGRW	antigen 85C, mycolyltransferase - ML0098	15828432	P_LGRW	18.9 / 23	Biossíntese de lipídeos: sínteses de aciltransferases, micolotransferases e fosfolipídeos
TPHTET	elongation factor Tu - ML1877	5103687	TPHTE	22.7 / 1.9	Tradução, biogênese e estrutura de ribossomos

ANEXO I.4: Continuação

NPARQLH	DnaJ homologue, Chaperone protein dnaJ 2 - ML0625	15827255	AR+LH	16.3 / 134	Processos celulares: chaperonas / heat shock
HLQRAPN	probable antigen 13	98782	LQRA	15.5 / 241	Desconhecida
PTLPAWM	putative exported p60 protein homologue - ML1811	15827969	PTLPA	18.5 / 31	Outras: virulência
NLPSTK	secreted antigen 85A, mycolyltransferase	15828096	TLPS	15.1 / 324	Biossíntese de lipídeos: sínteses de aciltransferases, micolotransferases e fosfolipídeos
NLPSTK	85-B antigen	44381	TLPS	15.1 / 324	Esterase
PVIAEHI	probable antigen 2	98783	PV+A+H	16.3 / 134	Desconhecida
REGULADORES / REPRESSORES					
GMLRPAL	possible transcriptional regulator- ML1753	15827939	ML_PA	15.5 / 241	Funções regulatórias: repressores/ ativadores
KNPTTGT			K_PTG	15.5 / 241	
MWAPLTP			W_LTP	16.3 / 134	
SPTLKAS			TL+AS	14.2 / 583	
VERHPSN	heat-inducible transcription repressor - ML0624	15827254	VERH	16.8 / 100	Processos celulares: chaperonas / heat shock
TGQVSVV			QV+V	15.5 / 241	
NYQRSQI			+YQ_SQ	14.2 / 583	

CAPÍTULO II

Identificação e Caracterização de Mimotopos do Glicolípídeo Fenólico 1 (PGL-1) de *Mycobacterium leprae*

RESUMO

O Glicolípido Fenólico-1 (PGL-1) é um antígeno de membrana altamente específico de *M. leprae*, não sendo encontrado em outras micobactérias. Os testes sorológicos com o PGL-1 têm sido implementados para a detecção de anticorpos circulantes nas formas clínicas multibacilares. Por ser um alvo importante na classificação clínica dos pacientes, procurou-se desenvolver peptídicos miméticos deste antígeno não-protéico por *phage display*, como forma de aprimorar o teste sorológico. Neste estudo uma biblioteca conformacional de heptapeptídeos randômicos foi selecionada para obtenção de ligantes específicos ao anticorpo monoclonal anti-PGL-1 CS-48. Após 3 ciclos de seleção, 13 clones foram seqüenciados e traduzidos, gerando seis mimotopos distintos. O mimotopo HWMLPED foi o mais freqüente (61,5%), indicando ser imundominante entre os peptídeos. Testes sorológicos com este mimotopo foram realizados em comparação com o PGL-1 sintético para 37 pacientes, classificados conforme a forma clínica, juntamente com seus 44 contatos, classificados conforme seus casos índice. Os resultados obtidos com o mimotopo e PGL-1 foram similares nos pacientes com as formas clínicas polares T e V. Contudo, as formas intermediárias dimorfas foram altamente variáveis e significantes, diferentemente do PGL-1, que apresentou positividade somente para as formas multibacilares. A forma clínica DT, apresentou 55,5% de positividade com a utilização do fagótopo, contra 0% para o PGL-1, podendo ser uma maior avidéz do fagótopo ao anticorpo circulante, ou maior especificidade do fagótopo para lesão neural pura, como também reação cruzada com outros anticorpos. O teste sorológico em contatos intradomiciliares para o fagótopo selecionado, apresentou uma média de 20,5% de positividade contra uma média de 7,5% no teste sorológico para o PGL-1. É provável que tenha ocorrido reação cruzada do mimotopo por este apresentar identidade parcial com proteínas do *M. leprae*. Os mimotopos devem ser analisados mais profundamente, pois podem indicar provável alvo de ação do PGL-1 na resposta imune humoral e ainda podem ser usados em estratégias diagnósticas e terapêuticas.

Palavras-chave: PGL-1, *Mycobacterium leprae*, testes sorológico, diagnóstico, hanseníase, mimotopos, *phage display*.

ABSTRACT

The phenolic glycolipid 1 (PGL-1) is a membrane antigen highly specific of *M. leprae*, and it is not found in other mycobacteria. Serological tests with PGL-1 have been performed to detect circulating antibodies in multibacillary patients. Due to its importance in the clinical classification of leprosy patients, we have developed mimotopes of this non-proteic antigen through phage display in order to improve serological assays. In this investigation, a random heptapeptide conformational library was selected to obtain specific ligands to the monoclonal antibody anti-PGL-1 CS-48. After three rounds of selection, 14 clones were sequenced and translated, generating six distinct peptides. The mimotope HWMLPED was the most frequent one (57%), suggesting an immunodominance. Serological tests with this mimotope were performed in comparison to the synthetic PGL-1 for 39 patients, classified according to their clinical form, together with their 44 household contacts, classified according to their index cases. Results were similar for T and LL patients. However, the intermediate forms were variable, differently from those results with PGL-1, which presented positivity only for multibacillary patients. The clinical form BT presented a seropositivity of 55.5% for the mimotope against 0% for the PGL-1, probably due the greater avidity of the mimotope to circulating antibodies, or due to the greater specificity of the peptide in detecting pure neural reaction, or yet a cross reaction with other human antibodies. The serological tests of household contacts for this same phage clone presented an average positivity of 20.5% versus an average of 7.5 for the PGL-1 antigen. It is probable that there was cross reaction of the mimotope with other antibodies; once it presented partial identity with other *M. leprae* proteins. The mimotopes must be further investigated, once they may be putative targets for the PGL-1 action in the immune humoral response, and also they could be useful in diagnostics and therapeutic strategies.

Key words: PGL-1, *Mycobacterium leprae*, serological assays, diagnostics, leprosy, mimotopes, phage display.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa que se caracteriza por apresentar formas clínicas, patológicas e imunológicas bem contrastantes e seu estudo torna-se fundamental para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença. Esta patologia ainda constitui-se em um problema de saúde pública em diversos países do mundo com altas taxas de detecção de novos casos.

Baseando-se na história natural da doença, observa-se que existe uma forma clínica de alta resistência à infecção pelo *Mycobacterium leprae*, representada pelo pólo tuberculóide, na qual as manifestações estão relacionadas à exacerbação da resposta imune celular, ocorrendo formação de granuloma bem definido, limitação das lesões e destruição completa do bacilo. No outro pólo, o virchoviano, encontra-se a forma clínica de alta susceptibilidade que se caracteriza por deficiência de resposta imune celular, excessiva multiplicação do bacilo e disseminação da infecção para vísceras e tecido nervoso (5). Entre os dois pólos situam-se as formas instáveis da doença como dimorfa-tuberculóide (DT), hanseníase dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchoviana (DV).

Entre as prioridades da pesquisa com hanseníase está o diagnóstico rápido e precoce da doença, permitindo assim um controle efetivo da hanseníase em áreas endêmicas. Testes sorológicos têm sido desenvolvidos para a detecção da infecção pelo *M. leprae*, porém até o momento, nenhum antígeno tem sido eficaz como marcador para diagnóstico, e as aplicações se restringem à classificação clínica e operacional dos pacientes, como é o caso do glicolípido fenólico-1 (PGL-1), que tem sido amplamente utilizado para o diagnóstico das formas clínicas multibacilares (8).

O PGL-1 é componente da parede celular, específico de *M. leprae*, o qual é encontrado em grandes quantidades em tecidos humanos infectados com a micobactéria (2). Sua estrutura é composta de um trissacarídeo (principal determinante antigênico), fenol, fitiocerol e de ácido micoseossídico. (3, 7). Este antígeno não apresenta reação cruzada com *M. tuberculosis* ou outras micobactérias, sendo único para *M. leprae*.

O pólo virchoviano caracteriza-se pelo predomínio de resposta humoral, exibindo altos títulos de anticorpos específicos contra o PGL-1, sem contudo conferir proteção significativa, pois o indivíduo tem disseminação bacilar. Há aumento de IgG e IgE, aumento de linfócitos B no sangue periférico e os anticorpos específicos anti-PGL-1 são predominantemente da subclasse IgM (6).

Os níveis de anticorpos anti-PGL-1 estão correlacionados com a carga bacteriana nos pacientes com hanseníase e a sensibilidade dos testes sorológicos baseados no PGL-1 varia de 30 a 50% entre pacientes paucibacilares a mais de 90% entre os pacientes multibacilares. Testes Sorológicos também são utilizados para acompanhar o tratamento dos pacientes com antígenos de PGL-1 devido ao seu rápido declínio no soro durante o tratamento quimioterápico (8).

Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar mimotopos do antígeno não-protéico PGL-1, imunorreativos contra um anticorpo monoclonal anti-PGL-1, e determinar a potencial utilização destes peptídeos em testes sorológicos com as diferentes formas clínicas da hanseníase.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Pacientes e Controles

Participaram deste estudo 37 pacientes não tratados (Anexo II.1), sendo 6 pacientes com a forma clínica tuberculóide (T), 9 com dimorfa tuberculóide (DT), 7 com dimorfa dimorfa (DD), 7 com dimorfa virchoviana (DV) e 8 com hanseníase virchoviana (V). Contatos de pacientes (n=44) também participaram do estudo, sendo 9 contatos para os casos índices T, DT, DD e DV, e 8 para o V. Todos os pacientes e contatos foram submetidos a um protocolo clínico-laboratorial, para o diagnóstico de hanseníase, no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária com ênfase em Hanseníase (CREDSH), Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU), em suas duas Unidades, Ambulatório Central e Centro de Saúde-Escola (CSE) – Jaraguá.

Anticorpo Monoclonal

O anticorpo monoclonal anti-PGL-1, da subclasse IgG, utilizado nesse trabalho foi purificado de camundongos (mAb CS-48) e foi gentilmente cedido pelo Dr. John S. Spencer e Dr. Patrick J. Brennan (Colorado State University, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Fort Collins, CO).

***Biopanning* Líquido (seleção de fagos)**

Foram realizados 3 ciclos de seleção de fagos com anticorpos anti-PGL-1, onde a biblioteca de fagos Ph.D.-C7C (*NEW ENGLAND BioLabs[®] Inc*) foi usada em seleção líquida (*biopanning*) com agarose específica para IgG (rProtein G Agarose – Invitrogen-Life Technologies), de acordo com o protocolo descrito por Barbas e colaboradores (1).

Primeiramente, 50 µL de uma suspensão a 50% de agarose rProteína G (Invitrogen), foi lavada uma vez em TBST (0,1% de Tween) e em seguida bloqueada por 60 minutos a 4°C em tampão de bloqueio (0,1M NaHCO₃ pH8.6, 5.0 mg/ml BSA). Nesse intervalo de tempo, 500 ng de anticorpo mAb CS-48 foram incubados, por 20 min em temperatura ambiente num volume final de 200 µL de TBST, com $1,2 \times 10^{10}$ pfu da biblioteca de fagos Ph.D.-C7C no primeiro ciclo e nos ciclos subsequentes com partículas de fagos amplificadas nos ciclos de seleção. A resina bloqueada foi lavada quatro vezes com 1,0 mL de TBST. A mistura fago-anticorpo foi transferida para o tubo contendo a resina bloqueada e lavada e incubou-se em temperatura ambiente por 15 minutos, misturando-se ocasionalmente. Os fagos não ligantes foram removidos por dez lavagens com TBST (0,1% Tween-20) no primeiro ciclo de seleção e nos ciclos subsequentes com TBST (0,5% Tween-20). Os fagos ligantes foram eluídos em cada ciclo com 1,0 mL de tampão glicina (0,2M pH 2,2, 1 mg/mL de BSA). A resina foi precipitada e o sobrenadante recuperado e neutralizado com 150 µL de Tris-HCl (1M, pH 9,1). Pequenas alíquotas do eluato de fagos foram utilizadas para a titulação.

Os fagos eluídos (eluatos) em cada ciclo, não amplificadas e amplificadas, foram titulados em cultura de *Escherichia coli* ER2738 para

acompanhar o enriquecimento dos fagos selecionados durante os ciclos de *biopanning*. Os clones individuais dos eluatos não amplificados do 3º ciclo foram usados para processo de amplificação em placas tipo *Deepwell*, para posterior extração e sequenciamento do DNA de cada fago selecionado.

Amplificação e Purificação de fagos e Extração de DNA

Para a extração do DNA dos fagos, 30 colônias azuis provenientes do 3º ciclo de *biopanning* (eluato não-amplificado), com formatos homogêneos e bem isoladas, foram transferidas, para poços de 2mL de placas de cultura tipo *Deepwell* contendo 1mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* ($OD_{600} \sim 0,3$); a cada poço foi adicionada apenas uma colônia de fago. A placa foi, vedada com um adesivo próprio e incubada a 37°C, por 24 horas, sob vigorosa agitação (300 rpm).

Para a extração de fagos, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 4°C, durante 20 minutos. Aproximadamente 800µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e foram adicionados 160 µL de PEG/NaCl a cada poço, sendo em seguida incubados a 4°C por 12 horas. Após esse intervalo, os fagos foram precipitados a 3700 rpm por 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os fagos foram diluídos em 200 uL de PBS 1X.

Para extração de DNA, após a última centrifugação de 1 hora, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se ao precipitado de fagos 100µL de tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI). As placas foram agitadas vigorosamente e, em seguida, 250µL de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas (3700 rpm, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O precipitado de DNA foi lavado com 500µL de Etanol 70% e recentrifugado. Finalmente, o DNA foi diluído em 20µl de água ultrapura e sua qualidade foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 1% corado com solução de brometo de etídeo (10 mg/ml).

Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado utilizando o Kit *Big Dye Terminator* (*Amersham Biosciences*) juntamente com *primer* - 96 gIII (5'-^{OH} CCC TCA TAG TA GCG TAA CG-3' - Biolabs) que amplifica a região recombinante dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionado à proteína pIII nos fagos filamentosos M13. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático MegaBace 1000 (*Amersham Biosciences*) do laboratório de Genética Molecular (UFU).

Análise de dados pela Bioinformática

A tradução das seqüências de ácidos nucléicos obtidas no seqüenciamento foi realizada pelo programa DNA2PRO12 ([hTp://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx](http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx)). O programa automaticamente localiza a posição do inserto, faz sua tradução e indica qualquer erro possível na seqüência do inserto, tais como códon inesperados ou erros na seqüência próxima.

As seqüências consensos encontradas entre os peptídeos juntamente com os outros que não formaram consensos foram alinhados com seqüências genômicas de *Mycobacterium leprae* publicadas no banco de dados não redundante *GenBank* usando a matriz de “*Search for Short Nearly Exact Matches*” do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - [hTp://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

Os índices de antigenicidade foram determinados para cada heptapeptídeo e também para a seqüência consenso pelo programa *Protean* (DNASTAR – Lasergene *softwares*), seguindo o índice de James Wolf.

Os grupos funcionais ou classificação funcional das proteínas anotadas pelo programa BLAST, com valores de *scores* maiores que 15.0, foram relatados para os heptapeptídeos obtidos, de acordo com dados disponíveis no sítio [hTp://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/MI_gene_list_hierarchical.shtml](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/MI_gene_list_hierarchical.shtml).

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

O teste ELISA foi realizado com o PGL-1 sintético (também cedido pelos Drs John Spencer e Patrick Brennan) e com o mimotopo mais frequente nos 37 pacientes não tratados e nos 44 contatos de pacientes.

Para o teste ELISA com o fagótopo, sensibilizou-se uma placa de microtitulação *Maxi Sorp* vedada com adesivo por 4 horas, em temperatura ambiente, com 5×10^{10} pfu/poço do fagótopo 1 (Tabela 2), em 100µl/poço de tampão Carbonato/Bicarbonato 0,06M pH 9,6 (1,0M Na HCO₃ e 1,0M Na₂CO₃ anidro). A placa foi lavada por 2 vezes em lavadora automática com PBS 1X 0,05% Tween (PBST) e acrescentou-se 200µl de solução bloqueio (PBS 0,1% de Tween - BSA 1,0%) incubando-a overnight a 4°C. Lavou-se novamente a placa por 2 vezes com PBST. Incubou-se 1,0 uL de cada soro sanguíneo juntamente com 99,0 uL de solução de bloqueio (diluição de 1:100) por 1 hora a 37°C. Lavou-se por 4 vezes com PBS 1X 0,2% tween e foi dispensado 100µl/poço de anticorpo Anti-IgM humano (Sigma Aldrich) conjugado com peroxidase em solução bloqueio [1:10.000], incubando a placa por 1 hora a 37°C. Ao seu término, fez-se 5 lavagens com PBST 0,2% e acrescentou-se 100uL de solução reveladora com substrato (tampão fosfato citrato 0,1M pH 3,5 com 0,01g de ortofenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogênio - Merck 30%), colocando-se a placa em câmara escura por 15min. Após este período, interrompeu-se a reação com 4M H₂SO₄ (10µL/poço) e fez-se leitura no leitor Flow Titertek Multiskan Plus - USA com comprimento de onda de 492nm.

Para o teste ELISA com o PGL-1, sensibilizou-se uma placa *Maxi Sorp* com 0,5 µg de PGL-1 sintético em 50 µl de etanol absoluto e deixou secar em temperatura ambiente. Acrescentou o bloqueio (PBS 0,1% de Tween - BSA 1,0%) e incubou-se por 1 hora a 37°C. Lavou-se a placa por 2 vezes com PBST. Incubou-se 1,0 uL de cada soro sanguíneo juntamente com 99,0 µL de solução de bloqueio (diluição de 1:100) por 1 hora a 37°C. A partir da incubação com soro sanguíneo humano o protocolo continua como o citado no parágrafo anterior.

Estabelecimento do Valor de Corte e Índice Elisa

O estabelecimento do valor de corte (*cutoff*) (4) foi realizado a partir da análise de 7 soros (pool) de contatos de T sadios em duplicata. Foi obtido um *cutoff* a partir da média das leituras dos soros considerados como negativos, adicionada de três desvios-padrão.

O índice elisa (IE) foi calculado para cada amostra dividindo-se o valor da leitura obtida (densidade óptica) pelo valor de *cutoff* obtido. Os índices maiores ou igual a 1 (um) foram considerados positivos e significativos.

RESULTADOS

Ciclos de Seleção dos Fagos:

A Tabela 1 reflete o enriquecimento dos fagos específicos que ficaram retidos na agarose a cada ciclo do processo de *biopanning*.

Tabela 1. Seleção dos fagos com peptídeos ligantes ao anticorpo monoclonal anti-PGL-1. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade (título de saída por 90 μ L).

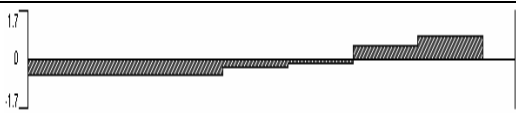
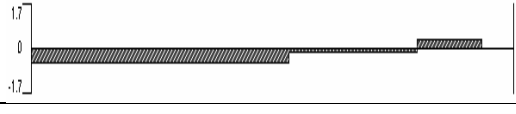
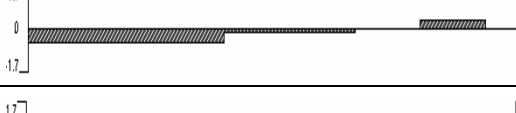
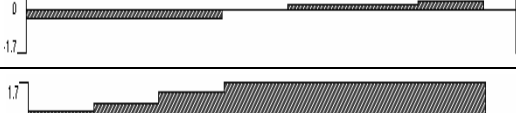

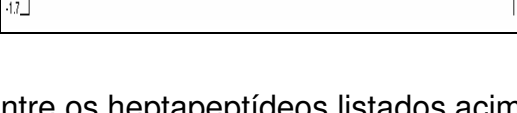
Ciclos de Seleção	Número de partículas de fagos	
	Entrada	Saída
1 ^o	$1,2 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^4$
2 ^o	$9,22 \times 10^{11}$	$8,1 \times 10^5$
3 ^o	$2,67 \times 10^{11}$	$2,8 \times 10^6$

Sequenciamento/Bioinformática:

Foram obtidas 13 seqüências viáveis para leitura e tradução no programa DNA2PRO12 resultando em 6 heptapeptídeos diferentes (Tabela 2). A Tabela 2 também apresenta o índice de antigenicidade, que é a probabilidade de

exposição, para cada heptapeptídeo encontrado, variando na vertical esquerda, de -1,7 a +1,7, sendo cada aminoácido representado na horizontal.

Tabela 2: Sequências dos heptapeptídeos imunorreativos contra o anticorpo monoclonal anti-PGL-1 selecionados por *Phage Display*, e suas respectivas freqüências e índices de antigenicidade.

Clone	Sequência	Freqüência	Antigenicidade
1	HWMLPED	8	
2	HWFLWDG	1	
3	HWCLWDG	1	
4	HWMLPGG	1	
5	SMSRYGG	1	
6	SSPIWPS	1	

A sequência consenso obtida entre os heptapeptídeos listados acima se encontra na Tabela 3.

Tabela 3: Sequência consenso obtida para 4 heptapeptídeos imunorreativos contra o anticorpo monoclonal anti-PGL-1 selecionados por *Phage Display*.

HWML	P	ED	7
HWML	P	GG	7
HWFL	W	DG	7
HWCL	W	DG	7
**	*		
Consenso: HWML W/P DG			

*: aminoácidos idênticos entre as sequências

A partir do alinhamento realizado para os heptapeptídeos, nos sentidos direto e reverso, obtiveram-se os grupos funcionais protéicos relacionados na Tabela 4, que podem eventualmente mimetizar outros alvos biológicos por possuírem identidade significativa.

Tabela 4: Relação dos grupos funcionais protéicos que apresentaram identidade com os mimotopos imunorreativos contra o anticorpo monoclonal anti-PGL-1.selecionados por *Phage Display*.

Grupo Funcional das Proteínas	Quantidade
Envelope celular	28
Hipotéticas conservadas	25
Metabolismo energético	13
Síntese e modificação de macromoléculas	12
Biossíntese de aminoácidos	10
Degradação de pequenas moléculas	8
Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores	8
Desconhecidas	7
Outras funções	6
Metabolismo central intermediário	5
Proteínas ligantes ou de transporte	3
Divisão celular	3
Poliketide e síntese peptídica não ribossomal	3
Adaptação e condições atípicas	2
Chaperonas ou <i>Heat shock</i>	2
Metabolismo de purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos	2
Biossíntese lipídica	2
Funções regulatórias	2
Degradação de macromoléculas	1

ELISA

Os dados obtidos dos soros humanos de pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares de todas as formas clínicas contra o fagótopo mais frequente e também o PGL-1 sintético estão representados na Tabela 5.

Tabela 5: Sororreatividade de IgM Humana de pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares para o Fagótopo 1 (HWMLPED) e o PGL-1 sintético.

Formas Clínicas ^a	Fagótopo 1		PGL-1	
	Nº de positivos/total	% de Positividade	Nº de positivos/total	% de Positividade
Pacientes				
T	0/6	0 %	0/6	0%
DT	5/9	55,5%	0/8	0%
DD	1/7	14,3%	2/6	33,3%
DV	3/7	42,9%	4/6	66,7%
V	6/8	75%	8/8	100%
Contados e seus Casos Índice				
T	3/9	33,3	0/9	0%
DT	1/9	11,1%	0/9	0%
DD	1/9	11,1%	2/8	25%
DV	2/9	22,2%	0/9	0%
V	2/8	25%	1/8	12,5

^a T– Tuberculóide; DT– Dimorfa Tuberculóide; DD– Dimorfa Dimorfa; DV– Dimorfa Virchoviana; V- Virchoviana.

DISCUSSÃO

Nesta investigação utilizou-se uma biblioteca de peptídeos randômicos conformacionais, que gera uma estrutura secundária no peptídeo recombinante em fusão com a proteína pIII do fago, devido à posição das duas cisteínas nas extremidades dos sete aminoácidos alvo, permitindo uma seleção altamente específica de mimotopos de um antígeno não-proteico, que culminou com a identificação e caracterização de 6 fagótopos.

Como já era esperado para um anticorpo monoclonal, poucos ciclos de seleção por *phage display* foram necessários para o enriquecimento dos fagótopos, bem como a formação de consenso entre a maioria dos heptapeptídeos gerados. O mimotopo HWMLPED foi o mais freqüente (61,5%), indicando ser o mais imunodominante entre os peptídeos e também perfaz um dos consensos, por isso seu uso preliminar no teste ELISA.

Os índices de antigenicidade foram pouco informativos, pois as seqüências lineares apresentaram índices negativos ou nulos, sugerindo uma baixa hidrofiliçidade, e conseqüentemente gerando uma baixa possibilidade desses heptapeptídeos estarem expostos na superfície, exceto para o fagótopo 5 (Tabela 2), que apresentou alto índice antigênico. Curiosamente, mesmo com baixa antigenicidade, como predito pelo programa, os fagótopos apresentaram

alta reatividade em teste ELISA preliminar com o anti-PGL-1 (dados não mostrados).

Realizou-se uma classificação funcional de proteínas anotadas pelo programa BLAST e aquelas proteínas com maior identidade com os mimotopos foram discriminadas com o intuito de se demonstrar uma provável reação cruzada na resposta imune gerada pela similaridade dos peptídeos selecionados com os potenciais antígenos do *M. leprae*. Interessantemente, o maior grupo funcional formado foi o de proteínas constituintes do envelope celular, com 90% delas sendo proteínas conservadas de membrana. O segundo maior grupo se trata de proteínas hipotéticas conservadas sem função definida. É importante enfatizar que os peptídeos são mimotopos de um antígeno não-protéico, o PGL-1, e embora imunorreativos contra o seu monoclonal, podem apresentar reação cruzada com outros anticorpos em testes sorológicos.

O teste ELISA aplicado em soro de pacientes e contatos intradomiciliares para verificar a reatividade de cada soro frente ao fagótopo selecionado se mostrou promissor, uma vez que nenhuma positividade foi encontrada na forma clínica tuberculóide (T), e houve um aumento gradual da positividade a partir da forma clínica DD, chegando a 75% na forma clínica virchoviana (V). Esses valores para as formas polares refletem a carga bacilar do paciente e são esperados, como observado nos resultados obtidos para o PGL-1 sintético, separando as formas multibacilares das paucibacilares.

Contudo, a forma clínica DT, apresentou 55,5% de positividade com a utilização do fagótopo, contra 0% para o PGL-1. Algumas hipóteses podem ser sugeridas para explicar tal porcentagem, como maior avidéz do fagótopo ao anticorpo circulante, especificidade do fagótopo para lesão neural pura na forma clínica DT, como também pode estar ocorrendo uma reação cruzada com outros anticorpos.

O teste sorológico em contatos intradomiciliares para o fagótopo selecionado, apresentou uma média de 20,5% de positividade contra uma média de 7,5% no teste sorológico para o PGL-1. Essa maior positividade observada para o fagótopo pode ser devido tanto a reações cruzadas entre o mimotopo e outros anticorpos que não de *M. leprae*, como também, existe a possibilidade de

se ter um antígeno alternativo ao PGL-1 com maior sensibilidade sorológica que detecte casos subclínicos da doença.

A fim de que todas essas hipóteses sejam elucidadas, este fagótopo juntamente com os outros devem ser intensamente explorados para confirmação da existência ou não de reações cruzadas com outros anticorpos, e tornando possível a utilização destes fagótopos como ferramenta diagnóstica na detecção e classificação da hanseníase.

Para experimentos posteriores, testes com o *pool* de todos os fagótopos e também testes individuais como aos pares devem ser realizados no sentido de melhor caracterizar cada fagótopo e verificar seu potencial no uso diagnóstico. Mudanças nas condições experimentais do teste Elisa também podem auxiliar numa melhor caracterização dos fagótopos. As amostras de soro de pacientes contêm anticorpos para mais de um epítipo do antígeno PGL-1 e a mistura de vários peptídeos mimotopos resultaria numa melhor reação para os soros de pacientes portadores de hanseníase (8).

O antígeno PGL-1 é um marcador usual para monitorar o efeito da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase e alta carga bacteriana. Como o PGL-1 é um antígeno específico de *M. leprae*, a presença do anticorpo no soro e outras amostras clínicas pode indicar uma infecção ativa do *M. leprae* (3).

O estudo da prevalência de anticorpos anti-PGL-1 entre controles sadios por testes sorológicos pode medir a taxa de transmissão e infecção pelo *M. leprae* (8).

Youn e colaboradores (8) na tentativa de produzir um antígeno alternativo ao PGL-1, obtiveram peptídeos mimotopos de PGL-1 usando o anticorpo monoclonal III603.8 por *phage display* com uso da biblioteca linear de sete aminoácidos. Entretanto o mimotopo encontrado não apresentou reatividade em amostras de soro de pacientes com hanseníase que foram reativos ao PGL-1, não sendo efetivo como antígeno alternativo ao PGL-1. Diferentemente dos resultados apresentados neste trabalho, onde as amostras de soro foram reativas ao mimotopo testado, sucesso provavelmente obtido pela utilização do anticorpo monoclonal CS-48 e da biblioteca conformacional PhD-C7C.

Os mimotopos que foram imunorreativos em amostras de pacientes com hanseníase, ou seja, que mimetizam os carboidratos imunodeterminantes de

PGL-1, podem auxiliar no entendimento da patogênese da infecção de *M. leprae*, bem como no entendimento da resposta imune gerada pelos pacientes. Estes mimotopos podem ainda compor uma vacina de potencial imunogênico se verificado a capacidade dos mesmos em induzir resposta imune nas formas clínicas da hanseníase.

REFERÊNCIAS

- 1- **Barbas, C. F. III, D. R. Burton, J. K. ScoT, G. J. Silverman.** 2001. Phage Display: A Laboratory Manual. Plain View, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 2- **BreT, S.J., C. Lowe, S. N. Payne, P. Draper.** 1984. Phenolic glycolipid 1 of *Mycobacterium leprae* causes nonspecific inflammation but has no effect on cell-mediated responses in mice. *Infect Immun.* **46(3)**: 802-808.
- 3- **Cho, S. N., R. V. Cellona, L. G. Villahermosa, T. T. Fajardo Jr, M. V. Balagon, R. M. Abalos, E. V. Tan, G. P. Walsh, J. D. Kim, P. J. Brennan.** 2001. Detection of Phenolic Glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in Sera from Leprosy Patients before and after Start of Multidrug Therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* **8(1)**: 138-142.
- 4- **Crowther J. R., H. Smith.** 1990. **ELISA Manual.** Institute for Animal Health, Pirbright, Surrey, UK.
- 5- **Foss, N. T.** 1997. Aspectos imunologicos da hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto.* **30(3)**: 335-339.
- 6- **Goulart, I. M., G. O. Penna, G. Cunha.** 2002. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **35(4)**: 365-75.
- 7- **Hunter, S. W., P. J. Brennan.** 1981. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol.* **147(3)**: 728-735.
- 8- **Youn, J. H., H. J. Myung, A. Liav, D. ChaTerjee, P. J. Brennan, I. H. Choi, S. N. Cho, J. S. Shin.** 2004. Production and characterization of peptide mimotopes of phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **41(1)**: 51-7.

ANEXO II

ANEXO II.1: Relação de pacientes e contatos intradomiciliares que participaram do Teste Elisa com o Fagótopo 1 (HWMLPED) e o PGL-1 sintético e seus respectivos dados como sexo, idade, classificação operacional (CO), forma clínica (FC), índice baciloscópico (IB), Teste de Fluxo Lateral de *M. leprae* (ML-Flow) e o Teste intradérmico de Mitsuda. T= Tuberculíde, DT= Dimorfo Tuberculóide, I= Indeterminada, DD= Dimorfa Dimorfa, DV= Dimorfa Virchoviana, V= Virchoviana, DTR= Dimorfa Tuberculóide Reacional e HNPT= Hanseníase Neural Pura Tuberculóide.

Prontuário	Sexo	Idade	CO	FC	IB	ML-Flow	Mitsuda
Pacientes T							
153782	M	57	PB	T	0	0	15
954259	M	42	PB	T	0	0	12
1011026	M	33	PB	T	0	0	10
998729	M	66	PB	T	0	0	12
1011026	M	33	PB	T	0	0	10
973727	M	31	PB	T	0	0	8
Pacientes DT							
716144	F	28	PB	DT	0	0	7
984010	F	28	PB	T	0	0	6
837348	M	23	PB	DT	0	0	8
316880	F	18	PB	I	0	0	5
617252	F	43	PB	DT	0	0	7
275452	F	48	PB	DT	0	0	6
275452	F	48	PB	DT	0	0	6
345061	F	58	PB	DT	0	0	7
984010	F	28	PB	T	0	0	6
Pacientes DD							
291215	F	63	MB	DD	1	+	1
154006	M	49	MB	DD	1,6	+	3
14162	M	46	MB	DD	2,5	++	3
174128	F	24	MB	DD	1,3	+++	1
813645	M	50	MB	DD	2	+++	0
312001	M	52	MB	DV	0,5	+++	0
236755	M	68	MB	DD	0,6	++	0
Pacientes DV							
79091	M	68	MB	DV	5	++++	0
273674	M	30	MB	DV	3,6	+++	0
641716	M	55	MB	DV	4,3	++++	0
998995	M	54	MB	DV	3,5	++++	0
542665	M	51	MB	DV	4,7	++++	0
65789	F	93	MB	DV	4	++++	0
51272	F	51	MB	DV	1,1	++++	2

Pacientes V							
333861	M	61	MB	V	3,2	++++	0
489130	F	26	MB	V	4,3	++++	0
630415	M	32	MB	V	5,3	++++	0
104742	M	61	MB	V	4,3	++++	0
969290	M	63	MB	V	6	++++	0
1007839	F	22	MB	V	6	++++	0
120160	F	46	MB	V	5,1	++++	0
974265	M	21	MB	V	4	++++	0

Prontuário	Sexo	Idade	CO	FC	BCG	ML-Flow	Mitsuda
-------------------	-------------	--------------	-----------	-----------	------------	----------------	----------------

Contatos T							
218515	F	20	PB	T	3	0	8
996341	M	27	PB	T	1	0	9
351287	M	70	PB	T	1	0	8
221070	F	42	PB	T	2	0	12
215861	F	35	PB	T	1	0	11
635486	M	20	MB	DT	1	0	9
185160	F	29	PB	T	1	0	11
202747	M	37	PB	T	1	0	11
324744	M	39	PB	DT	1	0	9

Contatos DT							
245288	M	33	MB	DTR	1	0	5
22377	F	35	MB	DTR	1	0	3
758619	M	7	MB	DTR	1	0	5
24020	F	67	MB	DTR	0	0	6
594123	M	28	PB	DT	1	0	6
201970	M	7	PB	DT	0	0	4
179020	F	47	PB	DT	1	0	3
845243	M	21	PB	DT	1	0	2
990613	F	8	PB	HNPT	1	0	3

Contatos DD							
59821	F	23	MB	DD	2	0	8
761111	F	36	MB	DD	1	0	6
21320	F	63	MB	DD	1	0	6
976794	M	0	MB	DD	1	0	8
586348	M	12	MB	DD	2	0	5
336221	F	24	MB	DD	1	0	8
670227	F	9	MB	DD	1	0	7
544307	M	40	MB	DD	0	0	3
966545	M	17	MB	DD	2	0	9

Contatos DV							
188195	F	19	MB	DV	2	+	5
186138	F	61	MB	DV	0	0	0
578157	F	13	MB	DV	2	+	9
570699	F	24	MB	DV	1	+	6
1000061	F	8	MB	DV	1	+	8
856280	F	41	MB	DV	0	+	3
928401	M	2	MB	DV	1	0	5
888652	M	3	MB	V	1	0	6
661328	F	9	MB	DV	1	0	4
Contatos V							
233160	M	36	MB	V	2	+	6
957309	M	27	MB	V	2	+	10
442603	M	16	MB	V	2	+	5
996879	M	43	MB	V	0	+	3
309680	F	19	MB	V	1	0	5
184080	M	17	MB	V	1	0	8
530433	F	14	MB	V	1	0	8
282429	F	60	MB	V	0	0	5