

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES IMUNORREATIVOS
CONTRA IgG HUMANA DE PACIENTES COM A DOENÇA DE CHAGAS PELA TÉCNICA DE
“PHAGE DISPLAY”**

Flávia Figueira Messias

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Julho-2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES IMUNORREATIVOS
CONTRA IgG HUMANA DE PACIENTES COM A DOENÇA DE CHAGAS PELA TÉCNICA DE
“PHAGE DISPLAY”**

Flávia Figueira Messias

Luiz Ricardo Goulart Filho

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Julho-2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES IMUNORREATIVOS
CONTRA IgG HUMANA DE PACIENTES COM A DOENÇA DE CHAGAS PELA TÉCNICA DE
“PHAGE DISPLAY”**

Flávia Figueira Messias

Luiz Ricardo Goulart Filho
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em __/__/__

Coordenadora do Curso: Vera Lúcia de Campos Brites

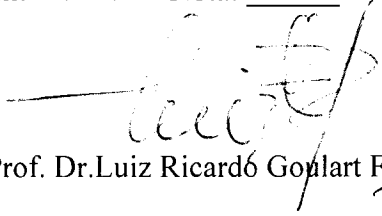
Uberlândia - MG
Julho-2007

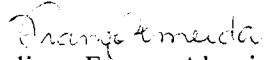
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES IMUNORREATIVOS
CONTRA IgG HUMANA DE PACIENTES COM A DOENÇA DE CHAGAS PELA TÉCNICA DE
“PHAGE DISPLAY”**

Flávia Figueira Messias

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____


Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho


MSc. Juliana Franco Almeida


MSc. Carlos Roberto Prudêncio

Uberlândia, 20 de julho de 2007.

Dedico à minha mãe, com amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela força, sabedoria e saúde, necessárias para que eu, a cada dia, pudesse continuar trilhando meu caminho, sem desistir perante aos obstáculos.

À minha mãe querida, Neida, por sempre ter sido um exemplo de vida para mim, me apoiando e cuidando de mim com um amor incondicional, nunca medindo esforços para me ajudar a realizar todos meus desejos e objetivos.

Ao meu pai, Carlos, que mesmo não estando comigo neste momento, deixou-me lições e amor para a vida inteira. À minha irmã Viviane e ao meu cunhado Luciano, que são pessoas únicas, e que, a todo momento, estiveram à disposição me auxiliando em tudo que precisei. Ao orientador Luiz Ricardo, por tornar possível meu sonho de participar de sua equipe, para que pudesse exercer um trabalho almejado a vida inteira. Muito obrigada por ter me acolhido, sua confiança em mim foi indispensável para que eu mesma pudesse acreditar em meu potencial.

À minha querida amiga Juliana, que além de ter sido minha coorientadora, me auxiliando sempre em meus experimentos, tornou-se também uma amiga irmã, com quem conversei, desabafo, compartilho experiências e convivo dia-a-dia no Laboratório.

A todos os meus amigos do Laboratório de Genética Molecular da UFU: Silvia Ferreira, Luciana Bueno, Tatiana Anjo, Janaína Lobato, Érica Reis, Paula Cristina, Paula Souza, Guilherme Lino, Rone Cardoso, Fausto Capparelli, Adriana Neves, Karina Marangoni, Fabiana Santos, Thaíse Araujo, Tiago Borges, Ana Paula Carneiro, Carolina Reis, Washington Carvalho, Thiago Barbosa, Márcia Nunes, Patrícia Tieme, Luciano Caetano, e em especial ao Carlos Prudêncio e Ana Paula Freschi, que participaram diretamente do meu trabalho, me auxiliando durante os experimentos e compartilhando opiniões e sugestões. Vocês todos tornaram os meus dias mais felizes, fazendo do Laboratório muito mais do que um ambiente de trabalho.

À Direção, Professores e Funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica e à Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio. Às agências de fomento Conselho de Aprendizagem e Ensino Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Às minhas inseparáveis amigas de graduação: Alice, Mariana e Rita de Cássia, que tornaram esses quatro anos de faculdade inesquecíveis. Os trabalhos, as conversas, as risadas, as festas e a convivência vão deixar muita saudade. Agradeço principalmente à Alice, que mesmo não entendendo muito dos meus procedimentos no Laboratório, sempre se interessou em saber do meu desempenho, dos meus resultados e dificuldades, além de ser uma pessoa com quem sempre pude contar. Espero que a amizade do quarteto seja eterna.

À minha amiga Patrícia Pereira, uma pessoa iluminada, com quem convivo desde o Ensino Fundamental. À Dolores, minha amiga de sempre, com quem convivi desde a infância, e que faz parte de tudo que consegui e de tudo que sou. Às minhas amigas Fernanda e Janayne, que mesmo tendo seguido caminhos diferentes do meu, sempre estiveram ao meu lado.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma participaram da minha vida, ajudando-me a construir a minha própria história.

RESUMO

Identificação e Caracterização de Peptídeos Recombinantes Imunorreativos Contra IgG Humana de Pacientes com a Doença de Chagas pela Técnica de “Phage Display”

A Doença de Chagas foi descoberta por Carlos Chagas em 1909, e representa uma importante doença parasitária crônica, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Depois de adquirida, distinguem-se duas fases na doença: aguda e crônica, sendo esta dividida principalmente em formas indeterminada, digestiva e cardíaca. A tecnologia de “Phage Display”, exposição de biomoléculas em bacteriófagos, tem sido amplamente utilizada no mapeamento de epítomos de proteínas antigênicas, constituintes de agentes causadores de doenças. Assim, este estudo visou verificar reatividade diferencial dos clones frente aos anticorpos utilizados para seleção e buscar biomarcadores com potencial diagnóstico, bem como avaliar a possibilidade de padrão diferenciado de resposta imunológica entre as principais formas da fase crônica. O “biopanning” foi realizado em placa e, após interação entre anticorpos alvo e fagos, promoveu-se três eluições. A partir do segundo *round* foi realizada ainda, seleção caracterizada por eluição competitiva com antígeno total de *Trypanosoma cruzi*. Após o “biopanning”, foram seqüenciados 67 clones, que demonstraram 50 seqüências distintas. Os testes ELISA validaram 25 clones com reatividade significativa diante dos soros positivos. Análises de bioinformática revelaram formação de epítomos e homologia com proteínas específicas.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, “Phage Display”, biomarcadores.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Epidemiologia, Sintomatologia e Clínica na Doença de Chagas	01
1.2. Imunologia e Caracterização Antigênica do Parasita	05
1.3. Tecnologia de “Phage Display”	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Purificação dos anticorpos	14
2.2. Seleção de peptídeos – “Biopanning” em placa	15
2.3. Caracterização dos clones e Obtenção do DNA	19
2.4. Sequenciamento do DNA	20
2.5. ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) Pós-sequenciamento	20
2.6. Análise dos dados	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1. Purificação dos anticorpos	22
3.2. Seleção de peptídeos – “Biopanning” em placa	23
3.3. Caracterização dos clones e Obtenção do DNA	24
3.4. Sequenciamento do DNA	24
3.5. ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) Pós-sequenciamento	26
3.6. Análise dos dados	28
4. CONCLUSÕES	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

INTRODUÇÃO

Epidemiologia, Sintomatologia e Clínica na Doença de Chagas

A Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma importante doença parasitária crônica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Foi descoberta e descrita por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909).

Segundo dados da WHO (2002), dentre os habitantes da América Latina, pelo menos 120 milhões (25%) estão sob risco de infecção e cerca de 16 a 18 milhões já estão infectados. Ainda, com base em estudos conduzidos no Brasil, é aceito que aproximadamente 30% da população infectada desenvolverá a doença clinicamente evidente.

Recentemente, devido ao aumento da imigração de áreas endêmicas para a América do Norte e Europa, intensificou-se o diagnóstico clínico da Doença de Chagas nos Estados Unidos, assim como casos de indivíduos infectados pela Doença de Chagas através de transfusão sanguínea, em áreas não endêmicas. A tripanossomíase americana também emergiu como uma infecção oportunista em pacientes imunossuprimidos, como os portadores de AIDS, indivíduos transplantados e pacientes em tratamento contra tumores (HUANG et al., 2006).

Os parasitos do gênero *Trypanosoma* são protozoários digenéticos pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, e podem apresentar-se sob três formas principais: Amastigota, caracterizada por apresentar pequenas dimensões, contorno aproximadamente circular, ovóide ou fusiforme, corpo achatado, com pouco citoplasma e com núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico, cinetoplasto de forma discóide bem visível, sendo o flagelo curtíssimo, tornando esta forma praticamente imóvel; epimastigota, a qual possui forma alongada (fusiforme), cinetoplasto discóide próximo do núcleo, um flagelo que emerge longe da extremidade anterior, mas mantém-se colado à membrana celular por uma prega da bainha flagelar denominada membrana ondulante; e tripomastigota, a qual possui o corpo celular longo e achatado, como nos epimastigotas, porém apresenta o bolso flagelar e o cinetoplasto deslocados para a região entre o núcleo e a extremidade posterior, tendo o cinetoplasto um contorno arredondado e o flagelo caracterizado por percorrer externamente toda a extensão de célula, aderido por sua longa membrana ondulante (REY, 1992).

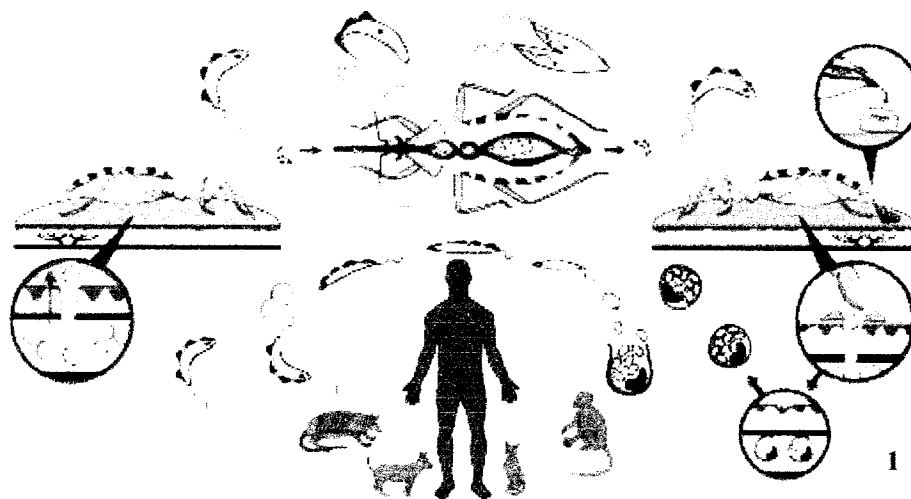


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma*. A parte superior da figura (azul) mostra o desenvolvimento das formas tripomastigotas no intestino do barbeiro e sua transmissão aos hospedeiros vertebrados. A parte inferior ilustra a fase de desenvolvimento das formas amastigotas no homem ou em outros reservatórios vertebrados. (Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>)

A Doença de Chagas é transmitida aos hospedeiros vertebrados susceptíveis através da picada de barbeiros; assim, as tripomastigotas, que são as formas que não se dividem e estão presentes na corrente circulatória de hospedeiros mamíferos, são ingeridas pelo inseto vetor (triatomíneos da família Reduviidae) após o repasto sangüíneo. No intestino médio do inseto, tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas que se multiplicam e migram para o intestino posterior, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicas (Figura 1). Essa é a forma infectante que é excretada com as fezes e infecta hospedeiros vertebrados, passando através de mucosas ou lesões na pele. Elas, então, invadem células vizinhas, diferenciando-se em amastigotas (Figura 1). Após a multiplicação no citoplasma, amastigotas transformam-se em tripomastigotas. As formas amastigota e tripomastigota são liberadas na corrente circulatória e tecidos adjacentes após a ruptura das células do hospedeiro. Assim, formas tripomastigotas invadem grande variedade de tipos celulares, incluindo células musculares cardíacas e esqueléticas (DaROCHA et al., 2002).

Depois de adquirida, distinguem-se duas fases na Doença de Chagas: a aguda e a crônica (CHAGAS, 1911). A fase aguda caracteriza-se por febre, mal estar, edemas, hepatoesplenomegalia, infartamento ganglionar generalizado, taquicardia e pela presença de tripanosomas no sangue periférico (ANDRADE, 1958). A multiplicação exponencial do parasita resulta em um aumento gradual da parasitemia, geralmente, detectada pelo exame a fresco. A maioria dos pacientes é capaz de desenvolver uma resposta imune que controla a proliferação dos parasitas, tornando a parasitemia subpatente (BRENER, 1987).

Geralmente, o início da infecção é acompanhado de sintomas e sinais locais, decorrentes da penetração do parasita e representados pelo inchaço do olho (sinal de Romaña) ou pelo chagoma de inoculação. (LARANJA; DIAS; NOBREGA, 1948; ANDRADE, 1958).

A fase aguda apresenta um curto curso clínico e reações inflamatórias nos tecidos parasitados (DIAS, 1984). O principal tecido acometido é o cardíaco, cuja manifestação é uma miocardite grave, relacionada com a presença de parasitas intracelulares (ANDRADE, 1982; PRATA; MACÊDO, 1984; PRATA, 2001) e com um processo inflamatório particularmente intenso, havendo dissociação das fibras cardíacas por um considerável grau de edema e infiltrado celular denso e difuso (ANDRADE, 1958). Foi descrita também uma forma assintomática da fase aguda, em que os sintomas são brandos e os pacientes são aparentemente imunorregulados (BRENER, 1987).

Os sintomas e sinais da infecção inicial são, em regra, transitórios, regredindo parcial ou totalmente após os primeiros meses da doença. Alguns doentes, principalmente crianças, morrem durante essa fase, com manifestações de meningo-encefalite ou de insuficiência cardíaca ou, de ambas. Sem tratamento, a mortalidade decorrente dessas causas é de cerca de 5 a 10% (PRATA, 2001). Na maioria, porém, a doença se desenvolve de maneira favorável, passando a uma fase de cronicidade mais ou menos assintomática (LARANJA; DIAS; NOBREGA, 1948).

Depois de dois a quatro meses, as manifestações clínicas agudas desaparecem e os parasitas são raramente detectados no sangue periférico, sendo o parasitismo tissular escasso. A doença entra na fase crônica, geralmente começando com um longo período assintomático, chamado de forma indeterminada, que acomete a maioria dos doentes (50 a 60%) e persiste de dez a trinta anos ou por toda a vida. Cerca de 20 a 30% desenvolvem, após 10 a 20 anos de infecção, uma miocardiopatia de gravidade variável; finalmente, 8 a 10% apresentam a forma digestiva, caracterizada por dilatações do esôfago e/ou cólon (megaesôfago e megacólon). Uma certa porcentagem mostra uma associação das manifestações cardíaca e digestiva (BRENER, 1987).

A forma indeterminada é caracterizada por positividade de exames sorológicos e/ou parasitológicos, ausência de sintomas e/ou sinais da doença, eletrocardiograma convencional normal, e coração, esôfago e cólons radiologicamente normais. Esses critérios estão de acordo com a Validade do Conceito de Forma Indeterminada da Doença de Chagas, apresentado em 1985. Porém, Barreto et al. (1990) afirmaram que todos os portadores da forma indeterminada apresentam algum comprometimento cardíaco, embora as alterações detectadas sejam de pequena magnitude e o dano cardíaco pouco acentuado.

Outra manifestação clínica da doença é a forma cardíaca, anatomicamente caracterizada pela localização das lesões no tecido cardíaco. Os pacientes cardíacos desenvolvem uma miocardiopatia de variável gravidade clínica, expressa por uma grande variação de manifestações, de pequenas alterações eletrocardiográficas até insuficiência cardíaca ou morte súbita (BRENER, 1987).

Quando há insuficiência cardíaca, geralmente, o coração torna-se hipertrofiado e apresenta dilatação em todas as câmaras. A cardiopatia chagásica pode ser sintomática ou assintomática, sendo a forma assintomática apenas detectada após eletrocardiograma em exames periódicos, não causando qualquer alteração na rotina desses pacientes. Entretanto, nesses casos, pode ocorrer morte súbita (PRATA; MACÊDO, 1984).

O conceito de morte súbita em Doença de Chagas é variável. Deve-se considerar como chagásicos falecidos subitamente, aqueles indivíduos cujo óbito ocorre repentinamente e que, anteriormente, não apresentavam sintomas e/ou sinais da doença (LOPES et al., 1975). Esta é uma característica comum da Doença de Chagas crônica, acometendo aproximadamente 38% dos pacientes com ou sem insuficiência cardíaca congestiva (PRATA, 2001).

Pode-se perceber, pelas características patológicas descritas acima, quão grave é a cardiopatia chagásica crônica. A desproporção verificada entre a presença de parasitas e a magnitude das lesões evolutivas suscitou outras hipóteses patogênicas não diretamente relacionadas a estes parasitas (CARVALHAL, 1977).

Grande número de trabalhos tem sugerido o papel patogênico de anticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos que reagem contra receptores muscarínicos e adrenérgicos de cardiomiócitos. A produção de auto-anticorpos pode interferir nas atividades mecânica e cardíaca de células do miocárdio (HIGUCHI et al., 2003). Esses autores postulam que, provavelmente, a resposta inflamatória é responsável pelos danos neuronais progressivos, alterações da microcirculação, deformação da matriz cardíaca e conseqüente insuficiência do órgão.

Sendo *Trypanosoma cruzi* um protozoário intracelular, é possível que porções do DNA do parasita persistam nas células cardíacas de pacientes ou nos leucócitos envolvidos nas lesões. A maneira pela qual tais seqüências podem existir é especulativa, mas as possibilidades incluem fragmentos de DNA episomal e elementos transponíveis do parasita para o genoma da célula do hospedeiro (TEIXEIRA et al., 1991). O fenômeno da auto-imunidade poderia contribuir para a patogênese da doença e a sua ocorrência seria conseqüência da presença contínua de DNA de *T. cruzi* nos locais de lesão (JONES et al., 1993).

A Doença de Chagas crônica pode acometer também o trato digestivo e o sistema nervoso. Na forma digestiva, uma das manifestações mais precoces do megaesôfago é a incoordenação dos movimentos peristálticos do esôfago, que mais tarde são seguidos por dilatação, disfagia e sintomas relacionados. Constipação prolongada é o principal sintoma do megacólon, que apresenta diferentes graus de dilatação (BRENER, 1987).

As principais manifestações clínicas encontradas na forma digestiva são a disfagia, odinofagia (dor à deglutição dos alimentos), regurgitações, epigastralgia, dispepsia, hipertrofia das parótidas, discinesia esofágica, alterações morfológicas e desordem motora do arco duodenal, alterações do trânsito intestinal, meteorismo (acúmulo de gases no abdômen) e constipação intestinal (REZENDE, 1959).

Chapadeiro et al. (1964) observaram casos em que há associação de “megas” com a cardiopatia chagásica crônica, sendo esta chamada de forma mista, representando 17,3% de prevalência.

Em nenhuma outra doença infecciosa o envolvimento do sistema nervoso autônomo é tão importante quanto na Doença de Chagas, o que é demonstrado pela presença de lesões, desnervação e desordens funcionais. A desnervação do sistema parassimpático está melhor documentada e é mais intensa do que do sistema simpático. A destruição ocorre, preferencialmente, em neurônios periféricos e é mais freqüentemente observada na fase aguda, provavelmente persistindo durante a crônica, sendo mais evidente nas formas cardíacas e digestivas do que na forma indeterminada (DeFARIA; REZENDE; RASSI, 1988; PRATA, 2001).

Imunologia e Caracterização Antigênica do Parasita

O sistema imunológico participa de modo complexo na Doença de Chagas. A resposta imune nos estágios iniciais parece ser protetora, entretanto, o tripanosoma é capaz de escapar dessa resposta e sobreviver (ABATH, 1983).

No homem, a infecção por *T. cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita (BRODSKYN; BARRAL-NETO, 2000). A eficiência e o caráter da resposta imune dependem do hospedeiro, da cepa de *T. cruzi* envolvida e da fase da doença (ABATH, 1983).

Tem sido descrito em diferentes estudos, que a forte participação do sistema imune ocorre durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, na qual há ativação inespecífica de macrófagos (ORTIZ-ORTIZ et al., 1976) e células *natural killer* (NK) (HATCHER et al., 1981)

acompanhada pela ativação policlonal de linfócitos B e T e por hipergamaglobulinemia (MINOPRIO et al., 1986; MINOPRIO et al., 1987). O mecanismo preciso dessa ativação inicial é pouco entendido (BRENER; GAZZINELLI, 1997).

Estudos recentes indicam que glicoconjugados presentes na superfície de tripomastigotas e amastigotas podem ser moléculas chave, envolvidas no início da inflamação e resposta imune durante a fase aguda da doença (BENTO et al., 1996; CAMARGO et al., 1997).

Glicosilfosfatidilinositol (GPI) ancorados a glicoproteínas do tipo mucina (GPI mucinas), que são moléculas dominantes na superfície de tripomastigotas e amastigotas, iniciam a síntese de citocinas por macrófagos inflamatórios. As quimiocinas e citocinas proinflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α), sintetizadas por macrófagos expostos ao parasita (ou moléculas do parasita), ativarão diferentes compartimentos do sistema imune (BRENER; GAZZINELLI, 1997).

Glicoinositolfosfolípídeos (GIPLS) extraídos da forma epimastigota e presentes nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* são capazes de estimular linfócitos B, de maneira não específica, a secretar imunoglobulinas IgM, IgG1 e IgG3 (BENTO et al., 1996). Estes achados explicam, pelo menos em parte, a ativação policlonal de células B e a hipergamaglobulinemia durante a fase aguda da Doença de Chagas.

Na fase aguda da Doença de Chagas humana, a maior parte da resposta imune humoral parece ser composta por anticorpos contra mucinas GPI de tripomastigotas, uma vez que boa parte dos anticorpos produzidos nessa fase da doença, reconhecem o epítipo galactosil- α -3galactose (Gal α 1-3Gal) (GAZZINELLI et al., 1991) que está presente nessas mucinas GPI (ALMEIDA et al., 1994).

A imunização experimental com parasitas fixados e frações induz proteção parcial ou ausência de infecção. Os anticorpos protetores, aumentados durante a fase crônica da doença, reconhecem epítipos na superfície de tripomastigotas vivos, que são rompidos em um ensaio *in vitro* e, então, esse processo foi denominado de lise mediada pelo complemento (CoML). Portanto, anticorpos protetores são denominados como anticorpos líticos (AL) (BRENER; GAZZINELLI, 1997).

Epítipos do parasita que induzem a produção de AL têm sido pesquisados e foi observado que um polipeptídeo de 160KD é indutor de anticorpos protetores. A glicoproteína de 160-KD é alvo de parasitas viáveis em membranas e foi demonstrado que expressa um epítipo presente apenas em tripomastigotas e não em outros estágios do desenvolvimento do parasita. A importância clínica desse polipeptídeo foi reconhecida, pois foi associado com atividade

não viável de tripomastigotas no soro de pacientes. A glicoproteína de 160-KD de *T. cruzi* é expressa em membranas de tripomastigotas em quantidades muito pequenas (revisito por BRENER; GAZZINELLI, 1997).

Soro de pacientes infectados por *T. cruzi* contém um anticorpo natural que reconhece o epítipo Gal α 1-3Gal. Foi demonstrado que anticorpos anti-Gal α 1-3Gal (anticorpos naturais anti-Gal) de pacientes chagásicos crônicos são muito mais potentes em mediar CoML do que anti-Gal α 1-3Gal de soros normais, participando no controle de tripomastigotas.

Sabendo-se da importância da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro a antígenos do parasita, é fundamental o conhecimento desses antígenos a fim de que novos métodos de detecção da doença e novos alvos para vacinas possam ser desenvolvidos.

Casos de Doença de Chagas aguda são, geralmente, resolvidos após poucos meses de infecção, mas muitos indivíduos desenvolvem as manifestações crônicas de uma doença sistêmica. Então, na maioria dos chagásicos crônicos, a existência da infecção é detectada por anticorpos contra o parasita, utilizando-se de frações do mesmo como antígeno. Entretanto, o uso de uma mistura complexa de antígenos não permite a detecção de variações na especificidade nas infecções aguda e crônica. Há, portanto, clara necessidade de melhor caracterização desses antígenos (VERGARA, 1992).

Assim, na Doença de Chagas, os anticorpos constituem importantes componentes nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra *T. cruzi*. Vários antígenos do parasita têm sido estudados no intuito de melhor compreender a interação antígeno-anticorpo na doença, possibilitando o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais exatos ou até mesmo possíveis antígenos candidatos à vacina. Além disso, é possível que diferentes antígenos de *T. cruzi* ativem mecanismos imunológicos distintos, levando ao aparecimento das manifestações clínicas da doença.

Detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, por métodos sorológicos, é ainda o principal método para o diagnóstico da Doença de Chagas. Os testes disponíveis comercialmente utilizam extratos ou frações semi-purificadas de formas epimastigotas (não infectantes), com considerável variação na reprodutibilidade e confiabilidade. A reatividade cruzada tem sido observada principalmente em pacientes com leishmaniose ou com infecção por *T. rangeli* (UMEZAWA et al., 1999).

Em relação aos antígenos desse parasita, muitos têm sido descritos, utilizando-se de clonagem ou de bibliotecas de expressão obtidas de pacientes chagásicos ou de animais infectados por *T. cruzi*. A fim de melhorar o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas e evitar problemas de especificidade e obtenção de antígenos, técnicas moleculares, tais como,

clonagem e expressão gênica e a síntese *in vitro* de peptídeos correspondentes, permitiram a identificação e avaliação de uma série de antígenos que poderiam ser úteis no diagnóstico e desenvolvimento de uma vacina (FERREIRA et al., 2001). Vários estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar esse aspecto.

Muitas moléculas antigênicas estão presentes no parasita, mas a maioria, se não todas, parecem estar presentes em pequenas quantidades. Assim, é difícil estimar, especialmente se os antígenos predominantes estão relacionados e codificados por famílias de genes de múltiplas cópias (FRASCH et al., 1991).

Alguns dos antígenos de *T. cruzi* identificados são proteínas internas, como o antígeno-30, CRA, JL8, TCR27, as proteínas P ribossomais e a proteinase de cisteína de *T. cruzi*, que é encontrada nos lisossomos e possivelmente na superfície da célula. Outros antígenos estão localizados no flagelo, como o antígeno I, FRA, JL7. Sabendo-se que frações flagelares protegem camundongos contra infecção fatal, tais antígenos podem ter implicações na sorologia e imunoproteção. Outros antígenos localizam-se na superfície do parasita como os antígenos 2, 13 e SAPA (Tabela 1) (revisado por FRASCH et al., 1991).

A seleção de antígenos específicos é de fundamental importância para a obtenção de diagnósticos mais exatos da Doença de Chagas (VERGARA et al., 1991).

Dessa maneira, novas tecnologias têm sido empregadas para mapear epítomos e antígenos que possam identificar ou gerar uma resposta imune específica, e dentre estas, a apresentação de antígenos recombinantes randômicos em fagos filamentosos, ou seja, *Phage Display*.

Tabela 1. Descrição de antígenos potenciais para uso em diagnóstico da Doença de Chagas (SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001).

Antígeno	Aminoácidos repetidos	Proteína (kDa)	Observações	Diagnóstico/uso
CRA	14	225	Ag citoplasmático	Infecções crônicas
Ag30		180-225		
JL8		>170		
TCR27		150-200		
FRA	68	>300	Proteína associada ao citoesqueleto	Infecções crônicas
Ag1		205		
JL7		>170		
H49		>300		
B13	12	116-140	Proteína de superfície de tripomastigota	Infecções crônicas
Ag2		85		
TCR39		82		
PEP-2				
Ag36	38	85	Proteína associada ao microtúbulo	Infecções agudas e crônicas
JL9		110		
MAP				
SAPA	12	105-205	Trans-sialidases (família TS)	Infecções agudas e congênitas
TCNA				
TS				
Ag13	5	85		Infecções agudas e crônicas
TcD		260		
B12	20	200-230		Infecções crônicas
TcE	7	35	Proteína ribossomal	Infecções crônicas
JL5	nenhum	38	Proteína P ribossomal	Formas clínicas cardíacas
A13	nenhum	230		Infecções agudas e crônicas
FCaBP	nenhum	24	Proteína de ligação de Ca ²⁺ flagelar	Infecções crônicas para monitoramento de cura
1F8		24		
Tc-24		24		
Tc-28		28		
Tc-40	nenhum	38-100		Infecções crônicas
Cy-hsp70	nenhum	70	Proteínas de choque térmico	Infecções crônicas para monitoramento de cura
Mt-hsp70		70		
Grp-hsp78		78		
FL-160	nenhum	160	Proteína de superfície associada ao flagelo	Infecções crônicas para monitoramento de cura
CEA				
CRP				
SA85-1.1	nenhum	85	Proteína de superfície de tripomastigota	Infecções crônicas
Ubiquitina	nenhum			Infecções crônicas

Tecnologia de “Phage Display”

Desde a sua descrição por Smith em 1985, a tecnologia de “Phage Display”, exposição de biomoléculas em fagos, tem apresentado uma crescente utilização em diversas áreas das Ciências. Este autor foi pioneiro a conseguir a expressão da enzima de restrição Eco RI como uma fusão da proteína três (pIII) do capsídeo do fago.

Os Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus responsáveis pela infecção de uma variedade de bactérias Gram-negativas por meio do pilus sexual. A classe Ff de bacteriófagos filamentosos (f1, fd, e M13) tem sido amplamente estudada. Esses fagos são formados por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 2). Das cinco proteínas presentes no capsídeo viral, existem aproximadamente 2800 cópias de 50 aminoácidos da pVIII (RUSSEL, 1991).

A exposição em fagos filamentosos é baseada na clonagem de fragmentos de DNA codificantes de milhões de variantes de certos ligantes (BENHAR, 2001), como proteínas, incluindo anticorpos ou peptídeos.

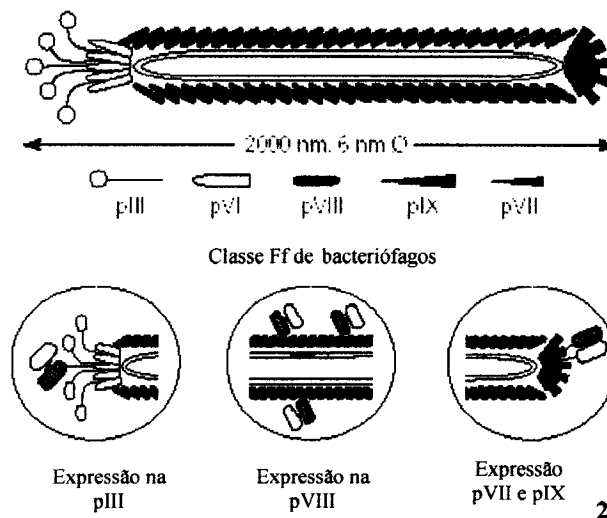


Figura 2. Esquema representativo de um bacteriófago de classe Ff ilustrando as proteínas do capsídeo viral e três modelos de exposição de peptídeos respectivamente nas proteínas pIII, pVIII e simultaneamente nas proteínas pVII e pIX.

(Disponível em: <http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html>)

Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que fagos filamentosos não geram uma infecção lítica em *E. coli*, mas preferencialmente induz um estado na qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise. A infecção é iniciada pelo acoplamento da

pIII do fago ao f *pilus* de uma *E. coli* do gênero masculino. Somente o DNA de fita simples e circular do fago penetra na bactéria, onde é convertido pela maquinaria de replicação do DNA bacteriano em uma forma replicativa de plasmídeo de fita dupla. Esta forma replicativa sofre constantes replicações do DNA circular para gerar DNA de fita simples e ainda servir como molde para expressão das proteínas de fago pIII e pVIII. A progênie do fago é montada por empacotamento do DNA de fita simples em capsídeos protéicos e expulsos da bactéria através da membrana no meio (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

Visando a abreviação do tempo requerido para seleção de populações moleculares compostas pelo maior número possível de variantes, desenvolveu-se a construção de bibliotecas conformacionais, que são definidas como uma população de ligantes em potencial, composta por (bio) moléculas de formas variantes. Cada membro da biblioteca apresenta uma forma distinta, que determinará a capacidade de interação deste com a molécula alvo. Quanto maior for o número de formas representadas na biblioteca, mais facilmente será encontrado um ligante afim (POSNER et al., 1994).

A conexão entre genótipo e fenótipo permite o enriquecimento de fagos específicos, com a utilização, por exemplo, de um alvo imobilizado para a seleção (BENHAR, 2001).

A seleção de seqüências baseada na afinidade de ligação do fago a uma molécula alvo é feita por um processo de seleção *in vitro* denominado *Biopanning* (PARMLEY; SMITH, 1988). A seleção, ou *Biopanning*, é realizada pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. O alvo é imobilizado em um suporte sólido tais como placas de ELISA, microesferas magnéticas ou de afinidade, resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas, e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O *pool* de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica ou *biopanning* (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com seqüências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens, os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA (Figura 3) (SMITH, 1985).

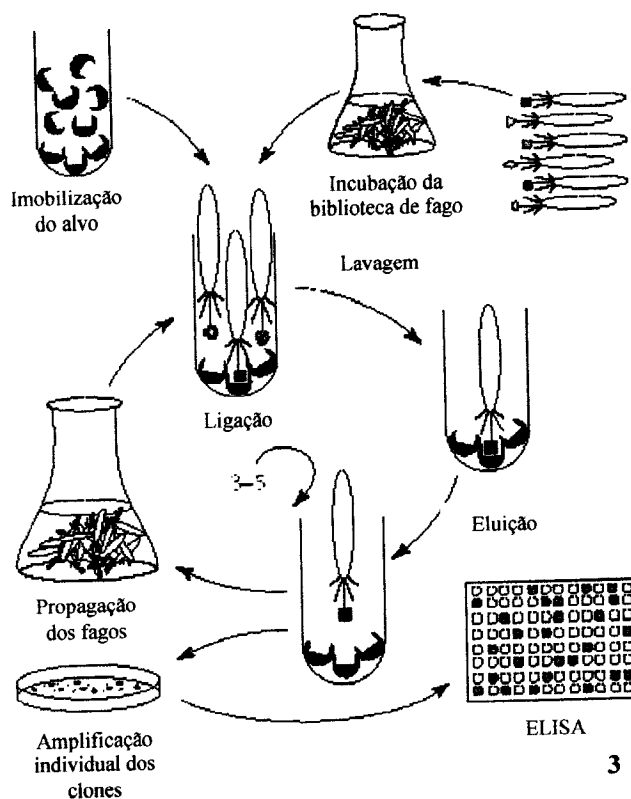


Figura 3. Esquema representativo do processo de *Biopanning*. Imobilização do alvo e incubação da biblioteca de fagos, retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas, eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli*, amplificação dos fagos eluídos e sequenciamento da população de fagos com maior afinidade pelo alvo. (Disponível em: <http://www.molgen.mpg.de/~invitro/technology.html>).

Peptídeos selecionados contra um alvo particular, com seqüência similar, têm um papel na identificação do motivo necessário para ligação (STEPHEN; LANE, 1992). Nos casos em que os peptídeos selecionados não se assemelham ao peptídeo ligante natural, foram denominados mimetopos (GEYSEN; RODDA; MANSON, 1986; SMITH; SCOTT, 1993).

Uma das moléculas mais utilizadas para a construção de bibliotecas em fagos filamentosos são as imunoglobulinas ou anticorpos, que são proteínas envolvidas na resposta imune a agentes infecciosos, sendo investigadas sistematicamente por seu envolvimento na homeostase do organismo dos vertebrados e por seu potencial biotecnológico. Peptídeos que neutralizam imunoglobulinas podem ser empregados como reagentes diagnósticos ou usados como agentes terapêuticos controlando doenças autoimunes (BLANK et al., 1999), explicitando a importância de pesquisas que envolvam o conhecimento desses peptídeos.

Apesar do controle da transmissão vetorial da Doença de Chagas em muitos países da América Latina, ainda necessita-se de um método diagnóstico mais preciso capaz de detectar a presença de infecção por *T. cruzi*, principalmente para a utilização em Bancos de Sangue. Ainda, não está definido se há um padrão de resposta imune predominante nas formas clínicas

cardíaca e digestiva e se esse possível padrão pode ser o responsável pelas manifestações clínicas da fase crônica.

Fica, portanto, evidente a procura por novos antígenos que permitam estudar a resposta imune e compreender melhor a interação antígeno-anticorpo na Doença de Chagas, sendo uma das mais importantes alternativas para o desenvolvimento de diagnósticos mais sensíveis e específicos, bem como de vacinas mais efetivas.

O intuito deste trabalho foi selecionar peptídeos recombinantes contra IgG humana purificada das formas cardíaca, digestiva e indeterminada da fase crônica da Doença de Chagas, a fim de avaliar a possibilidade de um padrão diferenciado de resposta imunológica entre as três formas da doença. Pretendeu-se ainda, verificar reatividade diferencial dos clones frente aos anticorpos utilizados para seleção (IgG) na busca clones com potencial diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Purificação dos anticorpos

Os soros utilizados para execução dos experimentos foram cedidos pela Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética, protocolo 343 (CEP UFTM). Foram fornecidos soros de pacientes com diagnóstico positivo para a Doença de Chagas, sendo esses pacientes enquadrados na fase crônica e separados, de acordo com os sintomas, em forma indeterminada, forma cardíaca e forma digestiva. Soros de pacientes negativos para a Doença de Chagas também foram cedidos.

Desta forma, foram feitos *pools* de soros de 10 pacientes positivos para cada forma da doença (digestiva, cardíaca e indeterminada) e um *pool* de soro de 10 pacientes controles. Estes *pools* foram purificados com microesferas magnéticas ativadas com proteína G para obtenção de IgG, segundo instruções do fabricante (DYNAL BIOTECH, Dynabeads Protein G): 2×10^9 microesferas foram lavadas três vezes com 500 μL de tampão MES (1M, pH 5,0), em seguida, adicionou-se 100 μL de soro e incubou-se por 40 minutos em temperatura ambiente sob forte agitação. Decorrido o tempo de incubação, as microesferas foram precipitadas por captura magnética em separador próprio, o sobrenadante foi descartado e lavou-se três vezes com tampão MES (1M, pH 5,0). Ao retirar o campo magnético, as IgG foram eluídas com tampão Citrato de Sódio (1M pH 2-3) e o pH neutralizado com Tris (1M pH 9,1), separando as IgGs das microesferas magnéticas após introdução dos tubos novamente no separador magnético.

As amostras obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro – Amersham Biosciences), com densidade óptica de 280 nm, utilizando-se 2,5 μL de amostra do anticorpo purificado e 500 μL de água MilliQ, gerando um fator de diluição de 200, o qual foi multiplicado à absorbância obtida. Em seguida, a presença de IgG purificada foi verificada através de um teste em membrana de nitrocelulose, (Hybond ECL – GE Healthcare) com poros de 0,45 μm , a qual foi bloqueada por 30 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação, com TBS-T (Tris-HCl 50 mM – pH 7,5; NaCl 150 mM+ 0,5% Tween 20+ 5% de molico), após a adição de 5 μL de cada amostra de anticorpo purificado obtida. Posteriormente, houve adição de anti-IgG humana marcada com fosfatase alcalina diluída em TBS-T (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$), a qual foi incubada por uma hora, em temperatura ambiente, sob agitação.

A revelação do teste foi realizada com NBT/BCIP em de tampão, até que os *dots* começassem aparecer.

Seleção de peptídeos – *Biopanning* em placa

Para a seleção dos peptídeos recombinantes, foi utilizado um Kit, que consiste em uma Biblioteca combinatória de Peptídeos randômicos de 12-mers fusionados na proteína pIII do fago M13 (Ph.D™ - 12 Phage Display Peptide Library – New England Biolabs).

O experimento procedeu de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante da Biblioteca (New England - BioLabs), com modificações para adequação ao objetivo proposto. O *Biopanning* foi realizado utilizando uma placa MaxiSorp (Nunc MaxiSorp™), a qual teve três poços sensibilizados com anticorpos (IgG) previamente quantificados em uma concentração de 100 µg/mL. Cada um dos poços foi sensibilizado com 150 µL de solução de anticorpos provenientes de cada forma da doença (digestiva, cardíaca e indeterminada) em tampão Carbonato 0,1M (NaHCO₃, pH=8,6) (Figura 4). A placa foi incubada *overnight*, a 4°C, em ambiente úmido, sob agitação constante e suave. O conteúdo da placa foi descartado, batendo-a com a face para baixo em papel absorvente para a eliminação total de soluções residuais (procedimento repetido após cada lavagem em todos os passos do experimento). Imediatamente após, 300 µL de solução bloqueio (NaHCO₃- 0,1M, pH:8,6; BSA- 5 mg/mL; NaN₃- 0,02%) foram acrescentados a cada poço, sendo esses incubados durante uma hora, a 4°C, sob agitação. A solução bloqueio foi descartada e a placa foi lavada seis vezes com 250 µL por poço de TBS-T (TBS + 0,05% de tween 20).

Foram utilizados 10 µL da Biblioteca original (4×10^{10} partículas virais) diluídas em 100 µL de TBS-T (0,05%) para cada poço da placa bloqueada. A incubação ocorreu por uma hora, em temperatura ambiente, sob agitação. Os fagos não ligantes foram descartados. A placa foi lavada por 10 vezes com TBS-T (0,05%).

Posteriormente, foi feita a primeira eluição, a qual caracterizou-se por ser negativa (Figura 4), uma vez que foi realizada na presença de IgG negativa para a Doença de Chagas em todos os poços. Adicionou-se, portanto, a cada *well*, 100 µL de solução de IgG negativa em TBS, numa concentração de 100 µg/mL. A incubação teve duração de uma hora, em temperatura ambiente, sob agitação. O sobrenadante foi descartado, e a placa foi lavada por mais 10 vezes com TBS-T (0,05%), sempre realizando-se o procedimento de secagem da placa para eliminação de soluções residuais.

1º, 2º e 4º Rounds:

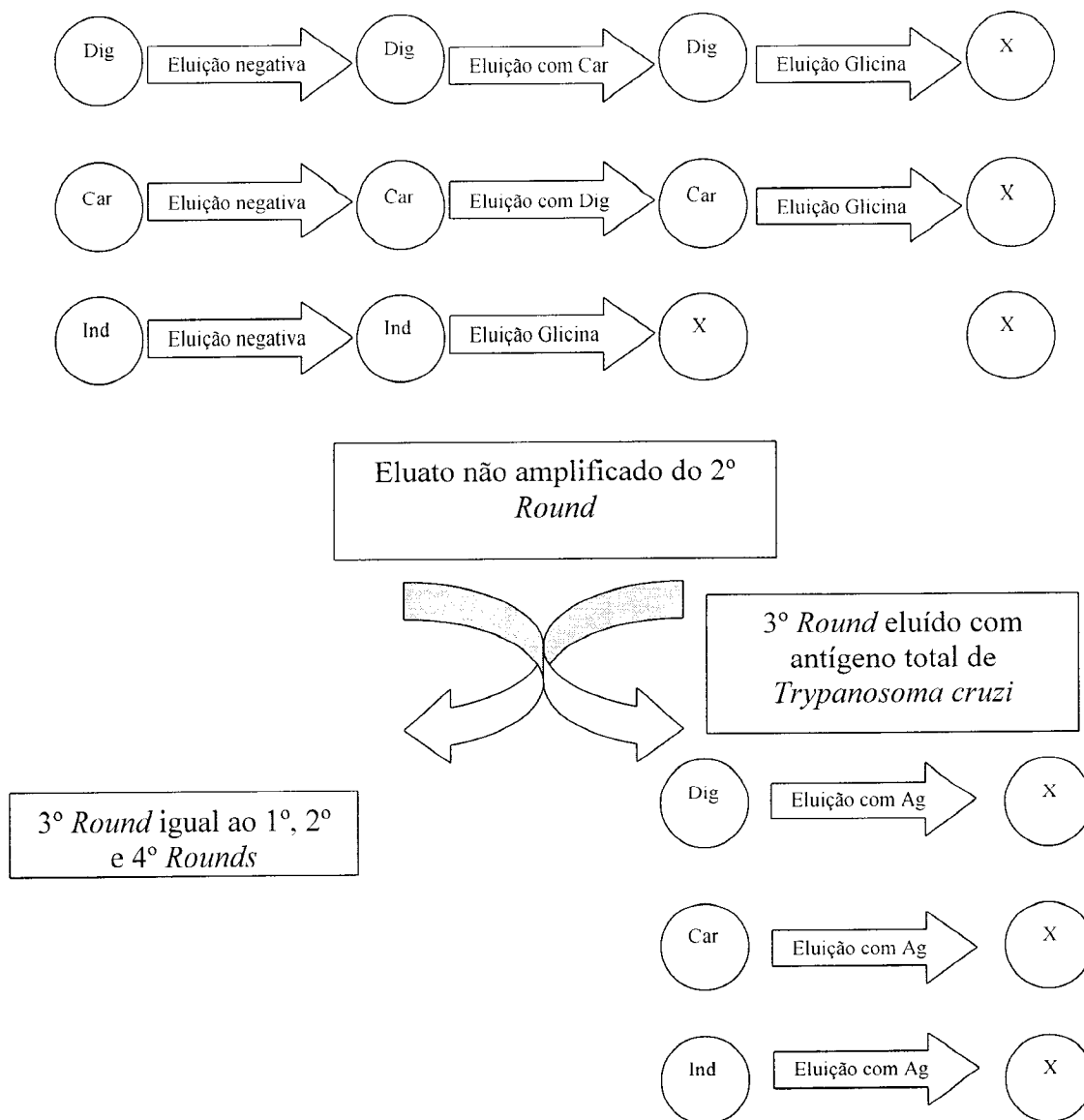


Figura 4. Descrição esquemática dos quatro ciclos de seleção (*Biopanning*) realizados, onde x corresponde aos eluatos não amplificados de cada *round*.

Os fagos ligantes foram mais uma vez eluídos, sendo o poço sensibilizado com IgG da forma digestiva da doença eluído com 100µL de solução de IgG da forma cardíaca da doença em TBS (Figura 4). De maneira semelhante, o poço sensibilizado com IgG da forma cardíaca da doença foi eluído com 100 µL de solução de IgG digestiva em TBS, tendo sido ambos incubados durante uma hora, em temperatura ambiente (Solução de eluição 100 µg/µL). O poço sensibilizado com IgG da forma indeterminada da doença foi eluído com 100 µL de tampão glicina (0,1 M; pH 2,7) (Figura4), a qual possui a propriedade de acidificar o meio,

provocando o desprendimento dos fagos ainda ligados na placa. Após 10 minutos de incubação, em temperatura ambiente, o sobrenadante obtido foi colocado em um microtubo contendo 15 μ L de Tris-HCL (1M pH 9,1), para estabilização do pH da solução, a qual foi armazenada a 4°C.

Os sobrenadantes resultantes das demais eluições foram descartados e os procedimentos de lavagem e secagem da placa foram realizados como descrito anteriormente.

A terceira eluição foi realizada, portanto, apenas nos poços sensibilizados com IgG das formas digestiva e da forma cardíaca da doença (Figura 4). Para cada poço, 100 μ L de glicina foram acrescentados e incubados por 10 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação. Os sobrenadantes foram coletados em microtubos contendo 15 μ L de Tris-HCl, e guardados a 4°C.

Os eluatos obtidos através do processo descrito são denominados eluatos não amplificados, os quais foram amplificados em bactéria *E. coli* (ER2738). Para realização da referida amplificação, incubou-se 20 mL de meio de cultura líquido (LB-10g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl- 2,0g para 100mL de água MilliQ) (previamente autoclavado), contendo o antibiótico tetraciclina em uma concentração de 1 μ g/mL, com *E. coli* (ER2738), a 37°C, *overnight*, sob agitação. Outros três meios de LB foram feitos e neles foram adicionado tetraciclina, bactéria já crescida durante a noite, numa proporção de 1:100, a fim de que atingisse uma Densidade Óptica (O.D) de 0,3 e mais 80 μ L de eluato, cada qual em um dos Erlen mayer contendo meio e bactéria. Houve uma incubação de cinco horas, a 37°C, sob agitação dos eluatos. As culturas foram transferida para tubos de centrífuga, os quais foram centrifugados durante 15 minutos, 5000 rpm, a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos limpos e recentrifugados por mais cinco minutos. Os sobrenadantes restantes foram transferidos para tubos limpos contendo 1/6 do volume total de PEG -NaCl (20% peso/volume de polietileno glicol-8000; NaCl 2,5 M). Os tubos foram incubados *overnight*, a 4°C, para que houvesse precipitação dos fagos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 40 minutos, 5000 rpm, a 4°C. Descartou-se os sobrenadantes e recentrifugou-se por mais um minuto. Os sobrenadantes restantes foram retirados com pipeta e descartados. A cada tubo foi adicionado 1mL de TBS, e os *pellets* foram ressuspensos com pipeta. As soluções obtidas foram transferidas para microtubos de 2mL e centrifugadas por cinco minutos, 14000 rpm, a 4°C. Os sobrenadantes foram novamente transferidos para microtubos limpos, contendo 1/6 do volume total de PEG (2,5M)-NaCl e deixados no gelo por uma hora. Subsequentemente, os microtubos foram centrifugados durante 15 minutos, 14000 rpm, a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e

os *pellets*, recentrifugados por mais um minuto. O restante dos sobrenadantes foi retirado com pipeta. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 150 μ L de TBS e centrifugados por cinco minutos, 14000 rpm, a 4°C. As soluções foram transferidas para tubos novos e armazenadas também a 4°C.

Esses eluatos amplificados foram utilizados nos *rounds* seguintes no lugar da Biblioteca original, de forma que o número de partículas virais incubadas foi de 2×10^{11} ufc. Assim, ao final de cada *round*, obtém-se eluatos não amplificados e eluatos amplificados, sendo estes usados no ciclo de seleção subsequente.

Cinco ciclos de seleção (*Biopanning*) foram realizados, sendo que a partir do eluato amplificado do 2º *round*, outras duas seleções diferentes foram feitas. A realização do 4º *round* foi importante para que se pudesse estimar se a variabilidade de fagos ainda era crescente, uma vez que através da quantificação das colônias geradas a partir dos eluatos não amplificados de cada *round*, é possível verificar o enriquecimento ou estabilidade da Biblioteca.

A metodologia acima descrita foi utilizada para os quatro *rounds* realizados, exceto para um terceiro *round*, que caracterizou-se por apresentar um processo de eluição distinto.

Para o terceiro *round* que se diferiu dos demais, a sensibilização, bloqueio, lavagem, título de entrada de fagos foram constantes, sendo a eluição diferente, uma vez que nesse ciclo, ela foi única e utilizando antígeno total da cepa y de *Trypanosoma cruzi*, 100 μ L/poço, em uma concentração de 100 μ g/mL (Figura 4). Após essa eluição, o conteúdo de cada poço foi retirado e guardado para realização do procedimento de titulação.

Todos os processos de titulação realizados ao longo do experimento foram executados de forma idêntica, para tanto, preparou-se meio de cultura sólido (6,0g de LB; 4,5g de Bacto Agar para 300 mL de água MilliQ) (previamente autoclavado), para confecção das placas. Posteriormente, espalhou-se 88 μ L de IPTG 0,5mM e X-Gal 40 μ g/mL em cada placa. Com as placas prontas, iniciou-se o processo de diluição dos eluatos. Os três eluatos não amplificados foram diluídos de 10^1 a 10^4 ; enquanto os amplificados foram diluídos de 10^1 a 10^{11} , embora apenas as quatro últimas diluições do amplificado tenham sido utilizadas. Desta forma, em cada microtubo, foram adicionados 9 μ L de meio líquido de cultura (LB previamente autoclavado) e 1 μ L dos eluatos nos primeiros microtubos de cada diluição seriada. Os microtubos eram agitados e 1 μ L de cada um deles era passado para o tubo seguinte. Foram adicionados ainda, 200 μ L de bactéria a uma O.D de 0,5 previamente crescida. Agitaram-se os microtubos, deixando a bactéria incubar por cinco minutos com as diluições de fagos. Houve também o preparo do meio denominado Agarose Top (1,6g de LB;

0,08g de $MgCl_2$; 0,56g de Agarose para 80 mL de água MilliQ) (3mL para cada placa), que também foi autoclavado. O conteúdo de cada microtubo dos eluatos não amplificados (10^1 a 10^4) de cada forma da doença, foi adicionado a 3 mL de Agarose Top (ainda líquida/55°C), agitado suavemente e colocado na placa confeccionada como descrito anteriormente. O mesmo procedimento foi realizado para os eluatos amplificados, no entanto, as diluições usadas foram de 10^8 a 10^{11} .

Caracterização dos clones e Obtenção do DNA

As colônias que apresentaram coloração azul, demonstrando a quebra do substrato X-Gal e a expressão do gene da β -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, foram reamplificadas separadamente em placas *deep-well* para armazenamento dos clones individuais selecionados e extração do DNA, da seguinte forma: as colônias isoladas foram adicionadas a 1mL de meio de cultura contendo *E. coli* (ER2738) em fase inicial de crescimento, e após cinco horas de incubação a 37°C sob agitação vigorosa, a placa foi centrifugada por 10 minutos, 3700 rpm, a 4°C. Um volume de 50 μ L foi armazenado juntamente com água e glicerol 50%. Conforme descrito por Barbas et al. (2001), o restante do conteúdo das placas continuou incubando por mais 19 horas, a 37°C sob agitação. Um volume de 800 μ L de cada poço foi transferido para poços de placas limpas, com posterior adição de 350 μ L PEG –NaCl (20% de polietileno glicol-8000, NaCl 2,5M), e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente para precipitação dos fagos. As placas foram centrifugadas durante 40 minutos, a 3700 rpm, a 20°C e invertidas sobre papel absorvente. O *pellet* foi ressuscitado em 100 μ L de Iodeto de Sódio (Tris-HCl 10mM pH:8,0, EDTA 1mM e NaI 4M) e a precipitação do ácido nucléico foi realizada com 250 μ L de Etanol absoluto por 10 minutos em temperatura ambiente. As placas foram centrifugadas mais uma vez por 40 minutos, 3700 rpm, a 20°C, e o conteúdo das placas foi descartado, com posterior acréscimo de 150 μ L de Etanol 70%. As placas foram centrifugadas por mais 15 minutos, 3700 rpm, 20°C e o sobrenadante foi descartado. O conteúdo das placas foi ressuscitado em aproximadamente 20 μ L de água.

A quantidade e a qualidade do DNA obtido foi avaliada por amostragem em gel de agarose 0,8%, tendo sido a leitura espectrofotométrica realizada à 260 nm.

Sequenciamento do DNA

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se “DYEnamic™ ET dye terminator kit” (MegaBace™) (GE Healthcare), com 3,0 µL do DNA obtido e 10 pMoles de *primer* (96 M13- 5' OHCCCTCATTAGTTAGCGCGTAACG 3'), o qual amplifica a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados nos fagos M13 recombinantes.

A reação de amplificação foi feita em termociclador (Eppendorf), e a precipitação do material amplificado realizou-se por meio do acréscimo de Acetato de Amônio (4M) e Etanol absoluto, seguido de centrifugação por 45 minutos a 14000 rpm em centrífuga refrigerada, lavagem com etanol 70% e centrifugação por 10 minutos nas mesmas condições anteriores. A diluição foi feita com tampão de corrida apropriado (“Loading buffer”). O processo de sequenciamento foi realizado em seqüenciador automático “MegaBace 1000” (Amersham Biosciences).

ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) Pós-sequenciamento

Os Ensaio Imunoenzimáticos foram realizados com sobrenadante de fagos e, para tanto, promoveu-se o crescimento dos clones em placa *deep well*, adicionando-se 1mL de meio de cultura contendo *E. coli* (ER2738), com O.D= 0,3, e 5 µL de fagos do *back up*. A placa foi incubada durante toda a noite, a 37°C, sob agitação.

Testes de ELISA foram realizados com o objetivo de rastrear a reatividade dos peptídeos sintéticos (expressos nos fagos selecionados), e para tanto, no sistema de captura, as partículas virais dispersas em solução no meio de cultura foram capturadas e utilizadas como antígeno.

Placas de alta afinidade (NUNC) foram sensibilizadas com 1 µg/well de anticorpo monoclonal anti-proteína pVIII do fago (Amersham Biosciences) diluídos em 50 µL de tampão carbonato e incubadas durante toda noite sob agitação, a 4°C. Posteriormente, foram adicionados a cada *well*, 200 µL de bloqueio (TBS 1X+ BSA 2,5%) e deixou-se as placas incubando durante uma hora, a 37°C. As placas foram lavadas por três vezes com TBS-Tween 20 (0,05%) em lavadora automática de microplacas (Thermo Plate) e, em seguida, adicionou-se 50 µL de meio de cultura contendo fagos e incubação por uma hora, a 37°C. As placas foram lavadas seis vezes com TBS-Tween 20 (0,05%) e adicionou-se 50 µL/well de um *pool* de soros de dez pacientes portadores da forma cardíaca da Doença de Chagas, 50 µL /well de

um pool da forma digestiva, 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ de um pool da forma indeterminada e 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ de um pool de dez soros de pacientes negativos para a doença. Todos os clones seqüenciados foram testados frente a todos os tipos de soros. Houve incubação de uma hora, a 37°C, com posterior lavagem das placas por mais seis vezes com TBS-Tween 20 (0,05%). Foram adicionados 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ de anticorpo conjugado, Anti-IgG humana marcada com peroxidase (IgG, Fc HRP-USBiological), diluída em bloqueio, em uma concentração de 1:5000. Houve incubação durante uma hora, a 37°C. As placas foram lavadas por mais seis vezes com TBS-Tween 20 (0,05%).

Os ensaios foram revelados com 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ de substrato OPD (O – Phenylenediamine dihydrochloride – Sigma Chemical) em água e o processo de coloração foi interrompido com 10 μL de Ácido Sulfúrico 2M. A leitura da absorbância foi feita em leitora de microplacas, com filtro de 492 nm (Thermo Plate).

O valor que representa a densidade ótica (OD) de cada amostra foi subtraído pelo valor obtido a partir da leitura do *well* contendo fago selvagem para cada forma da doença. Posteriormente, cada OD foi dividida pelo *Cut off* (média de todas as amostras negativas multiplicada por 3 x desvio padrão), possibilitando o cálculo do Índice ELISA de cada peptídeo testado. Foram consideradas positivas as amostras com $\text{IE} > 1$.

Análise dos dados

As seqüências de DNA geradas pelo sequenciamento foram submetidas a programas de informática disponíveis on-line.

Para a tradução do DNA seqüenciado em seqüências protéicas utilizou-se o programa DNA2PRO12, específico para seqüências de bibliotecas “New England Biolabs” (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>).

A análise dos motivos protéicos e o alinhamento dos peptídeos foram realizados utilizando-se o programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>).

Os motivos protéicos consenso gerados foram analisados quanto a homologies com proteínas de *Trypanosoma cruzi* depositadas no “GENEBANK” pelo programa BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação dos anticorpos

A purificação dos anticorpos (IgG) por meio de *beads* magnéticos mostrou-se eficiente, pois a quantificação espectrofotométrica realizada a uma densidade ótica de 280 nm, é utilizada para acusar a presença de proteínas, por meio de valores numéricos maiores que zero. Todas as leituras realizadas no espectrofotômetro geraram valores acima de zero, indicando a existência de anticorpos na solução, e possibilitando o posterior cálculo da concentração das referidas soluções (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação espectrofotométrica dos anticorpos (IgG) purificados, realizada em densidade ótica de 280 nm.

Anticorpos obtidos	Quantificação	Concentração
IgG de pacientes negativos para a Doença de Chagas	0,011	2,2 µg/µL
IgG da forma digestiva da Doença de Chagas	0,012	2,4 µg/µL
IgG da forma cardíaca da Doença de Chagas	0,015	3,0 µg/µL
IgG da forma indeterminada da Doença de Chagas	0,022	4,4 µg/µL

Além disso, a presença de IgG purificada foi confirmada através de um teste em membrana de nitrocelulose, uma vez que verificou-se imunorreatividade pelo marcação dos *dots* (Figura 5). O fato de haver marcação colorimétrica no teste, revelando um resultado positivo, deve-se ao fato de haver ligação do anticorpo secundário à IgG sensibilizada na membrana, e posterior quebra do substrato NBT/BCIP, pela enzima fosfatase alcalina complexada à anti-IgG.

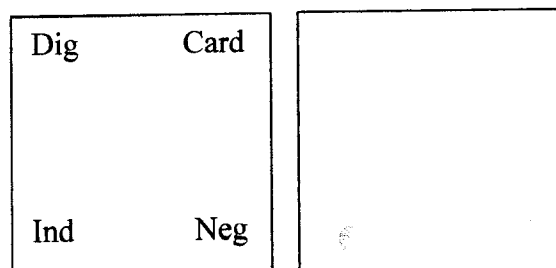


Figura 5. Teste de imunorreatividade realizado em membrana de nitrocelulose, para detecção de IgG.

Seleção de peptídeos – *Biopanning* em placa

As titulações realizadas foram eficientes em todos os ciclos de seleção de fagos, as colônias apresentaram coloração azulada, demonstrando a quebra do substrato X-Gal, e a expressão do gene da β -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, como mostrado na Figura 6.

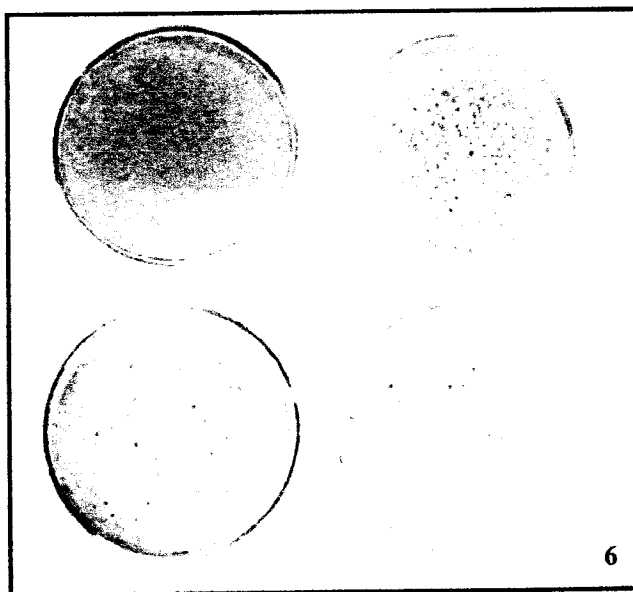


Figura 6. Demonstração de placas de titulação. As colônias azuis representam bactérias *E. coli* (ER2738) infectadas com fagos M13 carregando o gene da β -galactosidase.

Foram utilizadas para contagem, as placas com um número aproximado de 100 colônias. Após a contagem e multiplicação pelo devido fator de diluição, foram obtidos os títulos de entrada e saída para cada *round*.

Neste experimento, notou-se o enriquecimento dos clones a favor do alvo apenas durante os três ciclos de seleção, uma vez que o número de colônias azuis obtido pelas titulações dos eluatos não amplificados dos terceiro e quarto *rounds* permaneceu praticamente constante, demonstrando estabilidade da população de fagos selecionados. Portanto, houve utilização efetiva apenas dos eluatos não amplificados obtidos pelas eluições dos dois primeiros *rounds* realizados (Tabela3).

Tabela 3. Balanço dos eluatos não amplificados selecionados nos quatro *rounds* realizados, por meio de eluições negativa, invertida e com glicina.

	N.A 1° round	N.A 2° round	N.A 3° round	N.A 4° round
DIG	$7,8 \cdot 10^2 / \mu\text{L}$	$2,56 \cdot 10^4 / \mu\text{L}$	$1,1 \cdot 10^5 / \mu\text{L}$	$1,7 \cdot 10^5 / \mu\text{L}$
CARD	$8,9 \cdot 10^2 / \mu\text{L}$	$9,34 \cdot 10^4 / \mu\text{L}$	$9,9 \cdot 10^4 / \mu\text{L}$	$2,3 \cdot 10^5 / \mu\text{L}$
IND	$2,3 \cdot 10^2 / \mu\text{L}$	$8,90 \cdot 10^3 / \mu\text{L}$	$1,4 \cdot 10^5 / \mu\text{L}$	$1,3 \cdot 10^5 / \mu\text{L}$

Caracterização dos clones e Obtenção do DNA

Os clones obtidos a partir dos eluatos não amplificados dos dois terceiros *rounds* foram amplificados, para posterior extração de DNA. O processo de extração foi eficiente, pois verificou-se bandas no gel com peso molecular característico da molécula de DNA, além de não demonstrar nenhum tipo de degradação ou contaminantes. A quantidade de DNA obtida foi estimada por meio da comparação com o DNA padrão fornecido pelo kit de sequenciamento (200ng/ μL).

Sequenciamento do DNA

As seqüências de DNA geradas foram visualizadas pelo programa Sequence Analyzer (“MegaBace”). A tradução destas seqüências de DNA em aminoácidos foi feita pelo programa DNA2PRO12 (RELIC Softwares), o qual gerou 67 seqüências íntegras, sendo 50 distintas entre si (Tabela 4). As seqüências foram substituídas pelo número de identificação de cada clone seqüenciado.

Foram observadas repetições de seqüências, tendo um dos peptídeos aparecido por quatro vezes, no máximo. Outras três seqüências distintas apareceram três vezes cada uma, enquanto outras oito seqüências apresentaram duas repetições cada. Tais freqüências são apresentadas na Tabela 4. A maior freqüência de alguns clones pode estar associada à melhor seleção do clone frente ao anticorpo, assim como sua melhor infectividade, ou mesmo sua ligação

inespecífica. Por isso torna-se essencial testes imunoenzimáticos para melhor caracterização da especificidade de ligação aos anticorpos.

Tabela 4. Identificação de cada clone expresso nos fagos selecionados e suas respectivas frequências, na população de 67 peptídeos traduzidos.

Denominação do Clone	Frequência	Denominação do Clone	Frequência
E03, H07, D08, B12	4/67	E02	1/67
B05, D05, C03	3/67	H04	1/67
E01, C04, F04	3/67	B08	1/67
G09, C10, C11	3/67	B10	1/67
B09, G11	2/67	E06	1/67
A10, A12	2/67	D09	1/67
B01, D01	2/67	E08	1/67
A05, C05	2/67	E10	1/67
C01, E04	2/67	E11	1/67
G06, E07	2/67	H08	1/67
F10, E12	2/67	C06	1/67
A03, F06	2/67	C08	1/67
H12	1/67	F07	1/67
A01	1/67	F08	1/67
A02	1/67	D02	1/67
A04	1/67	F09	1/67
H02	1/67	D03	1/67
A06	1/67	D06	1/67
A09	1/67	G03	1/67
G12	1/67	G08	1/67
H01	1/67	G10	1/67
B03	1/67	H10	1/67
B04	1/67	C02	1/67
D10	1/67	F02	1/67
B06	1/67	C07	1/67

ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) Pós-sequenciamento

Todos os clones sequenciados foram testados por meio de Ensaios Imunoenzimáticos perante *pool* de soro de cada forma da Doença de Chagas e com *pool* de soro negativo. As Figuras abaixo demonstram o valor do índice ELISA para cada situação testada.

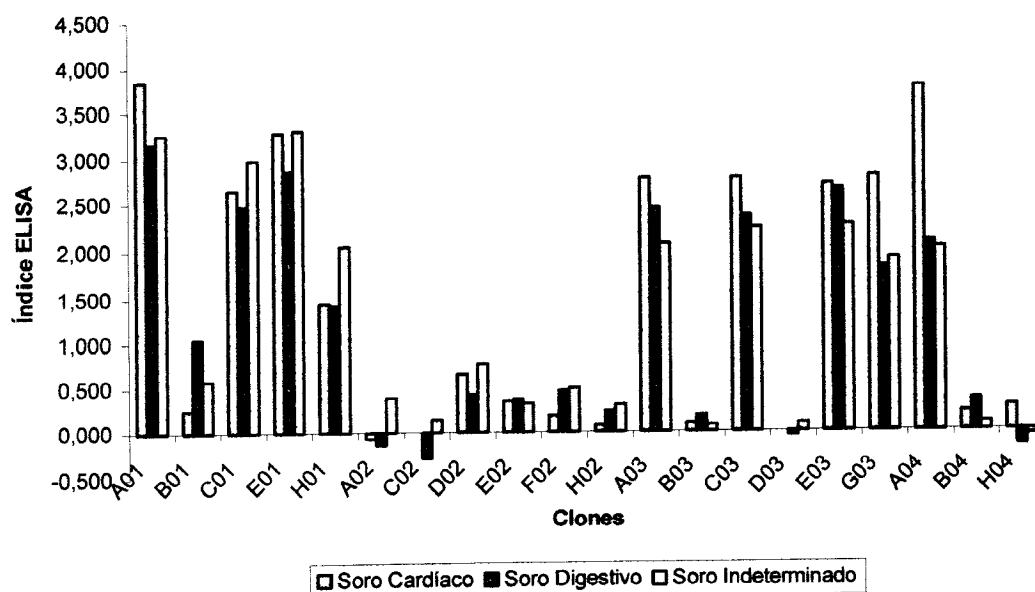


Figura 7. Demonstração do Índice ELISA dos clones selecionados para a forma digestiva da Doença de Chagas, diante dos soros das três formas doença e soro negativo.

Dos 20 clones selecionados para a forma digestiva da Doença de Chagas, dez (A02, C02, D02, E02, F02, H02, B03, D03, B04, H04) não apresentaram Índice ELISA superior a um, evidenciando que esses peptídeos não apresentaram diferenças significativas de reação entre soros positivos e negativo. (Figura 7). Os demais apresentaram, no geral, maior reatividade perante ao *pool* de soro da forma cardíaca da doença, revelando epítomos potenciais para a detecção geral da Doença de Chagas, mas não diferencial entre as formas, exceto pelo B01 que responde diferencialmente para a forma digestiva da Doença de Chagas.

Os clones selecionados para a forma cardíaca da doença apresentaram, em sua maioria, afinidade diferencial pelos soros positivos, independentemente da forma da doença (Figura 8).

Observou-se que os clones F06, G06, C07, H07 e B12 apresentaram Índice ELISA superior a um, porém, apesar de terem sido selecionados para a forma cardíaca da Doença de Chagas, demonstraram maior reatividade quando submetidos ao *pool* de soros de pacientes portadores da forma indeterminada da doença. Exceto pelo A05, não observou-se melhor reação perante soros de pacientes com a forma cardíaca (Figura 8).

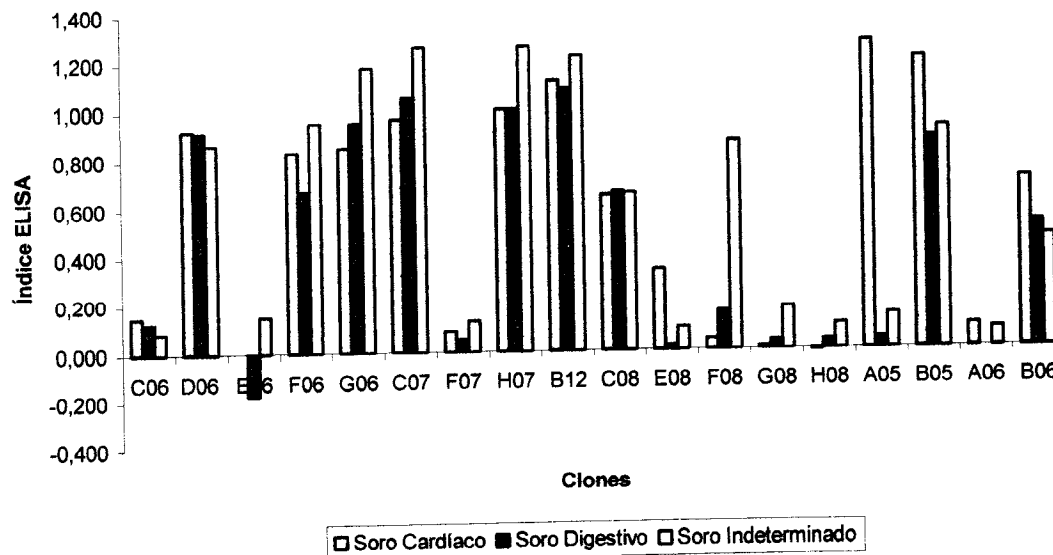


Figura 8. Demonstração do Índice ELISA dos clones selecionados para a forma cardíaca da Doença de Chagas, diante dos soros das três formas doença e soro negativo.

Os peptídeos recombinantes obtidos pela seleção frente à IgG da forma indeterminada da Doença de Chagas, demonstraram que alguns clones não foram selecionados por especificidade ao alvo, e por isso no teste ELISA, não apresentaram reação com soros positivos. No entanto, A10, B10, F10, H10, D09, A09, B09, E11 e B08 demonstraram um perfil satisfatório de reatividade, embora não diferencial (Figura 9).

O fato destes fagos reagirem também com o *pool* de soros de pacientes negativos, provavelmente deve-se ao fato dos anticorpos reagirem inespecificamente com outras moléculas da superfície viral, ou mesmo em consequência das condições laboratoriais das diferentes reações. Este fato é minimizado e padronizado pelos cálculos efetuados que ajustam todos os resultados.

A partir destes ensaios, as seqüências foram validadas pelo número do Índice ELISA calculado, sendo selecionados os clones com reatividade maior que 1,0. As demais seqüências foram desprezadas para as posteriores avaliações, pelo fato de não apresentarem, afinidade pelos soros das três formas da Doença de Chagas.

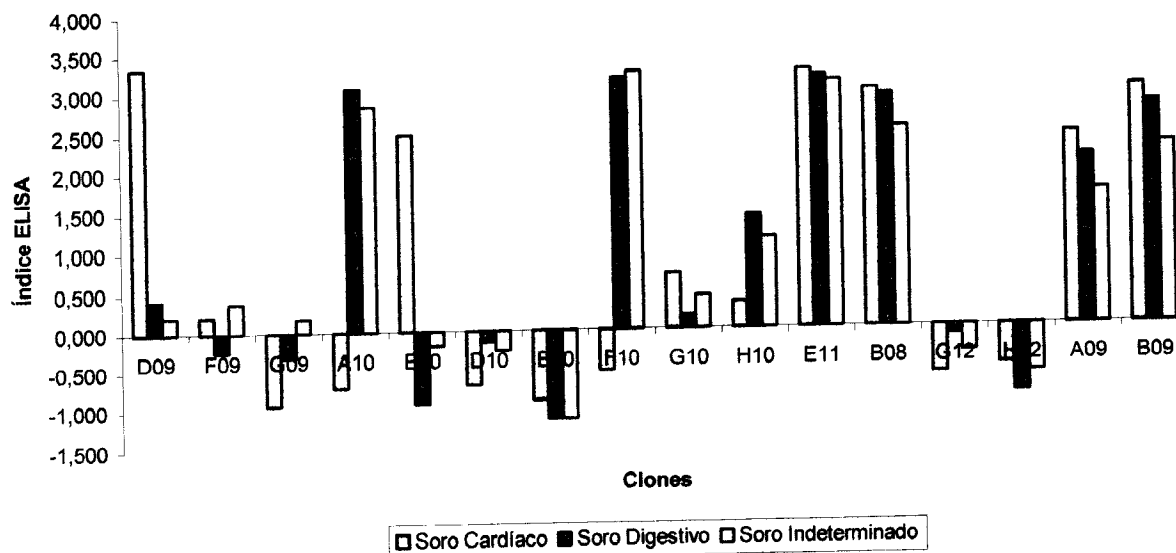


Figura 9. Demonstração do Índice ELISA dos clones selecionados para a forma indeterminada da Doença de Chagas, diante dos soros das três formas doença e soro negativo.

Análise dos dados

As seqüências de aminoácidos geradas foram comparadas com proteínas relacionadas ao *Trypanosoma cruzi*, já depositadas no "GENEBANK". As prováveis proteínas alvo foram alinhadas com os clones que apresentaram Índice ELISA maior que 1,0 (Tabela 5).

Houve alinhamento das seqüências obtidas e validadas pelos testes ELISA, com importantes proteínas relacionadas ao desenvolvimento e sobrevivência de *Trypanosoma cruzi*, bem como proteínas essenciais para a infecção do hospedeiro pelo parasita. As glicoproteínas do tipo mucina, por exemplo, são moléculas dominantes na superfície de tripomastigotas e amastigotas e são o principal alvo do anticorpo anti-Gal α 1-3Gal, encontrado no soro de pacientes infectados por *T. cruzi* (GAZZINELLI et al., 1991).

As proteínas hipotéticas, que foram encontradas com maior freqüência nos alinhamentos (Tabela 5), representam domínios protéicos altamente conservados, integrando-se a uma grande família de antígenos de superfície, presente em *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* (EL-SAYED et al., 2005a).

Mais de 50% do genoma de *T. cruzi* consiste em seqüências repetidas, como retrotransposons e genes que codificam para uma grande família de moléculas de superfície, como as Trans-sialidases e mucina associada a proteínas de superfície (MASP) (mais que

1300 cópias) (EL-SAYED, et al., 2005b), ambas encontradas no alinhamento com os peptídeos selecionados (Tabela 5).

Tabela 5. Representação dos clones selecionados, com Índice ELISA maior que um em alguma categoria e as proteínas alvo respectivas.

Peptídeos Selecionados	IE soro cardíaco	IE soro digestivo	IE soro indeterminado	Proteína Alvo [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
Forma Cardíaca				
G06	0.8	0.9	1.2	hypothetical protein, conserved
C07	1.0	1.1	1.3	kinesin, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
				ubiquitin hydrolase, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
B12	1.1	1.1	1.2	trans-sialidase, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				proteín kinase-like protein, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				beta prime COP protein, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				aldo/keto reductase [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				prostaglandin F synthase, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
A05	1.3	0.0	0.1	dynein heavy chain, cytosolic, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				phosphotransferase, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				mucin-associated surface protein (MASP), putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
B05	1.2	0.9	0.9	mucin-associated surface protein (MASP), putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				dynein heavy chain, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				helicase-like protein, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
Forma Digestiva				
A01	3.8	3.2	3.3	ESAG8-associated protein, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
B01	0.3	1.0	0.6	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, mitochondrial precursor
				phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type II beta, putative
C01	2.7	2.5	3.0	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
E01	3.3	2.9	3.3	transporter, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
H01	1.4	1.4	2.0	ubiquitin-protein ligase-like, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
A03	2.8	2.4	2.1	dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
C03	2.8	2.3	2.2	mucin-associated surface protein (MASP), putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
C03	2.8	2.3	2.2	putative adenylosuccinate synthetase [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
C03	2.8	2.3	2.2	dihydrouridine synthase (Dus), putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				N-acetyltransferase, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
C03	2.8	2.3	2.2	hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
C03	2.8	2.3	2.2	protein kinase, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				acyltransferase, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
C03	2.8	2.3	2.2	oligopeptidase B-like protein, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
C03	2.8	2.3	2.2	tyrosine specific protein phosphatase, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				hypothetical protein, conserved [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
C03	2.8	2.3	2.2	ESAG8-associated protein, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]
				2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, mitochondrial precursor
C03	2.8	2.3	2.2	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type II beta, putative
				phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type II beta, putative

				retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative [Trypanosoma cruzi]
				hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]
E03	2.7	2.7	2.3	hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]
G03	2.8	1.8	1.9	hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]
A04	3.8	2.1	2.0	oxidoreductase, putative [Trypanosoma cruzi] dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative [Trypanosoma cruzi]
Forma Indeterminada				
D09	3.345	0.414	0.207	protein kinase domain, putative [Trypanosoma cruzi] hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]
A10	-0.724	3.069	2.828	OMPDCase-OPRTase [Trypanosoma cruzi]
B10	2.483	-0.931	-0.172	orotidine-5-phosphate decarboxylase/urotate phosphoribosyltransferase hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]
F10	-0.517	3.172	3.241	proteasome regulatory non-ATPase subunit 1-1 [Trypanosoma cruzi] NAD/FAD dependent dehydrogenase, putative [Trypanosoma cruzi] histone H3, putative [Trypanosoma cruzi] hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]
H10	0.345	1.414	1.138	protein kinase, putative [Trypanosoma cruzi] vacuolar protein sorting-associated protein, putative dynein heavy chain, putative [Trypanosoma cruzi] GTP-binding protein, putative [Trypanosoma cruzi] hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]
E11	3.241	3.172	3.103	90 kDa surface protein, putative [Trypanosoma cruzi] aminopeptidase, putative [Trypanosoma cruzi] acetyl-CoA synthetase, putative [Trypanosoma cruzi] hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]
B08	3.000	2.931	2.517	hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]
A09	2.414	2.138	1.690	protein kinase, putative [Trypanosoma cruzi] regulator of chromosome condensation, putative peptidase T, putative [Trypanosoma cruzi] hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]
B09	3.000	2.793	2.276	hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]

Outros antígenos importantes já foram descritos, como aqueles usados em Teste Diagnóstico (DIAMED): TcD, TcE e Ag2 (HOUGHTON et al., 1999), embora nenhuma das seqüências relevantes obtidas tenham apresentado alinhamento com esses peptídeos sintéticos.

Como a Doença de Chagas possui um curso clínico variável, podendo evoluir para uma infecção caracterizada por sintomas leves, ou para uma doença crônica severa, que pode acometer o sistema cardiovascular ou o sistema gastrointestinal (megaesôfago ou megacólon), é possível que existam antígenos específicos que caracterizem a predominância dos sintomas em determinado tecido. Porém, os fatores que influenciam essa variabilidade clínica ainda não foram totalmente elucidados, mas já foi visto que a variação geográfica, tanto do hospedeiro, quanto do parasita, também é determinante da gravidade dos sintomas e da prevalência da forma da doença. Isso pode ser comprovado á medida que a forma digestiva da Doença de Chagas é predominante no Chile e Brasil Central, sendo relativamente rara em outras áreas

endêmicas do Brasil e praticamente ausente na América Central. É sugerido, portanto, que fatores genéticos inerentes ao parasito e ao hospedeiro podem ser importantes na fisiopatologia da doença (MACEDO; PENA, 1998).

Apesar de muitos clones não terem mostrado afinidade diferencial perante aos soros testados, como sujere os Índices ELISA (IE) listados na Tabela 5, sete clones apresentaram reação distinta frente aos quatro *pools* de soros testados. O clone A05, por exemplo, selecionado para a forma cardíaca da Doença de Chagas, obteve um IE maior quando submetido a um *pool* de soro da forma cardíaca da Doença de Chagas (Tabela 5). O mesmo ocorre com o clone B01, o qual foi selecionado para a forma digestiva da doença e apresenta maior reatividade com o *pool* de soros da forma digestiva (Tabela 5).

Os clones A10, B10, F10, H10 e D09, que foram selecionados para forma indeterminada da Doença de Chagas, demonstram um perfil interessante de reação, pois apresentam afinidade grande pelo próprio *pool* de soros da forma indeterminada da doença e por uma das outras duas formas, ou somente para o *pool* de soros da forma cardíaca ou digestiva da doença. Acredita-se que isso deve-se ao fato dos pacientes enquadrados na forma indeterminada da Doença de Chagas assumirem, potencialmente, a forma cardíaca, a forma digestiva ou ambas após um período de tempo assintomático.

Assim, apesar de características próprias ao hospedeiro e ao parasita serem indiscutivelmente importantes na determinação da forma da Doença de Chagas, os resultados sugerem que há possibilidade de um padrão diferenciado de resposta imune para as formas da referida doença. Foram selecionados epítomos que acusavam a presença de anticorpos contra antígenos gerais de *T. cruzi*, no entanto, foram vistos também epítomos que caracterizavam apenas uma forma da doença. Esses achados validam a hipótese de que existem antígenos primordialmente expressos em cada forma da Doença de Chagas, sendo um dado importante para o desenvolvimento de vacinas e de diagnóstico diferencial das formas cardíaca e digestiva, indicando ainda, no caso da forma indeterminada, propensão ao desenvolvimento de alguma das formas citadas.

CONCLUSÕES

- A tecnologia de “Phage Display” mostrou-se eficiente para a seleção de peptídeos recombinantes reativos com soros das três formas principais da Doença de Chagas.
- Por meio de Ensaio Imunoenzimático, foi possível verificar que há um padrão diferencial de resposta imunológica entre as formas cardíaca e digestiva da Doença de Chagas.
- Os resultados obtidos neste estudo são promissores no sentido da utilização destes fagos para vacinas e diagnóstico diferencial para as formas cardíaca e digestiva da Doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATH, F. G. C. Imunologia da doença de Chagas. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília DF, v. 35, n. 7, p. 101-108, 1983.
- ALMEIDA, I. C. et al. Lytic anti- α -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, v. 304, p. 793-802, 1994.
- ANDRADE, Z. A. Anatomia patológica da doença de Chagas. **Rev. Goiana Méd.**, Goiânia, v. 4, n. 2, p. 103-119, 1958.
- ANDRADE, Z. A. Patogenia da doença de Chagas. Novos aspectos. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 255-260, 1982.
- AZZAZY, H.M., HIGHSMITH, W.E. Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin. Biochem.**, v. 35, p. 425-445, 2002.
- BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. Phage Display. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 8.4-8.7. 2001.
- BARRETTO, A. C. P. et al. Forma indeterminada da doença de Chagas, uma doença polimórfica. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 55, n. 6, p. 347-353, 1990.
- BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, 1-33, 2001.
- BENTO, C. A. M. et al. Glycoinositolphospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production in vitro. **J. Immunol.**, v. 157, p. 4996-5001, 1996.
- BLANK, M. et al. Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by syntetic peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.96, p.5164-5168, 1999.
- BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, supl., p. 205-213, 1987.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 114, p. 103-110, 1997.

BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETO, M. Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 10, p. 170-176.

CAMARGO, M. M. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiated the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J. Immunol.**, v. 158, p. 5890-5891, 1997.

CARVALHAL, S. Considerações em torno da patogênese da moléstia de Chagas. Especial ênfase em relação à fase crônica. **AMB Rev. Ass. Med. Bras.**, São Paulo, v. 23, n. 4, 1977.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, C. Nova entidade morbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 219-275, 1911.

CHAPADEIRO, E. et al. Incidência de "megas" associados à cardiopatia chagásica. **Rev. Inst. Trop.**, São Paulo, v. 6, n. 6, p. 287-291, 1964.

DaROCHA, W. D. et al. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigen expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Parasitol.**, v. 88, p. 292-300, 2002.

De FARIA, C. R.; REZENDE, J. M.; RASSI, A. Desnervação periférica nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. **Arq. Neuropsiquiat.**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 225-236, 1988.

DIAS, J. C. P. Acute Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, p. 85-91, 1984.

EL-SAYED, N.M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v.309, n.5733, p.404-409, 2005a.

EL-SAYED, N.M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v.309, n.5733, p. 409-415, 2005b.

FERREIRA, A. W. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 12, p. 4390-4395, 2001.

FRASCH, A. C. C. et al. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. **Parasitol. Today**, v. 7, n. 6, p. 148-151, 1991.

GAZZINELLI, R. T. et al. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. **Parasite Immunol.**, v. 13, p. 345-356, 1991.

GEYSEN, H. M.; RODDA, S. J.; MASON, T. J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. **Mol Immunol.**, v. 23, p. 709-715, 1986.

HATCHER, F. M. et al. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. **J. Immunol.**, v. 127, p. 1126-1130, 1981.

HIGUCHI, M. L. et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc. Res.**, London, v. 60, n. 1, p. 96-107, 2003.

HOUGHTON, R. L. A Multi-Epitope Synthetic Peptide and Recombinant Protein for the Detection of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Radioimmunoprecipitation-Confirmed and Consensus-Positive Sera. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 1226-1234, 1999

HUANG, H.; WEISS, M.L.; NAGAJYOTHI, F.; TANOWITZ, B.H.; WITTNER, M.; ORR, A.G.; BAO, Y. Molecular cloning and characterization of protein kinase: A regulatory subunit of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biomech. Parasitol.**, v. 149, p. 242-245, 2006.

JONES, E. M. et al. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 48, n. 3, p. 348-357, 1993.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 2, p. 473-529, 1948.

LOPES, E. R. et al. Contribuição ao estudo da anatomia patológica dos corações de chagásicos falecidos subitamente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília DF, v. 9, n. 6, p. 269-282, 1975.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 3, p. 119-124, 1998.

MINOPRIO, P. et al. Polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. I. Quantification of both T and B responses. **Scand. J. Immunol.**, v. 24, p. 661-668, 1986.

MINOPRIO, P. et al. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. **J. Immunol.**, v. 139, p. 545-550, 1987

ORTIZ-ORTIZ, L. et al. Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 50, p. 232-242, 1976.

PARMLEY, S., SMITH, G. Antibody-selectable filamentous fd phagevectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, p. 305-318, 1988.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet**, London, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

PRATA, A.; MACÊDO, V. Morbidity of Chagas' heart disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, supl., p. 93-96, 1984.

POSNER, B.; et al. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. **Trends Biochem. Sci.**, v. 19, p. 145-150, 1994.

REY, L. Parasitologia Médica. **Tripanossomíase devido ao *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas**. RJ: Guanabara Koogan S.A. Pp. 25-27. 1992.

REZENDE, J. M. Forma digestiva da moléstia de Chagas. **Rev. Goiana Med.**, Goiânia, v. 5, p. 193-227, 1959.

RUSSEL, M. Filamentous phage assembly. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 1607-1613, 1991.

SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitol.**, v. 17, n. 6, p. 286-291, 2001.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

SMITH, G. P; SCOTT, J.K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. **Methods Enzymol.**, v. 128, p.37-42, 1993.

STEPHEN, C. W.; LANE, D. P. Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. **J. Mol. Biol.**, v.225, p. 577-583, 1992.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Inserção de DNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de célula hospedeira de mamífero por meio de infecção. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, n. 1, p. 55-58, 1991.

UMEZAWA, E. S. et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 5, p. 1554-1560, 1999.

VERGARA, U. et al. Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 9, p. 2034-2037, 1991.

VERGARA, U. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 46, n. 1, p. 39-43, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **TDR Strategic Direction: Chagas Disease.** 2002. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>. Acesso em: 22 março. 2007.