



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Seleção e caracterização de fragmentos de anticorpos scFv (*single chain variable fragment*) anti-rP21 de *Trypanosoma cruzi* por *Phage Display***

**João Paulo Borges**

**Uberlândia**

**Julho - 2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Seleção e caracterização de fragmentos de anticorpos scFv (*single chain variable fragment*) anti-rP21 de *Trypanosoma cruzi* por *Phage Display***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre.

**João Paulo Borges**

---

**Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira (orientador)**

---

**Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva (co-orientador)**

**Uberlândia  
Julho – 2015**

B732s      Borges, João Paulo, 1987-  
2015      Seleção e caracterização de fragmentos de anticorpos scFv (*single chain variable fragment*) anti-rP21 de *Trypanosoma cruzi* por Phage Display [recurso eletrônico] / João Paulo Borges. - 2015.

Orientador: Carlos Ueira Vieira.

Coorientador: Claudio Vieira da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.3030>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Vieira, Carlos Ueira, 1982-, (Orient.). II. Silva, Claudio Vieira da, 1972-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 013/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Discente: **JOÃO PAULO BORGES** – Matrícula nº 11312CSD017

Título do Trabalho: **"Seleção e caracterização de fragmentos de anticorpos scFv (*single chain fragment variable*) anti rP21 de *Trypanosoma cruzi* por *Phage Display*."** Às 14:00 horas do dia 28 de julho do ano de 2015, no Anfiteatro do Bloco 2H - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores Álvaro Ferreira Júnior (UNIUBE), Prof. Dr. Rafael Nascimento (UFU) e Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira – orientador do discente. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa o Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira apresentou a Comissão Examinadora e o discente, agradeceu a presença do público e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a argüir o candidato. Ultimada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato aprovado. Esta defesa Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 18:00 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Rafael Nascimento \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

*À Deus,*

*Pelo dom da vida e por seu cuidado e proteção.*

*A minha Mãe,*

*Emília Lúcia, por todos esses anos de dedicação e esforço me apoiando.*

*Aos meus irmãos,*

*Ana Cristina e Pedro Henrique, por todo carinho e ajuda.*

*Aos amigos e familiares,*

*A toda minha família e amigos, obrigado pelas palavras de carinho*

## Agradecimentos

Obrigado Senhor pelo dom da vida, por me fortalecer nos momentos mais difíceis.

Agradeço em especial a toda minha família, Mãe, irmãos e avós que nunca mediram esforços para que eu pudesse conquistar meu objetivo. A todos os queridos amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia e Tripanossomatídeos da UFU. O meu muito obrigado ao Prof. Dr. Luiz Ricardo por me receber em seu laboratório, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Ueira que me deu a oportunidade de conhecer um pouco do mundo molecular e sempre me auxiliando com seus conselhos. Agradeço meu co-orientador Prof. Dr. Claudio Vieira por ter me recebido com tanto carinho. A todos que de forma direta e indireta colaboraram com esse trabalho, meu muito obrigado!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS/ TABELAS</b>	4
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	6
<b>RESUMO</b>	8
<b>ABSTRAT</b>	7
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
<b>1.1 Considerações gerais</b>	12
<b>1.2 Mecanismos de invasão celular e proteína recombinante rP21</b>	18
<b>1.3 <i>Phage Display</i></b>	21
<b>1.4 Utilização de fragmentos de anticorpos expostos em fagos-scFv</b>	22
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	24
<b>3 OBJETIVO</b>	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	25
<b>5 RESULTADOS</b>	35
<b>5.1 Purificação da proteína recombinante rP21</b>	35
<b>5.2 Seleção de anticorpos recombinantes contra a proteína rP21 de <i>Trypanosoma cruzi</i>.</b>	36
<b>5.3 Expressão de scFv solúveis</b>	37
<b>5.4 Extração do DNA dos Fagomídeos e Sequenciamento.</b>	38
<b>5.5 Purificação de scFv por cromatografia de afinidade e análise das frações eluídas.</b>	39
<b>5.5 Ensaio de viabilidade celular</b>	41
<b>5.6 Ensaios de invasão celular utilizando os scFvs</b>	43
<b>6 DISCUSSÃO</b>	43
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Considerações Gerais.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 1. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 2. Demonstração do fago filamentoso e da expressão de suas proteínas na seleção de moléculas alvo.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3. Esquema ilustrativo da técnica de <i>Phage Display</i> com seus ciclos de seleção (<i>biopanning</i>) .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 4. Representação esquemática de uma molécula de scFv fusionada a pIII do fago.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 5. Representação de diferentes fragmentos de Imunoglobulinas recombinantes utilizados na engenharia genética.....</b>	<b>22</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>35?</b>
<b>Figura 6. SDS-PAGE corado com coomassie blue.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 7. ELISA para a análise da reatividade dos scFvs selecionados.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 8. Análise da extração de DNA plasmidial dos clones para montagem da reação de sequenciamento .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 9. Ensaio Imunoenzimático com clone eluído por cromatografia de HPLC.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 10. Análise por <i>dot blot</i> dos clones expressos e purificados por HPLC.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 11. Ensaio de viabilidade celular testando os scFv .....</b>	<b>41</b>

**Figura 12. Efeito biológico do scFv D5 na invasão celular.....42**

## **LISTA DE TABELAS**

**Resultados.....35**

**?**

**Tabela 1. Sequencia de aminoácidos dos clones de scFvs reativos a rP21.....38**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>μL</b>	<b>Micro litro</b>
<b>°C</b>	<b>Graus Celsius</b>
<b>iMØB/6</b>	<b>Macrófagos provenientes de medula óssea imortalizados ?</b>
<b>AE</b>	<b>Amastigotas extracelulares</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's modified Eagle's médium - Meio de cultura de células</b>
<b>HCL</b>	<b>Cloreto de hidrogênio</b>
<b>IPTG</b>	<b>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</b>
<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>mM</b>	<b>milimolar</b>
<b>mg</b>	<b>Miligrama</b>
<b>ng</b>	<b>Nanograma</b>
<b>Ni</b>	<b>Níquel</b>
<b>NaCl</b>	<b>Cloreto de sódio</b>
<b>OD</b>	<b>Densidade ótica</b>
<b>PBS</b>	<b>Solução de salina tamponada com fosfatos</b>
<b>PBS BSA</b>	<b>PBS 1X adicionado de albumina bovina sérica</b>
<b>PEG</b>	<b>Polietilenoglicol</b>
<b>pComb3X</b>	<b>Vetor de clonagem</b>
<b>PIII</b>	<b>Proteína III do capsídeo de bacteriófago filamentoso</b>
<b>PVIII</b>	<b>Proteína PVIII do capsídeo de bacteriófago filamentoso</b>
<b>PBST</b>	<b>Fosfato de Sódio com Tween</b>
<b>rP21</b>	<b>Proteína recombinante de P21</b>

<b>rpm</b>	<b>Rotação por minuto</b>
<b>SFB</b>	<b>Soro fetal bovino</b>
<b>SB</b>	<b>Meio Super-Broth</b>
<b>LB</b>	<b>Meio Luria-Bertani</b>
<b>scFv</b>	<b>Fragmento variável de cadeia única</b>
<b>TCT</b>	<b>Tripomastigotas de cultura de tecido</b>
<b>TA</b>	<b>Temperatura ambiente</b>
<b>TM</b>	<b>Tripomastigotas metacíclicos</b>
<b>Tris- HCL</b>	<b>Tris hidróclorido</b>

## RESUMO

*Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas é um protozoário de grande relevância na América do Sul. Este parasita secreta uma proteína chamada P21 envolvida na invasão da célula hospedeira, aumentando a fagocitose de macrófagos e a polimerização de actina. O objetivo desse trabalho foi a seleção e caracterização de fragmentos de anticorpos (scFv) tendo como alvo biológico a forma recombinante chamada de proteína rP21. Dois clones mais reativos foram isolados utilizando a técnica molecular de *Phage Display*. A imunoreatividade contra rP21 e extratos totais de *T. cruzi* foi analisada pelo método ELISA. Os resultados apresentaram dados onde o scFv D5 testado em ensaio de citotoxicidade e invasão *in vitro* utilizando uma linhagem celular de macrófagos imortalizados mostrou-se promissor no intuito de se conhecer mais sobre a relação que a P21 em sua forma nativa desempenha onde o scFv D5 poderá colaborar com os estudos atuais de interação do *T. cruzi* na invasão celular e no bloqueio de sítios de ligação da P21 que auxilia na invasão do parasita em linhagens celulares.

**Palavras chaves:** *T. cruzi*, *Phage Display*, scFv, proteína recombinante rP21, macrófagos imortalizados.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease is a protozoan very important in South America. This secret parasite is called P21 protein involved in host cell invasion by increasing the phagocytosis of macrophages and actin polymerization. The aim of this study was the selection and characterization of antibody fragments (scFv) having as biological target the recombinant form called RP21. The two most reactive clones were isolated and total immunoreactivity against RP21 extracts of *T. cruzi* was assayed by ELISA. The scFv D5 tested in vitro invasion assay using a cell line immortalized macrophages showed promise in order to know more about the relationship that the P21 in their native form plays where the scFv D5 could become a possible mediator of this interaction acting on the blocking protein.

**Key words:** *T. cruzi*, *Phage Display*, scFv, recombinant protein rP21, immortalized macrophages.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações Gerais

Há mais de um século, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas estava investigando casos de malária em Minas Gerais, quando se interessou pelo estudo de certos insetos que tinham o hábito de picar a face descoberta de indivíduos durante a noite (GARCIA, 2009). Ao analisar o intestino destes invertebrados, ele encontrou parasitas flagelados parecidos com formas na época denominadas de critídias, mas que poderiam corresponder a um estágio evolutivo do recém-descoberto *Trypanosoma minasense*, ou a uma nova espécie deste mesmo gênero. Após a inoculação dos parasitas em primatas e obtenção das mesmas formas flageladas no sangue destes animais algumas semanas mais tarde, ele concluiu tratar-se de uma nova espécie, chamada inicialmente de *Schyzotrypanum cruzi* e, subsequentemente de *Trypanosoma cruzi*. A fim de pesquisar a possibilidade de estes parasitas causarem infecção em seres humanos, Chagas analisou o sangue de pessoas e animais domésticos residentes na região onde haviam sido encontrados tais insetos. Depois de um intenso estudo, ele foi capaz de descrever o agente, os vetores, sinais clínicos em seres humanos e a existência de reservatórios animais (CHAGAS, 1909).

Agente etiológico da doença de Chagas, *T. cruzi* é um protozoário flagelado de grande relevância na América Latina (NOUVELLET, 2015). Estudo realizado com tecidos de múmias do Chile e Peru demonstrou a presença da doença em humanos há 9.500 anos (AUFDERHEIDE et al., 2004). Estima-se a existência de 9 milhões de pessoas infectadas e que 40 milhões vivam sob risco de infecção, constituindo assim um grande problema de saúde pública (SCHOFIELD et al., 2006; WHO, 2015). Na 15ª reunião da Comissão Intergovernamental da Iniciativa do Cone Sul contra a doença de Chagas foi declarado formalmente a interrupção da transmissão da doença de Chagas pelo inseto vetor *Triatoma infestans* no Brasil. É importante salientar que *T. cruzi* infecta várias espécies de triatomíneos e possui vários reservatórios animais.

O protozoário *T. cruzi* pertence à Ordem Kinetoplastida, atualmente conhecidos como Metakinetoplastina (ADL et al, 2012). Família Trypanosomatidae e caracteriza-se por apresentar três estágios evolutivos distintos morfológicamente: epimastigota, tripomastigota e amastigota (TYLER, 2001). O desenvolvimento de um estágio a outro é

um processo complexo, envolvendo mudanças ultra-estruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984). O ciclo biológico do *T. cruzi* é heteroxênico, envolvendo um hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, incluindo o homem) e um invertebrado (vetor), representado por insetos hemípteros da Família Reduviidae, cujos gêneros de maior importância são *Triatoma infestans*, *Rhodnius spp* e *Panstrongylus spp* (BARRETO, 1979).



**Figura 1.** Ciclo de vida do *T. cruzi*. Parte (vermelha) demonstra o desenvolvimento da forma tripomastigota no intestino do barbeiro. Parte (azul) demonstra o desenvolvimento de formas amastigotas no homem. (Disponível em: <http://besttemas.com.br/doenca-de-chagas/#prettyPhoto>).

Durante o ciclo de vida de *T. cruzi*, formas tripomastigotas sanguíneas passam então para o intestino médio do vetor, multiplicam-se como epimastigotas e no decorrer de algumas semanas migram para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Ao picarem um novo vertebrado, os insetos defecam próximo as lesões, depositando suas fezes e urina com parasitas sobre a pele ou mucosas do hospedeiro (ORG. PAN-AMERICANA, 2008). A penetração destes no organismo pode se dar diretamente nas mucosas ou quando o indivíduo coça o local da picada, provocando uma lesão tecidual. A partir daí, os tripomastigotas metacíclicos podem invadir variados tipos celulares, onde se diferenciam em amastigotas, começando a se multiplicar em um período aproximadamente de 20 a 30 horas. No final da fase de multiplicação, quando a célula está abarrotada de parasitas, os amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas, que escapam das células hospedeiras para os espaços

intercelulares ou ganham a circulação. Estes tripomastigotas, chamados tripomastigotas sanguíneos, podem então invadir novos macrófagos ou células de outros tecidos e órgãos do hospedeiro, ou serem ingeridos pelo inseto durante seu repasto sanguíneo (VIANNA, 1911).

Além do mecanismo vetorial, a transmissão da doença de Chagas pode também ocorrer por transfusão sanguínea, transmissão congênita, infecções laboratoriais acidentais, transplante de órgãos e por via oral (DIAS, 1992). O primeiro surto de infecção humana por *T. cruzi* por via oral foi relatado em 1968, em uma escola agrícola do município de Estrela (RS), onde 17 alunos apresentaram um quadro agudo da doença de Chagas e seis morreram. A fonte exata de contaminação não foi esclarecida: suspeita-se de alimento contaminado com o parasita. Outro surto semelhante ocorreu em Catolé do Rocha (PB), atingindo 26 pessoas, das quais uma faleceu (revisado em STEINDEL et al., 2005).

No período de 1968 a 2000, mais de 50% dos casos agudos da Doença de Chagas registrados na Amazônia brasileira foram atribuídos a micro epidemias de infecção transmitida oralmente (COURA et al., 2002). Houve um surto de doença de Chagas cuja transmissão estava relacionada ao consumo de caldo de cana de um único ponto de venda nas margens da BR 101 (Barracão Penha II) no município de Navegantes (SC), no dia 13 de fevereiro de 2005. Foram confirmados 25 casos, sendo que três se tornaram óbitos. No local da transmissão, foram capturados reservatórios (gambá) e vetor silvestre (*Triatoma tibiamaculata*) da doença, ambos infectados por *T. cruzi* (STEINDEL et al., 2005).

A infecção por *T. cruzi* possui apresentação clínica variável. A fase aguda inicial é caracterizada por parasitemia patente que pode perdurar por 40 a 60 dias. Os sintomas podem ser moderados e atípicos, podendo ser confundidos com os de diversas outras infecções, e conseqüentemente a infecção não é frequentemente reconhecida neste estágio (LARANJA, 1953). Neste período, as formas amastigotas podem ser vistas no interior de fibras cardíacas (TORRES, 1917), células musculares lisas e esqueléticas, células endoteliais, gliais, macrófagos e fibroblastos. Depois da fase aguda, os pacientes entram na fase crônica da doença, podendo o indivíduo permanecer na forma indeterminada por vários anos ou persistir indefinidamente (NEVES, 2002).

Este período é caracterizado por ausência de sintomas clínicos relevantes, baixa ou nenhuma parasitemia, mesmo que o paciente permaneça reativo em testes sorológicos de rotina. Durante este longo intervalo, pessoas infectadas vivendo em áreas endêmicas constituem em importantes reservatórios do parasita. Até 20 anos após a infecção,

aproximadamente 35% dos pacientes apresentam sinais clínicos característicos da doença de Chagas, como cardiomiopatia, danos no sistema nervoso periférico ou disfunção no trato digestivo frequentemente levando a megacolon e/ou megaesôfago (RASSI, 2008). Segundo Dias 2007, em ambientes naturais e agrícolas ainda existem focos de transmissão da doença de Chagas. Dados estatísticos mostraram que existem cerca de 12 a 14 milhões de pessoas infectadas (ROMANHA, 2010). Relatos de casos na Europa e alguns estados Americanos têm comprovado focos de infecções por *T. cruzi*, tal fato se deve a visita destes as áreas endêmicas (ICONE FIOCRUZ, 2012). Imigrantes que saíram de áreas endêmicas e foram residir na América do Norte, Japão, Europa e Austrália fizeram com que surgissem os primeiros casos no exterior, gerando preocupação para países que ainda não conhecem o diagnóstico e tratamento da doença (SANTOS, 2012). Em Portugal estima-se que exista cerca de 1255 casos de infecção mas, poucos relatos de indivíduos na fase aguda da doença (CORTEZ, 2012).

A área com maior risco de transmissão para doença de Chagas no Brasil conhecida no final dos anos 70 incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios, onde a presença de triatomíneos domiciliados foi comprovada. A soroprevalência da população rural no país, determinada por inquérito sorológico realizado entre 1975 e 1980, por amostragem em todos os municípios (à exceção daqueles do estado de São Paulo, onde as atividades de controle estavam em curso desde meados dos anos 60) era então de 4.2%. Ações sistematizadas de controle químico de populações domiciliadas do vetor foram instituídas a partir de 1975, tendo-se alcançado a total cobertura da área endêmica no ano de 1983 (BRASIL, 2005). Devido às ações de controle cumpridas extensivamente no Brasil, houve uma significativa alteração no quadro epidemiológico da doença de Chagas. Além disso, mudanças ambientais, a maior concentração da população em áreas urbanas, a melhor compreensão dos acontecimentos e as pesquisas desenvolvidas pela comunidade científica, tornam necessária a revisão das estratégias e da metodologia de vigilância epidemiológica no Brasil. Apesar dos grandes avanços no combate a Doença de Chagas e da certificação de seu controle, casos esporádicos nos estados do Pará, Amapá, Rondônia, Santa Catarina e na Amazônia são relatados onde a contaminação ocorre via oral no consumo de cana de açúcar e açaí (COURA, 2009; MATTOS, 2011). Estudos recentes mostraram a característica clínica e epidemiológica da doença de Chagas em estados brasileiros como Paraná e Minas Gerais com o intuito de conhecer a biologia comportamental do *T. cruzi* (REIS, 2012). Em 2012 o portal da saúde do SUS notificou surtos da doença de Chagas no estado do Pará onde a contaminação de maior prevalência

foi via oral segundo dados estatísticos atualizados em maio de 2012 (ICONE BRASIL, 2012).

Dados do ministério da saúde e da fundação Oswaldo Cruz via boletins epidemiológicos de 2012 em diferentes estados tem demonstrado avanços em relação às epidemias nos estados já supracitados. É relevante abordar que a aparente melhoria do sistema único de saúde (SUS) trouxe melhores condições para indivíduos chagásicos portadores das formas clínicas graves combatendo a descriminalização de tais na sociedade. Tal patogenia ainda é causa de morte no Brasil e os caminhos para um melhor entendimento do mecanismo da doença são longos, onde atualmente pacientes crônicos da doença que não tem acesso a um tratamento de qualidade sofrem com os sintomas durante muitos anos, assim não se deve negligenciar a atenção às formas de transmissão e possíveis probabilidades de novos pacientes infectados.

## **1.2. Mecanismos de invasão celular e proteína P21**

O parasitismo exercido por organismos intracelulares representa um evento complexo, usualmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno e um receptor na célula hospedeira (BEACHEY, 1981). Neste contexto, a superfície celular desempenha o principal papel no estabelecimento de qualquer relação parasita-hospedeiro e a identificação das moléculas envolvidas neste processo torna-se um passo obrigatório.

Evidências experimentais permitiram estabelecer que *T. cruzi* desenvolve mecanismos efetivos para escapar da ação lítica do sistema complemento de mamíferos. Foi observado que epimastigotas são totalmente lisados pelo sistema complemento na ausência de anticorpo (NOGUEIRA et al., 1975), enquanto que tripomastigotas possuem moléculas de superfície que inibem a formação de C3 convertases, essenciais à ativação do sistema complemento e, portanto, resistem à lise (KIPNIS et al., 1981; JOINER et al., 1986; SCHENKMAN et al., 1986). No momento da infecção o parasita precisa navegar pela matriz extracelular antes de se aderir e invadir a célula. Observações *in vitro* mostraram eficiência que o Tripomastigota tem ao se ligar a colágeno, fibronectina e heparina aliados a capacidade hidrolítica desses componentes favorecem a invasão celular (YOSHIDA, 2006). Tal mecanismo pode ocorrer pelo recrutamento de proteínas como a Proliloligopeptidase (POPTc80) e a Oligopeptidase B (OPBTc) influenciando na liberação de  $Ca^{2+}$  que possuem capacidade hidrolítica e estão envolvidas aparentemente

com a invasão (MOTTA, 2010). Entretanto, tripomastigotas podem ser lisados na presença de soro imune de animais infectados (KRETTLI; BRENER, 1982).

Formas amastigotas extracelulares de *T. cruzi* ativam eficientemente a via alternativa do complemento, porém impedem a fixação dos componentes C5b-C9 em sua membrana, escapando da lise (IIDA et al., 1989). Por outro lado, amastigotas intracelulares são altamente susceptíveis à lise pelo sistema complemento (FERNANDES; MORTARA, 2004) O processo de invasão celular pode ser dividido em adesão e interiorização (SILVERSTEIN et al., 1977). A adesão de formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) à célula hospedeira fixada é um processo ativo que requer energia do parasita e não requer microfilamentos da célula hospedeira intactos. Inibidores da geração de ATP inibem a adesão e penetração, sem alterarem significativamente o movimento do parasita, bem como o tratamento com citocalasina D, uma droga que rompe microfilamentos e impede a formação de extensões de membrana plasmática mediadas por actina, tem pouco ou nenhum efeito na invasão celular por TCT (SCHENKMAN et al., 1991). No entanto, formas amastigotas extracelulares não aderem a células hospedeiras fixadas e a invasão ocorre de maneira dependente de microfilamentos funcionais na célula hospedeira (MORTARA, 1991; PROCÓPIO et al., 1998).

Segundo Woolsey 2004, a polimerização do citoesqueleto de actina é essencial para a fusão do parasita a lisossomos demonstrando que tal fusão é importante para a invasão celular e a permanência do parasita na célula.

Estudos demonstraram que durante a invasão celular por TCT ocorre recrutamento e fusão de lisossomos à membrana plasmática da célula hospedeira no sítio de invasão do parasita de maneira dependente de cálcio (TARDIEUX et al., 1992; TARDIEUX et al., 1994). De acordo com este modelo, TCTs acionam um processo de sinalização que culmina com a formação do vacúolo parasitóforo (BURLEIGH; ANDREWS, 1998; BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Novas evidências surgem apontando para a participação de componentes anteriores da via endocítica, como dinamina e Rab5 indicando que o processo lisossomal deve ser mais elaborado e deve ocorrer após eventos primários (WILKOWSKY et al., 2002). Tripomastigotas metacíclicos invadem células Hella pelas suas bordas induzindo protrusões ricas em actina em redor do parasito e o tratamento com citocalasina D não inibiu a protrusão no parasito. Em formas amastigotas extracelulares o tratamento com a citocalasina D inibe a invasão de células Vero e Hella contradizendo o efeito de entrada das formas

Tripomastigotas metacíclicos. Tal fato comprova que cada estágio de invasão parasita-célula recruta componentes específicos.

Receptores de interleucina foram estudados nas células CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> medindo o nível de citocinas como as interleucinas IL-6, IL-2, IL-8, IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (MORETTI, 2002). Para a citocina TNF- $\alpha$  já foi descrito um receptor celular (TNFR1/p55) a partir de sua descrição analisou-se a via de sinalização após infecção com *T. cruzi* verificando tanto a ativação celular como disfunções causadas no coração (PALHARES, 2008). Conhecer os mecanismos celulares poderá ser uma ferramenta útil no acompanhamento da doença de Chagas. Proteínas como a Mieloperoxidase (MPO), 3-nitrotyrosine (3NT) têm sido analisadas para verificar sua atuação perante o nível de estresse oxidativo em macrófagos e neutrófilos após a invasão por *T. cruzi* utilizando modelos animais (DHIMAN, 2009). Outra proteína como a GP82 foi descrita na invasão celular por Tripomastigotas metacíclicos das cepas CL e G do qual se comprovou que a atuação dessa molécula em células de mamíferos tem sido altamente invasiva promovendo cascatas de sinalização eficientes para a adesão do parasita.

Experimentos demonstraram que o nível de cálcio em células Hela aumentou após a atuação da GP82 bem como a ativação de vários sinais moleculares (YOSHIDA, 2006). Outros Grupos de proteínas como as Glicoproteínas Gp90, Gp35/50, Gp85 e 83 foram descritos na literatura sendo responsáveis pela internalização do parasito na célula de mamífero hospedeira, porem os seus receptores ainda não são conhecidos (SOUZA, 2010).

A proteína P21, secretada por *T. cruzi* em todas as suas formas evolutivas foi caracterizada e apresenta um importante papel durante a invasão de células não fagocíticas por tripomastigotas metacíclicos e amastigotas extracelulares. Quando a forma recombinante da proteína é adicionada a estas formas parasitárias (G e CL), aumenta de forma significativa a invasão celular por ambas as formas. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a pré-incubação com a rP21 (forma recombinante) poderia dessensibilizar a célula, ativando eventos de sinalização cruciais para a internalização do parasita antes de seu contato (SILVA et al., 2009). Outros dados mostraram que a rP21 se liga ao receptor de quimiocinas CXCR4, pois o tratamento de células com a quimiocina SDF-1 alfa (que se liga ao CXCR4) reduziu a quantidade de partículas de zimosam fagocitadas por macrófagos peritoneais (RODRIGUES et al., 2012). Foi verificado que a rP21, ao se ligar ao seu receptor, sinaliza via PI3-Kinase, AKT, Erk1/2 e Mek1/2. Outro fator importante e já observado em resultados

apresentados no nosso grupo de pesquisa é o da proteína solúvel apresentar as mesmas funções biológicas que a rP21 renovelada, (SANTOS et al, 2014). A expressão da rP21 é distinta entre diferentes cepas de *T. cruzi* (FERNANDES, 2013) e o seu tráfego pelas vias endocíticas apresenta-se com pouca co-localização com marcadores lisossomais em experimentos de cinética (MARTINS, 2013).

A utilização de proteínas recombinantes apresenta vantagens como: fácil purificação, comparadas com o tecido de origem. O risco de transferência de patógenos e material oncogênico são reduzidos. Dessa forma a escolha da rP21 para o desenvolvimento desse trabalho foi crucial (MARQUES, 2005).

Sabendo que a P21 é secretada pelo *T. cruzi* em todos os seus ciclos evolutivos e apresenta um importante papel durante a invasão de células não fagocíticas por tripomastigotas metacíclicos e amastigotas extracelulares, e a interação de sua forma recombinante na invasão celular apresentou resultados importantes envolvendo o mecanismo de fagocitose, novas abordagens que permitem elucidar ainda mais a atuação biológica da proteína podem ser aplicadas, onde o uso de moléculas mediadoras desse processo como o de imunoglobulinas poderá ser de grande importância (Rodrigues, 2012; Santos 2014).

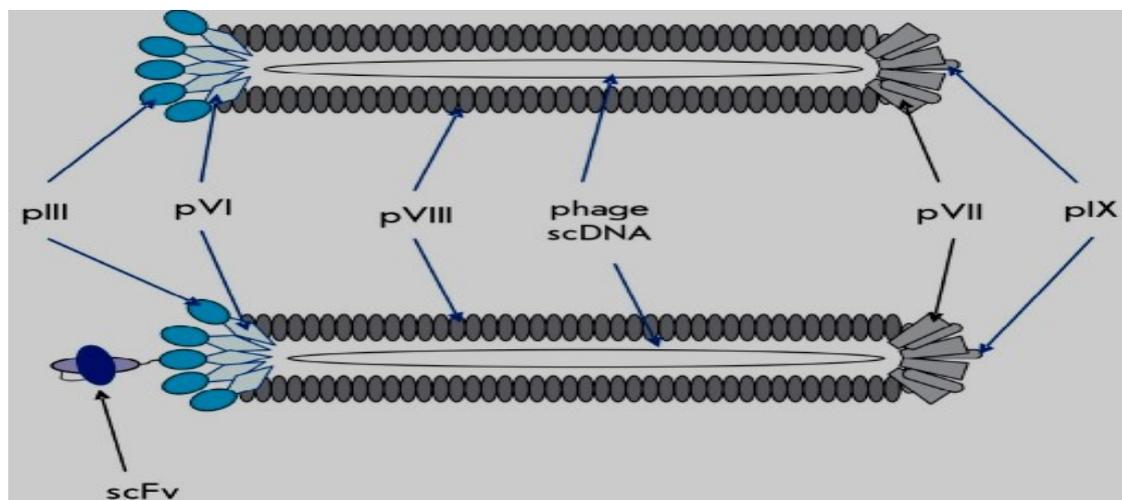
### **1.3. Phage Display**

A técnica molecular de *Phage Display* tornou-se uma ferramenta muito eficaz na caracterização de peptídeos e anticorpos com alta afinidade e especificidade utilizados em diferentes alvos em projetos de pesquisas tanto para diagnóstico como tratamentos de doenças. A técnica foi criada com o objetivo de construir bibliotecas de peptídeos expressos nos fagos M13 com o intuito de selecionar moléculas protéicas para alvos específicos (SMITH, 1985). Desde sua descoberta, essa metodologia tem sido utilizada com grande frequência em diferentes áreas da ciência a fim de caracterizar ligantes relacionados a várias doenças (BARBAS et al., 2001).

As bibliotecas construídas através do *Phage Display* têm proporcionado a descoberta de vários polipeptídios como anticorpos, enzimas e receptores (HAARD, et al., 1998).

A utilização do bacteriófago filamentososo que infecta *Escherichia coli* tem sido o método mais utilizado. Esses bacteriófagos, que também podem ser chamados de fagos, são pequenos vírus que infectam a bactéria do tipo Gram-Negativo pelo seu *pilus* sexual

passando seu DNA de fita simples envolvidos por uma camada protéica. Entre a proteínas expressas no fago temos as mais citadas e conhecidas como a pIII e pVIII *Phage Display* (Figura 2).

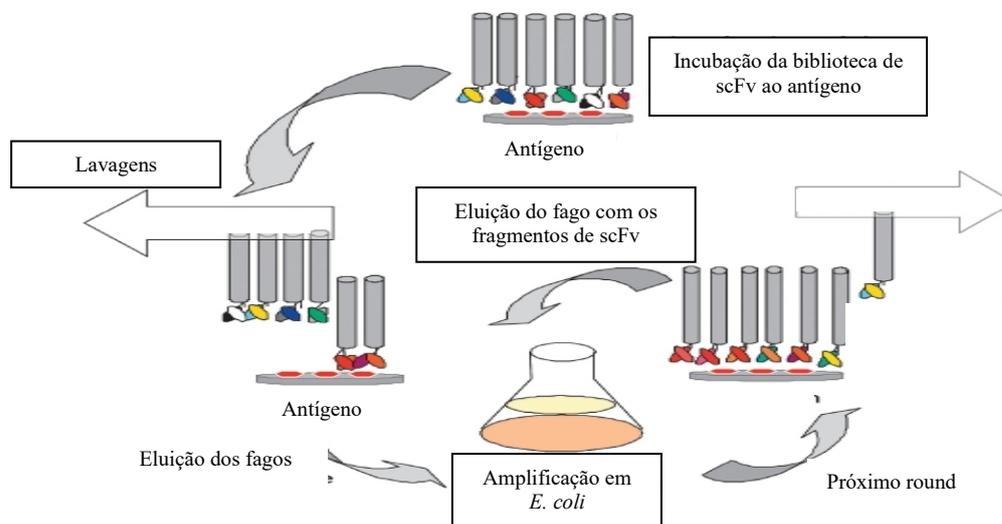


**Figura 2.** Demonstração do Fago Filamentoso e da expressão de suas proteínas na seleção de moléculas alvo (Adaptado de MOROZOVA, 2009).

A vantagem de utilizar o bacteriófago deve-se pelo fato de não causar lise na bactéria. A infecção ocorre pela fixação da pIII do fago no *pilus* sexual da bactéria onde o DNA viral é inoculado, replicando-se em milhares de novos clones idênticos e servindo como molde para expressão de novas proteínas como a pIII e pVIII (FRESCHI, 2006). Essa exposição de fagos ocorre através de clonagem do DNA dando origem a milhões de novos ligantes (AZZAZY, 2002). O peptídeo ou fragmento de anticorpo expresso na superfície do fago gera a possibilidade de milhares de ligantes alvos em um processo de seleção que ocorre *in vitro* chamado de *biopanning*, dessa forma os anticorpos presentes na superfície de fagos possibilitam a seleção de sequências que possuem alta afinidade de ligação à molécula-alvo (SMITH, 1998).

Para seleção, o alvo é imobilizado em suportes sólidos, como placas de ELISA, e incubados com a biblioteca de anticorpos. Após lavagens sucessivas os fagos que não se ligam ao alvo são eliminados e os fagos contendo anticorpos com afinidade pelo alvo permanecem ligados para posterior eluição (STECH et al., 2014; SMITH, 1985). O *pool* de fagos específicos eluídos é amplificado em *E. coli* e os fagos resultantes deste processo podem ser titulados e submetidos a uma nova seleção (ligação ao alvo, eluição e amplificação) (STECH et al., 2014; SMITH, 1985; SMITH., PETRENKO, 1997). Após

este processo, clones individuais são submetidos a ensaios imunológicos e suas sequências de DNA podem ser obtidas por sequenciamento (BARBAS et al., 2001, ZHANG et al., 2014) Figura 3.



**Figura 3.** Esquema ilustrativo da técnica de *Phage Display* com seus ciclos de seleção (*biopanning*) (Adaptado de MOROZOVA, 2009).

A técnica de *Phage Display* embora tenha sido descoberta a mais de 20 anos ainda a muito que se conhecer e aprimorar-se em relação à seleção de novos alvos como proteínas e peptídeos utilizados para fins específicos na melhoria de tratamentos e diagnósticos para várias doenças como a doença de Chagas alvo desse trabalho (HELL et al., 2009).

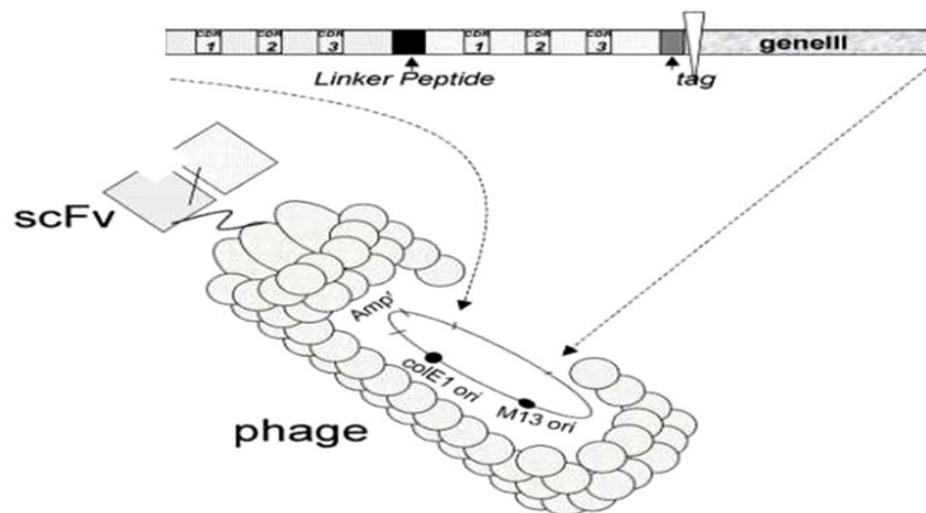
#### 1.4. Utilização de fragmentos de anticorpos expostos em fagos - scFv

A utilização de metodologias como a de engenharia genética, entre outras ferramentas moleculares passou a ser de grande importância no uso de anticorpos recombinantes que tem sido cada vez mais utilizados para o estudo de determinadas doenças, mantendo atualmente um perfil com maior reatividade funcional ao antígeno, demonstrando uma melhor eficiência quanto comparados a mAbs de 150 kDa. (HOLLIGER, 2005; KODUVAYUR 2014; SHUKRA, 2014).

Durante 34 anos desde a primeira geração de anticorpos monoclonais a partir de células B de hibridomas de camundongos (KOHLENER, 1975) e 23 anos desde o punho da

aprovação pela FDA da utilização de anticorpos monoclonais como terapia (OKT®3, JOHNSON & JOHNSON) os primeiros anticorpos monoclonais foram produzidos exclusivamente em células de camundongo. No entanto, houve um obstáculo quanto à utilização desta descoberta pois os anticorpos foram de origem animal e a sua utilização em seres humanos poderia causar respostas desconhecidas. Na busca de produzir anticorpos mais humanizados surge então técnicas de engenharia genética como a tecnologia de apresentação em fago, permitindo a produção de anticorpos totalmente humanos (umab) (PUCCA, 2011).

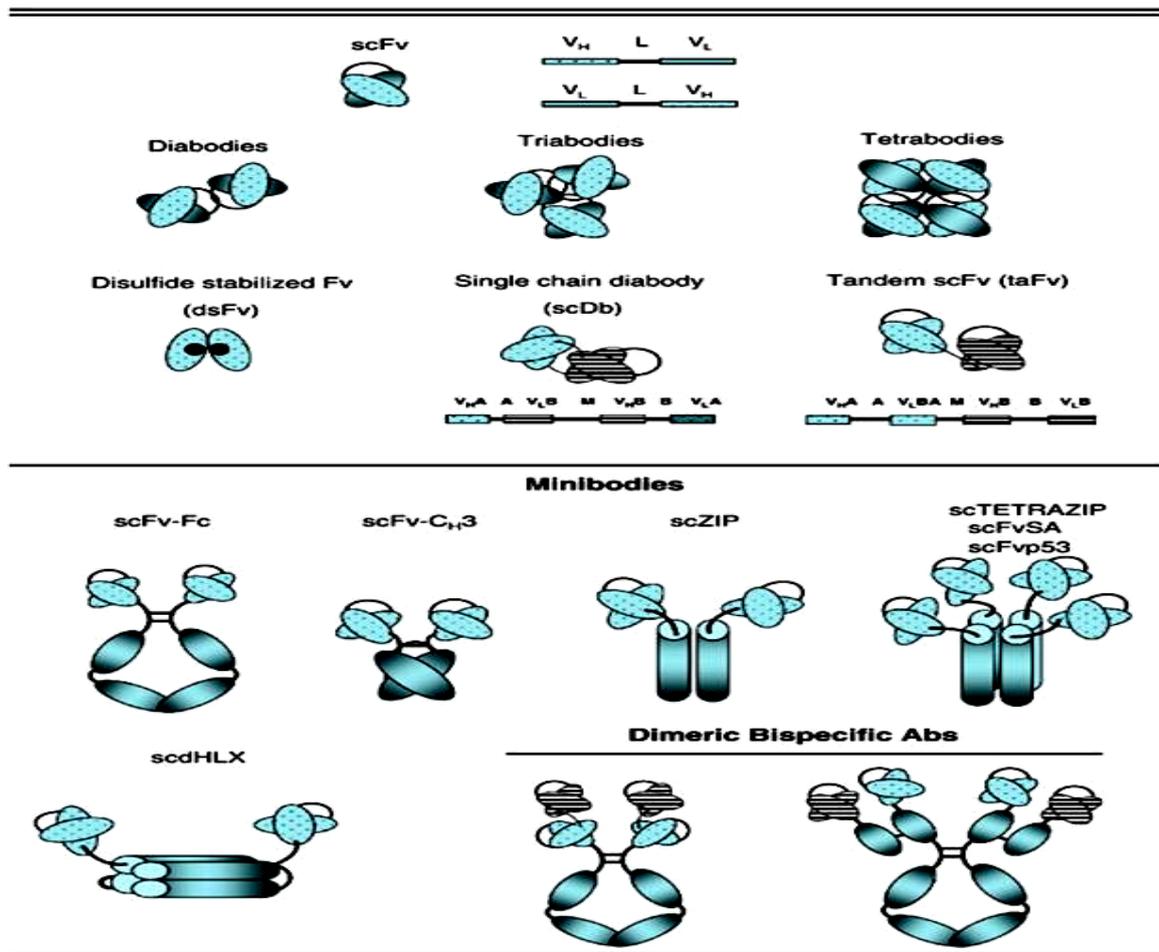
A utilização de fragmentos de cadeia única das regiões variáveis do anticorpo (*single chain variable fragment*) atualmente tem sido o formato de anticorpos recombinantes mais populares para a especificidade a diferentes antígenos. As primeiras moléculas de scFv foram criadas por Bird et.al em (1988) e Huston et. al. (1988) essas moléculas apresentam as cadeias VH-VL unidas por um peptídeo conector.



**Figura 4. Representação esquemática de uma molécula de scFv fusionada a pIII do fago.** São mostrados: o fago filamentososo ligado ao scFv, genoma do fago (fagomídeo) contendo gene de resistência ampicilina, origem de replicação para *E. coli* e origem de replicação para M13. O gene III ligado ao DNA codificante das CDRs da cadeia leve e pesada unidas por um linker (Adaptado de CARDOSO, 2008).

Imunoglobulinas são amplamente usadas como moléculas de fusão, e esse mecanismo envolve fagos filamentosos, a utilização de uma molécula inteira e o tamanho do seu arcabouço não permitiriam esse acoplamento, dessa forma moléculas menores

como os scFvs se tornaram ideais pelo seu tamanho. Os anticorpos recombinantes de scFv apresentam vantagens como a facilidade de construir a biblioteca, pela habilidade de formar estruturas multiméricas podendo aumentar a especificidade ao antígeno e a expressão apresenta maiores níveis, sendo capaz de ter acesso a regiões como exemplo do tecido que fragmentos maiores não teriam (SOUSA, 2007; SHUKRA, 2014).



**Figura 5. Representação de diferentes fragmentos de imunoglobulinas recombinantes utilizados na engenharia genética.** A molécula de scFv tem apresentado grandes vantagens com funções em agentes terapêuticos e aplicações medicinais (adaptado de WEISSER, 2009).

A grande vantagem dessa ferramenta da biologia molecular é que os anticorpos podem ser expressos tanto na superfície do fago (anticorpos ligados ao fago) e na forma solúvel (GOURDINE, 2005). Além disso, pode ser expressa em grandes quantidades em hospedeiros bacterianos sem a necessidade de utilizar animais.

## 2. JUSTIFICATIVA

Desde sua descoberta, a doença de Chagas tornou-se o foco de estudos por vários pesquisadores de todo Brasil e do mundo por ser considerado um problema de saúde pública. O processo de investigação da relação célula hospedeira e *T. cruzi* ainda continua sendo um desafio mesmo após 100 anos de descoberta da doença.

Carlos Chagas teve um papel importante na compreensão do ciclo celular do parasita e nas formas de contaminação. Suas descobertas contribuíram muito para que vários pesquisadores pudessem continuar no estudo da doença.

Estudar a interação parasita-célula hospedeira é buscar compreender o “diálogo” bioquímico e molecular que se estabelece entre estas células, traduzir esta linguagem é de fundamental relevância para que os pesquisadores possam compreender quais artifícios o parasita utiliza no processo de invasão e quais são usados para burlar as defesas da célula hospedeira, deixando-a tão suscetível à invasão do parasita (TODOROV et al., 2000).

Identificar as proteínas do parasita, os receptores da célula hospedeira, assim como compreender a cascata de sinalização envolvida poderá abrir um leque de possibilidades de alvos terapêuticos com a finalidade de interromper o ciclo de invasão do parasita em nível celular. Pois *T. cruzi* liga-se a receptores na superfície das células do hospedeiro, o que leva a sua internalização no vacúolo parasitóforo (CHUENKOVA; PERRIN, 2008)

O uso da biblioteca de anticorpos de scFv tendo como alvo a proteína recombinante rP21 proporcionará novos parâmetros através da caracterização de clones específicos anti-rP21 que contribuirá para uma maior compreensão da biologia da proteína possibilitando a descoberta de novos dados, corroborando com os resultados existentes envolvendo os mecanismos de invasão celular do parasita, dessa maneira podendo chegar a um entendimento mais específico da internalização do *T. Cruzi* em células de mamíferos. O tratamento convencional contra o *T. cruzi* com Benznidazol (N-benzil-2-nitro-imidazol-1-acetamida) e nifurtimox não apresentam atividade significativa na fase crônica da doença de Chagas (LAURIA-PIRES et. al, 2000; CANÇADO, 2002). Além disso, os metabólitos (eletrofilicos) formados por meio do mecanismo de ação dessas drogas possuem baixa especificidade de ação pelas vias bioquímicas do parasita, o que contribui para os efeitos citotóxicos observados no tratamento dos pacientes (CASTRO, MECA, BARTEL, 2006).

Estudos anteriores mostraram que a proteína P21 do *T. cruzi* é um componente essencial para a infecção e permanência do parasito no hospedeiro. Desta forma, anticorpos que bloqueiam a ação da P21 podem constituir um importante alvo terapêutico. Nesse contexto, considerando os surtos da doença e a falta de um tratamento eficaz, a prospecção de novas formas terapêuticas mais específicas, não tóxicas e com eficácia nas diferentes fases da doença, é de grande relevância no cenário internacional e poderá beneficiar milhões de pessoas no Brasil e no mundo.

### **3. OBJETIVO**

- ✓ Isolar e expressar anticorpos recombinantes scFv bioativos anti-rP21.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Cultura celular**

Células Vero (Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ), macrófagos provenientes de medula óssea imortalizados (iMoB/6) (gentilmente doadas pelo Ms. Alexandre Luiz Neves Silva do Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata, da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto), foram utilizados para os experimentos.

#### **4.2. Parasita**

Tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) da cepa G (mantidos em células Vero, em meio DMEM, 10% SFB, foram utilizados nos ensaios.

#### **4.3. Expressão e purificação da proteína rP21**

A proteína recombinante rP21 previamente construída pelo nosso grupo de pesquisa foi expressa e purificada de acordo com SILVA, et al., 2009.

Clones de *E. coli* da linhagem BL21, transformadas com plasmídeo pET-28a(+) (Novagen) contendo o gene codificador da P21 foram crescidas em um pré-inóculo a 37°C em meio LB com o antibiótico canamicina (15µg/mL) por 18h. O pré-inóculo foi

diluído 1:50 do mesmo meio e incubada a 37°C, com agitação a 150 rpm, até atingir Abs.600=0,6-0,9 quando foi adicionado 1mM de Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), para indução da produção protéica, e deixou-se incubando mais 3 horas. A cultura pós-indução foi centrifugada a 1600 x g por 10min a 4°C, e o precipitado foi ressuspensionado em PBS gelado, na proporção 2 ml de PBS para cada 100 ml da cultura. O material foi congelado durante a noite e, após descongelamento, foi incubada com 1mg/mL de lisozima por 20 minutos antes de ser sonicado. A amostra sonicada foi centrifugada em tubos *eppendorfs* de 1,5mL a 20200 x g por 20min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em tampão com uréia 6M (Amresco 0378).

A amostra foi incubada com resina de níquel, para purificação da proteína recombinante rP21, e incubado por 2h sob agitação a 4°C. Após três lavagens em *Binding Buffer* (imidazol 5mM, NaCl 500mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M), a resina foi lavada três vezes com *Washing Buffer* (imidazol 20mM, NaCl 500mM, Tris-HCl 20mM pH 8,0, uréia 6M) e, por fim, quatro eluições com *Elution Buffer* (imidazol 1M, NaCl 500mM, Tris-HCl 20mM pH 8,0, ureia6M), contendo alta concentração de imidazol para competir com a cauda de histidina pela coluna de níquel e liberar a proteína recombinante purificada.

Todo o material eluído foi dialisado em PBS com uma membrana de diálise de 3,5 kDa (Spectra/Por 131198) por 48 horas para a purificação da proteína dos resíduos de uréia e outros. A concentração da amostra foi quantificada por espectrofotometria utilizando-se a técnica de Bradford (Bradford, 1976) e um gel de SDS-PAGE 13% (Laemmli, 1970) com coloração de Coomassie foi realizado para se verificar a pureza da proteína recombinante eluída a partir da observação de uma banda de massa ideal isolada.

#### 4.4. Linhagens bacterianas

As linhagens de *E. coli* utilizadas durante o *biopanning* foram:

- **XL1-Blue** (Stratagene): *recA1 end A1gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [ F' Pro AB lacI<sup>q</sup> lacIqZ M15Tn10(Tet<sup>R</sup>)*. (SAMBROOK et al., 1989). Utilizada na produção de partículas virais.
- **Top 10** (Invitrogen): F- *mcrA*  $\Delta$  (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15 $\Delta$  *lacX74 recA1 araD139 $\Delta$  (araleu) 7697 gal*

U *Gal* K *rpsL* (StrR) *endA1 nup* G. Utilizada na expressão dos scFvs.

#### 4.5. Vetor fagomídeo

**pComb3XSS f(-):** 4,5 kb, *lac7*, *ori* ColE1, *ori* fl, *Amp<sup>R</sup>*. Possui a sequência codificadora para parte da proteína III de bacteriófagos filamentosos (aminoácidos de 230 a 406). Apresenta ainda códon de parada âmbar (TAG), não reconhecido eficientemente por linhagens supressoras (Sup E49) como a XL1-Blue ou ER2537, mas reconhecido por cepas de bactérias não supressoras como a TOP 10. Isto possibilita tanto a expressão de proteínas fusionadas a proteína III do fago quanto solúveis. Possui uma região com seis histidinas (H6), logo após o sítio de clonagem do gene, para purificação em coluna de níquel e uma região codificadora de resíduos que constituem o epítipo de uma hemaglutinina (HÁ) que possibilita a detecção do scFv com utilização de um anticorpo anti-HA (SCOTT; BARBAS, 2001).

#### 4.6. Bacteriófago auxiliar

**VCSM13 :** Derivado do bacteriófago M13 com o gene II mutado; origem de duplicação plasmidial derivada do p15 e gene de resistência à kanamicina (Stratagene)

##### 4.6.1 Preparação do bacteriófago auxiliar

Todo procedimento para preparação do fago auxiliar foi realizado de acordo com o protocolo descrito por (Barbas et.al. 2001)

##### 4.6.2 Obtenção de placas de lise

Para amplificação das placas de lise, foram inoculados 50 µL de células XL1 - Blue eletro-competente em 50 ml de meio SB pre- aquecido a 37 °C, com tetraciclina 10 µg/ml, em tubo Falcon de 50 ml e incubada a 37°C durante uma hora sob agitação. Uma placa de lise foi transferida com auxílio e um palito estéril ao tubo contendo a cultura de bactérias, para que ocorresse a infecção, em seguida, o tubo foi incubado a 37°C sob

agitação durante 2 horas. A cultura infectada foi transferida para um Erlenmeyer de 1 litro com 250 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, suplementando com tetraciclina 10 µg/ml, e incubada a 37°C sob agitação durante 1 hora. Após este período, foi adicionada Kanamicina 70 µg/mL e houve incubação a 37°C sob agitação, por 16 horas. Em seguida, a cultura foi transferida para tubos estéreis, centrifugando a 2500 X g, durante 15 minutos. O sobrenadante foi estocado em tubos estéreis a 4 °C.

#### **4.6.3. Amplificação do fago *helper* VCSM13**

Para a amplificação das placas de lise, foram inoculados 50 µL de células XL1 – Blue eletrocompetente em 50 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, com tetraciclina 10 µg /mL, em um tubo Falcon de 50mL e incubado a 37°C durante uma hora sob agitação. Uma placa de lise foi transferida com auxílio de um palito estéril ao tubo contendo a cultura de bactérias, para que ocorresse a infecção, em seguida, o tubo foi incubado a 37°C sob agitação durante 2 horas. A cultura infectada foi transferida para um Erlenmeyer de 1 litro com 250 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, suplementado com tetraciclina a 10 µg/ mL, e incubada a 37°C, sob agitação por 16 horas. Em seguida, a cultura foi transferida para tubos estéreis, centrifugando a 2500 x g durante 15 minutos e o sobrenadante coletado em tubos novos. O sobrenadante foi submetido à incubação a 70°C durante 20 minutos para eliminar as células residuais, então, foi centrifugada a 2500 x g, durante 15 minutos. O sobrenadante foi estocado em tubos estéreis a 4°C.

#### **4.6.4. Determinação do título da preparação de fagos auxiliares.**

Para determinar o título da preparação dos fagos auxiliares, os mesmos foram inoculados em 2 ml de meio SB, contendo tetraciclina (10µg/ml) e 2 µL de células XL1-Blue eletrocompetentes, as quais foram previamente incubadas a 37°C em agitação até atingir a uma OD a 600 nm entre 0,6 a 1,0. As células foram distribuídas em alíquotas de 50 µL em microtubos e adicionando 1µL de fagos auxiliares diluídos ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ ) e incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos. Foram adicionados os 50 µl de células infectadas a 3 ml de meio LB top ágar, misturado e espalhado em placas contendo meio LB ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas e após este período as placas de lise foram contadas e o título de fagos foi determinado em unidades formadoras de placas (pfu) por mL de fagos.

#### **4.7. Biblioteca de fragmentos de anticorpos expostos em fagos - scFv**

Ao final de todo o processo de construção, foi obtida uma biblioteca da ordem de  $2 \times 10^8$  seqüências de fragmentos de anticorpos scFv (CARNEIRO, 2013).

Por ser uma biblioteca com alta variabilidade, muito acima da quantidade de anticorpos nativos esperados, e com scFvs já selecionados com outros alvos biológicos, utilizamos esta biblioteca para a obtenção de fragmentos de anticorpos humanos anti-rP21 que apresentassem especificidade com possibilidade de sucesso.

#### **4.8. Reamplificação da biblioteca de scFv**

Foram inoculados 50  $\mu$ L de células XL1-Blue eletrocompetentes em 50 mL de meio SB contendo tetraciclina (10  $\mu$ g/ml). A cultura foi agitada a 37°C até atingir OD a 600 nm de 1,0. Na cultura foram adicionados 50  $\mu$ L da biblioteca seguida da incubação em temperatura ambiente durante 2 horas. Em seguida foram adicionados carbenicilina (50  $\mu$ g/mL) e glicose para uma concentração final de 2%. Nessa etapa, foi possível titular a saída dos fagos infectados inoculando-se 1  $\mu$ L das diluições de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  da cultura infectada em placas contendo LB ágar suplementado com carbenicilina e 2 % de glicose. Os 50 ml de cultura infectada foram incubados a 37°C durante 1 hora. Após esse período foram adicionados mais de 15  $\mu$ L de carbenicilina (100  $\mu$ g/mL) seguida de nova incubação a 37°C por 1 hora. A cultura foi sedimentada por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos e ressuspensa em 50 mL de SB contando os antibióticos nas proporções anteriores. Em seguida foram adicionados 2 mL do fago auxiliar VCSM13 e 150 mL de meio SB contendo carbenicilina (50  $\mu$ g/mL) e tetraciclina (10  $\mu$ g/mL). A cultura total foi incubada nas mesmas condições por 16 horas.

Em seguida, a cultura foi submetida á centrifugação a 3000 x g durante 15 minutos a 4 °C. O sedimento foi estocado a -20°C para futuras preparações plasmidiais. Ao sobrenadante foram adicionados 8g de PEG 8000 (polietilenoglicol) e 6g de cloreto de sódio e agitado a 250 rpm, durante 10 minutos a 37° C. Em seguida, o sobrenadante foi incubado em banho de gelo durante 30 minutos. Os fagos foram coletados por centrifugação a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a garrafa mantida invertida sobre papel toalha, por pelo menos 10 minutos. Para garantir a secagem do sedimento, as bordas da garrafa foram enxugadas com papel toalha. O

sedimento foi ressuspendido em 2 mL de TBS-BSA 1% (*tris buffered saline*) contendo soro albumina bovina 1% (p/v), a suspensão foi transferida para dois microtubos e centrifugada a 12.000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante contendo as partículas virais foi transferido para um tubo novo estocado a 4°C.

#### **4.9. *Biopanning* peptídeos ligantes a proteína rP21.**

Para a seleção de anticorpos ligantes a proteína recombinante, foi utilizada uma biblioteca *naive* de scFv fusionados a proteína pIII previamente construída no laboratório (CARNEIO, 2014). Ao final de todo o processo de construção, foi obtida uma biblioteca da ordem de  $4,6 \times 10^6$ . Todo o *biopanning* foi realizado de acordo com o protocolo de Barbas et al, 2001, com algumas modificações.

Poços de uma placa de microtitulação (*MAX™ Standard Set*) foram sensibilizados com tampão bicarbonato/carbonato (pH 7,0) com 1µg da proteína recombinante rP21 durante 16h a 4°C. Posteriormente, a placa foi bloqueada com PBS-BSA 5% por 1 hora. Em seguida biblioteca de fragmentos de anticorpo foi adicionada e incubada por 1 hora a 37°C. Após a este período, os poços foram lavados 10 vezes com TBS *Tween*-20 (PBS-T) 0,05%. Em seguida os clones foram eluídos com glicina 1M pH= 2.5 por 10 minutos. Os clones eluídos foram titulados e amplificados em meio SB e após o ciclo de seleção os fagos foram amplificados em bactéria XL1-Blue *overnight* com adição do fago *helper*.

#### **4.10. Produção do scFv solúvel para os clones selecionados do *Biopanning*.**

Em placas do tipo *deep well* de 96 poços foi adicionado, a cada poço, 1 ml de meio SB contendo carbenicilina a 50 µg/ml a 2% (v/v) de glicose 2M, seguido pela inoculação de colônia de bactérias TOP 10 transformados com a biblioteca de scFv advinda do *biopanning*. A placa foi selada com filme plástico, sendo o mesmo perfurado para permitir a aeração, seguida pela incubação por 14 horas a 37°C e 300 rpm. No dia seguinte, 50 µl de cultura de cada poço contendo clone de scFv foram transferidos para outra placa contendo, novamente, 1mL por poço de meio SB acrescido com carbenicilina a 50 µg/ml a 37°C e 300 rpm. Após incubação por 4 horas, a placa foi centrifugada a 3.700 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Os pellets de bactérias foram

então ressuspensos em 1 mL de meio SB contendo 50 µg/mL de carbenicilina (Sigma-C1389) e 2,5 mM de IPTG (Sigma – 16758-5G). A placa, foi novamente incubada por 18 horas a 30°C e 300 rpm, e no dia seguinte foi submetida a centrifugação de 3.700 rpm durante 15 minutos a 4°, o pellet foi estocado com glicerol 25% a -20°C e o sobrenadante contendo moléculas de scFv na forma solúvel foi transferido para outra placa de armazenamento a 4°C até ser utilizado nos ensaios de ELISA.

#### **4.11. Teste ELISA para análise da expressão heteróloga de moléculas scFv.**

Este ensaio foi realizado para detectar clones que expressavam scFv no sobrenadante de cultura induzida por IPTG. Placas de microtitulação foram sensibilizadas durante a noite a 4°C com o sobrenadante da cultura induzida, em tampão bicarbonato. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com 300 µL de PBS-BSA 5% durante 1 hora a 37°C. Na sequência, o bloqueio foi descartado e a placa lavada 3 vezes com PBST e foram adicionados 50 µl do anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Roche, 12013819001,) na diluição de 1:2500 em PBS-BSA 5% e a placa foi mantida por 1 hora a 37°C, sob a leve agitação. O anticorpo foi descartado e a placa lavada 3 vezes com PBST. Para revelar a reação, foram utilizados 50 µL do substrato OPD ( ortofenilenodiamina-Sigma, St.Louis, Missouri, EUA) e peróxido de hidrogênio ( 10 mg de C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> + 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% + 25 mL de tampão citrato fosfato 0,1 M pH 5,0) incubados à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 30 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida com 30 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>2N. A leitura da reação foi realizada em leitora de ELISA (Multi Scan Plus Versão 2.03) no comprimento de onda de 492 nm, considerando-se os brancos (controles negativos) contendo sobrenadante de cultura de bactérias transformadas com pComb3XSS vazio.

#### **4.12. Elisa para a seleção dos clones mais reativos**

Para selecionar os svFvs mais reativos ligantes da proteína, foi feito um ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA). Uma placa carregada de 96 poços (Maxsorp-NUC-44-2404-21) foi sensibilizada com a proteína rP21 na proporção de 1 µl para cada 10 µl do tampão Bicarbonato carbonato 0.1 M pH 9.6. Em seguida, bloqueou-se a placa com o tampão de PBS-BSA 5% por 1 hora a temperatura ambiente. Lavou-se 3 vezes a placa com PBST 0,05% *Tween* e adicionou o sobrenadante dos fagos, o qual

ficou incubando por 1 hora a 37°C. Foi feito 3 lavagens com PBST 0,05% e posteriormente adicionou-se o anticorpo anti-HA (Roche – 12013819001) marcado com peroxidase na diluição de 1:2500 por 1 hora a 37°C. Lavou-se, novamente a placa 3 vezes com PBST 0,05% de tween e em seguida a mesma foi revelada com Sigma *Fast*™ OPD (Sigma – Aldrich –P9187-50SET). A reação foi finalizada utilizando-se 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 4N. A leitura foi feita em leitor de microplaca (Thermo Plate) a 492 nm.

#### **4.13. Produção de scFv em maior escala**

Os clones selecionados por ELISA foram utilizados para avaliações mais específicas. Para realizar os seguintes ensaios, os clones foram induzidos novamente, porem num volume maior de cultura. Inicialmente um pré-inoculo de 50 mL de meio SB, contendo 10 µl (retirados do backup do scFv já transformados em *E. coli* TOP10, item 4.9), 1mL de glicose 2M e 50 µl de carbenicilina mantido overnight mantidos a 37°C. No dia posterior utilizamos 4 mL do pré-inoculo em 200 mL com carbenicilina (1:1) e glicose (1:50) num período de amplificação de 5 horas, por 37°C. Essa cultura foi centrifugada em tubos de centrifuga numa rotação de 5000 rpm, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 500 mL de meio SB, induzido por IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 2mM/mL e carbenicilina overnight, mantidos a 30°C. No último passo centrifugamos o amplificado utilizando tubos de centrifuga, numa rotação de 10.000 rpm, 20 minutos a 4°C, nesse passo guardamos o sobrenadante a 4°C para ser utilizado na cromatografia de afinidade por HPLC e o pellet é descartado.

#### **4.14. Purificação de scFv por cromatografia de afinidade em HPLC**

O sobrenadante de cultura de 500 mL resultante da expressão de fragmentos de scFv foi então submetido à purificação em cromatografia de afinidade liquida no HPLC e todos os reagentes utilizados e o manuseio técnico do equipamento seguiu a recomendação do fabricante. As frações que apresentaram maiores concentrações foram reunidas em um tubo de membrana Amicon 3Kda ( Milipore, EUA), centrifugadas com volume máximo de 15 mL, por 30 minutos a 4000 g, os scFvs eluidos do HPLC foram

lavados para retirada do excesso de sal e dosados de acordo com método de ácido bicinonínico (BCA) de dosagem de proteínas.

#### **4.15. ELISA dos scFvs purificados contra rP21 e extratos totais de *T. cruzi* cepa G**

Para verificar a integridade dos clones de anticorpos purificados de scFv e a especificidade após a purificação foram realizados ensaios de ELISA seguindo os mesmos procedimentos do item 5. Nesse ensaio foram utilizados como alvo além da rP21, extratos totais da cepa G. Esses extratos foram congelados em nitrogênio líquido e lisados por 3 ciclos de temperatura, congelamento e descongelamento do tubo contendo o extrato, nesse passo usamos um inibidor de protease para não comprometer a integridade da membrana celular da molécula. Outro teste de eficiência dos clones utilizando ELISA foi à desnaturação por beta-mercapto-etanol numa temperatura, de 100°C por 5 minutos.

#### **4.16. Dot blot**

Tiras foram cortadas de uma membrana de nitrocelulose 0,45 µM (Hybond ECL, Amersham Biosciences), 1 tira para cada clone. Essas membranas foram colocadas em um recipiente pequeno (Ex. tampa de Falcon de 50). Para cada clone utilizamos uma membrana diferente, pingando 10 µL de scFv, 10 µL de PBS BSA 5% (controle negativo) e 1 µL de anti-HA. Após as membranas secarem em temperatura ambiente e bloqueadas com 2mL de PBS-BSA 5% por 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida, precedeu-se as lavagens (3X) com PBST 0,05%. Os clones selecionados foram incubados por 1 hora com o anticorpo secundário anti-HA conjugado com peroxidase (1:2500) em PBS-BSA 5% , sob agitação a TA. Mais 3 lavagens foram realizadas e a revelação ocorreu com o substrato DAB. Ao surgimento da marcação a membrana foi lavada em água destilada e deixou-se secando overnight.

#### **4.17. Sequenciamento e bioinformática**

O DNA dos clones selecionados foram extraídos de bactérias TOP 10 utilizando-se o Kit Gen Elute Plasmid Miniprep (sigma-aldrich), seguindo as instruções do fabricante. Na reação de seqüenciamento utilizamos o Kit Dye Terminator.

As amostras foram preparadas em uma placa de 96 poços contendo aproximadamente 500 ng de DNA plasmidial e 5 picomoles do oligonucleotídeo MMB4 (senso) ou MMB5 (reverso) em um volume final de 10 µl em cada poço, completando com água de injeção quando necessário. Utilizamos um termociclador de placas com 35 ciclos (Master Cycler Eppendorf) nas condições seguintes: 95°C (desnaturação da fita por 20 minutos), 50°C (Acoplamento do *primer* por 15 minutos), 60°C (extensão da fita por 1 hora). Ao fim o DNA foi precipitado com 1 µl de Acetato de Amônia e 27,5 µl de etanol absoluto. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 3700 rpm, numa temperatura de 4°C e o sobrenadante descartado, 150 µl de etanol 70% foram adicionados e centrifugado novamente por 15 minutos a 3700 rpm a 4°C, descartando o sobrenadante.

A leitura do sequenciamento foi feita no sequenciador de DNA automático MegaBace 1000 GE no laboratório de Nanobiotecnologia (UFU). A variabilidade as sequencias de scFv foi analisada na ferramenta online IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>).

#### **4.18. Método colorimétrico da resazurina (AlamarBlue®)**

Os efeitos dos scFvs sobre a viabilidade das células foram testados em macrófagos imortalizados pelo teste de Alamar Blue. A resazurina principio químico do Alamar Blue tem cor azul e não fluorescente, em células viáveis ela é reduzida a resofurin e passa então a apresentar cor rosa e fluorescente (RÓLON et al., 2006 O'BRIAN et al, 2000).

Macrófagos imortalizados de camundongos BL6 foram plaqueados em placas de 96 poços em uma quantidade de  $2 \times 10^4$  por poço, em 100 µl de meio de cultura. Os scFvs foram diluídos em PBS em concentrações de 1, 15 e 30 µg/mL e expostas á célula num período de incubação de 24 hs, em estufa de CO<sub>2</sub>, numa temperatura de 37°C. Após esse período foi acrescentando em cada poço junto as scFvs e ao MØ ( Macrófagos imortalizado) 8µl de resazurina no período de 24 hs. As células foram mantidas novamente na estufa, com papel alumínio. A leitura foi realizada com espectôfotometro (Spectra Max, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) a 494 nm para análise da viabilidade celular.

#### **4.19. Ensaio de invasão celular usando scFv**

Nos ensaios de invasão para estudar o papel do clone D5 na invasão celular, foram utilizadas células de Macrófagos imortalizados plaqueadas em lamínulas estéreis redondas de 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços. A suspensão de 500 µl contendo  $6,0 \times 10^4$  células foi colocada em cada poço e deixada em *overnight*. Antes da incubação na célula no dia posterior foi feita uma pré-incubação parasito e scFv em tubos *ependorfs* em um período de 2 horas, no intuito de que manter uma maior interação entre o clone e *T. cruzi*. As células foram incubadas por 2h com 10 parasitas por célula junto com o scFv à 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e logo lavagens realizadas gentilmente para evitar a perda de células foram feitas, 3 vezes com PBS. Após lavagem, solução Bouin (73,4% de ácido pícrico, 23,8% de formaldeído e 4,8% de ácido acético) deve ser adicionada aos poços por 15 min para fixação. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e coradas com Giemsa por 4h. As lamínulas foram descoradas em soluções contendo concentrações decrescentes de acetona e crescentes de xilol e após secagem das mesmas, prosseguirá com a montagem das lâminas de vidro usando Entellan (Merck). As lamínulas devem ser observadas em microscópio de luz no aumento de 100X. Parasitos intracelulares foram contados em 100 células coradas em triplicata.

#### **4.20. Análise estatística**

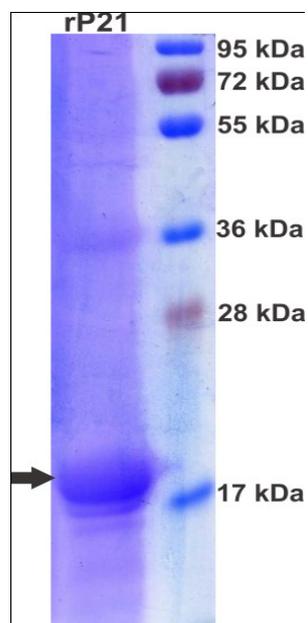
Os experimentos foram realizados em triplicata. A significância dos experimentos foi determinada pelo método ANOVA, com pós-teste Bonferroni, pelo Graph Pad Prism (©GraphPad Software Inc, 1992-2007) versão 5.01. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1. Purificação da proteína recombinante rP21**

Por meio da técnica de cromatografia de afinidade por coluna de níquel e dialise contra PBS, o processo de obtenção da proteína rP21 recombinante foi realizado utilizando um protocolo já estabelecido e otimizado por cromatografia de afinidade ao níquel (SILVA, 2007). A proteína recombinante purificada foi analisada em SDS-PAGE e

o perfil de possíveis contaminantes foi verificado no final da purificação, confirmando a eficiência na produção. A proteína foi dosada por Bradford, sendo a concentração obtida de 2 mg/mL em uma cultura amplificada em 1 L (Figura 6).



**Figura 6. SDS-PAGE corado com coomassie blue.** A - seta indica a posição correspondente à proteína de 21 kDa à esquerda e o peso molecular à direita.

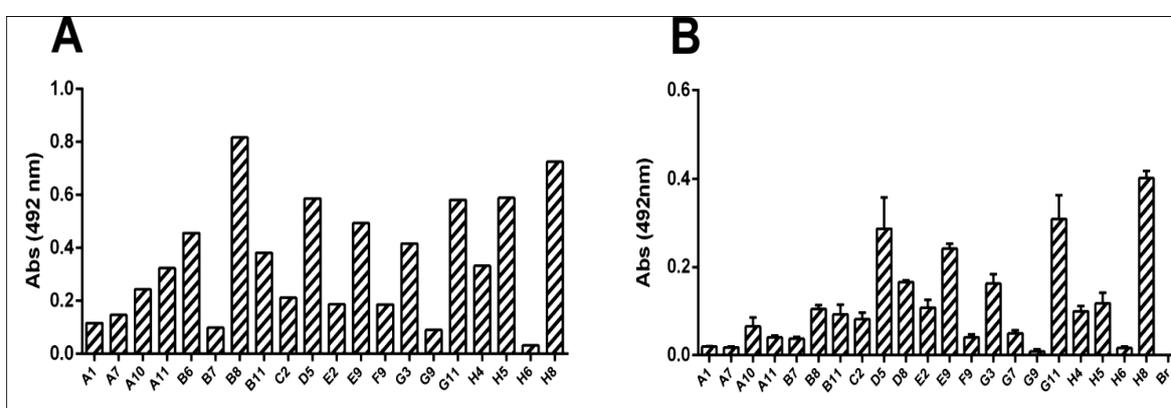
## 5.2. Seleção de anticorpos recombinantes contra a proteína rP21 de *T. cruzi*.

Uma biblioteca de anticorpos previamente construída foi utilizada como fonte de clones *naive* contendo scFv expressos na superfície de fagos filamentosos. Moléculas de scFvs ligantes a rP21 foram selecionadas, este processo ocorreu em um único ciclo de seleção dos quais constituíram em scFvs reativos a proteína. Fagos presentes no eluato do 1º ciclo foram amplificados em XL1-Blue, em seguida o plasmídeo foi extraído e utilizado para transformação em bactérias TOP 10, essa linhagem de *E. coli* foi requerida para a expressão de moléculas de scFv sem a porção da proteína pIII.

### 5.3. Expressão de scFv solúveis

Os clones de scFv foram induzidos com IPTG, depois de transformados na TOP 10 (n = 96 contra cada clone de scFv) e selecionados por ELISA, quanto a expressão dos scFvs no sobrenadante de cultura como mostrado na Figura 7.

Os ensaios de ELISA foram realizados exclusivamente para verificar a expressão dos clones através do epítipo de hemaglutinina (HA) fusionado ao fragmento de anticorpo clonado no vetor pComb3XSS de 96 clones testados somente 17 foram positivos, ou seja estavam expressando scFv (Figura 7).



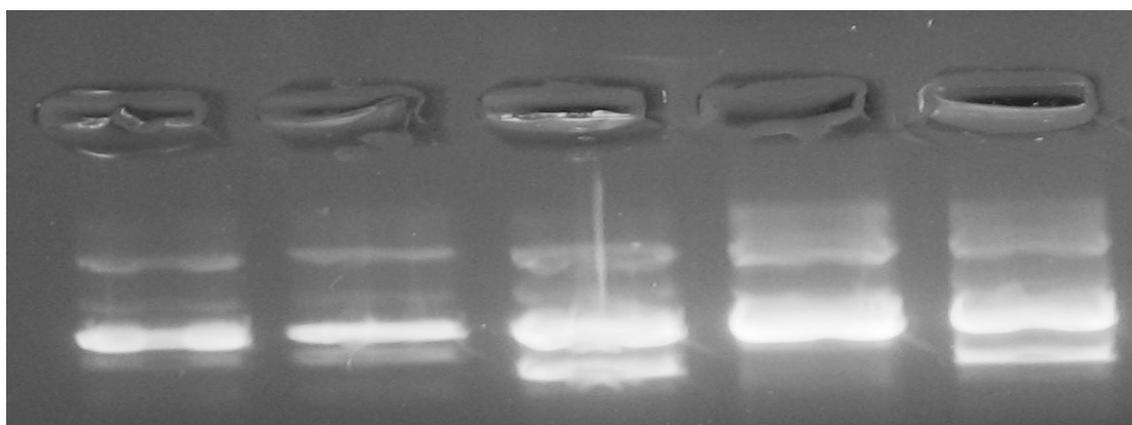
**Figura 7. ELISA para a análise da reatividade dos scFvs selecionados.** **A** - Ao final do último round clones de scFv foram testados para verificar a expressão e análise de quais dos fragmentos possuem maior viabilidade em sua expressão. **B** - Os poços foram sensibilizados com a proteína recombinante rP21 e a eficiência das interações dos scFvs solúveis expressos pela TOP 10 foi testada. Os clones selecionados apresentaram uma OD superior a (0,2).

Os clones positivos que expressaram o epítipo de hemaglutinina foram utilizados em um novo ensaio imunoenzimático ELISA, que possibilitou a validação de fragmentos de anticorpos reativos a proteína recombinante rP21.

A reatividade foi testada utilizando placas de microtitulação para ELISA, onde 20 clones foram selecionados contra o alvo. Esse ensaio possibilitou a seleção de 5 clones que apresentaram uma OD superior quando comparados aos demais (Figura 7B). Dessa forma esse resultado revelou os fragmentos de scFv que possuem maior reatividade a molécula alvo, sendo utilizados para testes posteriores de purificação em larga escala e ensaios celulares *in vitro*.

#### 5.4. Extração do DNA dos fagomídeos e sequenciamento.

Após a detecção dos scFvs mais reativos a proteína, a extração de DNA dos clones foi realizada para que esses fragmentos pudessem ser sequenciados e a variabilidade de suas sequências analisada. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose (Figura 8) e a sequência de cada clone foi determinada por sequenciamento (Tabela 1).



**Figura 8. Análise da extração de DNA plasmidial dos clones para montagem da reação de sequenciamento.** As bandas representam os clones D8, E9, H8, G11 e D5 respectivamente.

**Tabela 1. Sequência de aminoácidos dos clones de scFvs reativos a rP21.**

Alinhamento dos 2 clones selecionados, os CDRs (1 a 3) encontram-se sublinhados.

scFv	Sequência VL
<b>D5</b>	EVQLLESGAEVKKPGVSEDLLGFVIQLYWIQLYQQLDLGAPDARERPGVDGDDSLFLPTTT RPSKGHVTFVSVDKSISTATCSGAARXRTPHVLLCETGKCGIQLGPLLIS
<b>G11</b>	VMTQSPSAVSASVGDRTITCRAS <u>QDIGIWLAWYQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISRLEPEDFAVYLLFKQY <u>GHPHLPVGP</u>

scFv	Sequência VH
D5	EVQLLESGAEVKKPGESLRISCKASGFSFTSSWINWVRQMPGKGHGVDGDDSLVLP <del>TTTRPFQGHV</del> TFSVDKSISTAIPAVE <u>QPEGLGHRHVLLSRDIRKLSVYTAPFDIWGQGTAVTVSS</u>
G11	EVQLVESGVRLGPAWXGPDSPVQPLDSPFSSYWMTWVRQAPGKGSVVGQRSKMEVRNTMWTL RAEFSISRDN <del>SRDTLYLQMN</del> SLKTGDTAVYFCVRDPHYDLFTAARHDTG <u>FHF</u> WGQGT <del>LVTVSS</del>

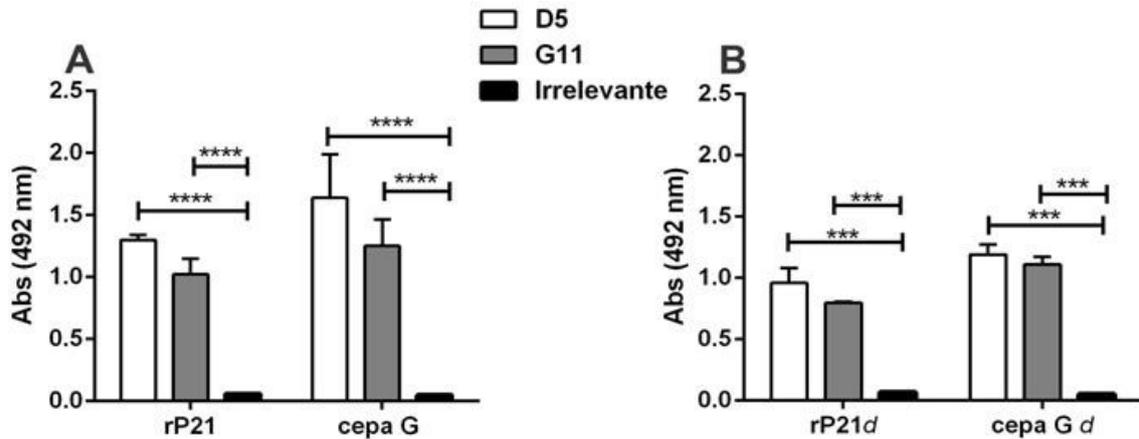
### 5.5. Purificação de scFv por cromatografia de afinidade e análise das frações eluídas.

Após os testes anteriores 2 clones produtores de scFvs foram submetidos a um processo de amplificação e expressão induzidos por IPTG num sistema de produção capaz de expressar partículas de scFvs em uma concentração ideal para ensaios celulares. A purificação foi realizada por Cromatografia de Eficiência Líquida (HPLC) uma vez que o scFv solúvel contém uma cauda de histidina (His Tag), podendo ser purificado em coluna de afinidade contendo íons de níquel. Os clones foram dessalinizados em membrana de Amicon, dosados e testados em *dot blot* para a visualização da banda em membrana de nitrocelulose utilizando o anticorpo anti-HA (Figura 10). O rendimento obtido dos clones purificados se manteve em torno de 100 e 600 mg/mL.

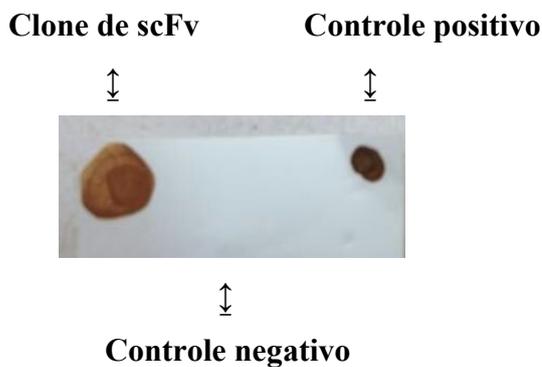
Os fragmentos de anticorpos purificados foram testados quanto a especificidade biológica por imunoenensaio enzimático (ELISA). Os resultados mostraram que os clones D5 e G11 produziram scFvs que reconhecem a proteína recombinante rP21 confirmado os testes anteriores dos scFvs solúveis, esses mesmos fragmentos foram testados também em extratos totais de Tripomastigotas de Cultura de Tecido (TCT) de *T. cruzi* da cepa G, cultivados em células vero e coletados do sobrenadante quando rompiam a célula, esses parasitas foram congelados em tampão de lise para evitar a degradação das proteínas.

Extratos foram utilizados para verificar a reatividade dos fragmentos não só a rP21 mas uma possível interação ao *T. cruzi*, esse resultado mostra agora uma eficiência nova, onde o clone D5 e G11 podem reconhecer a forma nativa do parasito. A reatividade dos anticorpos recombinantes foi testada, também, após a desnaturação das moléculas alvo por temperatura (rP21 e extrato total). Os scFvs continuam reconhecendo seu alvo mesmo que este esteja desnaturado, nesse ensaio notamos uma maior eficiência do clone D5, podendo ser testado numa interação mais específica com os TCTs (Figura 9). Foram

utilizados nos testes um scFv irrelevante para verificar com mais veracidade a eficiência da ligação.



**Figura 9. Ensaio Imunoenzimático com os clones D5 e G11 selecionado por *Phage Display*.** **A** - Clones D5 e G11 foram testados contra a proteína rP21 e Extrato de *T. cruzi* Cepa G, o clone D5 mostrou uma maior reatividade após purificação. **B** - A especificidade foi testada com a desnaturação da proteína recombinante mostrando uma possível ligação a uma porção linear. Os extratos totais também foram testados e os scFvs se mantiveram reativos mostrando uma ligação significativa.



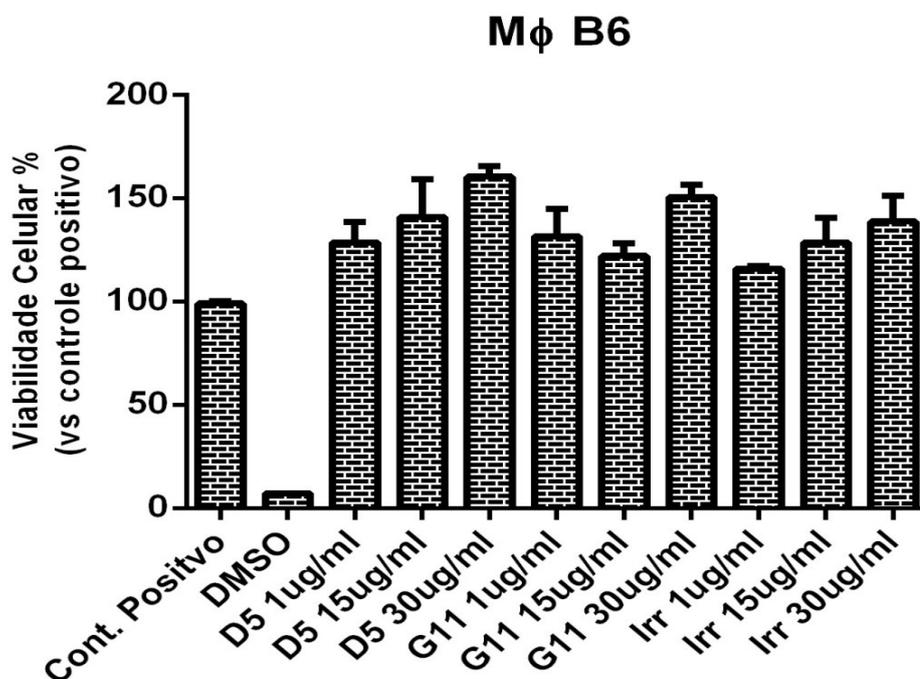
**Figura 10. Análise por *dot blot* dos clones expressos e purificados por HPLC.** As marcações foram consideradas positivas dos fragmentos de scFv em membrana de nitrocelulose utilizando o anticorpo anti-HA. O clone D5 e G11 apresentou o mesmo perfil de marcação na membrana.

Esses resultados demonstraram que os scFvs selecionados reconhecem epítomos *naive*, bem como linear, quando o antígeno foi desnaturado.

### 5.6. Ensaio de Citotoxicidade (Alamar Blue®)

Com o intuito de analisar a viabilidade celular que esses fragmentos de anticorpos causam na linhagem de MØ os scFvs dos clones D5 e G11 foram testados durante 24hs para a verificação do metabolismo celular.

Os resultados demonstram que esses scFvs não apresetaram citotoxicidade nas concentrações testadas (Figura11).

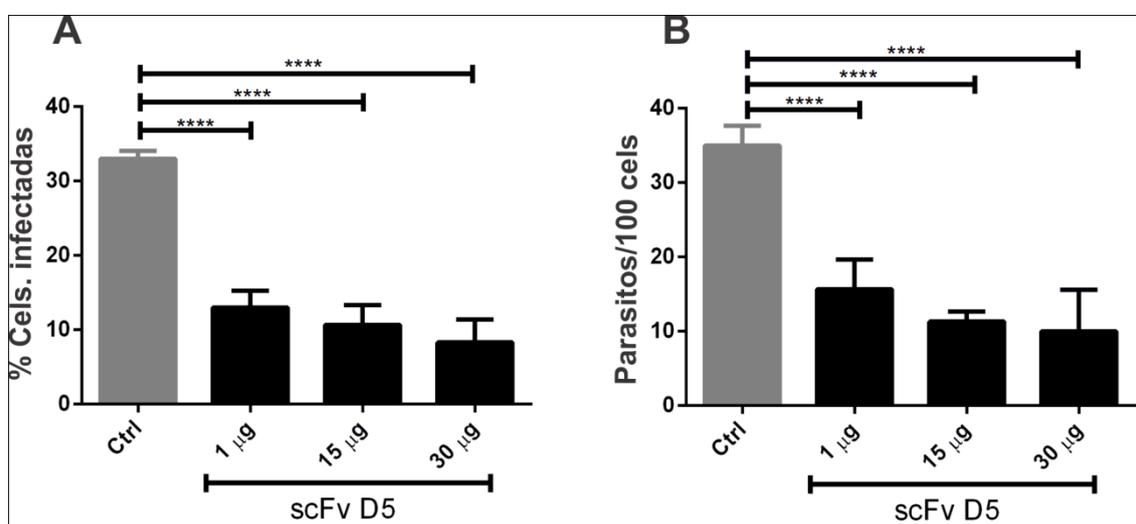


**Figura 11. Ensaio de viabilidade celular utilizando diferentes concentrações de scFv.** MØ foram incubados junto aos scFvs testados em diferentes concentrações (1,15 e 30) em um tempo de exposição de 24hs. O tratamento com os clones de scFv não apresentou citotoxicidade para a células quando comparados ao controle de morte.

## 5.7. Ensaios de Invasão Celular utilizando os scFvs

Para analisar os efeitos dos scFvs na invasão de *T.cruzi*, ensaios celulares utilizando parasitas da cepa G foram tratados junto com scFv do clone D5 (purificado, filtrado e estéril para o uso em cultura celular) em diferentes concentrações e posteriormente incubados em uma placa de cultura de 24 poços para uma interação com a linhagem celular de Macrófagos Imortalizados. A escolha do clone D5 deu-se pelo fato dele apresentar uma maior reatividade nos ensaios por ELISA e os resultados analisados por coloração de giemsa.

O numero de parasitas infectados por células foram verificados e a contagem foi otimizada de maneira que todas as células com citoplasmas intactos foram analisadas, em um numero total de 100 células. Dessa forma o vacúolo causado por *T. cruzi* poderia ser visualizado de forma íntegra intracelularmente. Esses resultados mostraram que em todas as 3 concentrações utilizadas de fragmentos de scFv, foram capazes de alterar o feito biológico da interação de *T. cruzi* com a linhagem celular, inibindo de forma significativa a invasão celular quando comparadas as controle sem tratamento \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



**Figura 12 Efeito biológico do scFv D5 na invasão celular.** A - Controle da invasão celular em macrófagos por tripomastigotas da cepa G incubados com os scFvs selecionados contra a rP21. Foram escolhidas células em regiões aleatórias nas lâminas coradas, o experimento foi realizado em triplicata para cada concentração. O controle utilizado mostra o perfil de invasão onde os tripomastigotas não foram incubados junto ao

scFv D5. **B** - A contagem de parasitas foi feita em pelo menos em 100 células verificando campos aleatórios da lamínula em microscópio invertido. O número de parasitos por célula infectada foi analisado.

## 6. DISCUSSÃO

O risco de novos casos de contaminação e os pacientes crônicos que sofrem com a doença de Chagas por ainda não existir um tratamento eficaz são atualmente grandes desafios para os países que possuem pacientes infectados. No Brasil são aproximadamente de 2 a 3 milhões de pessoas vivendo com a doença de Chagas (MARTINS-MELO et al., 2014), causando cerca de 6000 mortes anualmente (MARTINS-MELO et al., 2012).

O modelo de estudo envolvido a interação de *T. cruzi* com a célula hospedeira, e tais mecanismos moleculares envolvidos são ainda desafios a serem alcançados (AMARO, 2011). Pesquisas anteriores relatam o uso da técnica de hibridoma como uma possível ferramenta para a obtenção de imunoglobulinas secretadas por células híbridas que geraram expectativa para o tratamento de doenças. Por serem anticorpos de origem animal descobriu-se que poderiam causar alguma resposta imune quando usados em seres humanos (HOSONO, 1992., MARQUES, 2005). Tendo como objetivo o uso dessas imunoglobulinas como possíveis ferramentas no combate a doença de Chagas a obtenção pela técnica de biologia molecular expressando fragmentos de imunoglobulinas em fagos, para a seleção de ligantes foi fundamental e não apresenta restrições, onde a produção de fragmentos funcionais de anticorpo pode ser utilizado nesse trabalho e não apresentando imunogenicidade, sendo esses os primeiros anticorpos recombinantes utilizados no estudo do perfil biológico da proteína P21. A opção por utilizar a proteína recombinante nesse trabalho foi devido aos resultados promissores que o grupo tem alcançado, podendo ser uma molécula chave para elucidar mecanismos de interação entre parasita e célula (RODRIGUES, 2012).

Fragmentos de anticorpos, incluindo scFv, atualmente tem se tornado uma ferramenta poderosa e uma alternativa bastante utilizada para o tratamento de várias doenças, isso se deve a testes realizados demonstrando a boa farmacocinética e biodistribuição na terapia. O gene codificador do scFv pode ser sequenciado e facilmente modificado por engenharia genética para produzir moléculas de fusão com propriedades de diagnóstico ou terapêuticos desejáveis (LIU, 2014). Além disso, a sua produção pode

ser rápida e econômico (KAZUMA, 2013). Já existem fragmentos de anticorpos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso terapêutico humano, como o anticorpo F5 scFv-PEG utilizado contra Her2 para tratamento de câncer de mama (HOLLIGER, 2005).

Neste estudo, descrevemos pela primeira vez a expressão e caracterização de fragmentos de anticorpos (clones G11 e D5) anti-rP21, e o seu efeito frente a invasão celular de *T. cruzi* na linhagem de macrófago imortalizado. Esses fragmentos foram selecionados pela metodologia de *Phage Display* e foram capazes de reconhecer a proteína recombinante rP21. Durante o ciclo de seleção, clones dos fagos fracamente ligados foram lavados, enquanto os clones que permaneceram ligados à proteína foram amplificados e titulados e os anticorpos de ligação ao antígeno específicos foram isolados, dessa forma a seleção foi feita para isolar clones com maior eficiência ao alvo desejado.

Moléculas de scFv mostram-se efetivas em neutralizar as ações dos principais componentes tóxicos presentes em peçonhas de escorpiões (JUÁREZ-GONZÁLEZ et al., 2005), aranha *Latrodectus mactans* (BUGLI et al., 2008), vespa e serpente (DOBROVOLSKAIA et al., 2004). Em um estudo realizado na Universidade Federal de Uberlândia foi visto que o anticorpo scFv selecionado pela técnica de *Phage Display* contra toxinas presentes em peçonhas, apresentou atividades importantes por neutralizar a ação hemorrágica da peçonha (CARDOSO, 2008).

*Phage display* tem sido aplicada para a seleção de alvos que apresentem um papel promissor para o estudo de infecções parasitárias causadoras de várias doenças, selecionando e caracterizando moléculas importantes, em específico para a doença de Chagas ainda não existem muitos trabalhos na literatura, abrindo a possibilidade para novos estudos (TONELLI, 2013). O modelo de estudo das interações causadas pelo parasita da doença de chagas tem sido estudada, mas a descoberta de algum mecanismo que possa bloquear a atividade ainda não é descrita, onde nenhuma proteína secretada pelo parasita foi estudada a fundo e muitas vezes os mecanismos propostos não são desvendados por completo (SOUZA, 2010).

A utilização desses clones de scFv solúveis, apresentam um possível papel de um mediador que poderá se tornar uma ferramenta para o estudo de novos mecanismos que envolvem a internalização do parasita. De acordo com publicações peptídeos sintéticos como o domínio FLY selecionados por *phage display*, sendo uma sequência conservada e presente na família das glicoproteínas do *T. cruzi* bastante estudadas e o uso de anticorpos

policlonais estudando a motilidade do parasita tem sido demonstrado *in vitro*. (FINKELSZTEIN, 2015., TONELLI, 2010). Todas essas abordagens apresentaram eficiência nos resultados, mas nenhum desses estudos descrevem uma análise sobre uma molécula secretada, que induz a fagocitose do parasita em células de mamíferos e o uso de anticorpos recombinantes do tipo scFv que possam auxiliar na caracterização de um novo perfil biológico para a invasão celular ainda não foi publicado.

Os scFvs foram expressos de forma solúvel em *E. Coli* TOP 10 e o protocolo utilizado é descrito segundo Barbas et al. (2001) e determina o crescimento por 16 horas dos clones antes da indução por IPTG, porém nessa pré cultura é sugerido o uso de glicose. Em geral na ausência de IPTG o promotor lacZ é capaz de produzir scFv em quantidades baixas. O fato de não usar glicose na fase exponencial pode causar perda do inserto no vetor pComb3XSS, isso pode diminuir o número de scFvs na biblioteca selecionada, assim selecionamos o número de anticorpos recombinantes que apresentavam o inserto dos clones de scFv pelo uso da glicose, evitando uma possível queda de clones reativos a rP21. Essa técnica apresenta um lado prático positivo, pois os clones selecionados expressos apresentam uma menor toxicidade as bactérias e para garantir a qualidade do DNA o recomendado é que utilize glicose até a indução com IPTG. Outro fator importante é a diminuição da temperatura de 37°C para 30°C que diminui a taxa de crescimento bacteriano e aumenta a expressão de proteínas recombinantes (CARDOSO, 2008). Assim a descoberta de promotores e repressores específicos do genoma de *E. coli*, de uma variedade de vírus de *E. coli* e de células eucarióticas permitiu a manipulação da expressão de proteínas e a clonagem de genes sob o controle de um dado promotor cuja expressão pode ser induzida ou contínua. O primeiro, e mais comumente usado sistema de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é baseado no operon lac, sendo fundamental para a produção de proteínas recombinantes (FERNANDES, 2010).

Para avaliar a presença de anticorpos recombinantes após a seleção os ensaios de ELISA iniciais utilizaram os scFvs expressos que apresentaram eficiência, mostrando de fato o sucesso na expressão e os possíveis ligantes a proteína recombinante, sendo o teste de ELISA escolhido por apresentar uma estratégia mais fácil e indicada (JAPOLLA, 2014). Em nosso estudo, após a seleção dos clones imunoreativos, optamos pela expressão em grande escala que apresentou resultados satisfatórios. A purificação dos clones para testes iniciais mais específicos e a desnaturação da rP21, manteve a mesma eficiência dos testes anteriores de expressão, demonstrando que o scFv reconhece uma porção linear da proteína, porém o clone D5 apresentou uma melhor reatividade,

apontando para uma melhor atividade em sua produção e podendo ser usado em testes posteriores. Outro fator relevante foi a adaptação do protocolo para a purificação da proteína feito para eliminação de contaminantes, revelando de fato que os fragmentos de anticorpos utilizados nesse estudo mostram de forma clara sua reatividade a rP21, quando essa não apresentava nenhum tipo de contaminação ao final do processo da purificação (SILVA, 2009). A reatividade dos scFvs purificados também foi testada no extrato do parasita submetidos aos mesmos testes de desnaturação aplicados à proteína recombinante, mostrando uma possível interação a forma nativa de *T. cruzi*, em especial o clone D5 mostrou uma maior reatividade como demonstrado no ensaio com a proteína recombinante, criando caminhos para testes em linhagens celulares onde a interação entre o hospedeiro e o protozoário fossem analisadas usando a molécula de scFv como um mediador desse estudo.

Com os resultados obtidos nos ELISAs, utilizamos inicialmente o clone D5 em ensaios de citotoxicidade e invasão celular na linhagem de macrófagos imortalizados. Para estabelecer a viabilidade celular que o clone D5 apresentasse na célula, utilizamos o princípio químico de resazurina, e observamos que não foi demonstrado nenhum perfil citotóxico para o macrófago, podendo ser usado em cultura celular após a determinação do controle de células viáveis e do controle de morte celular. *T. cruzi* tratado com esse scFv e incubado com a linhagem celular demonstrou uma menor eficiência no momento da invasão, observando um bloqueio do clone D5 nos mecanismos de invasão celular. Vale ressaltar que os scFvs, após purificação, foram filtrados em membrana de Amicon (3 kDa) e lavados com PBS para retirar o excesso de sal que poderia interferir nesse processo. O clone D5 filtrado, ainda, em microfiltro contendo membrana de 22 micrometros. Esse protocolo foi estabelecido para eliminar qualquer componente residual restante do processo de purificação, evitando contaminação em aplicações usando o scFv em cultura celular (ARAUJO, 2014).

Os testes iniciais utilizando a linhagem celular de macrófagos e a utilização do clone de scFv D5 nos mostrou uma possível interação importante no momento da invasão celular, observou-se uma diminuição no número de células infectadas onde o scFv selecionado contra a rP21 atuou como um bloqueio do parasita. O fato de eliminar qualquer vestígio de impureza do clone utilizado e a preocupação em observar a viabilidade dos *T. cruzi* utilizados foi feita para o sucesso do ensaio, evitando outros vertentes na análise dos resultados. Os anticorpos scFv obtidos neste estudo podem ser expressos e produzidos em grandes quantidades em um processo mais curto do que o utilizado para

tradicional tecnologia de hibridoma, e a um custo consideravelmente mais baixo, podendo ter o anticorpo em alguns dias testado e dosado (WU, 2007).

Em conclusão selecionamos scFvs que reconhecem a proteína rP21 em sua forma natural e desnaturada, possui afinidade a extratos totais do *T. cruzi* em sua forma natural e desnaturada e apresentou eficiência considerável na invasão celular por *T. cruzi*. Acreditamos que esses scFvs podem ser úteis para um maior conhecimento da atuação da rP21 e podem colaborar com os resultados existentes para elucidar ainda mais a atuação da proteína na relação parasita-hospedeiro.

Uma análise mais aprofundada poderá trazer novas abordagens, relacionando os scFvs com a proteína recombinante e analisando com maior profundidade o perfil celular que outras linhagens podem apresentar sendo estimuladas pelos scFvs, onde o fragmento de anticorpo poderá ser utilizada para avaliar novos parâmetros celulares, bloqueando outras atividade ainda não conhecidas, modulando uma resposta celular e interferindo no efeito da rP21. O fato do scFv (clone D5) reduzir significativamente a invasão celular, poderá trazer novos caminhos para o estudo, nos conduzindo a continuar com outras abordagens e posteriormente poderá ser usado no controle da progressão da doença *in vivo*, analisando a viabilidade do scFv agora em um novo modelo de estudo, portanto é um clone promissor para o desenvolvimento de uma droga que controle a progressão da doença de Chagas.

## 7. REFERÊNCIAS

**A metodologia do Phage Display.** Disponível em <http://www2.iq.usp.br/docente/giordano/tecnologia.html>. Acesso em: 4 nov. 2012.

ADL, M. S., SIMPSON, G. A., LANE, C. E. The revised classification of eukaryotes. **Eukaryot Microbiol**, v. 59, n. 5, p. 429-514, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>

AMARO, I.; RIANO, U.M.; BARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D.; Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion. **Immunology Letters**, v.139, p. 73-79, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2011.05.002>

ARAUJO, T. G.; PAIVA, C. E.; ROCHA, R. M.; MAIA, Y. C, SENA, A. A.; VIEIRA, C. U. A novel highly reactive Fab antibody for breast cancer tissue diagnostics and staging also discriminates a subset of good prognostic triple-negative breast cancers. **Cancer Letters**, v. 343, p. 275-285, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.029>

AUFDERHEIDE, A.C., SALO, W., MADDEN, M., STREITZ, J., BUIKSTRA, J., GUHI, F., ARRIAZA, B., RENIER, C., WITTMERS, L.E.Jr., FORNACIARI, G., ALLISON, M.A 9,000-year Record of Chagas's disease. **PNAS** 101: 2034 – 2039, 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307312101>

AZZAZY, H.HIGHSMITH JR<sup>A</sup>, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Revista de Bioquímica Clínica**. v. 35, n. 6, p. 425-500, set. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00343-0)

BARRETO, M.P. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas** (BRENER, Z., ANDRADE, Z.A. Eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro:1979, p.89 – 151,

BARBAS, Carlos et al. **Phage Display .A Laboratory Manual**, New York, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância Sanitária. **Conselho Brasileiro em Doença de Chagas**. Brasília, 2005.

BRASIL, **Portal da Saúde**, SUS. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>. Acesso: 10 nov. 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2009.

BEACHEY, E. H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. **J. Infect. Dis.** v. 143: p. 325-345, 1981.

<https://doi.org/10.1093/infdis/143.3.325>

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 27, p. 347 - 382, 1973. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>

De SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cell Biol**, v. 86: p. 197 – 283, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60180-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60180-1)

BURLEIGH, B.A., ANDREWS, N.W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Opin. Microbiol.** v.1, p.461 - 465, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80066-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80066-0)

BURLEIGH, B.A., WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell. Microbiol.** n.4: p.701-711, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00226.x>

CANÇADO, J.R.; MARRA, U.D.; BRENER, Z. Clinical therapeutic trial of 5-nitro-2-furaldehyde-semicarbazone (nitrofurazone) in the chronic form of Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 6, p. 12-16, 2002.

CARDOSO, R. **Construção de uma biblioteca de fragmentos de anticorpo monoclonais apresentados em fagos e seleção de clones neutralizantes de toxinas**

presentes na peçonha de *Bothrops pauloensis*. 2008. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica), Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

CARNEIO, A. P.; REIS, C. F.; MORARI, E. C.; MAIA, Y. C.; NASCIMENTO, R.; BONATO, J. M.; et al A putative OTU domain-containing protein 1 deubiquitinating enzyme is differentially expressed in thyroid cancer and identifies less-aggressive tumours. **British Journal of Cancer** v. 111, p. 551-558, 2014. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.331>

CASTRO, J.A.; MECA, M.M.; BARTEL, L.C. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471-479, 2006. <https://doi.org/10.1191/0960327106het653oa>

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1, p.159 – 218. 1909. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>

COURA, J.R., JUNQUEIRA, A.C.V., FERNANDES, O. VALENTE, S.A.S., MILES, M.A. **Trends Parasitol** Emerging Chagas disease in Amazoni na Brazil. n.18, p.171–176, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02200-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02200-0)

CORTEZ, J.; PROVIDÊNCIA, R.; RAMOS, E.; VALENTE, C.; SEIXAS, J.; MERUJE, M.; MARQUES, A. L.; VIEIRA, A. Cardiology Emerging and under-recognized Chagas cardiomyopathy in non-endemic countries. **World Journal of**. Coimbra, v. 26, n. 4(7), p. 234-239, jul. 2012. <https://doi.org/10.4330/wjc.v4.i7.234>

CHUENKOVA, M.V.; PEREIRA PERRIN, M. *Trypanosoma cruzi* targets Akt in host cells as an intracellular antiapoptotic strategy. **Sci Signal**, v. 2, n. 97, p. 1-20, 2008. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000374>

DIAS, J.C.P. Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine (WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M.E., RASSI, A. Eds.) **ISBT**, São Paulo, p. 49 – 80, 1992.

DIAS, J. C. Iniciativa do Cone Sul para a eliminação de populações domésticas de Triatoma infestans e a interrupção da doença de Chagas transfusional. Aspectos históricos, situação atual e perspectivas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. n.102, p.11-18, 2007.

DHIMAN, M.; FRANCO J. G. E.; JASMINE M. P.; AGUILAR, F. J. R.; SPRATT, H.; CORZO, S. V.; MOLINA G. P.; SANDOVAL, R. G.; MORENO, R.; GARG, N. J. Increased Myeloperoxidase Activity and Protein Nitration Are Indicators of Inflammation in Patients with Chagas' Disease **Clinical and Vaccine Immunology**, Texas, v. 16, n. 5, p. 660–666, mai. 2009. <https://doi.org/10.1128/CVI.00019-09>

FERNANDES, A.B.; MORTARA, R.A. Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by *Trypanosoma cruzi* amastigotes and metacyclic

trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. **Microbes Infect**, n.6, p. 460-467, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.01.009>

FERNANDES, C. C. **Produção de fragmentos de anticorpos Monoclonais (scfv) contra isolados de campo do Vírus da bronquite infecciosa das galinhas Utilizando Phage Display**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.

FERNANDES, M. C.; FLANNERY, A. R.; ANDREWS N.; MORTARA, R. A.; Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cellular Microbiology**. 15 p. 977-91, 2013.

<https://doi.org/10.1111/cmi.12090>

FIOCRUZ. **Fundação Oswaldo Cruz**. Disponível em <http://portal.fiocruz.br/pt-br/search/site/Chagas>. Acesso: 10 nov. 2012.

FRESCHI, A. P. **Desenvolvimento de Aplicativos Tecnológicas da Metodologia de Phage Display no Diagnóstico do Câncer de Próstata**. 2006. 60 p. Tese de Doutorado em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

GARCIA, B. S. **Doença de Chagas: os 100 anos da descoberta e a atualidade do pensamento do seu descobridor** v. 46, n. 4, out/dez. 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0004-28032009000400001>

GOURDINE, P. J.; GREE, W. SMITH, E. Application of recombinant *Phage Display* antibody system in study of *Codakia orbicularis* gill proteins. **Humana Press Inc**, v. 125, n. 41, 2005. <https://doi.org/10.1385/ABAB:125:1:041>

HAARD, H.; HENDERIKX, P.; HOOGENBOOM, H.R. CREATING and engineering human antibodies for immune therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.31, p. 5–31, 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00091-4)

HOSONOL M.; ENDO, K.; SAKAHARA H.; WATANABE, Y.; SAGA, T.; NAKAIL T.; KAWAI, C.; MATSUMORI, A.; YAMADA, T.; WATANABE T.; KONISHIL, J. Human/mouse chimeric antibodies show low reactivity with human anti-murine antibodies (HAMA). **Br. J. Câncer**, v. 65, p. 197-200, 1992.

<https://doi.org/10.1038/bjc.1992.41>

HOLLIGER, P.; HUDSON, P.J. Enginee redanti body fragment sand therise of single domains. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 1126 -1136, 2005.

<https://doi.org/10.1038/nbt1142>

HEEL, Rodrigo apud AMIN. Human Inmuno diagnostic neuro cisticercose using a synthesis of selected peptides by *phage display*. v. 131, p. 129-38, 2009.

IIDA, K.; WHITLOW, M. B.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. **J. Exp. Med.** n.169, p. 881-891, 1989.

<https://doi.org/10.1084/jem.169.3.881>

JOINER, K.A., SHER, A., GAITHER, T., HAMMER, C. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 83, p. 6593-6597, 1986.

<https://doi.org/10.1073/pnas.83.17.6593>

JAPOLLA, G. **Construção e seleção de uma biblioteca combinatorial de anticorpos contra herpesvírus bovino tipo 1. 2014. 66 f. Dissertação** (Mestrado em Sanidade, Higiene e Tecnologia de Alimentos), Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

KATHLEEN, T. **RSC Publishing.** Disponível em: <http://blogs.rsc.org/ra/2012/01/04/selecting-chiral-nanotubes-using-phage-display/>. Acesso em: 2 nov. 2012.

KAZUMA, S. M.; CAVALCANTE, M. F.; TELLES, A. E. R.; MARANHÃO, A. K.; ABDALLA, D. Cloning and expression of an anti-LDL(-) singlechain variable fragment, and its inhibitory effect on experimental atherosclerosis. **mAbs** v. 14, n.53, 2013.

<https://doi.org/10.4161/mabs.25859>

KRETTLI, A.U., BRENER, Z. (1982) Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J. Immunol.**p.128: 2009-2012.

KIPNIS, T.L., DAVID, J.R., ALPER, C.A., SHER, A., DIAS da SILVA, W. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.78, p.602 - 605, 1981. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.602>

KODUVAYUR.; P. S.; GUSSIN, A. H.; PARTHASARATHY, R.; KAY, K. B.; PEPPERBERG, R. D. Generation of Recombinant antibodies to rat GABA<sub>A</sub> receptor subunits by affinity selection on synthetic peptides. **Plos One**, v.9 n. 2, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087964>

KOHLER, G. MILSTEIN, C. Laboratory of molecular biology. **Nature**, v. 256, 1975.

<https://doi.org/10.1038/256495a0>

LARANJA, F.S. Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 10, p. 482-491,1953.

LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M. S.; VEXENAT, A. C.; NITZ, N.; SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D. L.; TEIXEIRA, A. R. Progressive chronic Chagas heart

disease ten years after treatment with anti-*Trypanosomacruzi* nitroderivatives. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 63, p. 111-118, 2000. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.63.111>

LIU, H.; ZHENG, X.; ZHANG, F.; YU, L.; ZHANG, X.; DAI, H.; HUA, Q. Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against spring viraemia of carp virus from mouse phage display library. **Journal of Virological Methods**. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.017>

MAÇANEIRO, L. O. Expressão de Imunoproteassoma em Células infectadas com *Trypanosomacruzi*, 2008, 103f, Dissertação (Mestrado – Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

MARTINS, F.A. Estudos biológicos da P21 de *Trypanosoma cruzi* e seu efeito na multiplicação parasitária. **Monografia (Graduação)**. Instituto de Biologia – Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado. (2013). 52f.

MATTOS, E. R.; BERTO, B. P. Doença de chagas: uma breve revisão das recentes ocorrências via de transmissão e métodos diagnósticos. **Saúde e Ambiente**. Duque de Caxias, v.6, n.2, p.40-45, jul-dez. 2011.

MARTINS-MELO, F.R.; RAMOS, A.N.J.; ALENCAR, C.H.; LANGE, W.; HEUKELBACH, J. Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas. **Tropical Medicine & International Health**, v. 17, p.1066–1075, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2012.03043.x>

MARTINS-MELO, F.R.; RAMOS, A.N.J.; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p.167–174, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.10.002>

MARQUES, C. H. Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica, 2005. 126f. Mestrado (tecnologia de imunobiológicos). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

MOTTA, F. S. Proliloligopeptidase de tripanossoma: aspectos estruturais e funcionais. 149f. Tese (Doutorado – Patologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: amastigote and trypomastigotes Interact with different structure on surface of HeLa cells. **Exp. Parasitol**, n.73, p.1-14, 1991. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90002-E](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90002-E)

TIKUNOVA N.V., MOROZOVA V.V. Phage Display on the Base of Filamentous Bacteriophages: Application for Recombinant Antibodies Selection. **Acta naturae**, n. 3, 2009. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10751>

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** n.142, p. 224-229, 1975.

<https://doi.org/10.1084/jem.142.1.224>

NOUVELLET, N., CUCUNUBA, Z. M., GOURBIERE, S. Ecology, Evolution and Control of Chagas Disease: A Century of Neglected Modelling and a Promising Future. *Advances Parasitology*, v. 87, 2014. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2014.12.004>

MORETTI, E.; BASSO, B.; CERVETTA L.; BRIGADA A.; BARBIERI G.; Acute Chagas' Disease Receptors in the Sera of Children with Patterns of Cytokines and Soluble Cellular. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* v.9, n .6, p. 1324-1327, nov. 2002. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1324-1327.2002>

NEVES, David, P. *Trypanossoma Cruzi* e Doença de Chagas. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 73-95. Disponível em: [http://tga.blv.ifmt.edu.br/media/filer\\_public/7e/78/7e783c68-e298-4d4a-8294-2da4e23b706b/neves\\_-\\_parasitologia\\_humana\\_-\\_11ed.pdf](http://tga.blv.ifmt.edu.br/media/filer_public/7e/78/7e783c68-e298-4d4a-8294-2da4e23b706b/neves_-_parasitologia_humana_-_11ed.pdf)

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Doença de Chagas. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos**. Rio de Janeiro, 2009.

Organização Mundial de Saúde. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)**. Acesso em: HTTP <://www.who.int/tdr/publications/disease/chagas/en/>, 20 nov. 2012.

PROCÓPIO, D.O., SILVA, S., CUNNINGHAM, C. C., MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. **Exp. Parasitol.**, v. 1, n. 90, p. 1-13, 1998. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4314>

PALHARES, K. K.; SILVÉRIO, J. C.; DA SILVA, A. A.; MICHAÏLOWSKY, V.; MARINO, A. P.; SILVA, N. M.; CARVALHO, C. M. E. L.; PINTO, M. DE O.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, J. L. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-blockade. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103(4): p. 375-385, jun. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000400011>

PUCCA, M. B. Therapeutic monoclonal antibodies: scFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 47, n. 1, jan./mar., 2011. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>

ROMANHA, J. A., DE CASTRO, S. L ., SOEIRO, M. DE N. C ., VIEIRA J. L., RIBEIRO, I., TALVANI, A ., BOURDIN, B ., BLUM, B ., OLIVIERI, B ., ZANI, C ., SPADAFORA, C ., CHIARI, E ., CHATELAIN, E ., CHAVES, G., CALZADA, J. E., BUSTAMANTE, J. M ., JUNIOR, L. H. F ., ROMERO, L. I ., BAHIA, M. T ., LOTROWSKA, M., SOARES, M., ANDRADE, S. G ., ARMSTRONG, T .,

DEGRAVE, W ., ANDRADE Z. DE A. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105(2), p. 233-238. mar. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000200022>

REIS, D. Biological behaviour in mice of *Trypanosoma cruzi* isolates from Amazonas and Paraná. **Experimental Parasitology**, v. 130. 321–329, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.016>

RODRIGUES, A. A; CLEMENTE, T. M; SANTOS, M.A; MACHADO, F. C; GOMES R.G.B; MOREIRA, H. H. T; CRUZ M. C; BRIGIDO, P. C; DOS SANTOS P.C.F; MARTINS, F. A; BAHIA, D. MARICATO; J. T, JANINI L.M.R; REBOREDO, E. H; MORTARA, R. A, SILVA, C.V.A. Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **Plos One**. (2012). 7:e51384.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051384>

SANTOS, L. DA S.; TORRES, R. M.; MACHADO-DE-ASSIS, G. F.; BAHIA, M. T.; MARTINS, H. R.; CARVALHO, A. T.; DOS-REIS, J. G. A. C.; VIÑAS, P. A.; FILHO, O. A. M.; DE LANA, M. *In-house* ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Ouro Preto, 45(1), p.35-44, jan-fev. 2012.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000100008>

SANTOS M. A, TEIXEIRA FB, MOREIRA HHT, RODRIGUES AA, MACHADO FC, CLEMENTE TM, BRIGIDO PC, TAVARES E SILVA R, PURCINO C, GOMES, RGB, BAHIA D, MORTARA RA, MUNTE CE, HORJALES E, SILVA CV. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**. (2014). 4:4259

<https://doi.org/10.1038/srep04259>

SHUKRA, A. M.; SRIDEV, N. V.; CHANDRAN, D. Production of recombinant antibodies using bacteriophages. **European Journal of Microbiology and Immunology** v. 2 p. 91-98, 2014. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.4.2014.2.1>

SILVA, A. E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. **Cad.Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, n.10, p.2263-2274, out. 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007001000002>

SILVA, C. V.; KAWASHITA, S. Y.; PROBST, C. M.; DALLAGIOVANNA, B.; CRUZ, M. C. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 563-569. 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.03.007>

SILVERSTEIN, S. C., STEINMAN, R., COHN, Z. Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* n.46, p.669-722, 1977. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.003321>

DE SOUZA CARMO, E. V.; KATZ, S.; BARBIERI, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PLoS One*, v. 3, n. 5, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013815>

SCHOFIELD, C.J., JANNIN, J., SALVATELLA, R. The future of Chagas' disease control. *Trends Parasitol.* n. 22, p.583 – 588, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.011>

SCHENKMAN, S., DIAS, C., NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp. Parasitol.* n. 72, p. 76 – 86, 1991. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90123-E](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90123-E)

Só Biologia. **Doença de Chagas.** Disponível em: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/DoencadeChagas.php>). Acesso em: 2 nov. 2012.

SCHENKMAN, S., GUTHER, M.L.S., YOSHIDA, N. Mechanism of resistance to lysis by the alternative complement pathway in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes: effect of specific monoclonal antibody. *J. Immunol.* n. 137, p. 1623-1628, 1986. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/137/5/1623/tab-article-info>

SMITH, G.P. Filamentous phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 288, p. 1315-1317, 1985. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

SMITH, G.; PATEL, S.; WINDASS, J.; THORNTON, J.; WINTER, G.; GRIFFITHS, A. D. Pequenas proteínas de ligação selecionadas a partir de um repertório combinatorial exibido no fago. *Journal of Molecular Biology*. v. 277, n. 2, p. 317-332, 27 de mar. 1998. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1621>

STEINDEL, M. et al. Doença de Chagas: mal De Que ainda preocupa, *Ciência Hoje*. n. 37, p. 32-38, 2005. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/6811>

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M.H.; ANDREWS, N.W. Role in host cell invasion of Trypanosomacruzi- induced cytosolic free Ca<sup>2+</sup> transients. *J. Exp. Med.* n. 179: p. 1017-1022, 1994. <https://doi.org/10.1084/jem.179.3.1017>

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J.A.; HEUSER, J.E. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*. 71, p.1117-1130, 1992. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80061-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80061-3)

TODOROV, A.G.; EINICKER-LAMAS, M.; CASTRO, S.L.; OLIVEIRA, M.M.; GUILHERME, A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosomacruzi* infection. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 32182-32186, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909440199>

TONELLI, R. R. Role of the gp85/Trans-Sialidases in *Trypanosoma cruzi* Tissue Tropism: Preferential Binding of a Conserved Peptide Motif to the Vasculature In Vivo. **Plos One**, v. 4, n. 11, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000864>

TORRES, M. Estudo do miocárdio na moléstia de Chagas (forma aguda). I- Alterações da fibra muscular cardíaca. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.9, n. 114 – p.139, 1917. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761917000100005>

TYLER, K.M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, Chicago, n. 31, p.472-481, jan. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)

VIANNA, G. Contribuição para o estudo de anatomia patológica da moléstia de Carlos Chagas. p. 277-294, 1911. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761911000200004>

WOOLSEY, A.M.; BURLEIGH, B.A. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. **Cell. Microbiol.** n. 6, p.829-838, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00405.x>

WOOLSEY, A.M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C.A.; BRACHMANN, S.M.; CANTLEY, L.C.; BURLEIGH, B.A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **J. Cell. Sci.** n.116: p.3611-3622, 2003. <https://doi.org/10.1242/jcs.00666>

WILKOWSKY, S.E.; BARBIERI, M.A.; STAHL, P.D.; ISOLA, E. L. Regulation of *Trypanosoma cruzi* invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases dynamin, Rab5, and Rab7. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 291, n.3, p.516-521, 2002. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6474>

WU, S.; KE, A. A fast and efficient procedure to produce scFvs specific for large macromolecular complexes. **J Immunol Methods**, v. 318, p. 95–101, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.005>

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000100010>

YOSHIDA, Nobuko. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Scielo, São Paulo 78(1): p. 87-111, 2006. Disponível em: [www.scielo.br/aabc](http://www.scielo.br/aabc). Acesso em: 10 nov. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000100010>

