

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

SISBI/UFU



1000220652

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES LIGANTES A  
ANTICORPOS POLICLONAIS (IgG) PROVENIENTES DE PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE VISCERAL VIA “PHAGE DISPLAY”**

Juliana Franco Almeida

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

UBERLÂNDIA-MG

2005

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

MOZ  
636.993.161  
A447i  
TES/MEM

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES LIGANTES A  
ANTICORPOS POLICLONAIS (IgG) PROVENIENTES DE PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE VISCERAL VIA “PHAGE DISPLAY”**

Aluna: Juliana Franco Almeida

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

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

UBERLÂNDIA-MG  
2005

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

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES LIGANTES A  
ANTICORPOS POLICLONAIS (IgG) PROVENIENTES DE PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE VISCERAL VIA “PHAGE DISPLAY”**

ALUNA: Juliana Franco Almeida

**COMISSÃO EXAMINADORA**


Presidente: Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

Examinadores: Dr. Foued Salmen Spindola

Dr. Guilherme Correa de Oliveira

Data da Defesa: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

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



---

(Orientador)

Uberlândia, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

*Dedico à minha família, com amor.*

---

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar o meu caminho a cada dia, dando-me forças e saúde para superar cada obstáculo encontrado.

Aos meus pais, Odécio e Coleta; meus irmãos Júlio e Adriana e ao meu sobrinho Henrique, por entenderem a minha ausência e incentivar-me dia-a-dia na realização dos meus sonhos, eles são a base de tudo que sou como pessoa.

Ao orientador Luiz Ricardo, por dar-me a oportunidade de fazer parte da sua equipe e por participar constantemente do meu crescimento profissional e pessoal, obrigada pelos conselhos nos momentos complicados e principalmente, pela confiança em mim depositada.

À professora Maria Inês Machado pela disposição em auxiliar-me na execução deste trabalho, à Sandra Cardoso por ceder-me os soros e por estar sempre disposta a ajudar-me, também à professora Maria Aparecida de Souza por tudo que me ensinou nas minhas visitas ao seu laboratório.

À todos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular: Paula Cristina, Adriana, Elisângela, Karina, Alexandra, Karla, Thaíse, Isabela, Fabiana, Rafael, Thiago, Ana Paula, Letícia, Carolina, Luciana e Mércia, por fazerem dele mais que um ambiente de trabalho.

Ao "Grupo Phage": Ana Paula, Renata, Carlos, Rone, Paula Souza, Andréia, Guilherme e Fausto por ter confiado em mim e no meu trabalho para fazer parte deste grupo; obrigada pela troca de experiências, pelas discussões, pelos conselhos. Eu espero que juntos possamos crescer e conquistar todos os nossos objetivos.

Em especial, agradeço à Paula Cristina, pela amizade e companhia nos momentos finais da execução deste trabalho, inclusive nas madrugadas no laboratório; ao Guilherme, por acompanhar de perto meu trabalho, ajudando-me a cada nova experiência entendendo os meus problemas, sendo meu fiel companheiro de bancada; à Andréia, por sua grande amizade, que foi fundamental neste período, eu espero que ela continue forte e duradoura; e ao Fausto, por ser, além do companheiro de graduação e pós-graduação, meu amigo verdadeiro, uma pessoa ímpar, com quem eu sempre posso contar; a sua amizade, sua alegria, sua força, são muito importantes pra mim.

Agradeço também, aos colegas que se foram do laboratório, mas deixaram muitos ensinamentos e saudades: Maurício Machaim, Katiana, Lorraine, Cristiane, Waldesse, Jaqueline, Frederico, Walter, Ana Cândida, Juliana Meola, Rossana e Weruska.

Às minhas amigas que me acompanharam, mesmo que à distância, durante todo este período: Juliana Lucchese, Olívia, Laura, Ciléia, Lúbia, Vanessa, Daniela Valéria, Luciana Oliveira e Narcisa.

Agradeço também aos meus colegas do CEPE I, por mais este ano de convivência e estudos, e à nossa coordenadora Sandra, um exemplo de otimismo e fé, que me auxiliou com suas palavras de carinho a superar muitas dificuldades e a entender que podemos ser pessoas melhores, sempre.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica, seus professores, secretários e auxiliares por todo suporte e ao Conselho de Aprendizagem e Ensino Superior (CAPES), pela ajuda financeira.

Meu sincero muito obrigada, à todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

---

---

## ÍNDICE

---

---

ÍNDICE.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO GERAL.....	1
INTRODUÇÃO GERAL.....	2
▪ LEISHMANIOSES.....	3
▪ PHAGE “DISPLAY”.....	12
OBJETIVOS GERAIS.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPITULO ÚNICO.....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL DE MÉTODOS.....	35
▪ Purificação de anticorpos.....	35
▪ Seleção de peptídeos – “Biopanning” em solução.....	35
▪ Caracterização dos clones.....	38
▪ ELISA Pré – Seqüenciamento.....	38
▪ Obtenção e seqüenciamento do DNA.....	39
▪ Análise de dados.....	40
▪ ELISA Pós – Seqüenciamento.....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
▪ Purificação dos Anticorpos.....	42
▪ Seleção dos Peptídeos Recombinantes.....	43
▪ ELISA Pré – Seqüenciamento.....	45
▪ Seqüências e Análise de Dados.....	47
▪ ELISA Pós – Seqüenciamento.....	58
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

---

°C	-Graus Celsius
μL	-Microlitro
μm	-Micrômetro
BSA	-Soro Albumina Bovina
C	-Complemento
Con A	-Concavalina A
CPs	-Cisteína Proteases
DAT	-Testes de Aglutinação Direta
DNA	-Ácido desoxirribonucéico
EDTA	-Etileno-diamino tetra-acetato
ELISA	- Enzimed Linked Immusorbent Assay
ER2738	- <i>E.coli</i> Cepa ER2738
FG	-Fosfoglicanos
FML	-Glicoconjugados ligantes de Manose-fucose
g	-Grama
GIPL	-Glicosilfosfolípidios
GP36	-Glicoproteína de 36 KDa
gp63	-Leishmaniolisina
GPI	-Glicosilfosfatidilinositol
H <sub>2</sub> O	-Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-Água Oxigenada
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-Ácido Sulfúrico
IE	-Índice Elisa
IgA	-Imunoglobulina A
IgE	-Imunoglobulina E
IgG	-Imunoglobulina G
IgG1	-Imunoglobulina G subtipo 1
IgG2	-Imunoglobulina G subtipo 2
IPTG	-Isopropil α-D-tiogalactosideo
K26	-Antígeno tipo kinesina de 26 KDa
K9	-Antígeno tipo kinesina de 9 KDa



KDa	-Kilodaltons
KMP-11	- Principal determinante protéico de membrana de protozoários kinetoplastídeos
LACK	-( <i>Leishmania</i> homologue of receptor for activated C kinase)
LB	- Meio de Cultura Luria-Bertani
LC	-Leishmaniose Cutânea
LC	-Leishmaniose Cutânea
LCD	-Leishmaniose Cutânea Difusa
LcKin	-Kinesina de <i>Leishmania chagasi</i>
LMC	-Leishmaniose Mucocutânea
LmSTII	- <i>L. major</i> recombinant protein homologue to eukariotic stress-inducible protein
LPG	-Lipofosfoglicanos
LV	-Leishmaniose Visceral
M	-Molar
M13	-Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos
mg	-Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	-Cloreto de Magnésio
mL	-Mililitro
mM	-Milimolar
NaCl	-Cloreto de Sódio
Nal	-Iodeto de Sódio
ng	-Nanogramas
NH	-Nucleosídeo hidrolase
nm	-Nanômetro
OPD	- O - Phenylenediamine dihydrochloride
PBS-T	-Tampão Tris-NaCl contendo Tween 20
PEG	-Polietileno glicol
pH	-Potencial Hidrogeniônico
pIII	-Proteína III capsídica de bacteriófagos
pMoles	-Picomoles
PPG	-Proteofosfoglicanos
PSP	-Proteínas de Superfície de Promastigotos

pVIII	-Proteína VIII capsídica de bacteriófagos
RACKs	-Receptores intracelulares para Kinase C ativada
rK39	-Antígeno tipo Kinesina de 39 KDa recombinante
rLACK	-Antígeno LACK recombinante
rpm	-Rotação por minuto
TBS-T	-Tampão Tris-NaCl contendo Tween 20
TPmy	-Paramiosina de <i>Taenia solium</i>
TSA	- <i>L. major</i> recombinant protein homologue to eukariotic thiol-specific-antioxidant protein
ufc	-Unidade formadora de colônia
VP2	-Proteína do vírus da doença infecciosa da bursa
X-gal	-5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

---

---

A	Alanina
C	Cisteína
D	Aspartato
E	Glutamato
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

---

### INTRODUÇÃO GERAL

**Tabela 1:** Características clínicas da Leishmaniose Humana.....Pág. 5

### CAPÍTULO ÚNICO

**Tabela 2:** Seleção de peptídeos ligantes a anticorpos policlonais de pacientes com Leishmaniose Visceral. Títulos obtidos (ufc) nos quatro ciclos de seleção.....Pág. 45

**Tabela 3:** ELISA de captura para teste de imunorreatividade dos clones selecionados\* contra soro total de pacientes positivos para Leishmaniose Visceral (1:50)\*\* .....Pág. 46

**Tabela 4:** ELISA de captura para teste de imunorreatividade dos clones selecionados\* contra anticorpos purificados de pacientes positivos para Leishmaniose Visceral (0,5 µg/well)\*\* .....Pág. 46

**Tabela 5:** Seqüência de aminoácidos dos peptídeos expressos nos fagos selecionados a partir do quarto ciclo de seleção e suas respectivas freqüências, na população de 28 peptídeos traduzidos.....Pág. 48

**Tabela 6:** Índice de antigenicidade (Jameson-Wolf) para os peptídeos selecionados. Dados gerados pelo programa Protean 4.0. Em destaque os peptídeos com domínios selecionados. Os números de 1 a 12 representam os aminoácidos dos peptídeos mencionados à esquerda.....Págs. 51 e 52

**Tabela 7:** Resumos dos alinhamentos entre os domínios consenso e proteínas de *Leishmania chagasi*.....Pág. 54

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

---

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1:** Ciclo de vida da *Leishmania*.....Pág. 4

**Figura 2:** Representação estrutural de um fago filamentosos. A proteína de interesse é fusionada à extremidade amino-terminal da g3p (pIII). O gene do peptídeo é inserido entre as seqüências codificantes do peptídeo sinal e a proteína g3p (pIII) do capsídeo do fago fd-tet. Na morfogênese do fago, a proteína é apresentada na superfície (Figura modificada de Fernandez-Gacio *et al.*, 2003).....Pág. 13

**Figura 3:** Ciclo de “Biopanning” (Seleção) em solução. Em cada ciclo os fagos reativos com o alvo são selecionados por lavagens sucessivas, sendo os demais descartados. Os fagos remanescentes são então amplificados e seguem um novo ciclo para a maturação da afinidade de ligação ao alvo específico [http://ymbc.ym.edu.tw/teome/interact/phage\\_display.htm](http://ymbc.ym.edu.tw/teome/interact/phage_display.htm).....Pág.14

### CAPÍTULO ÚNICO

**Figura 4:** Perfil imunocromatográfico da purificação de IgGs totais de soros de pacientes com Leishmaniose Visceral e Negativo. Frações de 1-30: lavagem, 30-50: Eluição.....Pág. 42

**Figura 5:** Perfil eletroforético (SDS PAGE 16%) da purificação de IgGs totais (150KDa) de soros de pacientes com Leishmaniose Visceral (Canaleta 1 - soro total, 2 e 3 - soro purificado) e Negativo (Canaleta 4 – soro total 5 e 6 – soro purificado). M representa o padrão de peso molecular.....Pág. 43

**Figura 6:** Exemplo de titulação. As colônias azuis representam a infecção das bactérias *E. coli* (ER2738) com fagos M13 carregando o gene da  $\beta$ -Galactosidase.....Pág. 44

- Figura 7:** Alinhamento dos 28 peptídeos selecionados pelo programa T-Coffee.....Pág. 49
- Figura 8:** Alinhamento dos 24 peptídeos selecionados. Dados obtidos pelo programa CLUSTAL W (1.8.1). As cores azul e vermelho indicam as seqüências consenso selecionadas.....Pág. 50
- Figura 9:** Predições para rK39 gerada pelo programa Protean (Lasergene Softwares). As barras indicam a região do domínio QDR.....Pág. 55
- Figura 10:** Estrutura terciária da proteína gp63 (leishmaniolisina), gerada pelo programa Cn3D. Em amarelo, a localização dos peptídeos, RL+LG indicado pela seta azul e LSTV pela seta vermelha.....Pág. 58
- Figura 11:** ELISA de captura para os clones contendo os principais epítomos identificados. Colunas 1-2: KLAGLNLR; colunas 3-9: ATPRS; colunas 10-11: QDR; coluna 12: Controle Negativo – Fago selvagem.....Pág. 59

---

## RESUMO GERAL

---

### IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES LIGANTES A ANTICORPOS POLICLONAIS (IgG) PROVENIENTES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL VIA “PHAGE DISPLAY”

O protozoário causador da leishmaniose visceral (LV) nas Américas é um parasita intracelular obrigatório, da família Trypanosomatidae, gênero e subgênero *Leishmania* e espécie *chagasi* – *L. (L). chagasi*. Dentre as doenças causadas por este protozoário, a LV é de grande importância, pois pode ser fatal nos casos não tratados.

A tecnologia de exposição de biomoléculas em fagos (“Phage Display”) têm sido amplamente utilizada no mapeamento de epítopos de diversas proteínas antigênicas, constituintes de vários agentes causadores de doenças.

O presente trabalho, utiliza este método na identificação de peptídeos sintéticos ligantes a anticorpos policlonais (IgG) de pacientes acometidos pela Leishmaniose. Os fagos selecionados foram confirmados por testes imunoenzimáticos, sendo posteriormente seqüenciados e analisados por bioinformática. Foi possível identificar domínios protéicos comuns entre os peptídeos recombinantes, que puderam ser relacionados com antígenos de *Leishmania chagasi* de importância particular na resposta imunológica desencadeada. Além disso, as seqüências peptídicas reveladas neste trabalho podem ser consideradas como prováveis constituintes de epítopos.

Testes subseqüentes fazem-se necessários para melhor caracterização destes peptídeos e suas possíveis utilizações na identificação de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Leishmania*, Leishmaniose Visceral, anticorpos policlonais, “Phage Display”.

---

# **INTRODUÇÃO GERAL**

---



---

---

## LEISHMANIOSES

---

---

### Epidemiologia, Sintomatologia e Clínica na Leishmaniose.

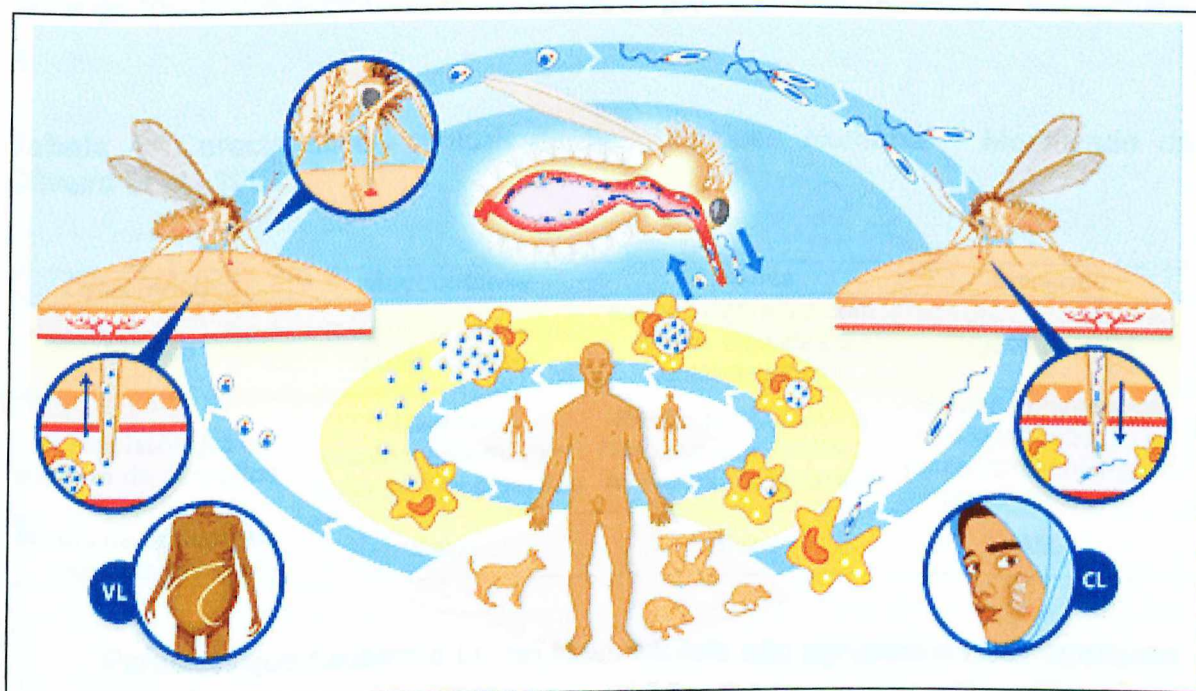
O resultante complexo de doenças, ou leishmanioses, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, afeta mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Estima-se que dois milhões de indivíduos são infectados anualmente e que 350 milhões vivem em área de risco de aquisição dessas protozoonoses. As leishmanioses ocorrem em 5 continentes e são endêmicas em regiões tropicais e subtropicais de 88 países (World Health Organization – WHO, 1998, 1990). Ainda, segundo a Organização Mundial de Saúde, mais de 90% dos casos de leishmanioses cutâneas ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru e mais de 90% dos casos de leishmanioses visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish.htm>).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários digenéticos pertencentes à família Trypanosomatidae, e apresentam-se sob duas formas: uma flagelada, denominada promastigota com dimensões entre 14 e 20  $\mu\text{m}$  de comprimento por 1,5 a 4  $\mu\text{m}$  de largura, que possui núcleo situado no terço médio da célula e cinetoplasto em posição mais anterior; outra não flagelada denominada amastigota, presente em hospedeiros vertebrados, inclusive o homem, de forma esférica, com diâmetro variando de 2,5 a 5  $\mu\text{m}$ , com o núcleo ocupando a posição central da célula e cinetoplasto adjacente ao mesmo (Molineux e Killick-Kendrick, 1987).

Existem 30 espécies de *Leishmania* das quais 10 ocorrem no Velho Mundo e 20 no Novo Mundo. Todas as espécies do Velho Mundo pertencem ao subgênero *Leishmania* e 7 são conhecidas por infectar o homem. Existem também 11 espécies do mesmo subgênero no Novo Mundo, das quais cinco não são encontradas no homem. Parasitas do subgênero *Viannia* ocorrem somente no Novo Mundo e das nove espécies conhecidas, oito infectam o homem (Shaw, 1994).

As leishmanias são heteroxênicas, parte do seu ciclo de vida acontece no intestino de um mosquito, onde assume a forma promastigota, o restante do ciclo

de vida é completado em tecidos de hospedeiros vertebrados, onde somente formas amastigotas são encontradas (Schmidt e Roberts, 1996). Ver Figura 1.



**Figura 1:** Ciclo de vida da *Leishmania*. A parte superior da figura (azul) mostra o desenvolvimento das formas promastigotas no trato digestivo do mosquito e sua transmissão aos hospedeiros vertebrados. A parte inferior mostra a fase de desenvolvimento das formas amastigotas no homem, ou em outros reservatórios vertebrados. Em destaque, as formas visceral e cutânea humanas, do lado esquerdo e direito da figura, respectivamente.  
[www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm)

A *Leishmania* é transmitida aos hospedeiros vertebrados susceptíveis através da picada de mosquitos; fêmeas infectadas inoculam formas promastigotas na corrente sanguínea enquanto se alimentam nos capilares dermais. Após o contato com o sangue, os promastigotos são opsonizados fatores do soro dos hospedeiros, que engatilham a ativação do complemento e deposição de C3 nos parasitas. Promastigotos são subsequentemente lançados a leucócitos aceptores e os parasitas associados à C3 são endocitados por fagócitos e monócitos polimorfonucleares. Dentro dos fagolisossomos dos leucócitos permissivos, promastigotos diferenciam-se em amastigotos, disseminando-se para órgãos e tecidos (Handman, 2000).

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas: leishmaniose tegumentar, variando da forma cutânea à mucocutânea (LC

e LMC), representando o pólo responsivo, para a leishmaniose cutânea difusa (LCD) que representa o pólo não responsivo e leishmaniose visceral (LV) abrangendo forma subclínica e a doença fatal (Oliveira *et al.*, 2004). Ver Tabela 1.

**Tabela 1:** Características clínicas da Leishmaniose Humana – Modificado de Oliveira *et al.*, 2004

Característica	Mucocutânea	Cutânea	Visceral
Lesões	Destruição ulcerativa do septo nasal	Lesões ulceradas com bordas elevadas e centro necrótico	Órgãos internos
Histopatologia e número de parasitos	Reações granulomatosas com muito poucos parasitas	Resposta inflamatória crônica com número moderado de parasitas	Marcada proliferação de macrófagos, forte parasitismo em órgãos hematopoiéticos
Níveis de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	Baixo	Baixo	Alto

Parasitas que causam a LC no Novo Mundo são agrupados nos complexos *L. braziliensis* e *L. mexicana*, enquanto os que causam LV são agrupados no complexo *Leishmania donovani* (Oliveira *et al.*, 2004). O protozoário causador da LV nas Américas é um parasita intracelular obrigatório, gênero e subgênero *Leishmania* e espécie *chagasi* – *L. (L.) chagasi*, da família *Trypanosomatidae*, (Lainson e Shaw, 1987).

A transmissão é associada com o mosquito *Lutzomia longipalpis*, de hábitos alimentares ecléticos, e os cães domésticos agem como maior fonte de infecção (Marzochi e Marzochi, 1994).

A leishmaniose brasileira se comportava como uma antropozoonose rural até recentemente, mas, após a década de 80, observou-se sua expansão também para as regiões periurbanas de grandes cidades. Mudanças ambientais causadas pelos humanos têm modificado o perfil epidemiológico das leishmanioses em áreas onde é relacionada com a vida selvagem, assim como em áreas onde a transmissão é em áreas rurais periurbanas ou vizinhança urbana e áreas em volta das casas. Em cada área, a transmissão depende da adaptação das espécies de mosquito (potenciais vetores) a estes ambientes e envolve animais domésticos (*L. chagasi*, causando a forma visceral da leishmaniose, e *L. braziliensis*, causando a

forma cutânea e mucosa) (Tolezano *et al.*, 1980; Lainson, 1989; Marzochi, 1992; Marzochi, e Marzochi, 1994).

Marzochi e Marzochi (1994), consideram a seguinte definição clínica para a Leishmaniose visceral: **forma subclínica**, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas (sinais e sintomas), presença de anticorpos para *Leishmania* e/ou teste de hipersensibilidade positivo; **forma branda**, caracterizada pela ausência de sintomas (indivíduos sem queixas clínicas), ou quando estes ocorrem ocasionalmente (oligosintomáticos), são esporádicos e difíceis de associar com a LV; **forma moderada**, caracterizada por história clínica duradoura por semanas ou poucos meses com febre variável, episódios de diarreia e ocasionalmente, outras manifestações; e **forma séria**, caracterizada por progressão de um diagnóstico tardio em que o paciente se refere à história de meses ou anos da doença, levando progressivamente a uma condição tísica, com febre, palidez, perda de peso, aumento do volume abdominal, episódios de hemorragia e diarreia, títulos de anticorpos são extremamente altos dentre outras manifestações, que culminam, muitas das vezes, na morte do paciente, geralmente causada por septicemia ou hemorragia.

O diagnóstico diferencial para leishmaniose visceral inclui malária, síndrome da esplenomegalia tropical, esquistossomose ou cirrose com hipertensão portal, tripanossomose africana, tuberculose, brucelose, febre tifóide, desnutrição, linfoma e leucemia. Parasitas podem ser visualizados em lâminas, cultura de biópsia ou aspirado tecidual (baço, medula ou linfonodos). A sensibilidade para aspirados do baço é alta (maior que 98% quando comparado com outros órgãos <90%), porém, existe o risco de hemorragia (Herwaldt, 1999).

O medicamento mais comumente usado, desde a década de 50, é o antimoniato N-metil Glucamina (Glucantime®) e permanece como método de escolha para o tratamento inicial, que apresenta resistência em 10% dos casos. Nessa circunstância, pode-se utilizar da Anfotericina B, que foi recentemente associada a partículas de lipossomos (partículas lipídicas artificiais), reduzindo os efeitos sistêmicos provocados pelo tratamento (Berman, 1997; Lee e Gilbert, 1999).

A imunorregulação das leishmanioses está sendo estudada para melhorar o entendimento da resposta imune para patógenos intracelulares em geral e

*Leishmania* em particular, para encontrar se as manipulações do sistema imune podem ser terapêuticas, e racionalizar o desenvolvimento de vacinas (Herwaldt, 1999).

Vários tipos de vacinas (ex: parasitas completos mortos ou atenuados, peptídeos recombinantes ou sintéticos, ou vetores recombinantes), com ou sem citocinas ou adjuvantes, estão sendo investigados, mas nenhuma vacina está pronta para o uso geral na prevenção das leishmanioses (Modabber, 1995). O número de pessoas infectadas assintomáticas é mais alto que o número de pessoas infectadas que apresentam sintomas da doença. Por esta razão, é importante saber como pessoas infectadas vão desenvolver a doença e como elas podem ser diagnosticadas antes de mostrarem as manifestações clínicas (Singh *et al.*, 2002).

### **Caracterização Antigênica do Parasita**

Chang e McGwire (2002), referem-se às moléculas, Glicosilfosfatidilinositol (GPI), Glicosilfosfolipídios (GIPL), Lipofosfoglicanos (LPG), Fosfoglicanos (FG), Proteofosfoglicanos (PPG), Leishmaniolisina (gp63) e Cisteína Proteases (CPs), dentre outras, como determinantes invasivos/evasivos que auxiliam a *Leishmania* no parasitismo intracelular, seguindo os eventos: evasão dos fatores líticos humorais, fixação dos parasitas aos macrófagos seguido de sua internalização dentro destes fagócitos, sobrevivência intracelular dos parasitas endocitados, diferenciação de promastigotos em amastigotos e replicação dos amastigotos. Segundo estes autores, tais determinantes são cruciais para a infecção, mas não produzem nenhuma patologia no hospedeiro.

As Proteínas de Superfície de Promastigotos (PSP), também conhecidas como gp63, são glicoproteínas de superfície de membrana que possuem atividade proteolítica. Elas são glicosiladas e ligantes de Conavalina A (Con A), devido à presença de sítios de manose em sua arquitetura. Além de moléculas de manose, sua estrutura também possui sítios de N-acetilglicosamina e N-acetilglicosamina. A gp63 é muito abundante, contribuindo com cerca de 1% de toda a constituição protéica da célula. Essas glicoproteínas são reconhecidas por anticorpos no plano externo da membrana do parasito, de onde são secretadas,

liberando o complexo imune (anticorpo + gp63) nos arredores. As PSP também possuem sítios de ligação para o fragmento do complexo C3bi, sendo importantes em auxiliar o reconhecimento por macrófagos. A gp63 é altamente imunogênica, apresentando reatividade cruzada entre as diferentes espécies de *Leishmania*, embora os anticorpos produzidos por essa molécula não sejam efetores no controle da infecção (Mood, 1993; Wright e El Amim, 1989).

Ramamoorthy e colaboradores (1992), demonstraram a expressão diferencial dos genes gp63, que resulta em diferentes quantidades da proteína gp63 o desenvolvimento *in vitro* das formas promastigotas para a forma infecciosa.

Glicoconjugados ligantes de Fucose-Manose (FML) constituem um complexo de proteínas antigênicas de formas promastigotas de *L. (L.) donovani* que são utilizados em testes sorológicos para diagnóstico, avaliação do prognóstico e controle do calazar humano, além de serem propostos em triagens de doadores de sangue de regiões endêmicas de calazar (Otero *et al.*, 2000; Palatnik *et al.*, 1995). O principal componente imunoprotetor da FML é a fração glicoprotéicas designada GP36 (Paraguai *et al.*, 2001), reconhecido unicamente por soros de pacientes com calazar humano (Palatinik *et al.*, 1996).

Santana e colaboradores (2002), isolaram o gene codificante da nucleosídeo hidrolase de *L. (L.) donovani*, que é um componente do antígeno GP36, e demonstraram que LdNH recombinante é útil no diagnóstico de calazar em cães uma vez que reage preferencialmente com IgG subtipo 1 de imunoglobulina que é aumentado em cães susceptíveis ao calazar e na doença avançada.

A clonagem molecular, caracterização e expressão dos antígenos K9 e K26 (Bathia *et al.*, 1999), mostrou que o K26 (proteína hidrofílica de 247 aminoácidos, contendo 11 repetições de 14 aminoácidos, 64% da proteína total) é um marcador diagnóstico altamente específico para avaliar a infecção no soro de indivíduos com leishmaniose visceral.

Trujillo *et al.*, (1999) demonstraram que o antígeno denominado KMP-11 (principal determinante protéico de membrana de protozoários kinetoplastídeos) parece ser antigênico e mostra uma resposta de anticorpos relativamente forte durante o curso natural das leishmanioses de doença de Chagas. A observação

de reação imunológica cruzada em infecções causadas por *Leishmania* e *T. cruzi* é particularmente importante, contradizendo estudos anteriores que relataram a alta sensibilidade da detecção destes anticorpos em pacientes com leishmaniose. O mapeamento de determinantes antigênicos em KMP-11 por estes autores, utilizando peptídeos sintéticos revelou a existência predominante de epítomos conformacionais nas infecções de *Leishmania*.

De maneira geral, os glicoconjugados presentes na superfície de *Leishmania* estão envolvidos na sobrevivência destes organismos, protegendo-os da proteólise (Karlsson, 1991), como, associados com a infectividade dos mesmos, propiciando o reconhecimento de sítios ligantes específicos em células hospedeiras (Ferguson e Homans, 1998; Verbet, 1994).

Até o presente, não é conhecido o papel biológico desempenhado pelos anticorpos anti-carboidratos IgG e IgE no relacionamento hospedeiro-*Leishmania* nem os fatores que influenciam a sua produção. Entretanto, o envolvimento deles, com a interação da *Leishmania* com receptores celulares e nos possíveis mecanismos de regulação negativa de enzimas como a gp63 devem ser investigadas (Atta, 2004).

Burns *et al.*, (1993), identificaram um antígeno de *Leishmania chagasi*, LcKin, com homologia à superfamília de proteínas motoras (kinesinas). Este antígeno, predominante em amastigotos, contém um domínio repetitivo extenso altamente relacionado entre as espécies de *L. chagasi* e *L. donovani*. Altos títulos de anticorpos foram encontrados para o antígeno rK39, que contém várias repetições de 39 aminoácidos, demonstrando a conservação da região repetitiva entre as espécies mencionadas.

Com a descoberta deste antígeno, muitos pesquisadores têm testado a sua viabilidade em diferentes testes diagnósticos para a Leishmaniose Visceral, a maioria deles mostrando resultados altamente promissores, na tentativa de utilização de métodos diagnósticos menos invasivos e economicamente viáveis para a população.

A detecção de anticorpos IgG para este antígeno tem sido encontrada como sendo extremamente sensível e específico no diagnóstico da Leishmaniose Visceral, embora seja difícil apontar alguma função protetora para estes

anticorpos específicos de tão altos títulos produzidos contra este e outros antígenos similares (Carvalho *et al.*, 2003; Chang e McGwire, 2002).

Os títulos de anticorpos IgG anti-rK39 têm um pico entre 6 e 9 meses e anticorpos IgA anti-rK39 têm um pico entre 3 e 6 meses. Os níveis de anticorpos tornam-se indetectáveis depois de 6 meses de tratamento com sucesso, enquanto os títulos de anticorpos IgG começam a declinar depois de 3 meses de tratamento, tornando-se indetectáveis depois de 2 anos. A presença ou persistência de anticorpos anti-rK39 detectáveis por mais de 4 anos indica a falha no tratamento ou recorrência (Singh *et al.*, 2002).

Vários autores apontam a viabilidade de testes diagnósticos utilizando o antígeno rk39 em diferentes metodologias. A especificidade e sensibilidade são na maioria dos casos muito promissoras.

Singh *et al.*, (2002), testaram 228 casos parasitologicamente confirmados utilizando rK39 em ELISA (IgG) e teste imunocromatográfico (dipstick test), os resultados apontaram 100% de sensibilidade e especificidade para ambos os casos. Resultados similares foram obtidos por Carvalho *et al.*, 2003, mostrando a sensibilidade do antígeno rK39 "strip test" e ELISA de 90% e 89%, respectivamente, enquanto a especificidade foi de 100% e 98% respectivamente.

Schallig *et al.*, 2002, analisaram a eficácia do antígeno rK39 em Testes de Aglutinação Direta - DAT (100% de sensibilidade e especificidade) e dipstick test (85,7% de sensibilidade e 82% de especificidade).

Análises semelhantes foram feitas para os testes de ELISA (Salotra *et al.*, 2003; Maalej *et al.*, 2003; Sreenivas *et al.*, 2002; Braz *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 1995; Qu *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 2001; Ozensoy *et al.*, 1998; Zijlstra *et al.*, 1998; Medrano *et al.*, 1998; Badaró R *et al.*, 1996) e Imunocromatografia (Sarker *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2003; Boelaert *et al.*, 2004; Chappuis *et al.*, 2003; Veeken *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2001; Berm *et al.*, 2000; Zijlstra *et al.*, 2001).

Um antígeno de *L. major*, designado LACK (*Leishmania* homologue of receptor for activated C kinase), foi identificado depois de uma busca por antígenos reconhecidos por um clone Th1 protetor derivado do baço de camundongo BALB/c que tinha sido infectado com um extrato solúvel de promastigotos de *L. major*. A seqüência de aminoácidos deduzidas deste



antígeno tem homologia substancial com os receptores intracelulares para Kinase C ativada (RACKs) e apresenta alta homologia entre *L. major* e *L. chagasi* (Mougneau *et al.*, 1995). Tem sido sugerido que a proteína LACK contém um epítipo imunodominante que representa o alvo da resposta imune inicial (Requena *et al.*, 2000).

O antígeno LACK tem sido usado para avaliar vacinas de DNA codificando este e outros antígenos (ex: LmSTII e TSA). A combinação desses antígenos tem conferido proteção durável e completa contra o desenvolvimento de lesões cutâneas (Méndez *et al.*, 2002).

Ramiro *et al.*, (2003), descrevem a efetividade da estratégia de vacinação utilizando plasmídeos codificando DNA na indução da proteção na leishmaniose visceral em cães. Estes autores analisaram o padrão de produção de anticorpos específicos e citocinas em animais imunizados, comparados com controles. Os animais vacinados mostraram altos níveis de anticorpos anti-LACK específicos e um aumento de IgG2 sobre IgG1 sugerindo uma resposta imune mediada por células T Th1, demonstrando que este regime de vacinação engatilha um alto nível de proteção contra a leishmaniose visceral.

---

## “PHAGE DISPLAY”

---

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

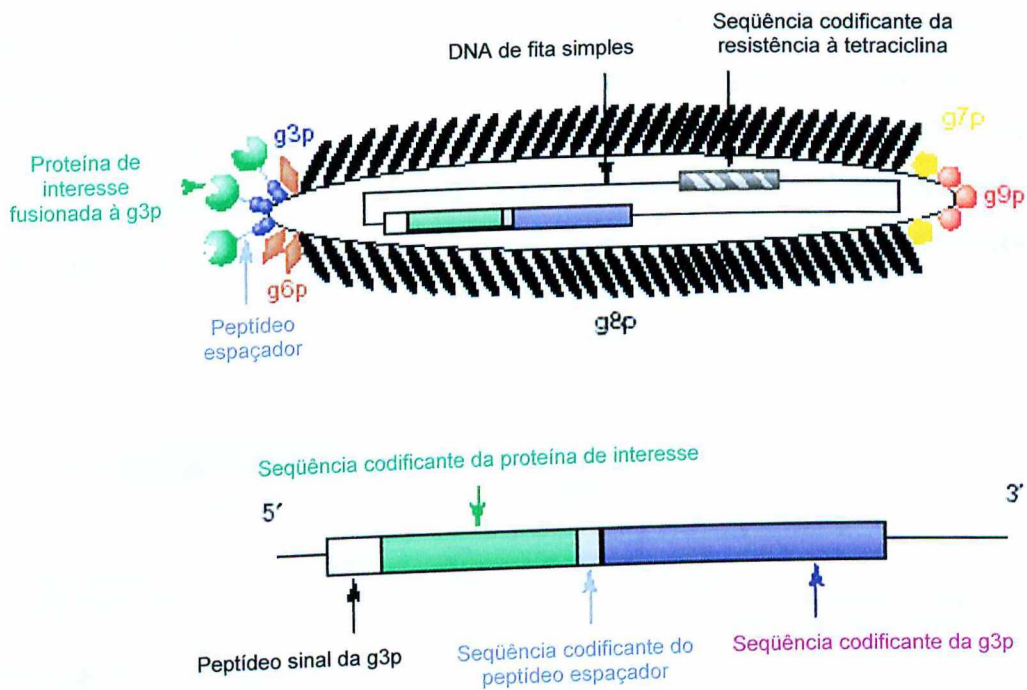
Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas usando o pilus sexual como receptor. As partículas de fagos filamentosos (linhagens M13, f1 e fd), que infectam *E. coli* via pilus F consiste de um DNA de fita simples incluso em uma cápsula protéica. Um fago viável expressa aproximadamente 2.700 cópias da proteína gene 8 (g8 ou pVIII, uma proteína de 50 resíduos de aminoácidos) e 3 a 5 cópias do gene III (p3p ou pIII, proteína de 406 aminoácidos) (Russel, 1991).

As duas principais proteínas utilizadas para este fim são a proteína pIII e a pVIII (Brígido e Maranhão, 2002), a proteína 3 é responsável pela adesão da partícula viral ao pilus sexual. O produto do gene III dos fagos filamentosos corresponde à maior das proteínas estruturais, com uma massa molecular de cerca de 42 KDa na sua forma madura (Makowski, 1993). São também usadas as proteínas pIV, pVI ou pVIII (Benhar, 2001), ver Figura 2.

Em sistemas onde todas as pIII ou pVIII são utilizadas, o tamanho da proteína inserida no vetor é limitado, pois grandes proteínas interferem nas funções das proteínas do capsídeo, tornando o fago pouco infectivo. Este sistema “Phage display” foi criado para a exposição de bibliotecas de pequenos peptídeos (no máximo 30 aminoácidos) (Phizicky e Fields, 1995).

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. As seqüências de DNA de interesse são inseridas em uma localização no genoma de bacteriófagos filamentosos, de modo que a proteína codificada é expressa na superfície do fago filamentoso como um produto de fusão a uma das proteínas da superfície do fago (Azzay e Highsmith, 2002).

A conexão entre genótipo e fenótipo, permite o enriquecimento de fagos específicos, como por exemplo, usando a seleção em um alvo imobilizado (Benhar, 2001).

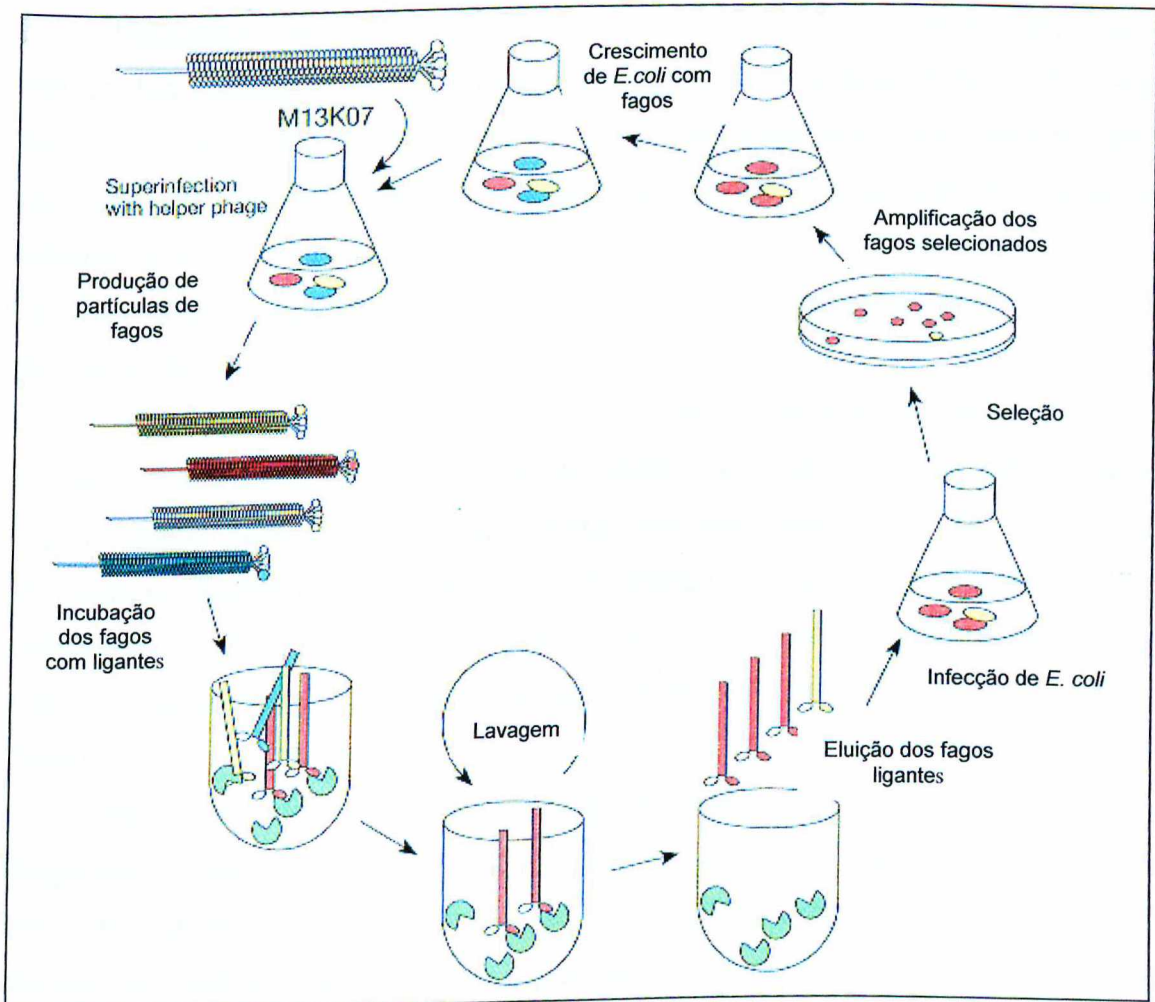


**Figura 2:** Representação estrutural de um fago filamentososo. A proteína de interesse é fusionada à extremidade amino-terminal da g3p (pIII). O gene do peptídeo é inserido entre as seqüências codificantes do peptídeo sinal e a proteína g3p (pIII) do capsídeo do fago fd-tet. Na morfogênese do fago, a proteína é apresentada na superfície (Figura modificada de Fernandez-Gacio *et al.*, 2003).

O “Biopanning” ou procedimento de seleção é feito pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. Na maioria das vezes, o alvo é retido em placas de ELISA, mas também se utiliza “beads”, 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 seqüenciamento de DNA, "Western Blot" ou ELISA (Smith, 1985). Ver figua 3.

Como alternativa ao "panning" contra um alvo immobilizado em uma superfície, a biblioteca pode ser reagida com um alvo em solução, dada pela afinidade de captura do complexo alvo-fago em uma matriz de afinidade (bead) específica para a proteína alvo. O experimento requer substancialmente menos alvo por experimento que o "panning" em superfície, podendo resultar em uma maior acessibilidade do sítio ligante para os peptídeos expressos nos fagos, assim como evita a desnaturação parcial do alvo na superfície plástica (Barbas, 1992).



**Figura 3:** Ciclo de "Biopanning" (Seleção) em solução. Em cada ciclo os fagos reativos com o alvo são selecionados por lavagens sucessivas, sendo os demais descartados. Os fagos remanescentes são então amplificados e seguem um novo ciclo para a maturação da afinidade de ligação ao alvo específico [http://ymbc.ym.edu.tw/proteome/interact/phage\\_display.htm](http://ymbc.ym.edu.tw/proteome/interact/phage_display.htm)

Oligonucleotídeos sintéticos com um comprimento constante, mas com códons não especificados, randomizados por mutagênese sítio-dirigida, usando deoxinucleotídeos degenerados, são clonados como fusão a uma das proteínas do capsídeo de fagos M13, onde são expressos como proteínas de fusão ligadas ao capsídeo. Peptídeos ligados aos fagos exibem um grande potencial mimético a epítomos lineares, conformacionais ou não protéicos (Smith, 1991; Smith *et al.*, 1993).

Vetores virais como o fago lambda (Sternberg e Roess, 1995), bacteriófagos T4 e P4 (Houshmand *et al.*, 1999; Lindqvist e Naderi, 1995), além dos vírus de eucariotos, tais como baculovírus, também podem ser utilizados neste processo (Boublik *et al.*, 1995).

Bibliotecas de peptídeos fusionadas em fagos têm sido muito utilizadas no estudo das interações entre antígenos e anticorpos (Coretese *et al.*, 1994; Birch-Marchin *et al.*, 2000; Christopher *et al.*, 1999), estes trabalhos demonstram a obtenção de peptídeos específicos pela seleção das bibliotecas de fagos com anticorpos monoclonais e policlonais, epítomos lineares, tanto quanto mimetopos, os que imitam antígenos lineares, descontínuos, conformacionais e até mesmo epítomos não peptídicos de antígenos.

Peptídeos selecionados contra um alvo particular que tem seqüência similar tem um papel na identificação do motivo necessário para ligação (Stephen e Lane, 1992). Nos casos em que os peptídeos selecionados não se assemelham ao peptídeo ligante natural, foram denominados mimetopos (Geysen *et al.*, 1986; Smith e Scott, 1993). Seqüências peptídicas identificadas por phage display têm sido mostradas como agonistas ou antagonistas de receptores (Doobar e Winter, 1994).

Peptídeos que neutralizam imunoglobulinas podem ser empregados como reagentes diagnósticos ou usados como agentes terapêuticos controlando doenças autoimunes (Blank *et al.*, 1999). Bibliotecas de peptídeos randômicos podem ser usadas para mapear epítomos de anticorpos policlonais e monoclonais, identificando peptídeos ligantes, e desenvolvendo fagos que definem sítios para diferentes enzimas (Mattheus e Wells, 1993; Ohkubo *et al.*, 2001).

Fagos que expressam epítomos ou mimetopos podem emergir como uma ferramenta útil para o desenvolvimento de vacinas efetivas ou podem servir como veículos de entrega de vacinas por si próprios (Benhar, 2001).

A apresentação de pequenos peptídeos na superfície de partículas viral pode aumentar sua imunogenicidade e conseqüentemente seu potencial como candidatos a vacinas. A resposta imunogênica a fagos M13 é dependente de células T e não requer adjuvante (Azzay e Highsmith, 2002).

Até o presente momento, não existem evidências na literatura revelando experimentos utilizando a técnica de "phage display" no estudo das interações antígeno-anticorpo com o protozoário *Leishmania*. Entretanto, vários autores relatam a utilização desta técnica no entendimento de doenças provocadas por vírus, bactérias, protozoários e a interação entre seus antígenos e a resposta imune do hospedeiro, na busca mapear epítomos ou desenvolvimento de vacinas.

De la Cruz *et al*, 1988, mostraram que a clonagem de regiões repetitivas do gene da proteína do circumsporozoito de *Plasmodium falciparum* no gene pIII de fagos filamentosos resulta na exposição de proteínas recombinantes na superfície do fago. Os fagos foram antigênicos e imunogênicos quando injetados em coelhos.

Willis *et al.*, 1993, expõem determinantes antigênicos da proteína do circumsporozoito do parasita causador da malária, *P. falciparum* em múltiplas cópias na pVIII de fagos Fd. Os epítomos peptídicos do fago híbrido foram extremamente imunogênicos em quatro diferentes linhagens de camundongos sem o uso de adjuvantes externos, e os anticorpos foram altamente específicos aos epítomos individuais.

Gazarian *et al*, 2000, mapearam epítomos da região N-terminal da TPmy (Paramiosina de *T. solium*), que são altamente imunogênicos nesta molécula. Utilizando diferentes métodos de seleção e eluição, identificaram peptídeos com homologia à proteína em questão, sugerindo a identificação de um epítomo linear e descontínuo, com prováveis propriedades de determinantes imunodominantes, reveladas por análises computacionais de antigenicidade.

Cui e colaboradores (2003), identificaram resíduos importantes na primeira região hidrofílica principal da proteína do vírus da doença infecciosa da bursa (VP2), para isto, foram construídos fagos filamentosos contendo o gene da região

variável da VP2 da IBDV (Infectious Bursal Disease Vírus). Anticorpos neutralizantes anti-VP2, foram usados para se ligar aos fagos contendo a região variável original da VP2, os fagos não ligantes foram também avaliados, na tentativa de localizar mutações.

Dada a viabilidade da tecnologia acima descrita, torna-se importante ressaltar que essa técnica complementa a atual onda de projetos genômicos, onde se gera um grande volume de informação, mas com pouca informação a nível fenotípico. Com a técnica de apresentação em fagos, podemos agora testar genes de interesse em grande escala, na busca de um conjunto de proteínas que interagem, e que vem sendo chamado de *interatoma*. A busca desses *interatomas* promete expandir os limites criados com os projetos genômicos e permitem agora inferir acerca de como esses genes se relacionam, explicando o indivíduo fenotipicamente (Brígido e Maranhão, 2002).

---

## OBJETIVOS GERAIS

---

Os objetivos principais do presente trabalho foram:

1. Identificar peptídeos ligantes à anticorpos policlonais de pacientes positivamente diagnosticados para Leishmaniose Visceral, a partir de bibliotecas de peptídeos recombinantes, "Phage Display".
2. Confirmar a imunorreatividade dos fagos recombinantes selecionados por métodos imunoenzimáticos e caracterizá-los por seqüenciamento e bioinformática, determinando os antígenos potenciais mais imunogênicos e seus prováveis domínios funcionais (epítomos).



---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Atta AM, Colossi R, Sousa-Atta MLB, Jerônimo SMB, Nascimento MDSB, Bezerra GF, Orge G and Carvalho EM (2004) Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosilated antigens in Visceral Leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:525-530.
- Azzay HME and Highsmith WE (2002) Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 35:425-445.
- Badaró R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR and Reed SG (1996) rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 173:758-761.
- Barbas CF, Burton DR, Scott JK and Silverman GJ (2001) Phage Display. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.8.4-8.7.
- Bathia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG and Skeik YAW (1999) Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Bioch Parasitol* 102:249-261.
- Benhar I (2001) Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotchnol Adv* 19:1-33.
- Berm C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD and Bista MD (2000) Use of the recombinat K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 63:153-157.
- Berman JD (1997) Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic development in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 24:684-703.

Birch-Machin I, Ryder S, Taylor L, Inguez P, Marault M, Cegliec L, Zientara S, Cruciere C, Cancellotti F, Koptopoulos G, Mumford J, Binns M and Davis-Poynter N (2000) Utilization of bacteriophage display libraries to identify peptide sequences recognized by Equine herpes virus type 1 specific equine sera. *J Virol Methods* 88:89-104.

Blank M, Shoenfeld Y, Cabilly S, Heldman Y, Fridkin M and Katchalski-Katzir E (1999) Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by syntetic peptides. *Proc Natl Acad Sci* 96:5164-5168.

Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Kardi B, Jacquet D, Chappuis F, Campino L, Desjeux P, Le Ray D, Koirala S and Van der Stuyft P (2004) A comparative study of effectiveness of diagnostic tests for Visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hug* 70:72-77.

Boublik Y, Di Bonito P and Jones IM (1995) Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotech* 13:1079-1084.

Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG and Jeronimo SM (2002) The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant k39 antigen in the diagnosis of America visceral leishmaniasis and differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 67:244-348.

Brígido MM, Maranhão AQ (2002) Bibliotecas apresentadas em FAGOS. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 26:44-51.

Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R and Reed SG (1993) Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specif antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci* 90:775-779.

Carvalho SF, Lemos EM, Corey R and Dietze R (2003) Performance of recombinant antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68:231-324.

Chang KP and McGwire BS (2002) Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol Disease* 1:1.

Chappuis F, Rijal S, Singh R, Acharya P, Karki BM, Das ML, Bovier PA, Desjeux P, Le Ray D, Koirala S and Loutan L (2003) Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Trop Med Int Health* 8:277-285.

Christopher G, Leann A, Robin T, Anders F and Foley M. (1999) Isolation of peptides that mimics epitopes on a malarial antigen from random peptide libraries displayed on phage. *Infect Immun* 67:4679-4688.

Cortese R, Felici F, Galfre G, Luzzago A, Monaci P and Nicosia A. (1994) Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage. *Trends Biotechnol* 12:262-267.

Cui X, Nagesha HS and Holmes IH (2003) Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display. *J Virol Meth* 109:75-83.

de la Cruz VF, Lal AA and McCutchan TF (1988) Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J Biol Chem* 263:4318-4322.

Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A and Arias J (2001) Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 8:355-357.

Doobar J and Winter G (1994) Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J Mol Biol* 244:361-369.

Ferguson MA and Homans SW (1988) Parasites glycoconjugates: towards the exploitation of their structure. *Parasite Immunol* 10:675-679.

Fernandez-Gacio A, Uguen M and Faztnez J (2003) Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends Biotechnol* 21:408-414.

Gazarian KG, Gazarian TG, Solís C, Hernnández R, Shoemaker CB and Laclette JP (2000) Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. *Immu Lett* 42:191-195.

Geysen HM, Rodda SJ and Mason TJ (1986) A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol* 23:709-715.

Handman E (2000) Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* 44:2-39.

Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191-1199.

Houshmand H, Frogman G and Magnusson G (1999) Use of bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction. *Anal Biochem* 268:363-370.

Karlsson, KA (1991) Glycobiology: a rowing field for drug design. *Trends Bioch Sci* 12:265-272.

Kumar R, Pai K, Pathak K and Sundar S (2001) Enzyme-linked assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1220-1224.

- Lainson R (1989) Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: Demographic and Vector-Borne Diseases. (MW Servicee, ed). CRC Preess, Boca Raton, pp 85-106.
- Lainson R and Shaw JJ (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In Lainson R and Shaw JJ (eds). The leishmaniasis. Academic Press, London pp.1-120.
- Lee MB and Gilbert HM (1999) Current approaches to leishmaniasis. *Infct Med* 16:34-45.
- Lindqvist BH and Naderi S (1995) Peptide presentation by bacteriophage P4. *FEMS Microbiol Rev* 17:33-39.
- Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F and Dellagi K (2003) Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinat or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68:312-320.
- Makowski L (1993) Structural constraints of the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene* 128:5-11.
- Marzochi MCA (1992) Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina* 63:82-104.
- Marzochi MCA and Marzochi KBF (1994) Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brasil – Emerging anthroozoonosis and possibilities for their Control. *Cad Saúde Públ* 10:359-375.
- Mattheus DJ and Wells JA (1993) Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science* 260:1113-1117.

Medrano FJ, Canavate C, Leal M, Rey C, Lissen E and Alvar J (1998) The role of serodiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. *Am J Trop Med Hyg* 59:155-162.

Méndez M, Belkaid Y, Seder RA and Sacks D (2002) Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 20:3702-3708.

Modabber F (1995) Vaccines against leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 89:83-88.

Molineux DH and Killick-Kendrick R (1987) Morphology, ultrastructure and life cycles. In: Peters W and Killick-Kendrick R *The leishmaniasis in biology and medicine* Academic. Florida, pp161-168.

Mood SF (1993) Molecular variation in *Leishmania*. *Acta Trop* 53:185-204.

Mougneau E, Altare F, Wakil AE, Zheng S, Coppola T, Wang Z, Waldmann R, Locksley RM and Glaichenhaus N (1995) Expression Cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* 268:563-566.

Ohkubo S, Miyadera D, Sugimoto Y, Matsuo Ki, Wierzba K and Yamada Y (2001) Substrate phage as a tool to identify novel sequence substrates proteases. *Comb Chem High Throughput Screen* 4:573-583.

Oliveira CI, Teixeira MJ, Gomes R, Barral A and Brodskyn C (2004) Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discov Today: Disease Models* 1:81-86.

Otero ACS, Silva VO, Luz KG, Palatnik M, Pirmez C, Fernandes O and Palatnik de Souza CB (2000) Occurrence of *Leishmania donovani* DNA in Donated Blood Donors. *Am J Trop Med Hyg* 62:128-131.

Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG and Ozcel MA (1998) Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Med Hyg* 59:363-369.

Palatinik de Souza CB, Gomes EM, Paraguai de Souza E, Palatinik M, Luz K and Borojevic R (1995) *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-manose ligand as a aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:390-393.

Palatinik de Souza CB, Gomes EM, Paraguai de Souza E, Santos WR, Macedo SR, Medeiros LV and Luz KG (1996) The FML (fucose manose ligand) of *Leishmania donovani*. A new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human kala-azar. *Rev Soc Bras Med Trop* 29:153-163.

Paraguai de Souza E, Bernardo RR, Palatinik M and Palatinik de Souza CB (2001) Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine* 19:3014-3015.

Phizicky EM and Fields S (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol* 59:94-123.

Qu JQ, Guan LR, Shulidan I, Zuo XP, Chai JJ, Chen SB, Kswazu S, Katakura K, Matsumoto Y, Reed SG and Chang KP (2000) Rapid screening with a recombinant antigen (rk39) for diagnosis of visceral leishmaniasis using dipstick. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 18:155-158.

Qu Jq, Zhong L, Masoom-Yasinzai M, Abdur-Rab M, Akzu HS, Reed SG Chang KP and Gilman-Sachs A (1994) Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* Kinesin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:543-545.

Ramamoorthy R, Donelson JE, Paetz KE, Maybodi M, Roberts SC and Wilson ME (1992) Three distinct RNAs for the surface protease gp63 gene are differentially

expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form. J Biol Chem 267:1888-1895.

Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA and Larraga V ((2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. Vaccine 21:2474-2484.

Requena JM, Alonso C and Soto M (2000) Evolutionarily Conserved Proteins as Proeminent Immunogens during *Leishmania* Infections. Parasitol Today 16:246-250.

Russel M (1991) Filamentous phage assembly. Mol Microbiol 5:1607-1613.

Salotra P, Sreenivas G, Beena KR, Mukherjee A and Rasmeh V (2003) Parasite detection in patients with post Kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. J Clin Pathol 56:840-843.

Santana DM, Borja-Cabrera GP, Paraguai de Souza E, Sturm NR, Palatinik de Sousa CB and Campbell DA (2002) Nucleoside hydrolase from *Leishmania (L.) donovani* is an antigen diagnostic for visceral leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol 120:315-319.

Sarker CB, Momen A, Jamal MF, Siddiqui NI, Siddiqui FM, Chowdhury KS, Rahman S and Talukder SI (2003) Immunochromatographic (rK39) strip test in diagnosis of visceral leishmaniasis in Bangladesh. Mymensingh Med J 12(2):93-97.

Schallig HD, Canto-Cavalheiro M and Silva ES (2002) Evaluation of the direct agglutination test and the rk39 dipstick for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 97:1015-1018.



Schmidt GD and Roberts LS (1996) Foundations of parasitology. Fifth edition. Copyright,USA, 659 pp.

Shaw JJ (1994) Taxonomy of the Genus *Leishmania*: Present and Future Trends and their Implications. Mem Inst Oswaldo Cruz 89:471-478.

Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP and Reed SG (1995) Diagnostic and prognostic value of k39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. J Parasitol 81:1000-1003.

Singh S, Kumari V and Singh N (2002) Predictin kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant k39 antigen. Clin Diagn Lab Immunol 9:568-572.

Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 228:1315-1317.

Smith GP (1991) Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. Curr Opin Biotechnol 2:668-673.

Smith GP, Schultz DA and Ladbury JE (1993) A ribonuclease S-peptide antagonist discovered with a bacteriophage display library. Gene 128:37-42.

Smith GP and Scott JK (1993) Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. Methods Enzymol 217:228-257.

Sreenivas G, Ansari NA, Singh R, Subba Raju BV, Bhatheja R, Negi NS and Salotra T (2002) Diagnosis of visceral leishmaniasis: comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR. R J Biomed Sci 59:218-222.

Stephen CW and Lane DP (1992) Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. J Mol Biol 225:577-583.

Sternberg N and Hoess RH (1995) Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci* 92:1609-1613.

Tolezano JE, Macoris AS and Diniz JMP (1980) Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Vale da Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 40:49-54.

Trujillo C, Ramírez R, Vélez ID and Berberich C (1999) The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American Leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 70:203-209.

Veeken H, Ritmeijer K, Seaman J and Davidson R (2003) Comparison of an rk39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. *Trop Med Int Health* 8:164-167.

Verbet, A (1994) The fascinating of producing recombinant glycoprotein. *Cienc Cult* 94:212-214.

Willis AE, Perham Rn and Wraith D (1993) Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* 128:79-83.

World Health Organization (1990) Control of leishmaniasis. World Health Organization (Tech Rep Ser, 793).

World Health Organization (1998) Leishmania and HIV in gridlock. World Health Organization (WHO/CTD/Leish/98.9 add. 1, UNAIDS/98.23).

Wright EP and El Amim ER (1989) Leishmania infection: surfaces and immunity. *Biochem Cell Biol* 67:525-536.

Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EA, El-Hassan AM, Reed SG and Ghalib HW (1998) rK39 enzyme-linked assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. Clin Diagn Lab Immunol 5:717-720.

Zijlstra EE, Nur Y, Desjeus P, Khalil EA, El-Hassan AM and Groen J (2001) Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. Trop Med Int Health 6:108-113.

---

**CAPÍTULO ÚNICO**

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES LIGANTES A  
ANTICORPOS POLICLONAIS (IgG) PROVENIENTES DE PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE VISCERAL VIA "PHAGE DISPLAY"**

---

---

## RESUMO

---

*Leishmania chagasi* é um parasita intracelular obrigatório que causa a Leishmaniose Visceral nas Américas, doença na qual uma alta mortalidade é observada em pacientes não tratados. Neste trabalho, utilizamos a tecnologia de exposição em fagos "phage display", no intuito de identificar peptídeos recombinantes com afinidade aos anticorpos (IgG) gerados por pacientes acometidos por esta doença. A seleção foi realizada em solução, mostrando enriquecimento da biblioteca a favor do alvo, com títulos de saída variando de  $5,8 \times 10^3$  no primeiro ciclo à  $4,6 \times 10^6$  no quarto ciclo. Os fagos obtidos a partir deste último ciclo de seleção foram submetidos a testes de ELISA apresentando 64,13% e 55,43% de positividade para ensaios contra soro total e anticorpos purificados, respectivamente. A partir de seqüenciamento de DNA e análises de bioinformática, foi possível identificar 24 clones com seqüências peptídicas distintas. Os alinhamentos gerados pelos programas T-Coffee e CLUSTAL W (18.1), mostraram a presença das seqüências consenso HKLAGLNL (três clones com homologia total) e ATPRS (13 clones consenso, com homologia parcial ou total), que apresentam homologia com proteínas imunogênicas de *Leishmania chagasi* tais como: K39 – LcKin, antígeno tipo kinesina (K+ LNL, 497-504); GP46 - Proteína de superfície de membrana (LA L+LR, 184-190 - LA LNL, 304-309); Proteína gp63 (RL+LG, 416-420) e antígeno LACK (AT RS, 253-257), dentre outras. A seqüência RDQ, encontrada em 4 dos 28 clones seqüenciados, quando invertida mostra similaridade no domínio repetitivo da k39 (rk39), sendo uma região de alta hidrofiliçidade, com elevado índice antigênico em provável região de superfície, segundo o programa Potean 4.0. Os clones contendo estes principais domínios mostraram reatividade diferenciada em testes de ELISA contra anticorpos de pacientes positivos e negativos para Leishmaniose. Índices de antigenicidade foram gerados isoladamente para cada um dos 24 clones, mostrando picos para as regiões dos domínios ATPRS e RDQ, fato que pode estar indicando, juntamente com os alinhamentos prévios, que estas regiões possam fazer parte de epítomos imunogênicos das proteínas com as quais se relacionam, o que pode fazer deles ferramentas úteis para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral.

---

## ABSTRACT

---

*Leishmania chagasi* is an intracellular obligatory parasite that causes American Visceral Leishmaniasis (VL), illness in which a high mortality is observed in non-treated patients. The present study used phage display to identify recombinant peptides with affinity to the antibodies (IgG) produced by VL patients. The selection was carried out by solution biopanning, which enriched the library for the target, with phage titer varying after selection from  $5,8 \times 10^3$ , in the first round, to  $4,6 \times 10^6$ , in the fourth round. The phages obtained in this last cycle were submitted to ELISA tests against total serum and purified antibodies, and presented 64.13% and 55.43% of positivity, respectively. After DNA sequencing and bioinformatic analyses, 24 clones with distinct peptide sequences were identified and annotated. The alignments generated by T-Coffee and CLUSTAL W (18.1) softwares have detected two consensus sequences, HKLAGLNLR (three clones with total homology) and ATPRS (13 clones, with partial or total homology), that presented homology with immunogenic proteins of *Leishmania chagasi*, such as: k39 - LcKin, Kinesin-like antigen (K+ LNL, 497-504); gp46 - membrane surface glycoprotein of 46 kDa (LA L+LR, 184-190 - LA LNL, 304-309); protein gp63 (RL+LG, 416-420) and the antigen LACK (AT RS, 253-257), among others. The motif RDQ, found in 4 out of 28 clones sequenced, when inverted, shows great similarity with the repetitive domain of k39 (rk39), a region of high hydrophilicity and antigenic index, with a putative surface exposure, according to calculations using the Lasergene 4.0 (Protean) software. Clones that contain these main domains showed differential immunoreactivity in ELISA tests against antibodies of positive and negative patients for Leishmaniasis. Antigenic indexes were generated separately for each of the 24 clones, and the higher indexes were obtained at the ATPRS and RDQ domains. These results associated to the previous alignments suggest that these regions may be part of important immunogenic epitopes of the parasite proteins, which could be useful tools for the diagnosis of the Visceral Leishmaniasis.

---

## INTRODUÇÃO

---

O protozoário causador da Leishmaniose Visceral nas Américas é um parasita intracelular obrigatório, gênero e subgênero *Leishmania* e espécie *chagasi* – *L. (L). chagasi*, da família Trypanosomatidae (Lainson e Shaw, 1987). Esta doença gera um amplo espectro de manifestações clínicas. A infecção permanece assintomática em alguns casos, ou pode seguir para um curso agudo, subagudo ou crônico (Herwaldt, 1999), levando progressivamente a uma condição tísica, com febre, palidez, perda de peso, aumento do volume abdominal, episódios de hemorragia e diarreia, títulos de anticorpos são extremamente altos dentre outras manifestações, que culminam, muitas das vezes, na morte do paciente (Marzochi e Marzochi, 1994).

A tecnologia de “Phage Display” (Smith, 1985), têm sido amplamente utilizada desde sua descrição. Bibliotecas de peptídeos randômicos expostos em fagos são úteis na identificação de epítopos lineares ligantes a anticorpos monoclonais por ser possível selecionar um grupo de peptídeos expostos em fagos e então obter seqüências consenso homólogas à seqüências de aminoácidos de epítopos originais (Sibille e Strosberg, 1997).

Não há relatos na literatura de trabalhos utilizando a tecnologia de “Phage Display” para a identificação de epítopos imunodominantes de *Leishmania*, portanto, muitos autores têm demonstrado a aplicação desta técnica no estudo das relações antígeno-anticorpo para os agentes causadores de muitas doenças e desenvolvimento de vacinas. Como por exemplo, em *Plasmodium falciparum* (De la Cruz, et al., 1988, Willis et al., 1993), *Taenia solium* (Gazarian et al, 2000), Vírus da Doença Infecciosa da Bursa (Cui, 2003), dentre outros.

Nosso grupo tem utilizado estas bibliotecas para seleção de peptídeos contra soro policlonal anti-neuwiedase da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Cardoso, 2004), na identificação de peptídeos reconhecidos por imunoglobulinas Y policlonais anti-proteínas totais de larvas de *Boophilus microplus* (Prudêncio et al., 2003) e construção de biblioteca combinatorial de anticorpos (Lino et al., 2003).

Dentro desta linha de pesquisa, propomos neste estudo a identificação de peptídeos recombinantes ligantes à pacientes com leishmaniose visceral, e a

caracterização necessária para a confirmação de reatividade e determinação de epítopos funcionais no reconhecimento de anticorpos para esta doença.



---

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### **Purificação de anticorpos**

Soros de pacientes diagnosticados positivamente para Leishmaniose Visceral foram cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram caracterizados.

A purificação de imunoglobulinas foi realizada por imunocromatografia a partir de um pool destes soros, utilizando coluna de proteína A sepharose. A coluna foi equilibrada com 10 volumes de tampão fosfato (0,1 M, pH 8,0). As amostras de soro diluídas (vol/vol) foram acrescentadas à resina e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, a coluna foi lavada com tampão fosfato, sendo a absorbância a 280 nm monitorada em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro – Amersham Biosciences) até igualar-se a zero. Cada amostra foi eluída com tampão glicina (0,1 M pH 2,7), sendo coletada frações de 1 mL que foram também monitoradas por leitura espectrofotométrica. As frações com maiores leituras foram reunidas e o pH neutralizado com NaOH 0,1 M. Assim, foram transferidas para membrana de diálise, concentradas em açúcar comercial (1h, 4°C) e em seguida dialisadas em 3L de tampão fosfato durante toda a noite em câmara fria a 4°C.

A quantidade de anticorpos obtida foi estimada pelo método de detecção e quantificação de proteínas descrito por Johnstone e Thorpe (1987), onde a Concentração da Amostra = Absorbância à 280nm / coeficiente e extinção à 280 nm (13,6 para IgG) x 10 mg/mL. A visualização das amostras foi realizada por SDS PAGE 16%.

O mesmo procedimento foi realizado para a purificação de anticorpos de um paciente com sorologia negativa para a mesma doença.

### **Seleção de peptídeos – “Biopanning” em solução**

Para a seleção dos peptídeos sintéticos (expressos na proteína III do capsídeo de fagos filamentosos), reativos com os anticorpos acima descritos, utilizou-se uma biblioteca randômica de peptídeos de 12 aminoácidos (“Ph.D – 12

mer – New England Biolabs”). O procedimento de seleção foi realizado em solução, de acordo com as recomendações do fabricante, com algumas modificações.

Como substrato para a realização deste processo, foram utilizados 50 µL de proteína G agarose em 50% de solução aquosa (recombinat Protein G Agarose – Invitrogen™), que foram lavados por ressuspensão em microtubo com 1mL de TBS-T (Tris-HCl 50 mM – pH 7,5, NaCl 150 mM – Tween 20 0,1%), o sobrenadante foi retirado cuidadosamente após centrifugação à 4.000 rpm por 30 segundos em centrífuga refrigerada. Em seguida, a resina foi bloqueada por uma hora com tampão de bloqueio (NaHCO<sub>3</sub> 0,1M, pH 8,6; BSA 5mg/mL; NaN<sub>3</sub> 0,02%) a 4°C, sendo misturada de 15 em 15 minutos. Após a incubação, a mesma foi lavada por quatro vezes, conforme descrito anteriormente, para então receber a mistura de 300 ng de anticorpo purificado, juntamente com 1,5 x 10<sup>11</sup> partículas virais em um volume final de 200 µL de TBS-T 0,1%, previamente incubados à temperatura ambiente por 20 minutos.

A mistura resina – anticorpo – fago foi misturada por 3 vezes durante os 15 minutos de incubação a temperatura ambiente e em seguida lavada por mais 10 vezes com 1 mL de TBS-T 0,1%, preparando-a para a eluição dos fagos ligantes feita com 1 mL de tampão de eluição (Glicina-HCl 0,2 M, pH 2,2; 1mg/mL de BSA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Esta mistura foi centrifugada por 1 minuto a 4.000 rpm, o eluato foi transferido para um novo tubo e imediatamente neutralizado com 150 µL de Tris-HCl (1 M, pH 9,1).

Uma pequena amostra deste eluato (10 µL) foi titulada e o restante foi utilizado para reamplificação, realizada em 20 mL de cultura contendo tetraciclina de *E. coli* (ER 2738) em fase inicial de crescimento (OD<sub>600</sub> ≤ 0,3) e incubada por 4,5 horas em agitador com temperatura controlada a 37°C, antes do procedimento de precipitação dos fagos e posterior titulação.

A cultura foi transferida para um tubo de centrifuga e centrifugada (10 min, 4.000 rpm). As células residuais foram descartadas e o sobrenadante transferido para um tubo limpo e re-centrifugado. Foi pipetado 80% do sobrenadante superior para um tubo limpo, onde foi adicionado 20% do volume de PEG-NaCl (20% peso/volume de polietileno glicol-8000; NaCl 2,5 M) e a mistura permaneceu em

repouso durante toda a noite a 4°C. No dia seguinte, a precipitação foi centrifugada (15 min, 10.000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o tubo foi novamente centrifugado, nas mesmas condições anteriores por mais 5 minutos para que o sobrenadante residual pudesse ser removido. O “pellet” de fagos foi ressuspensionado em 1 mL de TBS 1X, que foi transferido para um microtubo e centrifugado (5 min, 10.000 rpm, 5 min) para retirada das células residuais. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, para a adição de PEG-NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada por 1 hora em gelo e então centrifugada (15 min, 14.000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o tubo re-centrifugado por mais 5 minutos para retirada do sobrenadante residual. O “pellet” foi ressuspensionado em 200 µL de TBS 1X, estando prontos para a titulação.

Os fagos reamplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo ( $2,0 \times 10^{11}$  ufc) e assim subsequente por um total de quatro ciclos, sendo que a partir do segundo ciclo a estrigência do tampão de lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5%, utilizando-se então, 0,5% de Tween-20 em todas as lavagens.

Paralelamente, após o terceiro ciclo do procedimento acima descrito, realizou-se uma seleção negativa, utilizando para isto, anticorpos purificados de paciente negativo para leishmaniose, sendo os fagos não ligantes recuperados após a incubação resina – anticorpo – fago, com o intuito de desprezar fagos selecionados específicos para moléculas comuns entre pacientes sadios ou não, sendo assim, não específicos para a doença em questão.

Para todas as titulações foram utilizados 10 µL dos fagos, diluídos em 90 µL de meio de cultura LB. As diluições ( $10^1$  à  $10^4$ , para eluato não amplificado e de  $10^8$  à  $10^{11}$ , para fagos amplificados e purificados) foram incubadas com 200 µL de *E. coli* (ER2738) em fase de crescimento inicial por 5 minutos e plaqueadas em meio LB contendo IPTG (0,5mM) e X-gal (40 µg/mL), juntamente com 3 mL de Agarose Top (10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 1 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  / litro).

Após incubação em estufa por toda a noite a 37°C, as colônias azuis (resultantes do sistema de  $\alpha$ -complementação do vetor) foram contadas para a

obtenção dos títulos de entrada e saída para todos os ciclos de seleção (número de colônias azuis x fator de diluição).

### **Caracterização dos clones**

As colônias que apresentaram coloração azul, demonstrando a quebra do substrato X-Gal e a expressão do gene da  $\beta$ -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, foram reamplificadas separadamente em placas "Deep-Well" para o armazenamento dos clones selecionados. Para isso, as colônias isoladas foram adicionadas a 1 mL de meio de cultura contendo *E. coli* (ER2738) em fase de crescimento inicial, após a incubação por 5 horas a 37°C sob agitação vigorosa, a placa foi centrifugada à 14.000 rpm por 10 minutos, para a retirada do sobrenadante da cultura, que foi armazenado juntamente com o mesmo volume de glicerol 50%. Noventa e dois clones, juntamente com 4 controles negativos (3 fagos selvagem e cultura de bactérias não infectadas) foram devidamente identificados, foram utilizados para os processos de caracterização descritos abaixo.

### **ELISA ("Enzimed Linked Immusorbent Assay") Pré - Seqüenciamento**

Testes de ELISA foram realizados como rastreamento prévio quanto à reatividade dos peptídeos sintéticos (expressos nos fagos selecionados), com os anticorpos presentes no soro de pacientes acometidos pela Leishmaniose. Para isto foi realizado um sistema de captura, utilizando como antígeno as partículas virais dispersas em solução no meio de cultura de todos os clones acima mencionados. Os anticorpos foram provenientes de soro total ou purificado (IgGs).

Placas de alta afinidade (NUNC), foram sensibilizadas com 1 $\mu$ g/well de anticorpo monoclonal anti-proteína pVIII de fago (Amersham Biosciences), diluídos em 100  $\mu$ L de tampão carbonato e incubadas durante toda a noite sob agitação à temperatura de 4°C.

Após 3 lavagens com PBS-Tween 20 0,05%, foram adicionados 200  $\mu$ L tampão de bloqueio PBS-Tween 20 0,05% - BSA 3%, sendo a placa incubada por

mais 1 hora a 37°C. A placa foi então lavada por mais 3 vezes e 100 µL de meio de cultura contendo fagos foram adicionados. Após a incubação por 1 hora a 37°C, realizou-se mais 6 lavagens para a adição do soro, diluído 1:50 (soro: PBS-T-BSA 3%) no primeiro ensaio, ou, anticorpo purificado 0,5 µg/poço (diluído em PBS-T-BSA 3%) no segundo ensaio, sendo a placa incubada por 1 hora a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada por 6 vezes para adição do anticorpo conjugado, anti-IgG humana (IgG, Fc HRP – USBiological), diluídos 1:5000 em PBS-T BSA 3%, com incubação à 37°C por 1 hora. Após 6 lavagens a reação foi revelada utilizando-se OPD (O - Phenylenediamine dihydrochloride – Sigma Chemical), num volume final de 100 µL de tampão apropriado contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e interrompida pela adição de 10 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4M. A leitura da absorbância foi feita em leitor Multiscan Plus Versão 2.03, com filtro de 492 nm.

O Índice ELISA (IE) foi calculado utilizando-se a média das três amostras negativas contendo fago Selvagem (fago sem peptídeo sintético). (IE = Densidade óptica de cada amostra / cut off do helper = média + 3 x Desvio Padrão). Foram então consideradas positivas as amostras com IE > 1.

### **Obtenção e seqüenciamento do DNA**

Para a obtenção de DNA dos fagos, 30µL dos fagos previamente armazenados foram adicionados a 1 mL de cultura de ER2738 em fase de crescimento inicial em tubos FALCON de 15 mL, onde permaneceram sob agitação vigorosa por 6 horas a 37°C. Após o crescimento as culturas foram transferidas para microtubos para a sedimentação das bactérias (10 minutos, 14000 rpm), 500 µL do sobrenadante foram utilizados para precipitação com PEG/NaCl (20% de polietileno glicol-8000, NaCl 2,5 M), seguido da adição de Iodeto de Sódio (Tris-HCl 10 mM pH:8,0, EDTA 1mM e NaI 4M), precipitação de ácido nucléico com Etanol Absoluto e lavagem com etanol 70%, conforme descrito por Barbas *et al.*, 2001.

A qualidade e quantidade do DNA presente nas amostras foi avaliada por amostragem em gel de agarose 0,8% e leitura espectrofotométrica à 260 nm, respectivamente.

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se o kit "Big Dye Terminator" (Pharmacia), 1,5µL (~ 500 ng) do DNA obtido e 10 pMoles de "primer" universal (96 M13 - 5' HOCCCTCATTAGTTAGCGCGTAACG 3' – Amersham Biosciences), que amplifica a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados nos fagos M13 recombinantes.

A reação de amplificação aconteceu em termociclador (Eppendorf). A precipitação do material amplificado foi feita acrescentando-se Acetato de Amônio 4M e Etanol absoluto às amostras, seguido de centrifugação por 45 minutos a 14.000 rpm em centrifuga refrigerada e lavagem com etanol 70% com centrifugação por 10 minutos nas condições anteriores. A diluição foi feita com tampão de corrida apropriado ("Loading buffer").

O seqüenciamento foi realizado utilizando-se o seqüenciador automático "MegaBace 1000" (Amersham Biosciences).

### **Análise de dados**

As seqüências de DNA geradas pelo seqüenciamento foram analisadas utilizando-se programas de bioinformática disponíveis on-line.

Para a tradução das seqüências de aminoácidos utilizou-se o programa DNA2PRO12, específico para seqüências de bibliotecas da "New England Biolabs" (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>).

Para análise dos motivos protéicos e alinhamento dos peptídeos foram utilizados os programas T-COFFEE (<http://ch.embnet.org/software/Tcoffee.html>) e Clustal W versão 18.1 (<http://services.bioasp.nl/blast/cgi-bin/clustal.cg>).

Os motivos protéicos consenso gerados foram analisados quanto a homologias com proteínas de *Leishmania chagasi* depositadas no "GENEBANK" pelo programa BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Os parâmetros de antigenicidade foram determinados pelo software DNASTar 4.0 (subprograma Protean™). O alinhamento dos peptídeos na estrutura secundária das proteínas foi feito pelo programa Cn3D versão 4.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>).

## **ELISA (“Enzimed Linked Immusorbent Assay”) Pós - Seqüenciamento**

Após a obtenção das seqüências de DNA dos clones selecionados por seqüenciamento e suas análises por bioinformática, foi realizado o teste de ELISA com os clones considerados mais relevantes, devido à presença repetida de domínios consenso na população de fagos.

O procedimento seguiu em linhas gerais, os mesmos parâmetros mencionados para os ensaios anteriores, portanto, os clones foram reamplificados e precipitados com PEG/NaCl, para limpeza do meio de cultura. Cada um destes clones foi utilizado em duplicata, assim como o controle negativo (Fago Selvagem).

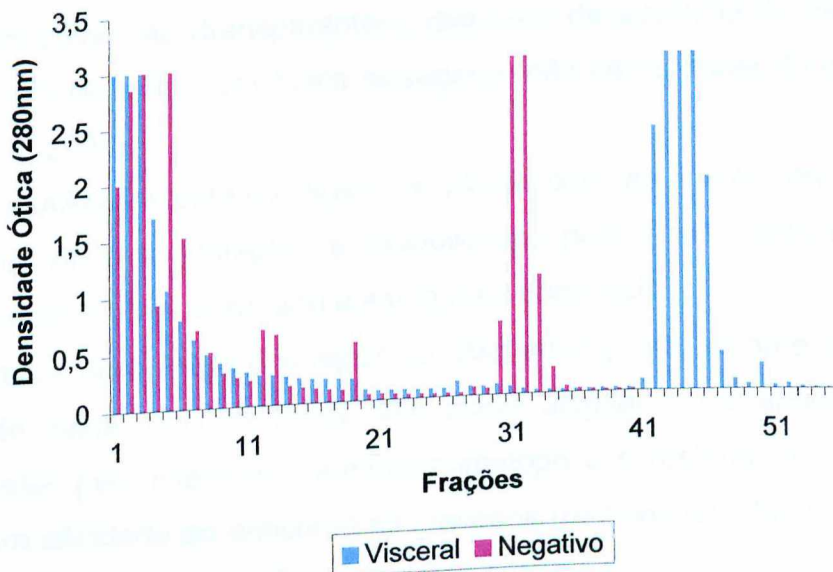
Os anticorpos utilizados foram provenientes dos soros purificados, positivos e negativos para Leishmaniose Visceral na concentração de 0,5 µg/poço.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Purificação dos Anticorpos

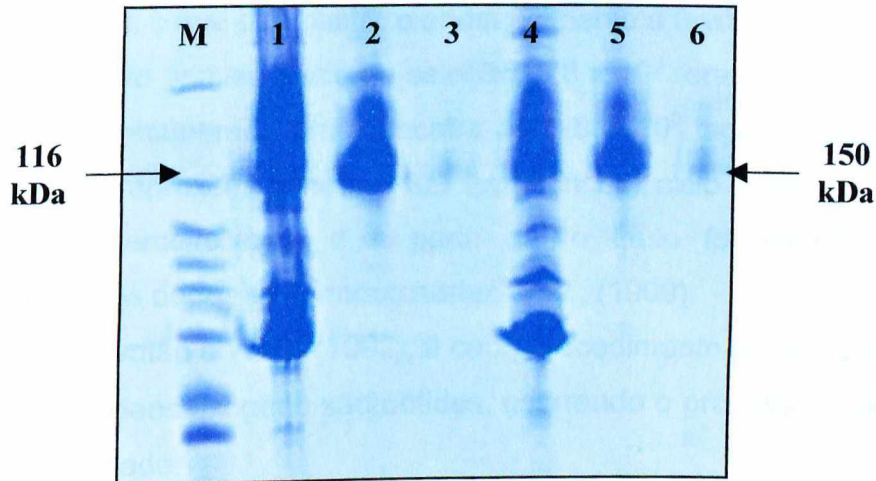
A purificação de anticorpos (IgGs) por imunocromatografia mostrou-se eficiente, exibindo o perfil demonstrado na Figura 4, que demonstra todo o processo de purificação dos anticorpos. No ponto zero do gráfico observamos o início da limpeza da coluna após a incubação do soro, mostrado pelo decréscimo da DO nas frações coletadas. O lado direito do gráfico mostra os picos da leitura no momento da eluição das imunoglobulinas pela queda do pH, dada pelo tampão Glicina. O rendimento protéico das frações de maior leitura ótica após concentração e diálise foi de  $11,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $6,87 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para as amostras de soros de pacientes com sorologia positiva e negativa para Leishmaniose, respectivamente.

Estas frações foram analisadas quanto ao perfil eletroforético demonstrando estar parcialmente livres de impurezas que pudessem prejudicar o procedimento de seleção de peptídeos recombinantes, como mostra a Figura 5. A utilização de anticorpos impuros, contendo outros derivados do soro como a albumina, poderiam direcionar a seleção dos peptídeos para outros alvos.



**Figura 4:** Perfil imunocromatográfico da purificação de IgGs totais de soros de pacientes com Leishmaniose Visceral e Negativo. Frações de 1-30: lavagem, 30-50: Eluição.





**Figura 5:** Perfil eletroforético (SDS PAGE 16%) da purificação de IgGs totais (150KDa) de soros de pacientes com Leishmaniose Visceral (Canaleta 1 - soro total, 2 e 3 - soro purificado) e Negativo (Canaleta 4 – soro total 5 e 6 – soro purificado). M representa o padrão de peso molecular.

### Seleção dos Peptídeos Recombinantes

As titulações realizadas foram eficientes em todos os ciclos de seleção de peptídeos, as colônias apresentaram coloração azulada, demonstrando a quebra do substrato X-Gal, e a expressão do gene da  $\beta$  - galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, como mostrado na Figura 6. Não foi observado nas titulações, colônias sem coloração (transparentes), resultado da ausência de bactérias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (não carreadores do gene *Lac Z*) (Barbas *et al.*, 2001).

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 ciclo.

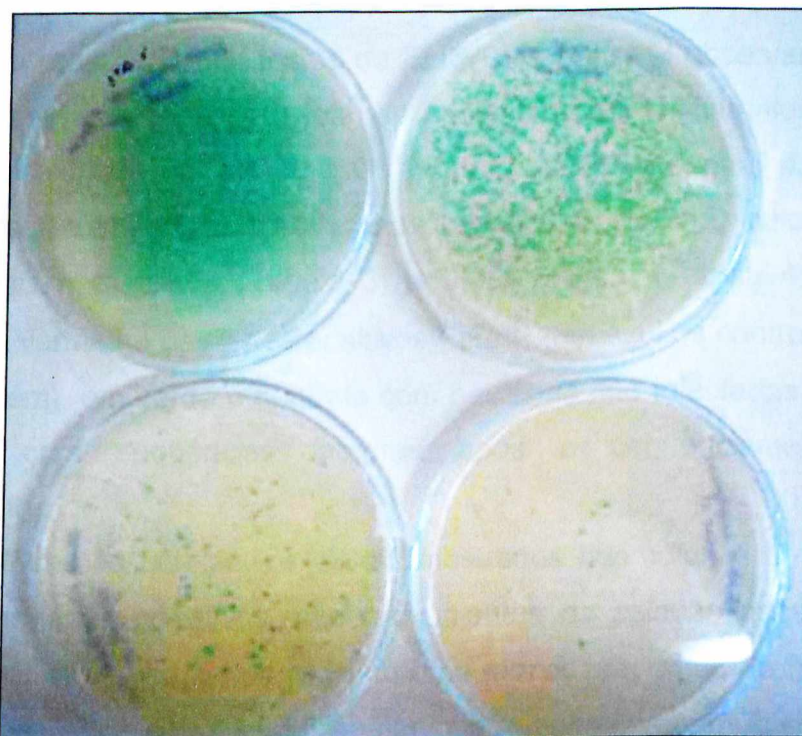
Os títulos de entrada dos fagos no “Biopanning” são sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos ficam ligados a estes pela interação paratopo/mimetopo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade ao anticorpo são lavados (removidos). Nas amplificações ocorre o inverso, indicando a eficiência deste processo.

Os títulos de entrada e saída obtidos neste experimento são mostrados na Tabela 2, onde se pode notar o enriquecimento dos clones mais reativos durante

os ciclos de seleção, o que demonstra o enriquecimento a favor do alvo. Dos  $1,5 \times 10^{11}$  fagos usados no primeiro ciclo de seleção,  $5,8 \times 10^3$  foram recuperados. No segundo ciclo, foi recuperada uma amostra de  $3,8 \times 10^5$  fagos, mostrando um enriquecimento de aproximadamente 100 vezes neste ciclo e de 10 vezes do segundo para o terceiro ciclo e a partir daí o título foi estabilizado, em concordância com os dados de Manoutcharian *et al.*, (1999).

Segundo Lowman e Wells (1993), a cada procedimento de seleção, formas mais afins do peptídeo exógeno são obtidas, ocorrendo o processo chamado de maturação da afinidade.

A eficiência do processo de amplificação pode ser observada pela manutenção dos títulos dos eluatos pós-amplificação, que se mantiveram em torno de  $10^{11}$  durante todas as passagens.



**Figura 6:** Exemplo de titulação. As colônias azuis representam a infecção das bactérias *E. coli* (ER2738) com fagos M13 carregando o gene da  $\beta$ -Galactosidase.

**Tabela 2:** Seleção de peptídeos ligantes a anticorpos policlonais de pacientes com Leishmaniose Visceral. Títulos obtidos (ufc) nos quatro ciclos de seleção.

<b>Seleção para leishmaniose visceral</b>		
<b>Ciclo / Estringência</b>	<b>Número de partículas de fagos (90 µL)</b>	
	<b>Entrada</b>	<b>Saída</b>
Primeiro / 0,01%	$1,5 \times 10^{11}$	$5,8 \times 10^3$
Segundo / 0,05%	$9,8 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^5$
Terceiro / 0,05%	$6,6 \times 10^{11}$	$3,3 \times 10^6$
Quarto / 0,05%	$7,1 \times 10^{11}$	$4,6 \times 10^6$

### **ELISA Pré – Seqüenciamento**

Com a realização dos testes de ELISA, foi possível observar que 64,13% (primeiro ensaio utilizando soro total de pacientes com leishmaniose) e 55,43% (segundo ensaio que se utilizou IgGs purificados dos mesmos pacientes) dos clones apresentaram reatividade acima do Índice ELISA (IE) calculado, sendo este 0,169 para o ensaio (Tabela 3) e 0,087 para o (Tabela 4). As tabelas mostram em vermelho os clones positivos ( $IE \geq 1$ ), em azul os controles negativos (fago selvagem), em verde o controle com bactérias não infectadas e em negrito os clones com seqüências íntegras após o seqüenciamento descrito posteriormente.

Em ambas as tabelas, os clones mostrados nas colunas 9, 10, 11 e 12, exceto os controles negativos, são provenientes da seleção negativa descrita anteriormente; estes resultados revelam uma menor proporção de fagos reativos aos anticorpos de pacientes com leishmaniose quando comparado com a seleção positiva, fato este que necessita ser melhor avaliado pois contradiz o resultado esperado, onde os clones provenientes da seleção negativa seriam reativos, devido à exclusão dos fagos não reativos pela reação destes com anticorpos de pacientes sadios.

**Tabela 3:** ELISA de captura para teste de imunorreatividade dos clones selecionados\* contra soro total de pacientes positivos para Leishmaniose Visceral (1:50)\*\*.

	Seleção Positiva para L. Visceral								Seleção Negativa			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,122	0,296	0,357	<b>0,365</b>	0,117	0,303	0,231	<b>0,184</b>	0,101	0,067	-0,065	<b>0,213</b>
B	<b>0,394</b>	0,329	0,166	0,271	0,307	0,206	0,22	0,248	<b>0,278</b>	0,057	0,187	0,012
C	0,089	<b>0,237</b>	0,332	0,076	0,294	0,315	0,31	0,302	0,108	<b>0,05</b>	<b>0,146</b>	<b>0,003</b>
D	0,341	<b>0,298</b>	<b>0,334</b>	0,283	0,294	<b>0,388</b>	0,154	<b>0,224</b>	<b>0,202</b>	0,222	0,277	0,279
E	0,141	0,119	0,261	<b>0,251</b>	0,349	<b>0,366</b>	<b>0,378</b>	0,303	0,1	0,061	0,107	<b>0,307</b>
F	<b>0,35</b>	0,294	<b>0,349</b>	0,291	0,334	0,124	<b>0,349</b>	<b>0,308</b>	0,097	0,087	0,068	<b>0,049</b>
G	<b>0,342</b>	0,312	<b>0,33</b>	0,268	<b>0,324</b>	0,329	<b>0,306</b>	0,338	0,102	0,19	0,04	<b>0,098</b>
H	0,341	<b>0,327</b>	0,147	<b>0,368</b>	<b>0,289</b>	<b>0,322</b>	<b>0,351</b>	0,129	0,062	0,071	<b>0,02</b>	<b>0,000</b>

\* Os clones foram selecionados a partir do quarto ciclo de seleção contra soro infectado por LV (seleção positiva) e soro normal (seleção negativa).

\*\* Os clones identificados em números vermelhos apresentam  $IE \geq 1$ ; os clones em cor azul representam os controles negativos (fago selvagem); a cor verde representa a cultura de bactérias sem fagos e os números em negrito representam os clones que foram seqüenciados.

**Tabela 4:** ELISA de captura para teste de imunorreatividade dos clones selecionados\* contra anticorpos purificados de pacientes positivos para Leishmaniose Visceral (0,5  $\mu\text{g}/\text{poço}$ )\*\*.

	Seleção Positiva para L. Visceral								Seleção Negativa			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,025	0,101	0,079	<b>0,132</b>	0,017	0,096	0,077	<b>0,052</b>	0,002	0,015	-0,018	<b>0,052</b>
B	<b>0,156</b>	0,032	0,063	0,105	0,155	0,064	0,015	0,143	<b>0,231</b>	-0,004	0,059	0,025
C	0,073	<b>0,097</b>	0,116	0,034	0,104	0,098	0,090	0,102	0,015	<b>0,026</b>	<b>0,079</b>	<b>0,026</b>
D	0,241	<b>0,145</b>	<b>0,198</b>	0,140	0,103	<b>0,041</b>	0,020	<b>0,150</b>	<b>0,097</b>	0,149	0,135	0,093
E	0,163	0,069	0,167	<b>0,131</b>	0,116	<b>0,156</b>	<b>0,123</b>	0,088	0,036	0,076	0,062	<b>0,185</b>
F	<b>0,130</b>	0,111	<b>0,123</b>	0,141	0,083	0,003	<b>0,019</b>	<b>0,091</b>	0,025	0,021	0,004	<b>0,042</b>
G	<b>0,143</b>	0,093	<b>0,104</b>	0,094	<b>0,113</b>	0,083	<b>0,064</b>	0,061	0,014	0,071	-0,013	<b>-0,010</b>
H	0,125	<b>0,106</b>	0,030	<b>0,048</b>	<b>0,068</b>	<b>0,092</b>	<b>0,091</b>	0,002	0,012	-0,002	<b>-0,006</b>	<b>0,000</b>

\* Os clones foram selecionados a partir do quarto ciclo de seleção contra soro infectado por LV (seleção positiva) e soro normal (seleção negativa).

\*\* Os clones identificados em números vermelhos apresentam  $IE \geq 1$ ; os clones em cor azul representam os controles negativos (fago selvagem); a cor verde representa a cultura de bactérias sem fagos e os números em negrito representam os clones que foram seqüenciados.

Em 87% dos casos (80 em 92 clones), notamos consistência entre os resultados obtidos em ambos os ensaios, embora, alguns clones (12) tenham mostrado alta reatividade no primeiro ensaio, e baixa no segundo, ou vice-versa. Este fato pode estar vinculado com vários fatores inerentes à execução do experimento, tais como o crescimento não homogêneo dos fagos ou falhas no processo de manipulação.

### **Seqüências e Análise de Dados**

A quantificação espectrofotométrica por amostragem do DNA obtido, demonstrou uma média de 245 ng/ $\mu$ l de DNA de fita simples para cada um dos clones, quantidade suficiente para a realização da reação de seqüenciamento. Análise eletroforética do mesmo material mostrou a ausência de degradação ou de contaminantes, tais como RNA bacteriano (dados não mostrados).

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), específico para bibliotecas de 12 peptídeos da "New England Biolabs". Este software gerou 28 seqüências de aminoácidos íntegras, sendo 24 distintas entre si. A seqüência ATLRNWIPPSST repetiu-se por duas vezes, a HKLAGLNLRDQL por três vezes e a TSAATMRLKSD também por duas vezes. A Tabela 5 mostra as seqüências de aminoácidos obtidas juntamente com a freqüência de cada uma delas, onde podemos observar a variabilidade dos clones selecionados pelos quatro ciclos.

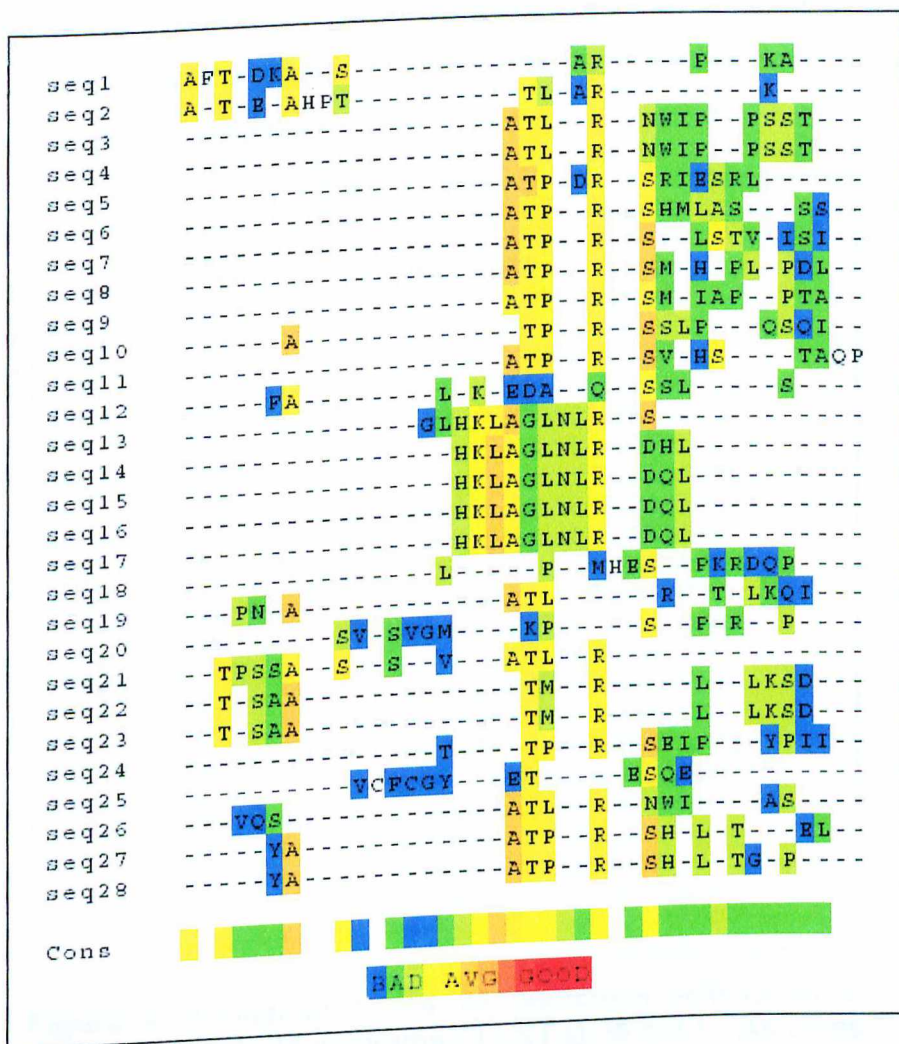
Segundo kay *et al.*, (2001), para manter a diversidade de seqüências entre os fagos ligantes, não se deve fazer mais que quatro ciclos de seleção. Ciclos de seleção adicionais podem comumente selecionar fagos que crescem, infectam ou eluem melhor, mais do que fagos que ligam melhor aos seus alvos.

**Tabela 5:** Seqüência de aminoácidos dos peptídeos expressos nos fagos selecionados a partir do quarto ciclo de seleção e suas respectivas freqüências, na população de 28 peptídeos traduzidos.

ID	PEPTÍDEOS	FREQ
Seq 1 / A8	AFTDKASARPKA	1/28
Seq 2 / C12	ATEAHPTTLARK	1/28
Seq 3 / H7	<b>ATLRNWIPPSST</b>	2/28
Seq 4 / H6	ATPDRSRIESRL	1/28
Seq 5 / F8	ATPRSHMLASSS	1/28
Seq 6 / A4	ATPRSLSTVISI	1/28
Seq 7 / G5	ATPRSMHPLPDL	1/28
Seq 8 / G7	ATPRSMIAPPTA	1/28
Seq 9 / H2	ATPRSSLPQSQI	1/28
Seq 10 / B1	ATPRSVHSTAQP	1/28
Seq 11 / F7	FALKEDAQSSLS	1/28
Seq 12 / D2	GLHKLAGLNLRS	1/28
Seq 13 / F3	HKLAGLNLRDHL	1/28
Seq 14 / E7	<b>HKLAGLNLRDQL</b>	3/28
Seq 15 / H4	LPMHESPQRDQP	1/28
Seq 16 / E4	PNAATLRTLKQI	1/28
Seq 17 / C10	SVSVGMKPSRP	1/28
Seq 18 / D6	TPSSASSVATLR	1/28
Seq 19 / G3	<b>TSAATMRLKSD</b>	2/28
Seq 20 / D3	TTPRSEIPYPII	1/28
Seq 21 / H5	VCFCGYETESQE	1/28
Seq 22 / G1	VQSATLRNWIAS	1/28
Seq 23 / D8	YAATPRSHLTEL	1/28
Seq 24 / C2	YAATPRSHLTGP	1/28

A Figura 7, gerada pelo programa T-Coffee, mostra o alinhamento dos 28 clones selecionados, permitindo notar a presença de seqüências de aminoácidos comuns, sendo consideradas como motivos protéicos repetidos, ou consenso.

Segundo Cortese *et al.*, (1995), a presença de motivos protéicos pode ser relacionada com a seleção a favor do ligante, pela indicação de que estes aminoácidos poderiam ser cruciais para o reconhecimento dos peptídeos pelo paratopo.

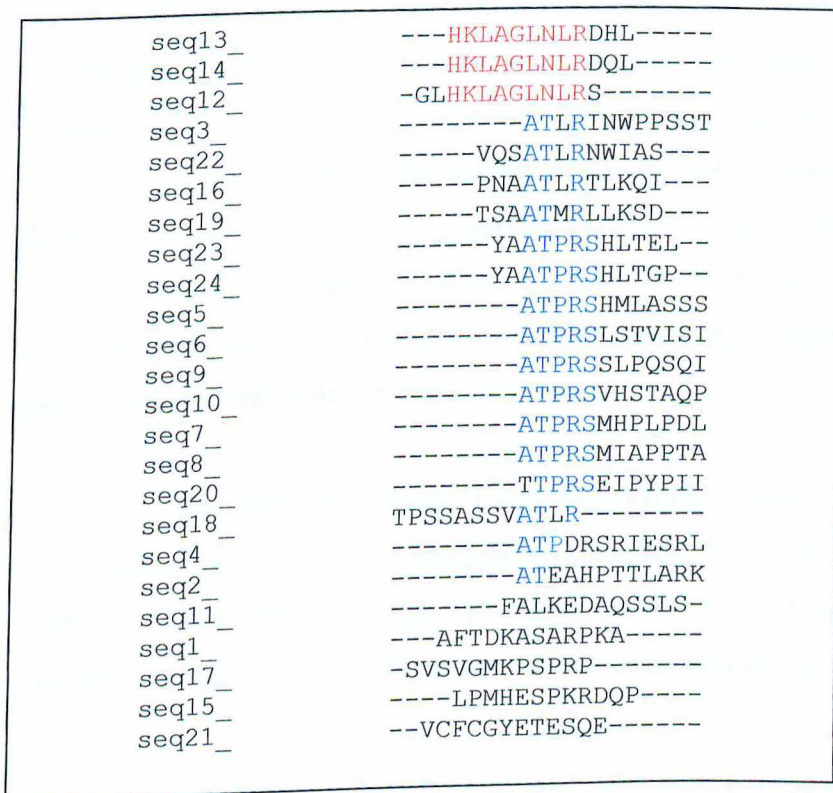


**Figura 7:** Alinhamento dos 28 peptídeos seleccionados pelo programa T-Coffee.

Os peptídeos acima mencionados foram alinhados também pelo programa CLUSTAL W (18.1), utilizando a matriz ID (Identidade), possibilitando a melhor visualização de dois motivos protéicos repetidos entre os clones seleccionados, sendo definidos: HKLAGLNLR (5 clones com homologia total) mostrado em vermelho e ATPRS (8 clones consenso, com homologia total e 8 clones com homologia parcial) em azul na Figura 8, baseada na seqüências de peptídeos enumerada na Tabela 5.

Foi calculado, segundo protocolo do fabricante, a representação destes motivos na biblioteca, o que demonstrou a probabilidade de que a biblioteca contenha tais motivos é de 0,005 e 1 para os motivos HKLAGLNLR e ATPRS,

respectivamente. Devido à baixa probabilidade do primeiro domínio ser encontrado na biblioteca original, a presença de 5 cópias sugere que o clone tenha uma importância particular.



**Figura 8:** Alinhamento dos 24 peptídeos selecionados. Dados obtidos pelo programa CLUSTAL W (18.1). As cores azul e vermelho indicam as seqüências consenso selecionadas.

O índice de antigenicidade (Jameson-Wolf) foi calculado para cada um dos peptídeos pelo programa Protean 4.0, gerando os gráficos que são mostrados na Tabela 6, onde se pode observar índices que variam de 1,7 à -1,7 para os maiores e menores índices de antigenicidade, respectivamente.

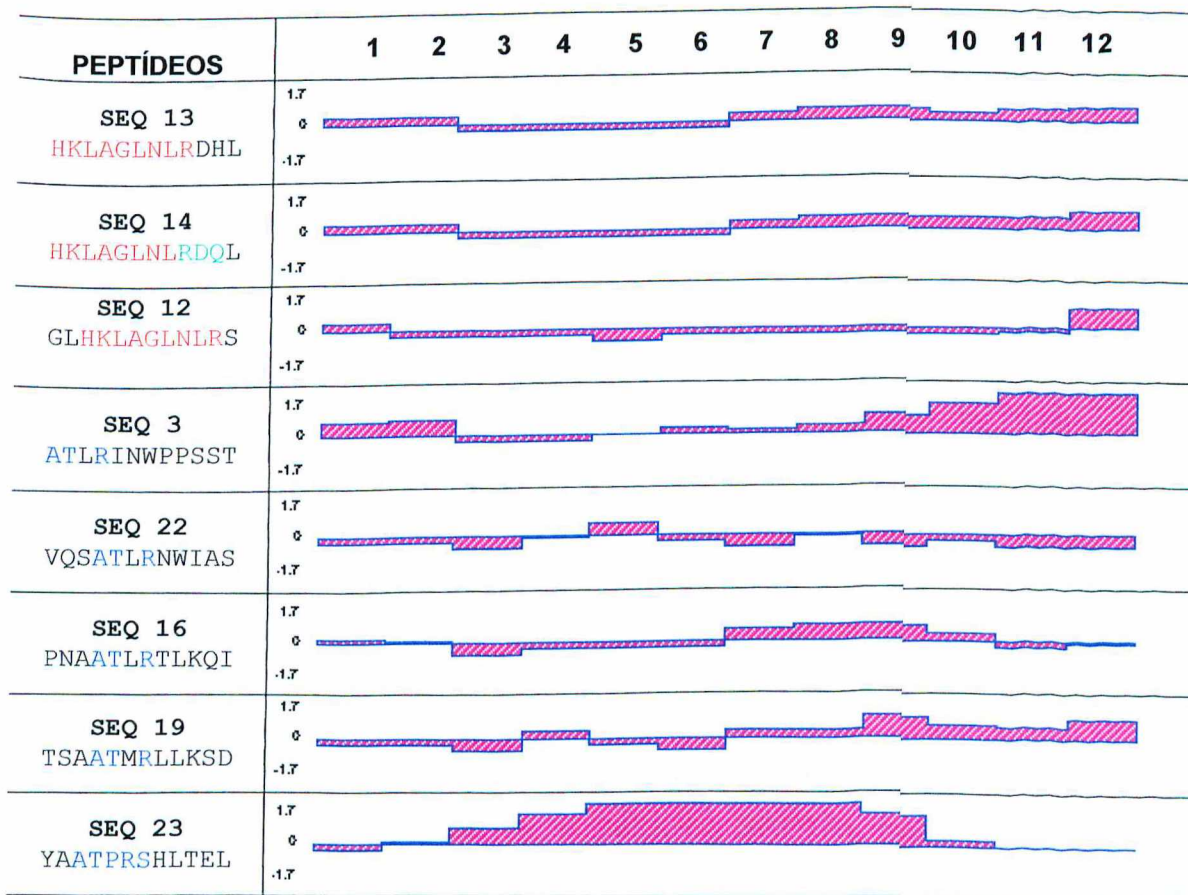
O índice de antigenicidade de Jameson-Wolf prediz determinantes antigênicos potenciais combinando métodos de predição estrutural de proteínas (Jameson e Wolf, 1988). Os resultados são mostrados como picos - determinantes antigênicos potenciais. O algoritmo pode ser usado para prever as características topológicas da proteína, diretamente a partir da seqüência primária de aminoácidos. O programa gera valores para parâmetros de acessibilidade, combina os valores obtidos para regiões flexíveis e prediz a



estrutura secundária, criando um perfil linear do contorno da proteína. A maioria dos sítios antigênicos das proteínas estão localizados nas suas regiões expostas, o programa oferece meios de predizer determinantes antigênicos potenciais.

Notamos que os peptídeos contendo os domínios ATPRS apresentam maiores índices que os demais, incluindo aqueles com domínios HKLAGLNLR, nota-se também, que os clones (seq. 14 e 15) com a seqüência QDR (ou RDQ), destacadas em verde apresentam índices elevados de antigenicidade na região correspondente à estes aminoácidos. Clones individuais também apresentam índices altos, como por exemplo, o clone de seqüência 4, estes devem ser levados em consideração, pois baseados nestes índices, podem apresentar potencial para o desenvolvimento de resposta imune.

**Tabela 6:** Índice de antigenicidade (Jameson-Wolf) para os peptídeos selecionados. Dados gerados pelo programa Protean 4.0. Em destaque os peptídeos com domínios selecionados. Os números de 1 a 12 representam a seqüência de aminoácidos dos peptídeos mencionados à esquerda.





As seqüências consenso identificadas HKLAGLNLNLR e ATPRS, juntamente com seus parâmetros invertidos (RLNLGALKH e SRPTA), foram alinhadas com proteínas depositadas em banco de dados (BLAST), sendo a pesquisa restrita à

proteínas de *Leishmania chagasi*. Estes motivos foram invertidos para o alinhamento, pois as interações protéicas com o peptídeo de 12 resíduos independem do sentido de leitura.

O resultado destes alinhamentos mostrou que estes peptídeos apresentam similaridade com diversas proteínas relacionadas às Leishmanias, previamente depositadas em bancos de dados, algumas delas descritas como antígenos importantes, comumente utilizados para o diagnóstico das Leishmanioses.

Optamos pela análise baseada nos domínios repetidos, pois os clones quando alinhados individualmente originam uma enorme quantidade de dados, que dificultam a análise dos resultados. O resumo dos alinhamentos é mostrado na Tabela 7.

Observando os resultados acima mencionados, observamos a similaridade do domínio HKLAGLNLR (K+ LNLR) com a proteína LcKin; antígeno de 230 kDa de *Leishmania chagasi*, com homologia à superfamília Kinesina de proteínas motoras. LcKin é predominante em amastigotos, está presente em diversas espécies de *Leishmania*, contém um domínio repetitivo extenso, K39, altamente relacionado com *L. chagasi* e *L. donovani*, além de que pacientes de diferentes regiões geográficas com Leishmaniose Visceral apresentam altos títulos de anticorpos anti-K39 (Burns *et al.*, 1993).

As regiões dos clones com o domínio K+ LNLR, não apresentam índices de antigenicidade altos, provavelmente porque este está localizado na região não repetitiva da proteína (497-504), diferentemente das que contém os aminoácidos RDQ, presentes em 4 dos 28 clones seqüenciados (clones de seqüência 14 e 15), que quando invertidos (QDR), apresentam similaridade dentro do domínio repetitivo da k39 (rk39). Além disso, os clones que contêm este domínio apresentam, em sua maioria, altos IEs nos ensaios mostrados anteriormente, o que nos leva a considerar a possibilidade de que este domínio seja uma provável parte de um epítipo linear, como mencionado por Gazarian *et al.*, (2000) visto que epítipos lineares são raros ou não existentes e que anticorpos são capazes de selecionar peptídeos miméticos contendo somente partes lineares de epítipos descontínuos.

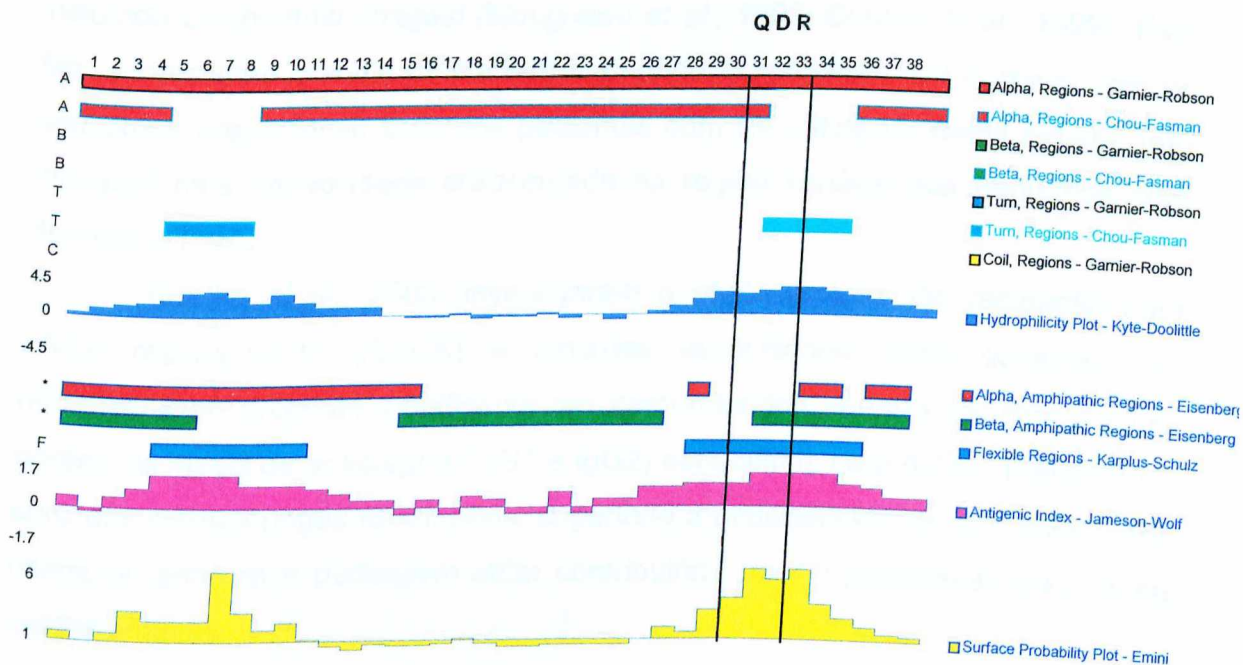
**Tabela 7:** Resumos dos alinhamentos entre os domínios consenso e proteínas de *Leishmania chagasi*. Os números entre parênteses representam os valores de Score e E Value, respectivamente.

Consenso	Proteínas	Similaridade
HKLAGLNLR	gi 422266 pir A47334 K39 - LcKin – Antígeno tipo kinesina [ <i>Leishmania chagasi</i> ] (fragmento). (Burns <i>et al.</i> , 1993).	K+ LNLR 497-504 (16.8/2.3)
	gi 2232357 gb AAB62271.1  GP46 - Proteína de superfície de membrana [ <i>Leishmania donovani chagasi</i> ]. (Beetham <i>et al.</i> , 1997)	LA L+LR 184-190 (15.5/5.6)
	gi 38146297 gb AAR11511.1  GP46 - Antígeno de superfície de promastigoto [ <i>Leishmania donovani chagasi</i> ]. (Beetham <i>et al.</i> , 1997)	LA LNL 304-309 (15.5/5.6)
	gi 44889435 gb AAS48353.1  Nucleosídeo hidrolase não-específico [ <i>Leishmania donovani chagasi</i> ]. (Santana <i>et al.</i> , 2002).	GLNL 190-193 (15.1/7.5)
	gi 5852143 emb CAB55505.1  Molécula tipo Kinesina [ <i>Leishmania major</i> ]. (Ivens <i>et al.</i> , 1998).	LAGL 1279-1282 (14.2/14)
RLNLGALKH	gi 308890 gb AAA53687.1  Proteína gp63 – Glicoproteína 63 – Leishmanolisina [ <i>Leishmania chagasi</i> ]. (Roberts <i>et al.</i> , 1993).	RL+LGA 416-420 (17.6/1.3)
	gi 22121984 gb AAM88576.1  dhfr-ts [ <i>Leishmania donovani chagasi</i> ]	GALK 470-473 (14.2/14)
	gi 5852143 emb CAB55505.1  Molécula tipo kinesina [ <i>Leishmania major</i> ]. (Ivens <i>et al.</i> , 1998).	NL AL 733-737 (14.2/14)
	gi 38146297 gb AAR11511.1  GP46 - Antígeno de superfície de membrana [ <i>Leishmania donovani chagasi</i> ]. (Lincoln <i>et al.</i> , 2004).	RL L AL 399-405 (13.4/24)
	gi 6453822 gb AAC05295.2  DNA topoisomerase II [ <i>Leishmania chagasi</i> ]	NL LK 476-481 (9.5/345)
ATPRS	gi 1276475 gb AAA97576.1  LACK – Antígeno LACK. (Mougneau <i>et al.</i> , 1995).	AT RS 253-257 (12.5/24)
SRTPA	Nenhuma similaridade	-

O domínio QDR, representado pelos aminoácidos de números 31 à 33, na análise dos parâmetros bioquímicos (antigenicidade, hidrofiliidade e probabilidade de superfície exposta ) da estrutura da rk39, é mostrado entre barras na Figura 9, gerada pelo programa Protean 4.0, que apresenta uma localização especialmente em região de alta hidrofiliidade (azul), com elevado índice antigênico (rosa) em provável região de superfície (amarelo).

O fato da alta antigenicidade da rK39, observada na Figura 9, fez desta proteína um antígeno de grande valor no diagnóstico imunológico da LV. Muitos autores têm testado a viabilidade deste antígeno em diversos tipos de diagnósticos para esta doença, como por exemplo: "dipstick test" (Boelaert *et al.*, 2004; Chappuis *et al.*, 2003; Veeken *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2000; Schallig *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2001; Berm *et al.*, 2000; Zijlstra *et al.*, 2001; Sarker *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2003) e ELISA (Salotra *et al.*, 2003; Maalej *et al.*, 2003; Sreenivas *et al.*, 2002; Braz *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 1995; Qu *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2001; Ozensoy *et al.*, 1998; Zijlstra *et al.*, 1998; Medrano *et al.*, 1998; Badaró R *et al.*, 1996).

A determinação de um motivo protéico consistente pela tecnologia de phage display pode levar à sua utilização em métodos diagnósticos, ou à produção de vacinas.



**Figura 9:** Predições para rK39 gerada pelo programa Protean (Lasergene Softwares). Os números de 1-39 representam os aminoácidos constituintes do domínio repetitivo da k39. As barras indicam a região do domínio QDR.

O mesmo domínio HKLAGLNL (nas posições LA L+LR, 184-190 e LA LNL, 304-309), mostra similaridade com a proteína GP46, que é uma abundante glicoproteína de 46 kDa na superfície de formas promastigotas da maioria das espécies de *Leishmania*, com níveis de expressão variáveis durante o desenvolvimento de promastigotos (Beetham *et al.*, 1997) e também com a proteína Nucleosídeo hidrolase (NH) não-específica (GLNL 190-193). Santana *et al.*, 2002, descreveram o isolamento do gene da NH e demonstraram a molécula recombinante é útil para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral clínica em cães já que reage preferencialmente com IgG1 que é aumentado em cães susceptíveis e na doença avançada.

O domínio HKLAGLNL quando invertido (RLNLGALKH) apresentou similaridade principalmente com a proteína gp63 ou leishmanolisina (RL+LG 416-420) (Roberts *et al.*, 1993), que é o maior componente da superfície de promastigotos ( $\sim 5 \times 10^5$  moléculas/célula), onde é enzimaticamente ativa contra substratos polipeptídicos (Etges *et al.*, 1986).

O consenso ATPRS, o mais comum na população de peptídeos, apresentou similaridade única com a proteína LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase), antígeno de 16 kDa altamente conservado entre as espécies de *Leishmania*, expressa em ambos os estágios do parasita, incluindo *Leishmania chagasi* (Mougneau *et al.*, 1995; Courret *et al.*, 1999). Este fato sugere uma grande afinidade dos peptídeos contendo este domínio com os anticorpos presente no soro dos pacientes com LV utilizados neste estudo, fato marcado pela variabilidade apresentada na região variável dos peptídeos com domínio ATPRS.

Coelho *et al.*, 2003, investigaram o efeito protetor da vacinação com LACK recombinante (rLACK) e algumas associações, seus achados não demonstraram proteção significativa em camundongos imunizados com rLACK, porém, os níveis de anticorpos (IgG1 e IgG2) específicos para rLACK presente no soro dos camundongos foram altos, sugerindo a possibilidade de que estes altos títulos de anticorpos pudessem estar contribuindo para a progressão da doença nestes animais.

O domínio em questão encontra-se localizado entre os aminoácidos 253-257 da proteína LACK, não incluso na região descrita como um epítipo

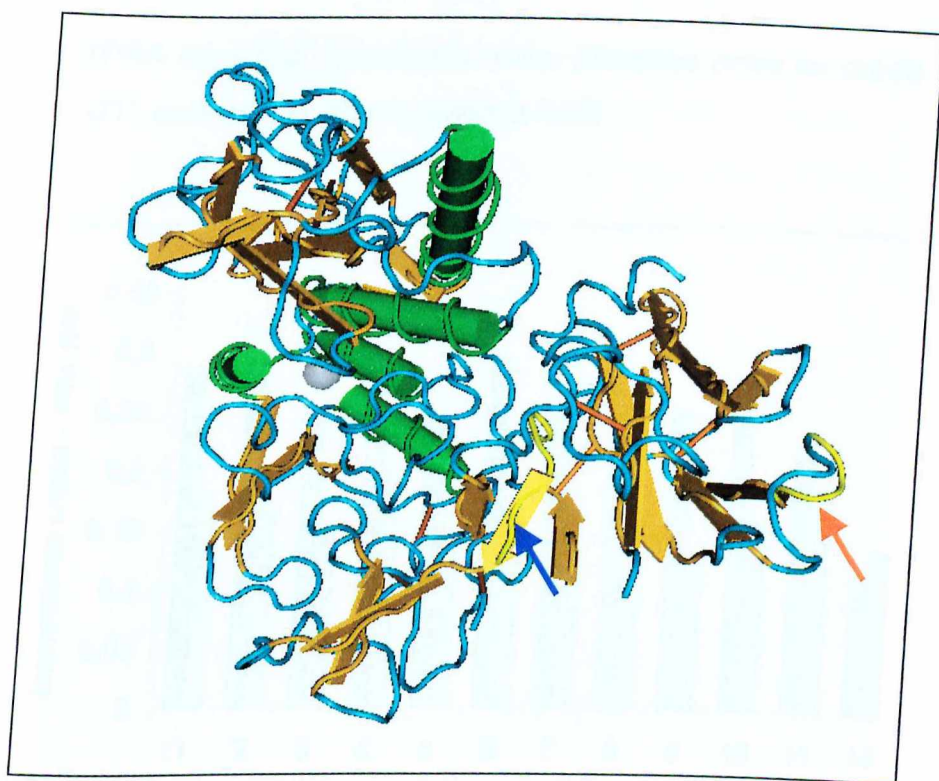
imunodominante desta proteína, que é altamente conservada (Melby, 2001; Mougneau, 1995) o que pode estar indicando a presença de um epítipo isolado ou outra região de importância imunológica.

O antígeno LACK tem sido usado em vacinas de DNA carregada por vetores plasmidiais (Méndez, 2002; Ramiro 2003), mostrando resultados contraditórios na efetividade deste antígeno e no tipo de resposta imune mediada por ele. Por este motivo, faz-se necessários estudos mais elaborados para avaliar a possibilidade dos clones contendo o domínio desta proteína serem utilizados como imunógenos ou na detecção de anticorpos no diagnóstico da leishmaniose visceral, pois o fato de estar tão representado na população de peptídeos selecionada neste trabalho nos alerta sobre a sua importância na progressão da doença.

Além das similaridades encontradas para os consensos, encontramos também seqüências isoladas que alinham com proteínas importantes, como LTEL, semelhante à k39 (593-597) e à DNA Topoisomerase II de *Leishmania chagasi* (1098-1101); LSTV relacionado com gp63 (Glicoproteína 63) em várias posições da molécula (275-278, 269-272, 121-124, 270-273, 268-271, 539-542, 540-543); SLST apresenta similaridade com a proteína de 43.7 KDa de *Lutzomyia longipalpis* (54-57) e com antígeno de superfície de promastigoto – GP46 (327-330). A seqüência TLKQ também apresenta semelhança com GP46 (255-258) e RTLK com o antígeno LACK (188-191), dentre outros não mencionados.

Schlagenhauf *et al.*, (1998) apresentaram a estrutura cristalográfica da Leishmaniolisina como uma molécula compacta, contendo predominantemente, estruturas secundárias  $\beta$ -sheet. Com a utilização do programa Cn3D 4.1, obtivemos alinhamento da molécula gp63 (leishmaniolisina), com os peptídeos a elas relacionados, RL+LG e LSTV, ambos localizados no domínio C-terminal da molécula, em estrutura  $\beta$ -pregueada e alças (“coil”), respectivamente, como mostra a Figura 10.

Através do programa Cn3D versão 4.1 pudemos observar que os peptídeos encontrado que possuem homologia com essa proteína encontram-se localizados na região externa da molécula, região esta estratégica para a localização de epítipos.



**Figura 10:** Estrutura terciária da proteína gp63 (leishmanolisina), gerada pelo programa Cn3D. Em amarelo, a localização dos peptídeos, RL+LG indicado pela seta azul e LSTV pela seta vermelha.

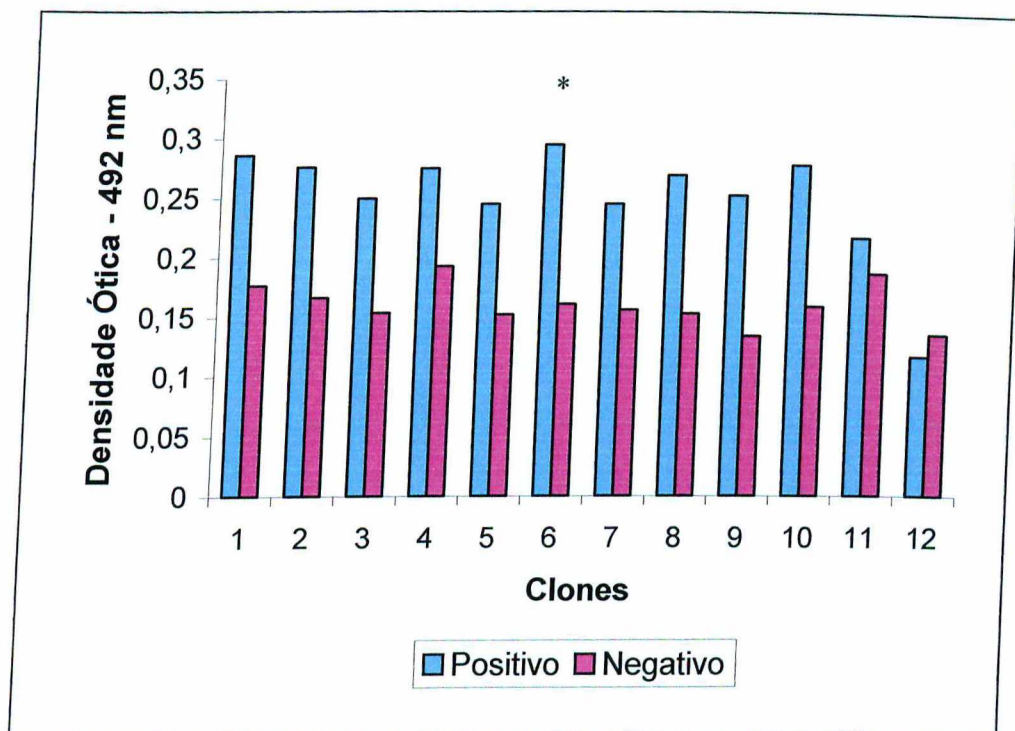
### ELISA Pós – Seqüenciamento

Foram testados 11 clones contendo os domínios mencionados anteriormente. A média de cada um deles tanto para soro positivo para Leishmaniose Visceral como para soro Negativo são mostradas na Figura 11. No gráfico, as colunas 1 e 2 mostram os clones contendo o domínio KLAGLNLR sendo eles: E7 e F3, respectivamente. As colunas de números 3 à 9 indicam os clones com domínio ATPRS que são os seguintes: A4, D8, H2, F8, E4, D9, G5 e A4. As colunas 10 e 11 mostram os clones com domínio RDQ (QDR), C11 e H4, respectivamente. A coluna 12 representa o controle negativo utilizando Fago Selvagem.

Podemos notar diferença significativa entre os soros positivos e negativos para todos os clones em questão, com média de Densidade Ótica de 0,25 para soro positivo e de 0,16 e Desvio Padrão de 0,047 e 0,018 para anticorpos



positivos e negativos e  $p=0,0001$ , sendo que o clone F8 (coluna 6), portador do domínio ATPRS foi o que apresentou maior diferença entre as médias, seguido pelo clone C11 (coluna 11), com o domínio QDR.



**Figura 11:** ELISA de captura para os clones contendo os principais epítomos identificados. Colunas 1-2: KLAGLNLR; colunas 3-9: ATPRS; colunas 10-11: QDR; coluna 12: Controle Negativo – Fago selvagem. \* Clone com a maior diferença entre as médias.

O fato de estes fagos reagirem também com os pacientes negativos, mesmo que em menor proporção que os positivos, é minimizado pela reação observada para o controle negativo, que demonstra a reação dos fagos com os anticorpos mesmo que eles não exibam peptídeos recombinantes e portanto reagem, com outras moléculas da superfície viral. Estes dados demonstram que os clones testados possuem realmente, reatividade com anticorpos presentes nos soros de pacientes positivos para Leishmaniose Visceral, caso contrário teriam reatividade semelhante para ambos os soros, levando em consideração tanto a reatividade dos fagos, quanto quaisquer artefato dos ensaios de ELISA.

Estes dados, juntamente com os demais apresentados neste trabalho, demonstraram a viabilidade da técnica de “Phage Display” na seleção de

peptídeos específicos aos anticorpos de pacientes acometidos pela leishmaniose. Dispondo da diversidade de utilização destes peptídeos, tanto em exposição na superfície viral quanto sintetizado individualmente, serão realizados em futuro próximo, todos os testes necessários à aplicabilidade destes no diagnóstico da leishmaniose visceral.

---

## CONCLUSÕES

---

- A tecnologia de “Phage Display” mostrou-se eficiente para a seleção de peptídeos recombinantes reativos com anticorpos policlonais de pacientes com Leishmaniose Visceral.
- Por meio das tecnologias de ELISA, seqüenciamento e bioinformática, foi possível determinar epítomos altamente reativos contra anticorpos de pacientes com Leishmaniose Visceral, que estão associados aos antígenos K39 – antígeno tipo kinesina (motivos: QDR); GP46 - Proteína de superfície de membrana (motivos: LA L+LR; LA LNL); Proteína gp63 (motivo: RL+LG) e antígeno LACK (motivo: AT RS, 253-257), dentre outras.
- O peptídeo relacionado ao antígeno LACK (AT RS), o mais comum na população de clones, pode representar a identificação de uma nova região imunogênica desta proteína, relacionada à *Leishmania chagasi*.
- Os resultados obtidos neste estudo são promissores no sentido da utilização destes fagos para a identificação de anticorpos no diagnóstico da doença e em testes de imunização para avaliação do efeito protetor dos fagos contendo os epítomos encontrados, ambos em fase de avaliação em novo estudo.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Badaró R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR and Reed SG (1996) rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 173:758-761.
- Barbas CF, Burton DR, Scott JK and Silverman GJ (2001) Phage Display. *A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.8.4-8.7.
- Beetham JK, Myung KS, McCoy JJ, Wilson ME and Donelson J (1997) Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. *J Biol Chem* 272:17360-17366.
- Berm C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD and Bista MD (2000) Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 63:153-157.
- Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Kardi B, Jacquet D, Chappuis F, Campino L, Desjeux P, Le Ray D, Koirala S and Van der Stuyft P (2004) A comparative study of effectiveness of diagnostic tests for Visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 70:72-77.
- Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG and Jeronimo SM (2002) The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant k39 antigen in the diagnosis of America visceral leishmaniasis and differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 67:244-348.
- Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R and Reed SG (1993) Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci* 90:775-779.

Cardoso R (2004). Isolamento e caracterização de peptídeos sintéticos em phage display pela interação com anticorpos policlonais anti-neuwiedase da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Carvalho SF, Lemos EM, Corey R and Dietze R (2003) Performance of recombinant antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68(3):231-324.

Chappuis F, Rijal S, Singh R, Acharya P, Karki BM, Das ML, Bovier PA, Desjeux P, Le Ray D, Koirala S and Loutan L (2003) Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Trop Med Int Health* 8:277-285.

Coelho EAF, Tavares CAP, Carvalho FAA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Charest H, Matlashewski G, Gazzinelli RT and Fernandes AP (2003) Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 71:3988-3994.

Cortese R, Monaci P, Nicosia A, Luzzago A, Felici F, Calfre G, Pessi A, Tramontano A and Sollazzo M (1995) Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. *Curr Opin Biotechnol* 6:73-80.

Courret NE, Prina E and Mougneau E (1999) Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. *Eur J Immunol* 29:762-773.

Cui X, Nagesha HS and Holmes IH (2003) Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display. *J Virol Meth* 109:75-83.

de la Cruz VF, Lal AA and McCutchan TF (1988) Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J Biol Chem* 263:4318-4322.

Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A and Arias J (2001) Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 8:355-357.

Etges R, Bouvier J and Bordier C (1986) The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem* 261:9098-9101.

Gazarian KG, Gazarian TG, Solís C, Hernández R, Shoemaker CB and Laclette JP (2000) Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. *Immu Lett* 42:191-195.

Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191-1199.

Ivens AC, Lewis SM, Bagherzadeh A, Zhang L, Chan HM and Smith DF (1998) A Physical Map of the *Leishmania major* Friedlin Genome. *Genome Res* 8:135-145.

Jameson BA and Wolf H (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS* 4:181-186.

Johnstone AP and Thorpe R (1987) *Immunochemistry in practice*. Blackwell Science, UK, 318 p.

Kay BK, Kabanov J and Yamabhai M (2001) Screening phage-displayed combinatorial peptides libraries. *Methods* 24:240-246.

Kumar R, Pai K, Pathak K and Sundar S (2001) Enzyme-linked assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1220-1224.

Lainson R (1989) Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: Demographic and Vector-Borne Diseases. (MW Servicee, ed). CRC Press, Boca Raton, USA, pp 85-106.

Lainson R and Shaw JJ (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In Lainson R and Shaw JJ (eds). The leishmaniasis. Academic Press, London pp.1-120.

Lincoln LM, Ozaki M, Donelson JE and Beetham JK (2004) Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. *Mol Biochem Parasitol* 137:185-189.

Lino GR, Prudêncio CR, Cardoso R, Maranhão AQ, Brígido MM and Goulart LR (2003) Geração de uma biblioteca combinatorial de scFv a partir do repertório de galinha imunizada com proteínas totais de carrapato bovino *Boophilus microplus*. 16° Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, Brazil.

Lowman HB and Wells JA (1993) Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J Mol Biol* 234:564-578.

Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F and Dellagi K (2003) Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68:312-320.

Manoutcharian K, Sotelo J, Garcia E, Cano A and Gevorkian G (1999) Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. *Clin Immunol* 91: 117-121.

Marzochi MCA and Marzochi KBF (1994) Tegumentary and Visceral Leishmaniasis Brasil – Emerging Anthroozoonosis and Possibilities for Their Control. *Cad Saúde Públ* 10:359-375.

Medrano FJ, Canavate C, Leal M, Rey C, Lissen E and Alvar J (1998) The role of serodiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. *Am J Trop Med Hyg* 59:155-162.

Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE and Cheng J (2001) *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 69:4719-4725.

Méndez M, Belkaid Y, Seder RA and Sacks D (2002) Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 20:3702-3708.

Mougneau E, Altare F, Wakil AE, Zheng S, Coppola T, Wang ZE, Waldmann, Locksley RM and Glaichenhaus (1995) Expression cloning of a Protective *Leishmania* Antigen. *Science* 268:563-266

Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG and Ozcel MA (1998) Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Med Hyg* 59:363-369.

Prudêncio CR, Cardoso R, Lino GR and Goulart LR (2003). Produção de soros policlonais em galinhas para a detecção de antígenos do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). 16° Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, Brazil.

Qu JQ, Guan LR, Shulidan I, Zuo XP, Chai JJ, Chen SB, Kswazu S, Katakura K, Matsumoto Y, Reed SG and Chang KP (2000) Rapid Screening with a recombinant antigen (rk39) for diagnosis of visceral leishmaniasis using dipstick. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 18:155-158.

Qu Jq, Zhong L, Masoom-Yasinzai M, Abdur-Rab M, Akzu HS, Reed SG Chang KP and Gilman-Sachs A (1994) Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* Kinesin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:543-545.



Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA and Larraga V (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21:2474-2484.

Roberts SC, Swihart KG, Agey MW, Ramamoorthy R, Wilson ME and Donelson JE (1993) Sequence diversity and organization of the msp gene family encoding gp63 of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 62:157-71.

Salotra P, Sreenivas G, Beena KR, Mukherjee A and Rasmeh V (2003) Parasite detection in patients with post Kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. *J Clin Pathol* 56:840-843.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York.

Santana DM, Borja-Cabrera GP, Paraguai de Souza E, Sturm NR, Palatinik de Sousa CB and Campbell DA (2002) Nucleoside hydrolase from *Leishmania (L.) donovani* is an antigen diagnostic for visceral Leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 120:315-319.

Sarker CB, Momen A, Jamal MF, Siddiqui NI, Siddiqui FM, Chowdhury KS, Rahman S and Talukder SI (2003) Immunochromatographic (rK39) strip test in diagnosis of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Mymensingh Med J* 12:93-97.

Schlagenhauf E, Etges R and Metcalf P (1996) The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure* 6:1035-1046.

Schallig HD, Canto-Cavalheiro M and Silva ES (2002) Evaluation of the direct agglutination test and the rk39 dipstick for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 97:1015-1018.

Sibille P and Strosberg AD (1997) A FIV epitope defined by a phage peptide library screened by a monoclonal anti-FIV antibody. Immunol Lett 59:133-137

Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 228:1315-1317.

Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP and Reed SG (1995) Diagnostic and prognostic value of k39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. J Parasitol 81:1000-1003.

Singh S, Kumari V and Singh N (2002) Predictin kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant k39 antigen. Clin Diagn Lab Immunol 9:568-572.

Sreenivas G, Ansari NA, Singh R, Subba Raju BV, Bhatheja R, Negi NS and Salotra T (2002) Diagnosis of visceral leishmaniasis: comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR. R J Biomed Sci 59:218-222.

Veeken H, Ritmeijer K, Seaman J and Davidson R (2003) Comparison of an rk39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. Trop Med Int Health 8:164-167.

Willis AE, Perham RN and Wraith D (1993) Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. Gene 128:79-83.

Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EA, El-Hassan AM, Reed SG and Ghalib HW (1998) rK39 enzyme-linked assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. Clin Diagn Lab Immunol 5:717-720.

Zijlstra EE, Nur Y, Desjeus P, Khalil EA, El-Hassan AM and Groen J (2001)  
Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience  
from the Sudan. Trop Med Int Health 6:108-113.

FU00034896-5