



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

Peptídeos e Anticorpos Combinatoriais Imunorreativos às Leishmanioses
Visceral e Tegumentar e Implicações Diagnósticas e Terapêuticas

Aluno: Juliana Franco Almeida

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

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

UBERLÂNDIA - MG

2011



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

Peptídeos e Anticorpos Combinatoriais Imunorreativos às Leishmanioses
Visceral e Tegumentar e Implicações Diagnósticas e Terapêuticas

Aluno: Juliana Franco Almeida

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

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

UBERLÂNDIA - MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- A447p
2011 Almeida, Juliana Franco, 1979-
Peptídeos e anticorpos combinatoriais imunorreativos às
leishmanioses visceral e tegumentar e implicações diagnósticas
e terapêuticas / Juliana Franco Almeida. -- 2011.
99 f. : il.
- Orientador: Luiz Ricardo Goulart.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Bioquímica - Teses. 2. Peptídeos - Teses. 3. Leishmaniose
visceral - Teses. 4. Imunoglobulinas - Teses. I. Goulart Filho,
Luiz Ricardo, 1962- . II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Títu-
lo.

CDU: 577.1



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

**Peptídeos e Anticorpos Combinatoriais Imunorreativos às Leishmanioses
Visceral e Tegumentar e Implicações Diagnósticas e Terapêuticas**

ALUNO: Juliana Franco Almeida

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

Examinadores:

Prof^a Dr^a Fernanda Caroline de Carvalho

Prof^a Dr Salvatore Giovanni de Simone

Prof Dr Jair Pereira da Cunha Junior

Prof Dr Marcelo Emílio Beletti

Data da Defesa: 22/07/2011

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

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus avós;

Que se foram deixando muitas saudades, mas seus sábios ensinamentos

sempre permanecerão:

“o estudo é a maior herança que se pode deixar”.

E aos meus pais;

*Que tais ensinamentos seguiram e por esse intuito lutaram, me deram os meios
para minha formação profissional e me apóiam nas minhas decisões para que eu*

trilhe o meu caminho e alcance a minha “herança”.

Assim pretendo fazer, se Deus conceder-me a bênção da maternidade.

A eles dedico, com todo o meu amor, meu respeito e minha gratidão.

"Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma....É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida...." Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar suas bênçãos em minha vida a todo instante, e fazer sua presença sentida nos momentos de dificuldades, permitindo-me entender que todos os percalços são uma forma de aprendizado. Obrigada pelo dom da vida, pela saúde e pelas oportunidades pessoais e profissionais que se abriram em meu caminho.

Ao meu companheiro Jairo, por fazer minha vida mais feliz, por sempre me compreender, apoiar e incentivar. *Obrigada por estar comigo nos momentos mais difíceis tornando-os mais brandos. Você é para mim exemplo de dedicação e disciplina. Ao seu lado quero aprender por toda vida a quoi ça sert l'amor.*

Aos meus pais, pelo carinho e compreensão pela minha ausência, por todos ensinamentos, apoio e orações. Ao meu irmão Júlio, e minha cunhada Fernanda pelo exemplo de dedicação na área científica e profissional e por sempre apoiar-me a seguir este caminho. A minha irmã Adriana, por estar presente no meu dia-a-dia e compartilhar comigo os momentos felizes e aqueles mais difíceis. Ao meu sobrinho Henrique que sempre me ilumina com seu carinho e seu sorriso. *Vocês são minha família, meu porto seguro, meu exemplo. A vocês toda minha gratidão.*

Ao meu orientador Luiz Ricardo Goulart, pela orientação, compreensão e por todo apoio em todos esses anos de formação. *Obrigada por acreditar no meu potencial e comigo colaborar nos momentos mais penosos. Seu apoio, sua compreensão e a sua colaboração foram fundamentais na execução deste trabalho. Como orientador e como amigo, sinceramente agradeço.*

Às minhas companheiras na etapa de finalização do doutorado Ana Carolina e Yara. *Obrigada por compartilharem comigo as angústias, dúvidas e também as alegrias; vocês são exemplos de amor e dedicação pela pesquisa. Juntas descobrimos o real sentido deste título e vivenciamos o amadurecimento que ele trouxe para nossa vida pessoal. Obrigada pelo carinho e pelas orações.*

Ao meu amigo Fausto, pela amizade, cumplicidade e por todo apoio que a mim dedicou em todos os anos de nossa formação profissional. *Obrigada pelo seu carinho, pela ajuda e por me mostrar sempre o que é uma amizade verdadeira. Conte comigo sempre.*

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Thaise, Karina, Paula Souza, por compartilharem não somente horas de trabalho, mas também tantas vivências e experiências. *Obrigada pelo carinho e amizade.*

À Vanessa Silva, pela colaboração e trocas de experiências profissionais.

À Prof^a. Dr^a Vivian Alonso Goulart, pela colaboração neste trabalho e na parceria que concebemos. *Sua chegada ao laboratório me trouxe um exemplo de disciplina e dedicação. Muito obrigada pela amizade e por todo apoio nos momentos finais da execução deste trabalho.*

Ao Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, pela colaboração e experiências vividas no âmbito profissional e pela amizade.

À toda família Nanobiotecnologia, por todos os momentos divertidos e pelas experiências profissionais compartilhadas: Carol, Fabiana, Galber, Lara, Lea, Luiz, Patrícia Tieme, Patrícia Terra, Siomar, Tamiris, Elisa, Emília, Washington. E também àqueles que deixaram o laboratório, mas deixaram lembranças pela participação na minha formação profissional e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, pelos ensinamentos e experiência compartilhada. *Obrigada pela colaboração e ensinamentos na área de imunologia, pela compreensão e pela disponibilidade em participar da banca de defesa.*

Aos professores Dr. Cláudio Vieira da Silva e Dr. Jonny Yokosawa pela participação como membros suplentes da minha banca de defesa de doutorado.

Aos demais membros da banca, pela disponibilidade de participar da banca de defesa de doutorado, colaborando com a finalização deste trabalho.

Aos docentes do Instituto de Genética, pelo conhecimento compartilhado e pela cooperação.

Aos secretários do INGEB, Gerson e Madson pela prontidão em ajudar nos processos burocráticos.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó por todo auxílio prestado.

E finalmente, agradeço o fomento da Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG.

ÍNDICE

Lista de Tabelas	xi
Capítulo II	xi
Capítulo III	xi
Lista de Figuras	xii
Capítulo I	xii
Capítulo II	xii
Capítulo III	xiii
Apresentação	1
Capítulo I	2
Fundamentação Teórica	2
1. Leishmanioses	3
1.1. Leishmanias e Epidemiologia das Leishmanioses	3
1.2. Resposta imune ao parasito	6
1.3. Proteínas de interesse diagnóstico e vacinal em Leishmania	8
2. A tecnologia de <i>Phage Display</i>	11
2.1. Aspectos gerais	11
2.2. Bibliotecas de peptídeos	13
2.3. Bibliotecas de anticorpos	15
3. Bibliografia	17
Capítulo II	27
Seleção de anticorpo recombinante e caracterização antigênica de seus ligantes em <i>L. amazonensis</i>	27
Resumo	28
Abstract	29
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	31
2.1 Parasitos	31
2.2 Biblioteca de anticorpos recombinantes e seleção de ligantes a antígenos de superfície de <i>L. amazonensis</i>	32
2.3 Produção e purificação de proteínas recombinantes	33
2.4 Métodos imunológicos para análise dos fragmentos de anticorpos	33
2.4.1 ELISA	33

2.4.2	Imunofluorescência.....	34
2.4.3	Western Blot	34
2.5	Mapeamento antigênico parcial da proteína ligante ao anticorpo recombinante por biblioteca de peptídeos expressos em fagos.....	35
2.6	Identificação da proteína nativa ligante ao Fab – Imunoprecipitação.....	36
2.7	Bioinformática	36
2.8	Análises Estatísticas	37
3.	Resultados	37
3.1	Especificidade de ligação do Fab selecionado por ensaios imunológicos	37
3.2	Identificação da proteína de ligação ao anticorpo recombinante	39
3.3	Mapeamento antigênico de ligantes ao anticorpo recombinante	39
4.	Discussão	42
5.	Bibliografia	45
	Capítulo III.....	48
	Identificação de peptídeos miméticos a antígenos relacionados às leishmanioses por meio da tecnologia de <i>Phage Display</i>	48
	Resumo	49
	Abstract	50
1.	Introdução	51
2.	Material e Métodos.....	53
2.1.	Seleção e caracterização de peptídeos recombinantes.....	53
2.1.1.	Material Biológico: Imunoglobulinas (IgG) e Proteína total e recombinante	53
2.1.2.	Biopanning: Seleção de Peptídeos Recombinantes.....	54
	- Seleção Competitiva de Peptídeos recombinantes – Leishmaniose Visceral	54
	- Seleções ácida e competitiva de peptídeos recombinantes - Leishmaniose Tegumentar.....	55
2.1.3.	Amplificação e Precipitação dos Bacteriófagos Recombinantes	57
2.1.4.	Titulação dos Bacteriófagos Recombinantes.....	57
2.1.5.	Extração de DNA dos Fagos	58
2.1.6.	Sequenciamento de DNA	58
2.1.7.	Predição das sequências e alinhamento dos aminoácidos	59

2.1.8.	Ensaio de imunorreatividade	59
2.2.	Ensaio de funcionalidade in vitro de peptídeo recombinante	61
2.2.1.	Material Biológico: Parasitos e Macrófagos	61
2.2.2.	Marcação dos parasitos com CFDA-SE	61
2.2.3.	Preparação do peptídeo sintético	61
2.2.4.	Infecção de macrófagos in vitro	62
2.2.5.	Teste de viabilidade celular	62
2.2.6.	Mensuração de nitrito	63
2.2.7.	Análise de macrófagos infectados	63
2.2.8.	Análises estatísticas	63
3.	Resultados	64
3.1.	Peptídeos recombinantes relacionados à Leishmaniose Visceral	64
3.2.	Peptídeos recombinantes relacionados à Leishmaniose Tegumentar	71
3.3.	Efeito do peptídeo recombinante relacionado à L. chagasi em macrófagos J774A.1	75
3.3.1.	Viabilidade Celular	75
3.3.2.	Avaliação da produção de nitrito	76
3.3.3.	Índice de infecção por L. chagasi nas células tratadas com peptídeo recombinante	77
4.	Discussão	79
5.	Bibliografia	82

Lista de Tabelas

Capítulo II

Tabela 1: Alinhamento linear de proteínas de superfície de <i>L. amazonensis</i> com peptídeos recombinantes selecionados contra anticorpo recombinante específico ao mesmo parasito.	41
Tabela 2: Alinhamento tridimensional dos peptídeos recombinantes selecionados contra anticorpo recombinante específico a <i>L. amazonensis</i> , com a proteína de superfície gp63.	41
Tabela 3: Alinhamento tridimensional dos peptídeos recombinantes selecionados contra anticorpo recombinante específico a <i>L. amazonensis</i> , com a proteína de superfície gp46.	42

Capítulo III

Tabela 1: Relação da reatividade dos clones selecionados nas seleções específicas com a suas frequências e presença de sequência consenso.	68
Tabela 2: Proteínas mimetizadas pela população de peptídeos recombinantes em seleção específica contra rK39.	70
Tabela 3 Peptídeos recombinantes selecionados contra relacionados com Leishmaniose Tegumentar. Eluição ácida e específica com antígeno recombinante de <i>L. amazonensis</i>	72
Tabela 4: Alinhamento dos peptídeos recombinantes relacionados a Leishmaniose Tegumentar. Eluição ácida e específica com antígeno de <i>L. amanzonensis</i>	73
Tabela 5: Proteínas mimetizadas pela população de peptídeos recombinantes em seleção contra <i>Leishmania amazonensis</i>	74

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania*. A parte superior da figura (azul) mostra o desenvolvimento das formas promastigotas no trato digestivo do mosquito e sua transmissão aos hospedeiros vertebrados. A parte inferior (amarelo) mostra a fase de desenvolvimento das formas amastigotas no homem, ou em outros reservatórios vertebrados. Em destaque, as formas visceral e cutânea humanas, do lado esquerdo e direito da figura, respectivamente..... 4

Capítulo II

Figura 1: Teste da especificidade do anticorpo recombinante La7h contra proteínas de tripanosomatídeo (*L. amazonensis* e *T. cruzi*) em ensaio de ELISA. 1 µg/poço dos antígenos foram utilizados para sensibilização, sobrenadante de cultura do Fab foi adicionado e a ligação detectada utilizando anti-HA conjugado com peroxidase. As médias das triplicatas foram analisadas mostrando P=0.0016. 38

Figura 2: Imunocitoquímica: marcação de *L. amazonensis* com anticorpos recombinantes selecionados por *phage display* para diferentes alvos. A detecção foi feita utilizando anticorpos anti-HA conjugado com FITC e anti-proteína A conjugada com FITC. Sendo A: La7h (Fab selecionado para *L. amazonensis*); B: Tc10c (Fab selecionado para *T. cruzi*) e C: Anticorpo Fab irrelevante (selecionado contra tumores de mama). 38

Figura 3: SDS-PAGE das proteínas imunoprecipitadas pelos *beads* magnéticos anti-His₍₆₎. M: marcador de peso molecular; 1 e 3 (Fab controle e La7h respectivamente) anticorpos Fab precipitados, sem a presença da proteína de *L. amazonensis*. 2 e 4 (Fab controle e La7h respectivamente), na presença de proteína de *L. amazonensis*. A seta superior indica a banda de aproximadamente 42KDa, imunoprecipitada diferencialmente pelo Fab La7h e a seta inferior indica os anticorpos recombinantes..... 39

Figura 4: Alinhamento dos peptídeos recombinantes selecionados com as proteínas de superfície KMP-11, GP63 e GP46 de *L. amazonensis* (Clustal W).

Nota-se o alinhamento dos clones em regiões específicas de cada uma das proteínas. 40

Figura 5: Alinhamento dos peptídeos recombinantes na estrutura tridimensional da proteína de superfície GP63. Os alinhamentos deram-se em três regiões distintas, sendo mostradas em vermelho (Grupo 1), Azul (Grupo 2) e Rosa (Grupo 3) com relação à Tabela 2 e 3. 42

Capítulo III

Figura 1: Alinhamento das sequências dos peptídeos recombinantes relacionados à Leishmaniose Visceral nas diferentes seleções: A: Eluição Ácida, B: Eluição específica com o antígeno rK39 e C: Eluição específica com antígeno total de *L. chagasi*. Em amarelo, sequência consenso principal. 64

Figura 2: Ensaio de *dot-blot* realizado para os peptídeos recombinantes selecionados nas eluições específicas frente anticorpos de pacientes portadores de Leishmaniose Visceral (V), Leishmaniose Tegumentar (T) e controles saudáveis (N). Selvagem e Irrelevante referem-se aos controles negativos: fago sem expressão de peptídeo recombinante e proveniente de seleção irrelevante, respectivamente. A reação do anticorpo secundário anti-IgG foi revelada com DAB. 66

Figura 3: Ensaio de “dot-blot” competitivo para os clones de maior relevância na seleção específica para Leishmaniose Visceral, os anticorpos de pacientes acometidos pela Leishmaniose Visceral foram pré-incubados com antígeno total de *Leishmania chagasi*. 1- controle sem antígeno, 2 - 0,5 µg/mL, 3 - 1,3 µg/mL, 4 - 4,9 µg/mL, 5 - 14,8 µg/mL, 6 - 44,4 µg/mL, 7 - 133,3 µg/mL e 8 - 400 µg/mL. A reação do anticorpo secundário anti-IgG foi revelada com DAB. 67

Figura 4: Ensaio da redução de MTT em macrófagos J774A.1 tratados com peptídeo sintético, infectados ou não infectados com *L. chagasi*. A: Peptídeo sintético teste. B: Peptídeo sintético irrelevante. 76

Figura 5: Produção de NO por células J774A.1 tratadas com peptídeo sintético. A: tratamento com peptídeo *L. chagasi*; B: tratamento com peptídeo sintético irrelevante (5×10^4 células/poço). Ambas as reações foram feitas com e sem infecção com *L. chagasi* ($2,5 \times 10^5$ células/poço). Dados mostrados como média $\pm$ SEM da concentração de NO (estimada por nitrito). **p<0.001; *p<0.005. 77

Figura 6: Macrófagos J774A.1 infectados com <i>L. chagasi</i> marcadas com CFDA-SE. (A) células tratadas com peptídeo sintético na concentração de 10mM. (B) células cotrole tratadas com diluente.	78
Figura 7: Porcentagem de infecção de células J774A.1 infectadas com <i>L. chagasi</i> ($2,5 \times 10^5$ células/poço) marcadas com CFSE-DA ($2,5 \times 10^5$ células/poço). Os dados representam a media de macrófagos infectados em 100 células.	78
Figura 8: Media do numero de <i>L.chagasi</i> internalizadas por 50 macrófagos J774A.1 infectados. Pep – Peptideo sintético teste; Irrel - Peptídeo sintético irrelevante; Dil. Controle com diluente; RPMI – Controle com meio de cultura. *p<0.005.....	79

Apresentação

Esta tese contempla a seleção e caracterização de anticorpos e peptídeos recombinantes relacionados às leishmanioses visceral e tegumentar selecionados por *Phage Display*, no intuito de identificar antígenos com potencial vacinal e diagnóstico.

As leishmanioses ameaçam cerca de 350 milhões de homens, mulheres e crianças em 88 países ao redor do mundo. Estima-se que atualmente, 12 milhões de pessoas estão infectadas, com cerca de 1-2 milhões de novos casos todos os anos. A doença pode ter uma ampla variedade de sintomas clínicos, que pode ser cutânea, mucocutânea ou visceral. A leishmaniose cutânea é a forma mais comum e a leishmaniose visceral é a forma mais severa, em que órgãos vitais do corpo são afetados.

A aplicabilidade da metodologia de *Phage Display* na apresentação de peptídeos ou bibliotecas protéicas na superfície de fagos filamentosos permite uma seleção altamente específica a determinados alvos. Uma vantagem crucial dessa tecnologia é a conexão direta entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, a qual possibilita uma evolução clonal de ligantes selecionados. Nesse sentido, essa metodologia tem se mostrado significativa à prática clínica, ao permitir a seleção de peptídeos e anticorpos expressos na superfície viral. Atualmente, terapias baseadas na utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) representam uma das mais promissoras áreas na indústria farmacêutica. Os anticorpos têm se mostrado um excelente paradigma na busca de moléculas altamente específicas a seus alvos protéicos desempenhando um papel central nas pesquisas pós-genômicas.

Esta tese é composta de três capítulos sendo o primeiro deles uma fundamentação teórica a respeito das leishmanioses e da tecnologia de *Phage Display*; o segundo capítulo refere-se à seleção e caracterização de anticorpos recombinantes expressos em fagos ligantes às proteínas de superfície de *L. amazonensis* e por último, o terceiro capítulo a respeito da seleção e caracterização de peptídeos recombinantes expressos em fagos relacionados à leishmaniose visceral e tegumentar.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

Leishmanioses

1.1. Leishmanias e Epidemiologia das Leishmanioses

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários digenéticos pertencentes à família Trypanosomatidae, e apresentam-se sob duas formas: uma flagelada denominada promastigota, com dimensões entre 14 e 20 μm de comprimento por 1,5 a 4 μm de largura com núcleo situado no terço médio da célula e cinetoplasto na porção mais anterior; outra não flagelada denominada amastigota, presente em hospedeiros vertebrados, inclusive o homem, de forma esférica, com diâmetro variando de 2,5 a 5 μm , com o núcleo ocupando a posição central da célula e cinetoplasto adjacente ao mesmo (Molineux and Killick-Kendrick, 1987). As leishmanias são heteroxênicas, parte do seu ciclo de vida acontece no intestino de um mosquito, onde assume a forma promastigota, o restante do ciclo de vida é completado em tecidos de hospedeiros vertebrados, onde somente formas amastigotas são encontradas (Schmidt and Roberts, 1996).

A transmissão dá-se através da picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* que ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, ingere macrófagos contendo o parasita na forma amastigota. Durante a digestão do sangue, as formas amastigotas iniciam sua diferenciação para a forma promastigota procíclica, capaz de se dividir e não é infectante. Nesta forma, o parasita ataca o epitélio intestinal prendendo-se a ele. Em seguida, passa por um processo chamado metaciclogênese, se convertendo para a forma promastigota metacíclica, incapaz de se dividir e é infectante. Os parasitas se destacam das células intestinais e migram para o aparelho bucal do inseto. Na próxima picada, o parasita na forma promastigota metacíclica é inoculado no hospedeiro mamífero e invade as células do sistema fagocitário mononuclear (Descoteaux and Turco, 1999). Os hospedeiros mamíferos vão de ratos do deserto a humanos que muitas vezes, são um hospedeiro acidental (Handman and Bullen, 2002).

Após o contato com o sangue, os promastigotos são opsonizados por fatores do soro dos hospedeiros, que engatilham a ativação do complemento e deposição de C3 nos parasitas. Promastigotos são subsequenteiramente lançados a leucócitos aceptores e os parasitas associados à C3 são endocitados por

fagócitos e monócitos. Dentro dos fagolisossomos dos leucócitos permissivos, promastigotos diferenciam-se em amastigotos, disseminando-se para órgãos e tecidos após a ruptura das células infectadas (Handman, 2000), permitindo a infecção de flebotomíneos no ato da picada. O ciclo de vida das leishmanias é mostrado na Figura 1.

As leishmanioses ameaçam cerca de 350 milhões de homens, mulheres e crianças em 88 países ao redor do mundo. Estima-se que atualmente, 12 milhões de pessoas estão infectadas, com cerca de 1-2 milhões de novos casos todos os anos. A doença pode ter uma ampla variedade de sintomas clínicos, que pode ser cutânea, mucocutânea ou visceral. A leishmaniose cutânea é a forma mais comum e a leishmaniose visceral é a forma mais severa, em que órgãos vitais do corpo são afetados (<http://www.who.int/leishmaniasis/en>).

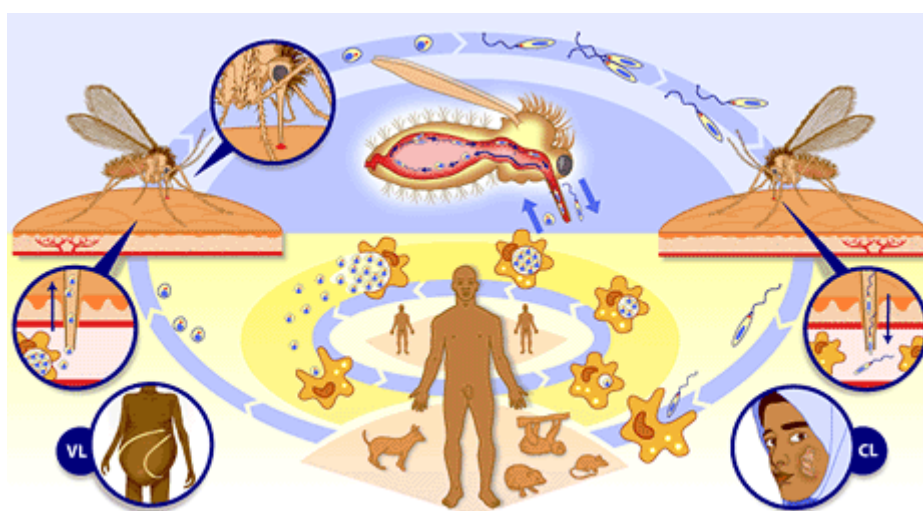


Figura 1 Ciclo de vida da *Leishmania*. A parte superior da figura (azul) mostra o desenvolvimento das formas promastigotas no trato digestivo do mosquito e sua transmissão aos hospedeiros vertebrados. A parte inferior (amarelo) mostra a fase de desenvolvimento das formas amastigotas no homem, ou em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

Distribuídas em 22 países no Novo Mundo e em 66 países do Velho Mundo, as leishmanioses são principalmente encontradas no Sudeste da Ásia, Leste da África e Brasil. As infecções humanas ocorrem em 16 países da Europa, incluindo a França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal. As formas da doença são notadamente diversas. Na maioria dos casos resultam em três formas clínicas principais: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea

(LMC) e Leishmaniose Visceral (LV). A LC causa lesões não fatais e desconfigurantes na pele, e é principalmente causada pela *Leishmania major*, *L. tropica*, e *L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamanensis* e *L. guyanensis* no Novo Mundo. A LV, que é a forma fatal da doença quando não tratada corretamente, é responsável por milhares de mortes a cada ano e é causada pela *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e pela *L. chagasi* no Novo Mundo. A LMC é principalmente causada pela *L. braziliensis* e ocasionalmente pela *L. panamensis* ou *L. guyanensis*. Aproximadamente 90% dos casos de LMC ocorrem na Bolívia, Brasil, e Peru. Esta forma de leishmaniose é caracterizada pela metástase das lesões da pele para tecidos mucosos por disseminação linfática e hematógena (Van Assche et al., 2011).

Baseado em dados do Ministério da Saúde no Brasil, as principais espécies de leishmanias responsáveis pela leishmaniose tegumentar de interesse médico sanitário no Brasil são: *L. amazonensis* (Amazonas, Pará e Maranhão), *L. guyanensis* (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e *L. braziliensis* (ampla distribuição da Amazônia ao sul do país com maior número de casos no estado do Ceará, seguido da Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Goiás, Espírito Santo e Rio de Janeiro) e para a leishmaniose visceral, a *L. chagasi* em todo o território do país (Costa, 2005).

Esta doença é uma zoonose ou antropozoonose, dependendo da região estudada. No Brasil, assim como no Novo Mundo e no Mediterrâneo, a LV canina é considerada uma zoonose e a estratégia de tratamento corrente para o controle da doença é baseada em três ações principais, incluindo (1) o tratamento sistemático dos casos humanos, (2) controle do vetor e (3) eliminação dos cães soropositivos (Tesh, 1995).

Apesar do progresso no diagnóstico e no tratamento, as leishmanioses continuam sendo um problema de saúde pública, particularmente nos países em desenvolvimento. O impacto das leishmanioses na saúde humana foi grosseiramente subestimado por muitos anos, sendo esta doença hoje classificada como uma das principais doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (Zimmermann et al., 2009).

1.2. Resposta imune ao parasito

A evolução da doença é determinada pelas interações entre o sistema imune do hospedeiro e as diferentes espécies do parasito, a patogênese das leishmanioses ainda permanece obscura e o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune à *Leishmania* em humanos e cães ainda limitados. Geralmente, a imunidade protetora está associada com uma resposta imune clássica mediada por células que induz a ativação de macrófagos por citocinas derivadas de células T, enquanto a progressão da doença está associada com a geração de uma resposta humoral exacerbada (Gradoni, 2001; McMahon-Pratt and Alexander, 2004).

A leishmaniose é caracterizada pela imunossupressão induzida pelo parasito não somente como uma subversão ativa, mas também por um desvio imunológico que resulta em respostas imunes que suprimem a resposta imune anti-leishmania futura. Pelo fato dos macrófagos serem não somente células hospedeiras para o parasito, mas também células sentinelas do sistema imunológico, estas células são direcionadas pelo parasito para modular o sistema imunológico e garantir a sua sobrevivência. Os parasitos interferem no sistema de sinalização da célula de tal modo que as funções efetoras desencadeadas por vários receptores da superfície celular ou são ativamente suprimidas ou alteradas para favorecer respostas imunes que favorecem a sobrevivência do parasito. Uma variedade de mecanismos que potencialmente contribuem para a desativação do fagócito mononuclear durante a infecção tem sido identificada (Reiner, 1994).

A leishmaniose cutânea é caracterizada por lesões cutâneas transientes (pápulas ou úlceras) que são auto-curáveis em hospedeiros imunocompetentes, apesar de que o parasito irá persistir em pequenas quantidades por toda a vida (Bogdan et al., 1996, Bodgan et al., 2000; Mendonça et al., 2004; Schubach et al., 1998). O modelo animal para esta infecção foi muito utilizado no passado para definir os mecanismos imunológicos que contribuem para o controle deste patógeno intracelular. Foi mostrado que células do sistema imunológico (macrófagos, células dendríticas - DCs), células matadoras naturais (NK), células T CD4⁺ e CD8⁺, citocinas (IFN- γ e IL-12) e moléculas efetoras (Óxido Nítrico - NO) são componentes chave na resposta imune contra o parasito (Bogdan et al., 1993; Solbach and Laskay, 2000).

O controle das leishmanioses é dependente da produção de IL-12 e do desenvolvimento de células T CD4+, células T CD8+ e NK produtoras de IFN- γ (Kirkpatrick and Farrell, 1982; Murray, 1997; Murray et al., 2005).

Células fagocíticas profissionais produzem uma série de compostos microbicidas, auxiliando no controle da proliferação intracelular de micróbios. Entre estes, o NO tem sido descrito como um potente agente citotóxico e citostático em respostas imunes mediadas por células, sendo capaz de limitar o crescimento de vários microrganismos (Wilkins-Rodríguez et al., 2010). O Óxido Nítrico (NO₂) é um mediador inflamatório importante, que desempenha um papel principal em vários processos fisiológicos, como vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e neurotransmissão (Autore et al., 2001; Woo et al., 2005).

O óxido nítrico é sintetizado a partir da L-arginina em vários tecidos e tipos celulares por três formas estruturalmente distintas da família de óxido nítrico sintase (NOS) (Salerno et al., 2002). A isoforma induzível da NOS (iNOS) está implicada na superprodução patológica de NO, com sua expressão gênica sendo induzida por diferentes agentes pró-inflamatórios como a interleucina-1b (IL-1b), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e lipopolissacarídeo (LPS) em certos tipos celulares, incluindo macrófagos (Matsuda et al., 2003).

A produção de óxido nítrico dá-se a partir da arginina por meio da óxido nítrico sintase induzível (iNOs) em consequência da ativação de macrófagos por IFN- γ ou TNF- α , sendo certamente o principal efector para destruir amastigostos intracelulares (Liew et al., 1990). Vários alvos celulares na Leishmania podem estar sujeitos a esta toxina incluindo enzimas do metabolismo da glicose, assim como sistemas transportadores de membrana (Mauël and Ransijn, 1997). Apesar do efeito do NO na Leishmania e em outros protozoários ser bem documentado, poucos alvos moleculares foram identificados (Salvati et al., 2001; Bocedi et al., 2004).

O macrófago é dotado e armado com mecanismos antimicrobianos, que os organismos intracelulares precisam burlar para sobreviver. Durante as leishmanioses, as interações microbicidas entre o parasito e a célula hospedeira ocorrem em dois estágios. Primeiro, durante a fagocitose inicial, o macrófago pode ser submetido a uma resposta oxidativa, estimulada pelo evento da fagocitose. Segundo, uma vez que a infecção com amastigostos é estabelecida,

os macrófagos quiescentes podem ser ativados potencialmente para matar a leishmania. A evasão eficiente de moléculas microbidas tóxicas produzidas em cada estágio da infecção é importante para a leishmania ser capaz de iniciar e manter a infecção na célula hospedeira (Gantt et al., 2001).

1.3. Proteínas de interesse diagnóstico e vacinal em Leishmania

As moléculas, Glicosilfosfatidilinositol (GPI), Glicosilfosfolipídios (GIPL), Lipofosfoglicanos (LPG), Fosfoglicanos (FG), Proteofosfoglicanos (PPG), Leishmaniolisina (GP63) e Cisteína Proteases (CPs), dentre outras, têm sido apontadas como determinantes invasivos / evasivos que auxiliam a Leishmania no parasitismo intracelular, nos eventos de: evasão dos fatores líticos humorais, fixação dos parasitas aos macrófagos seguido de sua internalização dentro destes fagócitos, sobrevivência intracelular dos parasitas endocitados, diferenciação de promastigotos em amastigotos e replicação dos amastigotos. Tais determinantes são cruciais para a infecção, mas não produzem nenhuma patologia no hospedeiro (Chang and MacGwire, 2002).

O revestimento de superfície do parasito Leishmania proporciona proteção notável em ambientes severos encontrados dentro dos insetos vetores e hospedeiros vertebrados. Ele também oferece especificidade para as interações destes parasitos com as células do intestino de flebotomíneos e com os macrófagos humanos. Surpreendentemente, poucas moléculas foram identificadas na superfície de Leishmania. As principais moléculas de superfície de ambos promastigotos e amastigotos são glicoconjugados lipofosfoglicanos e uma glicoproteína de 63KDa. Estas proteínas de superfície variam estruturalmente nas espécies de Leishmania e durante o ciclo de vida do parasito.

Além destes glicoconjugados principais, leishmanias produzem um número menos abundante de moléculas de superfície, incluindo a família dos glicosilinositol fosfolipídeos, o complexo de glicoproteínas PSA-2 (Promastigote surface antigen-2) e uma glicoproteína de peso molecular relativo de 46.000 (Mr 46.000). Estas moléculas compartilham a característica comum de ligação à membrana plasmática via ancoradores lipídicos glicofosfatidilinositol. Leishmanias também liberam moléculas de sua superfície de maneira específica (Moody, 1993).

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

A sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos dependem do método empregado no preparo do antígeno, uma vez que alguns antígenos de parasitos exibem epítomos de reatividade cruzada com outros patógenos. Como estratégia para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico sorológico para as leishmanioses, os genes codificadores para alguns antígenos parasitários foram isolados a fim de obter moléculas recombinantes adequadas para o diagnóstico sorológico (Kubar and Fragaki, 2005).

Burns e colaboradores (1993), identificaram um antígeno de *Leishmania chagasi*, LcKin, com homologia à superfamília de proteínas motoras (kinesinas). Este antígeno, predominante em amastigotos, contém um domínio repetitivo extenso altamente relacionado entre as espécies de *L. chagasi* e *L. donovani*. Altos títulos de anticorpos foram encontrados para o antígeno rK39, que contém várias repetições de 39 aminoácidos, demonstrando ser uma região conservada entre as espécies mencionadas. Com a descoberta deste antígeno, muitos pesquisadores têm testado a sua viabilidade em diferentes testes diagnósticos para a Leishmaniose visceral, a maioria deles mostrando resultados altamente promissores, na tentativa de utilização de métodos diagnósticos menos invasivos e economicamente viáveis para a população.

Um antígeno de *L. major*, designado LACK (*Leishmania* homologue of receptor for activated C kinase), foi identificado depois de uma busca por antígenos reconhecidos por um clone Th1 protetor derivado do baço de camundongo BALB/c, infectado com um extrato solúvel de promastigotos de *L. major*. A sequência de aminoácidos deduzidas deste antígeno tem homologia substancial com os receptores intracelulares para Kinase C ativada (RACKs) e apresenta alta homologia entre *L. major* e *L. chagasi* (Mougneau et al., 1995). Tem

sido sugerido que a proteína LACK contém um epítipo imunodominante que representa o alvo da resposta imune inicial (Requena et al., 2000).

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

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

As opções de tratamento para as leishmanioses são limitadas ao uso de antimoniais pentavalentes como primeira linha de drogas e pentamidina, anfotericina B como segunda linha de drogas. Mas, devido ao aumento da resistência à primeira linha de drogas, o desenvolvimento de uma vacina contra as doenças tem sido altamente desejado. O uso de vacinas é vantajoso sobre a quimioterapia, pois induz um efeito de longa duração e pode ser administrado de modo profilático e terapêutico, além de não encontrar o problema da resistência como no caso da quimioterapia (Nagil and Kaur, 2011).

O controle dos reservatórios e vetores não é muito eficiente devido as dificuldades operacionais e recaídas frequentes no hospedeiro. Portanto, o desenvolvimento de uma vacina efetiva e acessível contra as leishmanioses é extremamente necessário. . Embora um progresso considerável ter sido feito na última década no entendimento dos mecanismos imunes subjacentes a potenciais antígenos candidatos, incluindo parasitos mortos e atenuados, extratos totais, proteínas puras ou recombinantes ou DNA codificando proteínas de leishmania, assim como moduladores da saliva do mosquito, poucos candidatos vacinais tiveram progresso além do estágio experimental. Assim não há nenhuma vacina contra a forma humana da doença. Recentemente, entretanto, muito interesse

tem sido estimulado principalmente em torno da vacinação contra a leishmaniose cutânea com menos tentativas contra a leishmaniose visceral (Nagill, Kaur, 2011).

2. A tecnologia de Phage Display

2.1. Aspectos gerais

A tecnologia de *Phage Display* ou expressão de biomoléculas em fagos tem apresentado desde a sua descrição por Smith (1985), uma utilização cada vez mais crescente em diversas áreas das ciências. Este autor foi o pioneiro na expressão da enzima de restrição *Eco RI* fusionada à proteína três (pIII) do capsídeo viral.

A expressão de biomoléculas em fagos filamentosos é baseada na clonagem de fragmentos de DNA codificantes de milhões de variantes de certos ligantes (Benhar, 2001), como proteínas, incluindo anticorpos ou peptídeos. As sequências de DNA de interesse são inseridas em uma localização no genoma de bacteriófagos filamentosos, de modo que a proteína codificada é expressa na superfície do fago filamentoso como um produto de fusão a uma das proteínas da superfície do fago (Azzay and Highsmith, 2002). A conexão entre genótipo e fenótipo, permite o enriquecimento de fagos específicos, como por exemplo, usando a seleção em um alvo imobilizado (Benhar, 2001).

Tipicamente, utilizam-se os vírus filamentosos bacteriófagos da família Inoviridae (M13, fd, f1) (Sidhu, 2001) que parasitam bactérias Gram-negativas e que, necessariamente, apresentam pilus F. Em geral, o bacteriófago M13 não apresenta um ciclo lisogênico, mas é capaz de induzir um estado no qual a célula infectada origina e libera continuamente novas partículas virais, causando uma queda na taxa de reprodução bacteriana (Smith and Petrenko, 1997; Azzay and Highsmith, 2002; Russel et al., 2004).

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

(p3 ou pIII, proteína de 406 aminoácidos) (Russel, 1991). Estas proteínas são as principais proteínas utilizadas no sistema de expressão baseado em “Phage Display” (Brígido and Maranhão, 2002), a proteína 3 é responsável pela adesão da partícula viral ao pilus sexual. O produto do gene III dos fagos filamentosos corresponde à maior das proteínas estruturais, com um peso molecular de cerca de 42 KDa na sua forma madura (Makowski, 1993). As proteínas pIV, pVI ou pVIII são também usadas em sistemas de expressão em fagos (Benhar, 2001).

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

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

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

O “Biopanning” ou procedimento de seleção é feito pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. Na maioria das vezes, o alvo é retido em placas de ELISA, mas também se utiliza “beads”, resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas, e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O pool de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica ou “biopanning” (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com sequências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens, os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA, “Western Blot” ou ELISA (Smith, 1985).

Como alternativa ao “panning” contra um alvo imobilizado em uma superfície, a biblioteca pode reagir com um alvo em solução, dada pela afinidade de captura do complexo alvo-fago em uma matriz de afinidade (bead) específica para a proteína alvo. O experimento requer substancialmente menos alvo por teste que o *panning* em superfície, podendo resultar em uma maior acessibilidade do sítio ligante para os peptídeos expressos nos fagos, assim como evitar a desnaturação parcial do alvo na superfície plástica (Barbas et al., 2001).

Esta tecnologia tem sido utilizada para produzir diagnósticos clínicos, novas drogas contra diversas patologias e para mapeamento de interação proteína-proteína (Rodi and Makowski, 1999). Proteínas, anticorpos, hormônios, inibidores de proteases, enzimas e proteínas que se ligam a ácidos nucleicos tem sido mapeados por essa técnica. Ela permite a seleção de peptídeos e proteínas incluindo anticorpos, com alta afinidade e especificidade para vários alvos. A vantagem crucial desta tecnologia está na ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas (Azzay and Highsmith, 2002).

2.2. Bibliotecas de peptídeos

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

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

Peptídeos que neutralizam imunoglobulinas podem ser empregados como

reagentes diagnósticos ou usados como agentes terapêuticos controlando doenças autoimunes (Blank et al., 1999). Bibliotecas de peptídeos randômicos podem ser usadas para mapear epítomos de anticorpos policlonais e monoclonais, identificando peptídeos ligantes, e desenvolvendo fagos que definem sítios para diferentes enzimas (Mattheus and Wells, 1993; Ohkubo et al., 2001). Bibliotecas de peptídeos randômicos têm sido usadas com sucesso para identificar peptídeos bioativos contra receptores purificados e imobilizados ou contra células intactas (Rodi and Makowisk, 1999) e para identificar alvos ligantes de um órgão particular ou um tipo celular *in vivo* (Pasqualini and Ruoslahti, 1996). Sem alvo, a partícula viral (fago) não tem tropismo por células, exceto células bacterianas (Barry et al., 1996).

A apresentação de pequenos peptídeos na superfície de partículas virais pode aumentar sua imunogenicidade e conseqüentemente seu potencial como candidatos a vacinas. A resposta imunogênica a fagos M13 é dependente de células T e não requer adjuvante (Azzay and Highsmith, 2002). Fagos que expressam epítomos ou mimetopos podem emergir como uma ferramenta útil para o desenvolvimento de vacinas efetivas ou podem servir como veículos de entrega de vacinas por si próprios (Benhar, 2001).

Vários autores relatam a utilização desta técnica no entendimento de doenças provocadas por vírus, bactérias, protozoários e a interação entre seus antígenos e a resposta imune do hospedeiro. Na busca por mapear epítomos no desenvolvimento diagnóstico ou vacinal, nosso grupo tem trabalhado no mapeamento de epítomos de *L. chagasi* e *L. amazonensis* (Goulart et al., 2010).

A exposição de determinantes antigênicos da proteína do circunsporozoito do parasito causador da malária, *P. falciparum* em múltiplas cópias na pVIII de fagos Fd mostrou que os epítomos peptídicos do fago híbrido foram extremamente imunogênicos em quatro diferentes linhagens de camundongos sem o uso de adjuvantes externos, e os anticorpos foram altamente específicos aos epítomos individuais (Willis et al., 1993). De la Cruz e colaboradores (1988) mostraram que a clonagem de regiões repetitivas do gene da proteína do circunsporozoito deste mesmo parasito no gene pIII de fagos filamentosos resulta na exposição de proteínas recombinantes na superfície do fago. Os fagos foram antigênicos e imunogênicos quando injetados em coelhos.

Gazarian e colaboradores (2000), mapearam epítomos da região N-terminal da TPmy (Paramiosina de *T.solium*), que são altamente imunogênicos nesta molécula, sugerindo a identificação de um epítopo linear e descontínuo, com prováveis propriedades de determinantes imunodominantes, reveladas por análises computacionais de antigenicidade.

Cui e colaboradores (2003) identificaram resíduos importantes na primeira região hidrofílica principal da proteína do vírus da doença infecciosa da bursa de Fabricius (VP2), para isto, foram construídos fagos filamentosos contendo o gene da região variável da VP2 da IBDV (Infeccious Bursal Disease Vírus). Anticorpos neutralizantes anti-VP2, foram usados para se ligar aos fagos contendo a região variável original da VP2, os fagos não ligantes foram também avaliados, na tentativa de localizar mutações.

Outros exemplos são encontrados com foco para: hepatitis C (Minenkova et al, 2001, Urbanelli et al, 2000); febre tifóide (Tang, 2003); tuberculose (Barenholz, 2007), neurocisticercose (da Silva Ribeiro et al., 2010) e doença do sono (Van Nieuwenhove et al., 2011), entre outros.

2.3. Bibliotecas de anticorpos

A imunização de animais seguida pela tecnologia de hibridoma tem sido usada para gerar anticorpos monoclonais para uma diversidade de antígenos. Nos últimos dez anos, avanços na biologia molecular permitiram o uso de *E. coli* para a produção de anticorpos recombinantes. Por restringir o tamanho seja de um Fab, um Fv ou um scFv, tais fragmentos de anticorpos podem não somente serem expressos em células bacterianas mas também serem apresentados como proteína de fusão às proteínas de superfície de bacteriófagos (Griffiths and Duncan, 1998).

A tecnologia de “Phage Display” pode ser usada: (1) na geração de anticorpos monoclonais para imunoterapia, (2) no isolamento de anticorpos a partir de pacientes exposto a um determinado patógeno e (3) no estudo de anticorpos autoimunes (Azzay and Hichsmith, 2002).

Os fragmentos de anticorpos expressos na superfície de fagos possibilitam a seleção de sequências baseadas em sua afinidade de ligação a uma molécula alvo (antígeno) por um processo de seleção *in vitro* (BARBAS et al. 2001).

Atualmente, a maioria das bibliotecas são construídas no formato scFv. Os fragmentos do tipo Fab, além de mais estáveis, ocorrem em formatos monoméricos, o que permite uma rápida triagem de clones baseada, impreterivelmente, em sua afinidade ao antígeno estudado (De Haard et al., 1999).

Fragmentos de anticorpos têm sido utilizados no estudo de doenças parasitárias e infecciosas como: na seleção de anticorpo recombinante com ligação específica a esporozoítos de *Eimeria tenella* (Abi-Ghanem et al., 2008); no acesso a proteínas densamente enoveladas na superfície de *T. brucei* (glicoproteínas variáveis de superfície) nas quais os epítomos conservados permanecem inacessíveis para grandes moléculas (Stijlemans et al., 2004).

A expressão de anticorpos em fagos tem se transformado em uma técnica bem aceita e, num pequeno espaço de tempo tem gerado moléculas de altíssima qualidade. Anticorpos derivados por *Phage Display* têm provado sua segurança e eficácia em testes clínicos. Processos de seleção adaptados a essa técnica, em combinação com anticorpos de fácil montagem, abrem amplamente as portas para desenvolvimento sofisticado de anticorpos como medicamentos. Em adição, estes anticorpos selecionados por *Phage Display* oferecem maiores vantagens em termos de velocidade e rendimento para pesquisa e identificação/validação de alvos. *Phage Display* é uma moderna ferramenta na descoberta de novas drogas (Kretzschmar et al., 2002). Anticorpos expressos em fagos, juntamente com “screening” automatizado, facilita e potencializa a exploração de bibliotecas combinatoriais complexas e a identificação de potentes carreadores de drogas (Buckler et al., 2008).

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

A tecnologia de *Phage Display*, aliada à tecnologia de construção de bibliotecas combinatoriais de anticorpos poderão gerar biomarcadores específicos para auxiliar no diagnóstico e no tratamento de doenças parasitárias.

3. Bibliografia

Abi-Ghanem, D., Waghela, S.D., Caldwell, D.J., Danforth, H.D., Berghman, L.R., 2008. Phage display selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against *Eimeria tenella* sporozoites. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 58-67.

Autore, G., Rastrelli, L., Lauro, M. R., Marzocco, S., Sorrentino, R., Sorrentino, U., Pinto, A., Aquino, R., 2001. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. *Life Sci.* 70, 523–534.

Azzay, H.M.E., Highsmith, W.E., 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem.* 35, 425-445.

Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G. J., 2001. *Phage Display. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 8.4-8.7.

Barenholz, A., Hovav, A.H., Fishman, Y., Rahav, G., Gershoni, J.M., Bercovier, H., 2007. A peptide mimetic of the mycobacterial mannosylated lipoarabinomannan: characterization and potential applications. *J. Med. Microbiol.* 56-, 79–586.

Barry, M.A., Dower, W.J., Johnston, S.A., 1996. Toward cell-targeting gene therapy gene therapy vectors: selection of cells-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nat. Med.* 2, 299-305.

Benhar, I., 2001. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotchnol. Adv.* 19, 1-33.

Birch-Machin, I., Ryder, S., Taylor, L., Inguez, P., Marault, M., Cegliec, L., Zientara, S., Cruciere, C., Cancellotti, F., Koptopoulos, G., Mumford, J., Binns, M. Davis-Poynter, N., 2000. Utilization of bacteriophage display libraries to identify

peptide sequences recognized by Equine herpes virus type 1 specific equine sera. J. Virol. Methods. 88, 89-104.

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

Bocedi, A., Gradoni, L., Menegatti, E., Ascenzi, P., 2004. Kinetics of parasite cystein proteinase inactivation by NO donors. Biochem. Biophys. Res. Com. 315, 710-718.

Bogdan, C., Donhauser, N., Doring, R., Rollinghoff, M., Diefenbach, A., Rittig, M.G., 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. J. Exp. Med. 191, 2121–2129.

Bogdan, C., Gessner, A., Rollinghoff, M., 1993. Cytokines in Leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. Immunobiology. 189, 356–396.

Bogdan, C., Gessner, A., Solbach, W., Rollinghoff, M., 1996. Invasion, control, and persistence of Leishmania parasites. Curr. Opin. Immunol. 8, 517–525.

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

Brígido, M.M., Maranhão, A.Q., 2002. Bibliotecas apresentadas em FAGOS. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 26, 44-51.

Buckler, D.R., Park, A., Viswanathan, M., Hoet, R.M., Ladner, R.C., 2008. Screening isolates from antibody phage-display libraries. Drug Discov. Today. 13, 318-24.

Burns, J.M., Shreffler, W.G., Benson, D.R., Ghalib, H.W., Badaró, R., Reed, S.G., 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania*

chagasi that detects specif antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 775-779.

Chang, K.P., McGwire, B.S., 2002. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. Kinetoplastid. Biol. Disease. 1-1.

Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaert, M., 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat. Rev. Microbiol. 5, 873-82.

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

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

Costa, J. M. L., 2005. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. Gazeta Med Bahia.75, 3-17.

Cui, X., Nagesha, H.S., Holmes, I.H., 2003. Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display. J. Virol. Meth. 109, 75-83.

da Silva Ribeiro, V., Manhani, M. N., Cardoso, R., Vieira, C. U., Goulart, L. R., Costa-Cruz, J. M., 2010. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. Immunol. Lett. 129, 94-99.

de Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruine, A.P., Arends, J.W., Hoogenboom, H.R., 1999. A Large Non-immunized Human Fab Fragment Phage Library¹² That Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affintiy Antibodies. J. Biol. Chem. 274, 18218-18230.

de la Cruz, V.F., Lal, A.A., McCutchan, T.F., 1988. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J. Biol. Chem.* 263, 4318-4322.

Descoteaux, A., Turco, S. J., 1999. Glycoconjugates in leishmania infectivity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1455, 341–352.

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

Gantt, K.R., Goldman, T.L., McCormick, M.L., Miller M.A., Jeronimo, S.M., Nascimento, E.T., Britigan, B.E., Wilson, M.E., 2001. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.* 167, 893-901.

Gazarian, K.G., Gazarian, T.G., Solís, C., Hernnández, R., Shoemaker, C.B., Laclette, J. P., 2000. Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. *Immu. Lett.* 42, 191-195.

Geysen, H.M., Rodda, S.J., Mason, T.J., 1986. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.* 23, 709-715.

Gradoni, L., 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol.* 100, 87–103.

Goulart, L.R., Vieira, C.U., Freschi, A.P., Capparelli, F.E., Fujimura, P.T., Almeida, J.F., Ferreira, L.F., Goulart, I.M., Brito-Madurro, A.G., Madurro, J.M., 2010. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. *Crit. Rev. Immunol.* 30, 201-222.

Griffiths, A.D., Duncan, A.R., 1998. Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 102-108.

Handman, E., 2000. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol.* 44, 2-39.

Handman, E., Bullen, D.V.R., 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18, 332-334.

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

<http://www.who.int/leishmaniasis/en>

Kirkpatrick, C.E., Farrell, J.P., 1982. Leishmaniasis in beige mice. *Infect. Immun.* 38, 1208-1216.

Kretzschmar, T., von Rüden, T., 2002. Antibody discovery: phage display. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 598-602.

Kubar, J., Fragaki, K., 2005. Recombinant DNA-derived Leishmania proteins: from the laboratory to the field. *Lancet Infect. Dis.* 5, 107-114.

Liew, F.Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R.M., Moncada, S., 1990. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 144, 4794-4797.

Lindqvist, B.H., Naderi, S., 1995. Peptide presentation by bacteriophage P4. *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 33-39.

Makowski, L., 1993. Structural constraints of the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene.* 128, 5-11.

Matsuda, H., Wang, T., Managi, H., Yoshikawa, M., 2003. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 5317–5323.

Mattheus, D.J., Wells, J.A., 1993. Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science.* 260, 1113-1117.

Mauël, J., Ransijn, A., 1997. Leishmania spp. Mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp. Parasitol.* 87, 98–111.

McMahon-Pratt, D., Alexander, J., 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? Immunol Rev. 201, 206–224.

Méndez, M., Belkaid, Y., Seder, R.A., Sacks, D., 2002. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. Vaccine. 20, 3702-3708.

Mendonça, M.G., de Brito, M.E.F., Rodrigues, E.H.G., Bandeira, V., Jardim, M.L., Abath, F.G.C., 2004. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? J. Infect. Dis. 189, 1018–1023.

Minenkova, O., Gargano, N., De Tomassi, A., Bellintani, F., Pucci, A., Fortugno, P., Fuscaldi, E., Pessi, A., Rapicetta, M., Miceli, M., Ludicone, P., Cortese, R., Felici, F., Monaci, P., 2001. ADAM-HCV, a new-concept diagnostic assay for antibodies to hepatitis C virus in serum. Eur. J. Biochem. 17, 4758-4768.

Molineux, D.H., Killick-Kendrick, R., 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. The leishmaniasis in biology and medicine. Academic Press. Florida, pp.161-168.

Moody, S.F., 1993. Molecular variation in *Leishmania*. Acta Trop. 53, 185-204.

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

Murray, H.W., 1997. Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. J. Infect. Dis. 175, 1477–1479.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G., 2005. Advances in leishmaniasis. Lancet. 4, 1561-1577.

Nagill, R., Kaur, S., 2011. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. Int. Immunopharmacol.

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

Otero, A.C.S., Silva, V.O., Luz, K.G., Palatinik, M., Pirmez, C., Fernandes, O., Palatinik de Souza, C.B., 2000. Ocurrence of *Leishmania donovani* DNA in Donated Blood Donors. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62, 128-131.

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

Palatinik de Souza, C.B., Gomes, E.M., Paraguai de Souza, E., Santos, W.R., Macedo, S.R., Medeiros, L.V., Luz, K.G., 1996. The FML (fucose manose ligand) of *Leishmania donovani*. A new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human kala-azar. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 29, 153-163.

Paraguai de Souza, E., Bernardo, R.R., Palatinik, M., Palatinik de Souza, C.B., 2001. Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. Vaccine. 19, 3014-3015.

Pasqualini, R., Ruoslahti, E., 1996. Tissue targeting with phage peptide libraries. Mol. Psychiatry. 1, 423.

Phizicky, E.M., Fields, S., 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. Microbiol. 59, 94-123.

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

Reiner, N. E., 1994. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol Today*. 15, 374–381.

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

Rodi, D.J., Makowski, L., 1999. Phage-display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol*. 10, 87-93.

Russel, M., Lowman H.B., Clackson, T., 2004. Introduction to phage biology and phage display. In: Clackson, T., Lowman, H.B., *Phage Display*. Oxford University Press, 266, pp.1-26.

Russel, M., 1991. Filamentous phage assembly. *Mol. Microbiol*. 5, 1607-1613.

Salerno L., V. Sorrenti, S., C. Di Giacomo, C., G. Romeo, G., M.A. Siracusa, M.A., 2002. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr. Pharm. Design*. 8, 177–200.

Salvati, L., Mattu, M., Colasanti, M., Scalone, A., Venturini, G., Gradoni, L., Ascenzi, P., 2001. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1545, 357-366.

Schmidt, G. D., Roberts, L.S., 1996. Foundations of parasitology. Copyright, USA.

Schubach, A., Haddad, F., Neto, M.P.-O., Degraeve, W., Pirmez, C., Grimaldi, G., Fernandes, O., 1998. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J. Infect. Dis*. 178, 911–914.

Sidhu, S.S., 2001. Engineering M13 for phage display. *Biomol. Eng*. 18, 57-63.

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

Smith, G.P., 1991. Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2, 668-673.

- Smith, G.P., Petrenko, V.A., 1997. Phage Display. Chem.Rev. 97, 391-410.
- Smith, G.P., Schultz, D.A., Ladbury, J.E., 1993. A ribonuclease S-peptide antagonist discovered with a bacteriophage display library. Gene. 128, 37-42.
- Smith, G.P., Scott, J.K., 1993. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. Methods Enzymol. 217, 228-257.
- Solbach, W., Laskay, T., 2000. The host response to Leishmania infection. Adv. Immunol. 74, 275–317.
- Stephen, C.W., Lane, D.P., 1992. Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. J. Mol. Biol. 225, 577-583.
- Sternberg, N., Hoess, R.H., 1995. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 1609-1613.
- Stijlemans, B., Conrath, K., Cortez-Retamozo, V., Van Xong, H., Wyns, L., Senter, P., Revets, H., De Baetselier, P., Muyldermans, S., Magez, S., 2004. Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. J. Biol. Chem. 279, 1256-1261.
- Tang, S.S., Tan, W.S., Devi, S., Wang, L.F., Pang, T., Thong, K.L., 2003. Mimotopes of the Vi antigen of Salmonella enterica serovar typhi identified from phage display peptide library. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10, 1078-1084.
- Tesh, R. B., 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? Am. J. Trop. Med. Hyg. 52, 287–292.
- Urbanelli, L., Fortugno, P., Bartoli, F., Nuzzo, M., De Tomassi, A., Felici, F., Monaci, P., 2000. "Affinity maturation" of ligands for HCV-specific serum antibodies. J. Immunol. Methods. 236, 167-76.
- Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R. A., Maes, L., Cos, P., 2011. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. Free radical bio med. 51, 337-351.
- Van Nieuwenhove, L.C., Rogé, S., Balharbi, F., Dieltjens, T., Laurent, T., Guisez, Y., Büscher, P., Lejon V., 2011. Identificatin of Peptide

Mimotopes of *Trypanosoma brucei* gambiense variant Surface Glycoproteins. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1189.

Wilkins-Rodríguez, A.A., Escalona-Montaña, A.R., Aguirre-García, M., Becker, I., Gutiérrez-Kobeh, L., 2010. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. Exp. Parasitol. 126, 426-434.

Willis, A.E., Perham, R.N., Wraith, D., 1993. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. Gene. 128, 79-83.

Woo, E.R., Lee, J.Y., Cho, I.J., Kim, S.G., K.W. Kang, K.W., 2005. Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF- κ B activation in macrophages Pharmacol. Res. 51, 539-546.

Zimmermann, S., Moll, H., Solbach, W., Lüder, C. G. K., 2009. Meeting Report IFoLeish-2008: Current Status and Future Challenges in *Leishmania* Research and Leishmaniasis. Protist. 160, 151-158.

Capítulo II

Seleção de anticorpo recombinante e caracterização antigênica de seus ligantes em *L. amazonensis*

Resumo

Seleção de anticorpo recombinante e caracterização antigênica de seus ligantes em *L. amazonensis*

A *Leishmania amazonensis* é um dos agentes causadores da leishmaniose tegumentar no Novo Mundo. Apesar do fato de que os parasitas intracelulares representam a maior causa de doenças e apesar de anos de esforços, nenhuma vacina efetiva foi desenvolvida. Antígenos de superfície, secretados e excretados foram testados para seu potencial profilático por serem os primeiros fatores do parasito a interagir com sistema imune do hospedeiro e estão usualmente envolvidos no estabelecimento da infecção. Uma vez que a resposta humoral é induzida por epítomos na superfície de um antígeno, ao invés de um antígeno inteiro, é importante localizar estes epítomos com o objetivo de se conceber uma vacina eficaz. Neste intuito, a tecnologia de *phage display* foi utilizada para a seleção de anticorpos combinatoriais ligantes à superfície do parasito. Um anticorpo denominada La7h foi isolado e a sua reatividade em relação ao parasito foi testada por diferentes ensaios imunológicos demonstrando alta afinidade. Prováveis epítomos ligantes ao anticorpo recombinante foram caracterizados pela seleção de peptídeos recombinantes expressos em fagos, o que permitiu a caracterização de uma possível região antigênica comum em diferentes proteínas de superfície caracterizadas como principais na espécie. Por meio de imunoprecipitação utilizando o anticorpo recombinante em questão, foi possível isolar uma proteína de aproximadamente 42KDa. Tal achado corrobora com os alinhamentos lineares dos peptídeos recombinantes às proteínas de superfície e o estudo da estrutura tridimensional desta proteína contribui para a caracterização do sitio antigênico mapeado pelo anticorpo de fundamental interesse na busca de alvos vacinais mais direcionados e eficazes.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, proteínas de superfície, anticorpos combinatoriais, Fab.

Abstract

Selection of recombinant antibody and characterization of its ligands in *L. amazonensis*

Leishmania amazonensis is a causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. Despite the fact that the intracellular parasites represent a major cause of illness and despite years of efforts, no effective vaccine was developed. Surface antigens, secreted and excreted were tested for their prophylactic potential for being the first factors to interact with the parasite's immune system and are usually involved in the establishment of infection. Once the humoral response is induced by epitopes on the surface of an antigen, instead of a whole antigen, it is important to locate these epitopes with the goal of designing an effective vaccine. To this end, Phage Display technology was used for the selection of combinatorial antibody binding in the parasite's surface. An antibody named La7h has been isolated and their reactivity against the parasite was tested by different immunological assays demonstrated high affinity. Likely antibody binding epitopes were characterized by selecting recombinant peptide expressed in phages, which allowed the characterization of a possible antigenic region common to different surface proteins characterized as the main proteins in *Leishmania sp.* By immunoprecipitation with this recombinant antibody, was possible to isolate a protein with approximately 42KDa. This finding confirms the linear alignments of recombinant peptides to surface proteins, the study of three-dimensional structure of this protein has contributed to the characterization of antigenic sites mapped by the antibody of fundamental interest in finding vaccine targets more directed and effective.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, surface proteins , recombinant antibodies, Fab.

1. Introdução

As Leishmanioses ameaçam cerca de 350 milhões de homens, mulheres e crianças em 88 países ao redor do mundo. Acredita-se que 12 milhões de pessoas são consideradas atualmente infectadas, com estimativa de cerca de 1 - 2 milhões de novos casos a cada ano. A leishmaniose tegumentar é a forma mais comum enquanto a leishmaniose visceral é a forma mais severa, na qual órgãos vitais do corpo são afetados. (<http://www.who.int/leishmaniose/en>). A *Leishmania amazonensis* é um dos agentes causadores da leishmaniose tegumentar no Novo Mundo (Coltinho et al., 1987; Van Assche et al., 2011).

Protozoários parasitas intracelulares representam a maior causa de doenças e apesar de anos de esforços, nenhuma vacina efetiva foi desenvolvida para imunização de rotina contra estes patógenos (Goldszmid and Sher., 2010). Antígenos de superfície, secretados e excretados foram testados para seu potencial profilático por serem os primeiros fatores do parasito a interagir com sistema imune do hospedeiro e estão usualmente envolvidos no estabelecimento da infecção, sendo alguns dos mais importantes destes antígenos a gp63, gp46, kmp-11 e HASPB1 (Soto et al., 2009).

Uma vez que a resposta humoral é induzida por epítomos na superfície de um antígeno, ao invés de um antígeno inteiro, é importante localizar estes epítomos com o objetivo de se conceber uma vacina eficaz (Chen et al., 2011).

O advento da tecnologia de *phage display* revolucionou o mundo da produção de anticorpos monoclonais e pavimentou o caminho para inovações até então inéditas. As sequências gênicas de interesse podem ser inseridas dentro do gene de uma das proteínas do capsídeo viral, usualmente a gII ou gVIII. Como o fago replica seu DNA no interior do seu hospedeiro, o mesmo acontece com o DNA inserido (Smith and Petrenko, 1997).

A aplicação da tecnologia de *phage display* para elucidar os recursos químicos essenciais dos epítomos de patógenos por anticorpos pode prover informações importantes sobre os mecanismos moleculares destas doenças. Conjuntos de peptídeos selecionados podem também levar a um futuro desenho de novas drogas para terapêutica e/ou para fins diagnósticos. No campo do desenvolvimento de vacinas, mimetopos selecionados por *phage display* estão

sobre intensiva investigação para a produção de componentes vacinais que não representam necessariamente a estrutura completa equivalente ao antígeno original, mas fornecem imagens funcionais que podem substituir o antígeno original para o desenvolvimento de vacinas (Bastien et al., 1997; Agadjanyan et al., 1997; Grothaus et al., 2000).

O objetivo deste projeto foi selecionar e caracterizar um anticorpo recombinante, ligante à *L. amazonensis* intacta e determinar seu potencial alvo antigênico na superfície do parasito, para que possa ser testado como biomarcador diagnóstico ou alvo vacinal/terapêutico.

2. Material e Métodos

2.1 Parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram mantidas a 25°C em meio de cultura para insetos (Schneider's Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Para utilização nos ciclos de seleção de anticorpos recombinantes, os parasitos foram lavados duas vezes em PBS, sendo os sedimentados por centrifugação a 0,6 x g por 10 min a temperatura ambiente. Os parasitos foram ressuspendidos e o número de parasitos/mL foi determinado em câmara de Neubauer e assim, 2×10^6 promastigotos foram diluídos em 1 mL de meio de congelamento (soro fetal bovino contendo 10% de DMSO) como previamente descrito (Abi-Ghanem et al., 2008) e resfriado gradualmente até -80° C, temperatura na qual foram armazenado até o momento do uso.

Extratos protéicos de *L. amazonensis* foram preparados por ruptura dos parasitos com 6 ciclos rápidos de congelamento e descongelamento (nitrogênio líquido e 37°C, respectivamente), seguido de breve sonicação entre um ciclo e o subsequente. O extrato protéico obtido foi centrifugado 11.500 x g por 30 min no intuito de remover debris particulados. A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford e o sobrenadante dividido em alíquotas e estocados a -20°C.

2.2 Biblioteca de anticorpos recombinantes e seleção de ligantes a antígenos de superfície de *L. amazonensis*

A biblioteca de fragmentos de anticorpos recombinantes (Fab) descrita neste trabalho trata-se de uma biblioteca construída a partir de RNA mensageiro de pacientes com câncer de próstata, cortesia do Laboratório de Nanobiotecnologia tendo como responsável a aluna Thaise Gonçalves de Araújo (Araújo, 2009). A complexidade da referida biblioteca foi estimada em torno de $1,7 \times 10^6$ clones distintos. Nos ciclos de seleção foram utilizadas 10^9 unidades formadoras de colônias (CFU) de fagos que foram amplificados e infectados com fago *helper* para a produção de partículas virais expressando Fabs em suas superfícies.

Foram realizados dois ciclos de seleção da biblioteca de anticorpos contra a superfície dos promastigotos de *L. amazonensis* criopreservados. Com o intuito de minimizar reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, a biblioteca de anticorpos recombinantes foi previamente incubada com formas tripomastigostas de *T. cruzi* igualmente tratadas (número de parasitos e criopreservação). Ambos Tripanosomatídeos foram lentamente descongelados e sedimentados por centrifugação e em seguida, lavados com PBS seguindo a mesma condição de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e os parasitos diluídos em 100µL de solução de bloqueio para *biopanning* (0.1M NaHCO₃ pH 8.6, 5 mg/ml BSA and 0.02% NaN₃). A biblioteca previamente diluída em 50 µL do mesmo tampão foi submetida primeiramente à seleção negativa com tripomastigotos de *T. cruzi*, sendo ambos colocados em contato por 1h a temperatura ambiente e centrifugada novamente. O sobrenadante foi adicionado aos promastigotos de *L. amazonensis* e a mistura foi mantida em contato por 1h a temperatura ambiente.

Os fagos ligantes foram recuperados por centrifugação e da mesma forma, o sedimento lavado por 3 vezes com PBS para exclusão dos fagos não ligantes. Os fagos ligantes foram eluídos com glicina (0.1 M glicina-HCl, pH 2.2), e imediatamente neutralizados (2 mM Tris-HCl, pH 9.1). Os fagos foram reamplificados e titulados a fim de prover o material para o segundo ciclo de seleção que foi realizado nas mesmas condições acima descritas. O eluato do segundo ciclo de seleção foi adicionado à cultura de *E. coli* XL1-Blue. Os eluatos não amplificados e amplificados foram titulados para mensuração do número de

fagos selecionados. Todas as centrifugações mencionadas no processo de seleção foram de 750 x g por 5 min.

2.3 Produção e purificação de proteínas recombinantes

A partir da cultura de fagos proveniente dos ciclos de seleção, foi extraído DNA plasmidial (QIAprep Spin Miniprep Kit) e o mesmo foi transformado em *E. coli* TOP10 (Invitrogen) para produção da forma solúvel dos anticorpos recombinantes.

Os clones individualizados foram inoculados em 1 mL de meio SB contendo 100 mg/mL de carbenicilina e 2% de glicose 2 M (v/v), em placa *deep well* e incubados durante a noite sob agitação a 37°C. No dia seguinte, 50 µl da cultura foram transferidos para uma nova placa, contendo 1 mL de meio SB suplementado da mesma forma que o anteriormente citado, e mantido sob agitação a 37°C até atingir uma OD₆₀₀ próxima de 1. A cultura foi centrifugada a 3.700 rpm por 10 minutos e o sedimento ressuspendido em 1,5 mL de SB suplementado com carbenicilina (100 µg/mL) e IPTG a 2 mM. A placa foi incubada sob agitação a 30°C por 18 horas e em seguida foi centrifugada a 3.700 rpm por 20 minutos. O sobrenadante de cultura foi transferido para uma nova placa e armazenado a 4°C para ensaios preliminares de ELISA.

A expressão de anticorpos recombinantes em larga escala foi feita obedecendo as mesmas proporções acima descritas, e a purificação feita em coluna de afinidade (Ni sepharose His Trap HP - GeHealthcare) em HPLC, seguindo as recomendações do fabricante com concentrações de Imidazol otimizadas para 40mM nos tampões de amostra e ligação, mantendo-se o tampão de eluição indicado. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford e a pureza avaliada por SDS-PAGE (12%) corado com Comassie G.

2.4 Métodos imunológicos para análise dos fragmentos de anticorpos

2.4.1 ELISA

Os sobrenadantes de cultura dos clones selecionados foram submetidos à análise prévia frente a extrato total de *L. amazonensis*. Placas (Nunc - Polisorb) foram sensibilizadas com 1 µg por poço de extrato total em 50 µL de tampão carbonato (0,1 M NaHCO₃ pH 8.6) durante a noite a 4°C. No dia seguinte, a placa

foi bloqueada com 300 µL de leite em pó desnatado (3% em PBS) por 1h a temperatura ambiente. A placa foi lavada uma vez com PBS e posteriormente foram adicionados 100 µL de sobrenadante de cultura da expressão dos Fabs recombinantes, mantidos a 37°C por 1,5 h. A placa foi lavada por três vezes com PBST (PBS contendo 0,05% de Tween-20) e posteriormente foi adicionado anticorpo secundário anti-hemaglutinina marcado com peroxidase (mouse monoclonal anti-HA HRP) diluído em PBS (1:1000), o qual foi incubado por 1,5 h a temperatura ambiente. Foram realizadas mais três lavagens e a reação revelada com OPD (SigmaFast™ OPD) e a absorbância a 495 nm mensurada em leitora de microplacas. O clone mais reativo no ensaio anterior foi submetido à mesma análise, comparando a reatividade do mesmo com proteína de *T. cruzi*.

2.4.2 Imunofluorescência

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram fixadas em lâminas tratadas com silano (1×10^5 células/círculo). As células foram fixadas por imersão das lâminas em metanol previamente resfriado -20°C por 20 min e hidratadas por imersão das lâminas em PBS duas vezes por 5 min a temperatura ambiente. (Sherwin and Read, 1993). As células foram incubadas com: Fabs purificados, anticorpo secundário conjugado com FITC (mouse anti-HA monoclonal antibody FITC) e proteína A conjugada com FITC, todos estes diluídos em PBS. Cada uma das incubações ocorreu por 1h a temperatura ambiente seguida de três lavagens de 5 min por imersão em PBS. Os controles de reação foram feitos com omissão de cada um dos anticorpos e a reação foi visualizada em microscópio de fluorescência (Evos® fl - AMG).

2.4.3 Western Blot

Proteínas de *L. amazonensis* contidas no extrato total (50 µg) foram fracionadas por eletroforese (SDS-PAGE, 12%) e eletro transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond™ ECL™ 0.2 µm). Após visualização com Ponceau S, a membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado (3% em PBS) por 1h a temperatura ambiente. Fragmentos de anticorpos a serem testados, assim como os respectivos controles foram diluídos em PBS e incubados com a membrana previamente bloqueada durante a noite a

4°C sob suave agitação. Após uma breve lavagem com PBST (PBS contendo 0,05% Tween-20), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (mouse anti-HA HRP) em PBS (1:1000) por 1,5 h a temperatura ambiente e lavadas por 3 vezes como descrito acima. A membrana foi revelada com DAB (SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine).

2.5 Mapeamento antigênico parcial da proteína ligante ao anticorpo recombinante por biblioteca de peptídeos expressos em fagos

Para seleção de peptídeos recombinantes ligantes ao anticorpo previamente selecionado, foi utilizada uma biblioteca comercial de peptídeos expressos em fagos (™C7C - New England Biolabs Inc). Dois ciclos de seleção foram realizados. No primeiro ciclo um poço de microplaca (Nunc - Maxisorb) foi sensibilizado com 0,5 µg de anticorpo monoclonal para captura do Fab (mouse mab anti-(His)₆ antibody - Sigma) em tampão bicarbonato (0,1 M NaHCO₃ pH 8.6) e incubado durante a noite a 4°C. O anticorpo foi descartado e foram adicionados 300 µL de tampão de bloqueio (0,1 M NaHCO₃ pH 8.6, 5 mg/ml BSA and 0.02% NaN₃), por 1 h a 37°C. Posteriormente 20 µg do Fab previamente selecionado e diluído em 50 µL de TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.5) foi adicionado por 1 h a 37°C. O poço foi lavado cinco vezes com TBST (TBS contendo 0.1% Tween-20). No primeiro ciclo de seleção, 10 µL (1.5×10¹¹ partículas virais) da biblioteca foram diluídos em 100 µL de TBST e incubados com o fragmento de anticorpo Fab ligado ao poço por 1h a temperatura ambiente sob agitação leve. Após 10 lavagens com TBST, os fagos ligantes foram eluídos competitivamente com 30 µg de proteínas de *L. amazonensis* por 1h a 37°C. O sobrenadante foi coletado, titulado, amplificado em *E.coli* ER2738 e precipitado com PEG/NaCl.

O segundo ciclo de seleção foi realizado nas mesmas condições acima descritas, exceto quanto à concentração do TBST que passou de 0,1% para 0,5%. Os fagos obtidos ao final dos ciclos de seleção foram amplificados para extração de DNA e posterior sequenciamento do DNA do inserto ligado ao gene codificador da proteína gIII. As amostras isoladas foram submetidas ao sequenciamento automático utilizando o *Kit Big Dye Terminator* (GE Healthcare) e sequenciador automático *MegaBace 1000* (GE Healthcare). As sequências de

aminoácidos foram deduzidas a partir da sequência de DNA e comparadas com proteínas de superfície de *Leishmania spp.*

2.6 Identificação da proteína nativa ligante ao Fab – Imunoprecipitação

Para captura da proteína ligante ao anticorpo recombinante, foi utilizado um sistema magnético, utilizando para captura do anticorpo recombinante *beads* magnéticos acoplados a anticorpo monoclonal anti-His₍₆₎ (Mouse anti-His mab MagBeads - GenScript) segundo as recomendações do fabricante. Os *beads* foram ressuspensos e transferidos para um tubo de ensaio, com o auxílio de um aparato magnético, o sobrenadante foi descartado e os *beads* lavados por duas vezes com um mL de tampão de ligação. Após a lavagem, os *beads* foram ressuspensos em tampão de ligação e foi adicionado 50 µg do anticorpo recombinante. O tubo foi agitado gentilmente e mantido a temperatura ambiente sob agitação por 1h. O sobrenadante foi descartado e os *beads* lavados por três vezes como anteriormente mencionado.

Os *beads* magnéticos acoplados ao anticorpo recombinante foram divididos em dois tubos, sendo uma alíquota reservada para análise em SDS-PAGE e à outra foram adicionadas 200 µg da proteína alvo – proteína total de *L. amazonensis*. Os tubos foram invertidos gentilmente e incubados a 4°C por uma hora. O sobrenadante foi descartado e os *beads* lavados com 500 µL de tampão de ligação e em seguida foi adicionado 20 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e os *beads* incubados por 5 min a 100°C. Após incubação eles foram separados utilizando o aparato magnético e o eluato transferido para um tubo novo e analisado por SDS-PAGE. O ensaio foi realizado utilizando-se como controle um anticorpo selecionado sob as mesmas condições do anticorpo testado, tendo como alvo uma cepa de *T. cruzi*.

2.7 Bioinformática

Programas de bioinformática disponíveis *on line* foram utilizados para a predição das sequências de aminoácidos a partir da sequência de DNA correspondente (<http://expasy.org/tools/dna.html>); alinhamento das sequências de aminoácidos umas com as outras e com proteínas de interesse (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>); predição de regiões antigênicas

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>); sequências e caracterização de proteínas (<http://www.uniprot.org/>), alinhamento em estrutura tridimensional - Pepsurf (<http://pepitope.tau.ac.il/index.html>). Para inferência de estrutura tridimensional foi utilizado o programa LOMETS (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS>), os modelos gerados foram analisados e alinhados com os peptídeos recombinantes pelo mesmo programa acima referido. As sequências das proteínas utilizadas para alinhamentos foram obtidas no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

2.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software Prism 5 (GraphPad Prism5).

3. Resultados

3.1 Especificidade de ligação do Fab selecionado por ensaios imunológicos

Dois ciclos de seleção foram realizados contra promastigotos de *L. amazonensis*. Para padronização da qualidade do material alvo e para a manutenção da membrana dos parasitos, os mesmos foram criopreservados estando assim disponíveis para cada ciclo de seleção.

Após dois ciclos de seleção em busca de anticorpos com afinidade à forma promastigota de *L. amazonensis*, com eluição negativa para tripomastigotos de *T. cruzi*, o DNA dos clones resultantes foi purificado e transformado em cepa de *E. coli* não supressora (XL1-Blue) para expressão da forma solúvel da proteína recombinante.

Ensaio preliminar de ELISA com o sobrenadante dos clones selecionados frente à proteína total de *L. amazonensis* demonstrou a presença de um anticorpo de reatividade diferenciada dentre os demais, este clone foi denominado La7h. Tal clone foi submetido ao mesmo teste para caracterização da sua especificidade comparada ao *T. cruzi*, ensaio que mostrou reatividade diferenciada para *L. amazonensis*, como mostrado na **Figura 1**. Fenômeno este confirmado por imunocitoquímica demonstrada na **Figura 2**; ELISA convencional e ELISA utilizando o parasita inteiro; contudo, não foi possível observar a ligação do anticorpo recombinante em ensaios envolvendo desnaturação protéica, como

por exemplo quando o anticorpo foi analisado por *dot blot* e *western blot* em gel sob condições desnaturantes (dados não mostrados), sugerindo tratar-se de um antígeno conformacional.

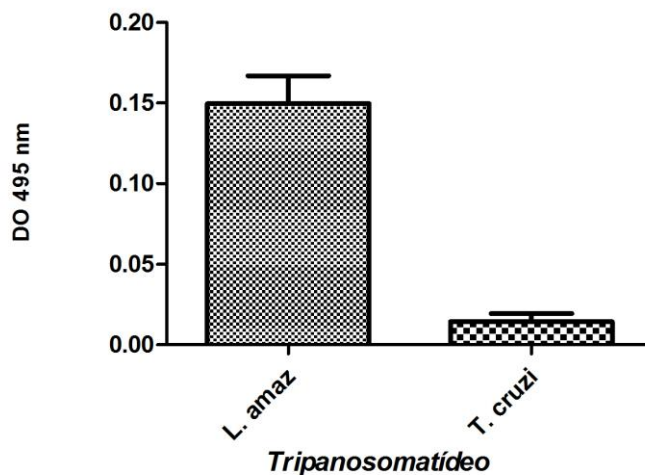


Figura 1: Teste da especificidade do anticorpo recombinante La7h contra proteínas de tripanosomatídeo (*L. amazonensis* e *T. cruzi*) em ensaio de ELISA. 1 µg/poço dos antígenos foram utilizados para sensibilização, sobrenadante de cultura do Fab foi adicionado e a ligação detectada utilizando anti-HA conjugado com peroxidase. As médias das triplicatas foram analisadas mostrando $P=0.0016$.

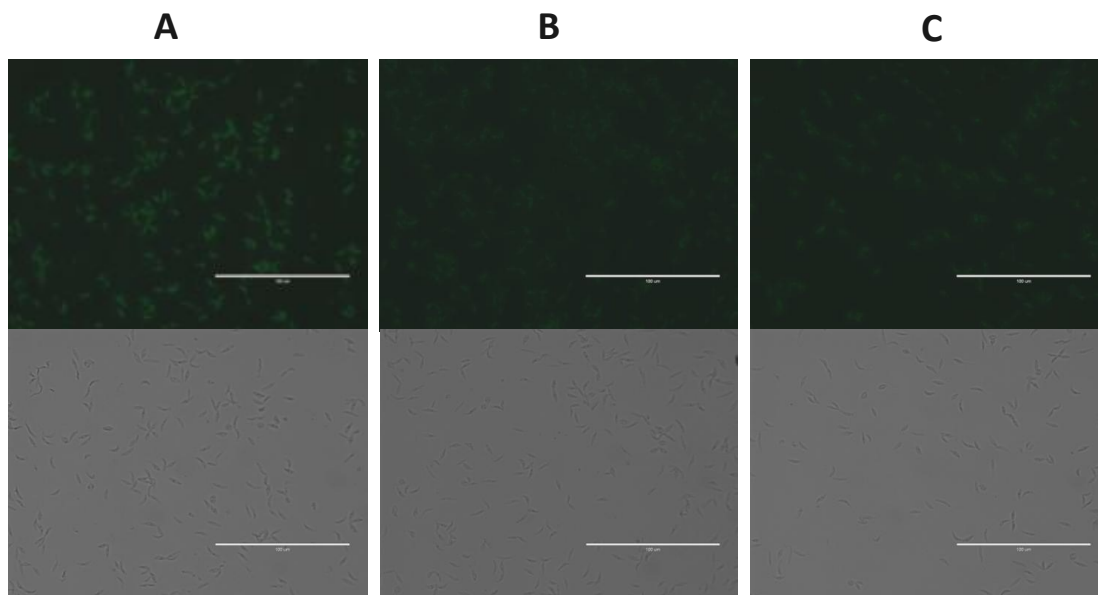


Figura 2: Imunocitoquímica: marcação de *L. amazonensis* com anticorpos recombinantes selecionados por *phage display* para diferentes alvos. A detecção foi feita utilizando anticorpos anti-HA conjugado com FITC e anti-proteína A conjugada com FITC. Sendo A: La7h (Fab selecionado para *L. amazonensis*); B: Tc10c (Fab selecionado para *T. cruzi*) e C: Anticorpo Fab irrelevante (selecionado contra tumores de mama).

3.2 Identificação da proteína de ligação ao anticorpo recombinante

Para identificação da proteína ligante ao anticorpo foi realizada imunoprecipitação por meio de anticorpo monoclonal anti- His₍₆₎ acoplado a *beads* magnéticos para captura do anticorpo recombinante La7h e controle de reação, e em seguida ligação à proteína total de *L. amazonensis* que foram eluídas por aquecimento para análise de SDS-PAGE. O ensaio demonstrou afinidade diferencial do anticorpo La7h a uma proteína de aproximadamente 42KDa, quando comparado ao anticorpo controle, como mostrado na **Figura 3**.

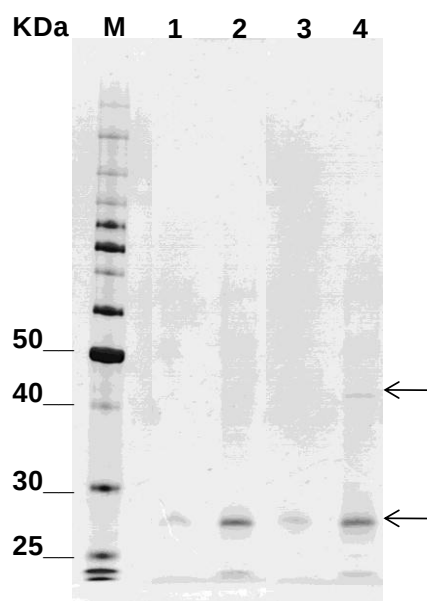


Figura 3: SDS-PAGE das proteínas imunoprecipitadas pelos *beads* magnéticos anti-His₍₆₎. M: marcador de peso molecular; 1 e 3 (Fab controle e La7h respectivamente) anticorpos Fab precipitados, sem a presença da proteína de *L. amazonensis*. 2 e 4 (Fab controle e La7h respectivamente), na presença de proteína de *L. amazonensis*. A seta superior indica a banda de aproximadamente 42KDa, imunoprecipitada diferencialmente pelo Fab La7h e a seta inferior indica os anticorpos recombinantes.

3.3 Mapeamento antigênico de ligantes ao anticorpo recombinante

Com o intuito de mapear a região da proteína ligante ao anticorpo recombinante La7h, e relacioná-la à proteína imunoprecipitada por este mesmo anticorpo, foi realizada uma seleção de peptídeos recombinantes conformacionais de sete aminoácidos contra o anticorpo recombinante em questão. Após dois ciclos de seleção, os clones foram isolados e analisados por sequenciamento do DNA do vetor e predição da sequência de aminoácidos. A partir destas sequências foram identificadas 19 sequências peptídicas, que quando alinhadas umas com as outras apresentam consenso entre as sequências de aminoácidos.

As sequências peptídicas foram alinhadas com as sequências de aminoácidos lineares de algumas das principais proteínas de superfície de *Leishmania spp.* sendo elas: GP46/M2, GP63, KMP-11 (**Figura 4**) permitindo a identificação de regiões de alinhamento dos peptídeos selecionados em cada uma destas proteínas.

B07	-----SPTLPFR-----	7
C07	-----PTSPPR-----	7
D07	-----HAKLPHR-----	7
D09	-----SRLSPVS-----	7
kmp-11	FFADKPDESTLSPEMKEHYEKFERMIKEHTDKFNKKMHEHSEHFKQKFAELLEQQKAAQY	89
B04	-----SPLSPLF-----	7
C03	-----FPSHPPS-----	7
C04	-----LQSPSQP-----	7
C05	-----TP--P-----	3
gp63	TCGIRGYSTPFSPYWQYFTNISLGGYSPFLDYCPFVIGYGDGSCNQDASLATGFFGAFNV	480
D01	-----DPLIP-----	5
C02	-----LSSNPSS-----	7
D11	-----STYPASI-----	7
C06	-----STPSSSS-----	7
gp46	PTTTGTAAASSTPSPGSGCEVDGCEVCEGDSAARCAREGYSLTDEKTCIGEPWRWRRGG	299
C01	-----RAQVHHE-----	7
D03	-----QSSHELQ-----	7
C09	-----LQPRLH-----	7
A05	-----LGASQAT-----	7
B09	-----FNRAAHH-----	7
D02	-----TAPWSFF-----	7
B10	-----PFDESKT-----	7

Figura 4: Alinhamento dos peptídeos recombinantes selecionados com as proteínas de superfície KMP-11, GP63 e GP46 de *L. amazonensis* (Clustal W). Nota-se o alinhamento dos clones em regiões específicas de cada uma das proteínas.

A partir da análise de antigenicidade das regiões de alinhamento, foi possível verificar que grande maioria destas regiões refere-se a regiões antigênicas como mostrado na Tabela 1. Tais resultados inferem a existência de epítomos comuns entre estas proteínas de superfície que puderam ser mapeadas pelo anticorpo recombinante La7h selecionado por meio da metodologia de *phage display*, epítomo este de maior relevância na proteína GP46, homóloga à proteína de 42KDa, supostamente capturada pelo anticorpo recombinante La7h.

Tabela 1: Alinhamento linear de proteínas de superfície de *L. amazonensis* com peptídeos recombinantes selecionados contra anticorpo recombinante específico ao mesmo parasito.

Proteína de superfície de <i>L. amazonensis</i> (UniProtKB)	Região de alinhamento dos peptídeos recombinantes (ClustalW)	Resultado da Predição (BepiPred 1.0)
GP46 (P21978)	250 – 256	Epítopo
GP63 (Q27673)	439 – 437	Epítopo parcial
KMP-11 (Q9GU60)	36 – 44	Epítopo

Ao alinhamento dos peptídeos recombinantes com a estrutura tridimensional da proteína GP63 e GP46 permitiu a melhor caracterização das regiões mapeadas consensuais dadas pelo anticorpo recombinante La7h, como mostrado na Tabela 2 e 3 respectivamente. Todos os alinhamentos independentemente do grupo mostraram $P < 0.01$.

Tabela 2: Alinhamento tridimensional dos peptídeos recombinantes selecionados contra anticorpo recombinante específico a *L. amazonensis*, com a proteína de superfície gp63.

GP63 Grupo (PepSurf)	Peptídeos recombinantes associados	Região envolvida	Número de aminoácidos alinhados	Aminoácidos em regiões antigênicas (BepiPred 1.0)
Grupo 1	16	260 – 445	40	50%
Grupo 2	2	418 – 465	9	55,5%
Grupo 3	1	468 – 527	6	33,3%

A grande maioria dos peptídeos recombinantes, referente ao primeiro grupo de aminoácidos acima descritos (16 de 19 peptídeos) alinha-se na mesma região da estrutura tridimensional da proteína, região esta que também envolve a região linear caracterizada pelo alinhamento em estrutura linear mostrado na tabela 1 (**Figura 5**).

Tabela 3: Alinhamento tridimensional dos peptídeos recombinantes selecionados contra anticorpo recombinante específico a *L. amazonensis*, com a proteína de superfície gp46.

GP46 Grupo (PepSurf)	Peptídeos recombinantes associados	Região envolvida	Número de aminoácidos alinhados	Aminoácidos em regiões antigênicas (BepiPred 1.0)
Grupo 1	4	420 - 476	22	50%
Grupo 2	3	126 - 181	16	55,0%
Grupo 3	3	295 - 404	14	40,00%

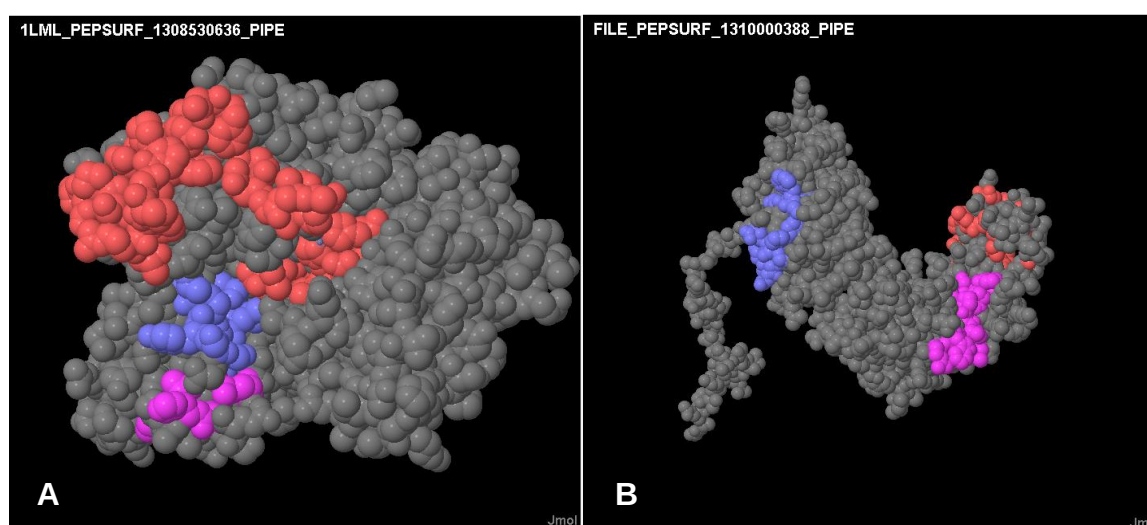


Figura 5: Alinhamento dos peptídeos recombinantes na estrutura tridimensional da proteína de superfície GP63 (A) e GP46 (B). Os alinhamentos deram-se em três regiões distintas, sendo mostradas em vermelho (Grupo 1), Azul (Grupo 2) e Rosa (Grupo 3) com relação à Tabela 2 e 3.

4. Discussão

Este estudo é o primeiro relato da seleção de uma biblioteca combinatorial Fab contra *L. amazonensis* intacta por *phage display*, em que um anticorpo recombinante ligante foi caracterizado por sequenciamento, ELISA, imunocitoquímica e bioinformática e está associado a um antígeno específico de superfície do parasito.

Outra investigação que utilizou a seleção de scFv contra cinco proteínas de *L. major*, expressas em *E. coli*, secretadas e purificadas, descreve superficialmente os anticorpos obtidos e apenas dois são pré-validados por western blot, mas com alta inespecificidade (Shea et al., 2005), provavelmente por terem sido realizadas contra proteínas purificadas em um organismo

hospedeiro (*E. coli*) e que geralmente não se apresentam com a estrutura original. Diferentemente, demonstramos ter um anticorpo específico Fab à um antígeno de superfície, e também caracterizamos a sequência de sua cadeia pesada (dados não mostrados).

É sabido que uma resposta imune protetora é dependente não somente da indução de uma resposta imune Th1, mas há indícios de que alguns antígenos de leishmania requerem uma conformação próxima à nativa para serem protetores. Modificações pós-traducionais e o enovelamento da proteína podem ser importantes não somente para a indução de anticorpos neutralizantes, mas também para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora (Sjölander et al., 1998).

Tendo em vista que anticorpos capazes de reconhecer antígenos de superfície podem ser considerados como candidatos para efetores imunes e que antígenos contendo epítomos expostos são fortes candidatos para alvos vacinais (Sepulveda et al., 2010); nós investigamos a potencialidade de ligação deste anticorpo Fab ao seu alvo de diferentes maneiras, que demonstraram reatividade eficaz.

Testes imunológicos inferiram tratar-se de um anticorpo com afinidade limitada à forma nativa de sua proteína alvo. Fato este suportado pela estratégia de seleção adotada, na qual foi mantida a estrutura intacta do parasito, sabendo-se que a seleção de anticorpos em células intactas oferece a vantagem de isolar anticorpos contra epítomos nativos (Abi-Ghanem et al., 2008).

Com o intuito de caracterizar a proteína alvo de ligação deste anticorpo recombinante, fez-se a imunoprecipitação da proteína na sua forma nativa, utilizando proteína total do parasito. Comparando-se a afinidade de ligação deste anticorpo recombinante com o anticorpo controle, foi possível identificar a precipitação diferencial de uma proteína de aproximadamente 42 KDa. Fazendo uso da potencialidade da tecnologia de *phage display* no mapeamento antigênico de anticorpos, foi utilizada uma biblioteca comercial de peptídeos conformacionais para o mapeamento e caracterização de epítomos da proteína alvo do anticorpo recombinante. Selecionou-se 19 sequências peptídicas, em dois ciclos de seleção contra o anticorpo recombinante, as quais apresentaram homologia com as três

proteínas de superfície deste parasito mais frequentes e de interesse vacinal e diagnóstico.

Ferramentas de bioinformática foram utilizadas para o alinhamento dos peptídeos recombinantes com as principais proteínas de superfície do parasito (gp46, gp63, kmp-11) como anteriormente revisado (Sepulveda et al., 2010). Os alinhamentos lineares destas proteínas com as sequências peptídicas possibilitaram a identificação de um motivo protéico comum nestas três proteínas, que pode ser alvo importante na resposta imunológica que envolve este parasito e seu hospedeiro, por estarem localizados em regiões sabidamente imunogênicas destas proteínas.

Pelo fato da proteína GP46 homóloga a uma proteína de 42 KDa, forma não glicosilada da molécula (Lohman et al., 1990; Burns et al., 1991), ser uma das proteínas envolvidas no mapeamento deste epítipo linear, sugere-se que este epítipo esteja envolvido no sítio de ligação efetivo do anticorpo recombinante com a proteína imunoprecipitada. Interessantemente, durante a seleção subtrativa com *T. cruzi*, também identificamos outro Fab ligante de tripanosomatídeos e que não foi capaz de imunoprecipitar a proteína de 42 KDa de *L. amazonensis*.

Considera-se que o alinhamento e a comparação de sequências de aminoácidos de clones selecionados contra anticorpos monoclonais podem determinar uma ou mais sequências consenso e que esta abordagem permite mapear epítipos de microrganismos de uma maneira eficaz. Sendo que estes perfis não somente revelam o papel importante de cada antígeno, mas também fornecem as estruturas de epítipos dentro de uma proteína antigênica que estão envolvidas no desencadeamento das respostas imunes (Y. Li et al., 2008). É importante enfatizar que a tecnologia *phage display* é particularmente interessante e muito eficaz no mapeamento de epítipos conformacionais.

Considerando que os epítipos estão expostos na superfície de regiões antigênicas de proteínas, a disposição dos peptídeos recombinantes na estrutura tridimensional da proteína GP63 e GP46 foram exemplificadas, sendo estas proteínas altamente abundantes na superfície de promastigotos com caracterização e função bem definidas (Yao, 2003). Esta análise, que foge da estrutura linear dos aminoácidos da proteína em questão, demonstrou que a grande maioria dos peptídeos recombinantes conformacionais selecionados

possuem homologia em uma região específica e imunogênica da molécula, corroborando com a hipótese de que o mapeamento de pequenos sítios protéicos ligantes a anticorpos monoclonais podem definir regiões de importância particular.

Esta inferência é reforçada pelo fato das proteínas de superfície aqui mencionadas serem alvo de estudos quanto aos seus potenciais diagnóstico e vacinal, revisado por Soto (2009).

Ainda como forma de validação, o Fab marcou especificamente todo o parasito na imunocitoquímica demonstrando ser um alvo altamente frequente na superfície do parasito e peptídeos tripsinizados de antígenos totais foram imunocapturados magneticamente com o Fab e submetidos à espectrometria de massas (análises em andamento).

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

Desta forma, reconhecemos a flexibilidade da tecnologia de *phage display* na seleção de anticorpos e peptídeos recombinantes capazes de mapear sítios de importância particular nas proteínas envolvidas e que o anticorpo recombinante aqui selecionado, bem como o sítio antigênico por ele caracterizado, devem ser alvos de estudos posteriores para avaliações funcionais de interesse diagnóstico e vacinal na busca de vacinas mais eficazes e específicas que gerem respostas direcionadas ao parasito.

5. Bibliografia

Abi-Ghanem, D., Waghela, S.D., Caldwell, D.J., Danforth, H.D., Berghman, L.R., 2008. Phage display selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against *Eimeria tenella* sporozoites. Vet. Immuno. Immunopathol. 15, 58-67.

Agadjanyan, M., Luo, P., Westerink, M.A., Carey, L.A., Hutchins, W., Steplewski, Z., Weiner, D.B., Kieber-Emmons, T., 1997. Peptide mimicry of Carbohydrate epitopes on human immunodeficiency virus. *Nat. Biotechnol.* 15, 547-51.

Araújo, TG. Construção de uma biblioteca de anticorpos recombinantes (fab) anti - carcinoma mamário e obtenção de fragmentos ligantes de antígenos tumorais por *phage display*. 2009. 118 f. Tese (Mestrado) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

Bastien, N., Trudel, M., Simard, C., 1997. Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus. *Viol.* 234, 118-22.

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

Burns, J.M., Scott, J.M., Carvalho, E.M., Russo, D.M., March, C.J., Van Ness, K.P., Reed, S.G., 1991. Characterization of a membrane antigen of *Leishmania amazonensis* that stimulates human immune responses. *J. Immunol.* 146, 742-748.

Chen, W.H., Sun, P.P., Lu, Y., Guo, W.W., Huang, Y.X., Ma, Z.Q., 2011. MimoPro: a more efficient Web-based tool for epitope prediction using phage display libraries. *BMC bioinformatics*. 12, 199.

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

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

Coutinho, S.G., Mendonça, S.C.F., Conceição-Silva, F., Dorea, R.C.C. 1987. Pathogenesis and Immunopathology of leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82, 214-228.

Goldszmid, R.S., Sher, A., 2010. Processing and presentation of antigens derived from intracellular protozoan parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 118-123.

Grothaus, M.C., Srivastava, N., Smithson, S.L., Kieber-Emmons, T., Williams, D.B., Carlone, G.M., Westerink, M.A., 2000. Selection of an immunogenic peptide

mimic of the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A using a peptide display library. *Vaccine*. 18, 1253-1263.

Li, Y., Ning, Y.S., Wang, Y.D., Luo, J., Wang, W., Dong, W.Q., Li, M., 2008. Production of mouse monoclonal antibodies against *Helicobacter pylori* Catalase and mapping the antigenic epitope by phage display library. *Vaccine*. 26, 1263-1269.

Lohman, K.L., Langer, P.J., McMahon-Pratt, D., 1990. Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 8393-8397.

Sepulveda, J., Tremblay J.M., DeGnore, J.P., Skelly, P.J., Shoemaker, C.B., 2010. *Schistosoma mansoni* host-exposed surface antigens characterized by sera and recombinant antibodies from schistosomiasis-resistant rats. *Int. J. Parasitol.* 40, 1407-1417.

Shea, C., Bloedorn, L., Sullivan, M.A., 2005. Rapid isolation of single-chain antibodies for structural genomics. *J. Struct. Funct. Genomics*. 6, 171–175.

Sherwin, T., Read, M., 1993. Immunofluorescence of parasites. In: *Methods in molecular biology*. Clifton, N.J. 21, pp. 407-414.

Sjölander, A., Baldwin, T.M., Curtis, J.M., Bengtsson, K.L., Handman, E. 1998. Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. *Vaccine*. 16, 2077-2084.

Soto, M., Ramírez, L., Pineda, M.A., González, V. M., Entringer, P. F., Nascimento, I.P., Souza, A.P., Corvo, L., Alonso, C., Bonay, P., Brodskyn, C., Barral, A., Barral-Netto, M., Iborra, S., 2009. Searching Genes Encoding *Leishmania* Antigens for Diagnosis and Protection. *Scholarly Res. Exchange*. 1-25.

Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R. A., Maes, L., Cos, P., 2011. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Bio. Med.* 51, 337-351.

Yao, C., Donelson, J.E., Wilson, M.E., 2003. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol. Biochem. Parasitol.* 132, 1-16.

Capítulo III

**Identificação de peptídeos miméticos a
antígenos relacionados às leishmanioses
por meio da tecnologia de *Phage Display***

Resumo

Identificação de peptídeos miméticos a antígenos relacionados às leishmanioses por meio da tecnologia de *Phage Display*

A leishmaniose é uma doença tropical importante e com incidência crescente a nível mundial, pois não existem vacinas disponíveis e o seu controle é baseado no diagnóstico e tratamento, o que muitas vezes apresenta efeitos colaterais severos. Os testes não são eficazes, pois deixam de detectar com especificidade e sensibilidade as várias formas da doença, além de não identificarem recidiva de reinfecção. Portanto, testes diagnósticos altamente precisos, de baixo custo, de utilização simples e rápida são cruciais para o controle e tratamento das leishmanioses, mas novos antígenos se tornam necessários para o aprimoramento de tais testes. Neste sentido propomos desenvolver peptídeos miméticos de antígenos de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* pela técnica de *Phage Display* como estratégia proteômica para a descoberta de novos antígenos mais eficazes e sensíveis. Seleções de peptídeos randômicos por *Phage Display* foram realizadas contra IgG purificada de pacientes com Leishmaniose visceral e tegumentar como forma de mapear antígenos que reconhecessem a resposta imunológica específica nas duas formas clínicas e que pudessem oferecer uma nova abordagem terapêutica. Os clones foram purificados, amplificados, sequenciados e analisados por bioinformática. Diversos peptídeos recombinantes foram caracterizados e pré-validados por ELISA, dot-blot competitivo e ensaios funcionais com cultura de macrófagos. Nossos resultados mostraram que foram selecionados peptídeos recombinantes específicos para ambas as formas da doença que se relacionam com importantes antígenos utilizados tanto como ferramentas diagnósticas como alvos vacinais.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, *Leishmania amazonensis*, *Phage Display*, Peptídeos recombinantes.

Abstract

Identification of peptides mimetics to antigens related to leishmaniasis by Phage Display Technology

Leishmaniasis are an important tropical disease with increasing incidence worldwide, because there are no vaccines available and its control is based on the diagnosis and treatment which often has severe side effects. The diagnostic tests are not effective, they fail to detect the sensitivity and specificity in the various forms of the disease, and don't identify release from infection. Therefore, highly accurate diagnostic tests, inexpensive, simple and fast are crucial for the control and treatment of leishmaniasis, but new antigens would be required for the improvement of such tests. In this sense we propose to develop mimetic peptides of *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* by Phage Display technology as a strategy for the proteomic discovery of new antigens more effective and sensitive. Phage Display random peptide selections were carried out against purified IgG from visceral and cutaneous leishmaniasis in order to map antigens that recognize the specific immune response in both clinical forms. The clones were purified, amplified, sequenced and analyzed by bioinformatics. Several recombinant peptides were characterized and pre-validated by ELISA, competitive dot-blot and functional tests with macrophage culture. Our results showed that specific recombinant peptides were selected for both disease forms and they are related to important antigens used for diagnostic tools and vaccine targets.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, *Leishmania amazonensis*, Phage Display, Recombinant peptides.

1. Introdução

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada com um amplo espectro clínico que possui o envolvimento cutâneo, mucocutâneo e visceral. Seus sintomas são variáveis e o diagnóstico pode ser desafiador. A ocorrência de infecção é determinada pela espécie do parasito e pela resposta imunológica do hospedeiro (Roberts, 2006).

A leishmaniose visceral (LV) é geralmente causada por *L. chagasi*, *L. donovani*, ou *L. infantum* (Pearson and Sousa, 1996), enquanto a leishmaniose tegumentar é causada pelas *Leishmania major*, *L. tropica*, e *L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamanensis* e *L. guyanensis* no Novo Mundo (Van Assche et al., 2011).

O teste diagnóstico mais promissor é o de aglutinação direta, onde há detecção do antígeno rK39 na urina com sensibilidades que atingem entre 87 a 95% (Boelaert et al., 2004). Um teste indireto com anticorpo fluorescente foi desenvolvido, mas testes sorológicos de campo podem ser de alto custo e não confiáveis, resultando em uma grande proporção de falsos negativos em pacientes imunodeficientes, além de serem menos precisos em leishmaniose cutânea. O teste diagnóstico padrão-ouro continua sendo o parasitológico em biópsias de tecidos afetados, como linfonodos, baço ou aspirados de medula óssea, com positivities que se aproximam a 80% neste último (Zijlstra et al., 1992). As técnicas baseadas em PCR também têm sido empregadas com sucesso (De Doncker et al., 2005).

A leishmaniose visceral é fatal se não for adequadamente tratada. Os medicamentos usados atualmente para tratar LV podem ter efeitos colaterais graves e a apresentação clínica da LV não é suficientemente específica para orientar o tratamento. Testes diagnósticos altamente precisos (sensíveis e específicos), baratos, simples e rápidos são, portanto, cruciais para o controle e tratamento de LV. A detecção precoce de casos seguido pelo tratamento adequado é central no controle de LV, pois até agora nenhuma vacina está disponível e o impacto a longo prazo do controle de vetores não é claro. Embora a necessidade de diagnósticos precisos de LV seja óbvia, a inovação neste campo tem sido lenta. Desde os anos 1980, o principal objetivo para o desenvolvimento

de novos diagnósticos de LV é a substituição da demonstração direta de parasitos em esfregaços de tecidos. Os médicos não têm as ferramentas necessárias para distinguir re-infecção de recorrência em casos de reincidência, e programas de controle não têm validado os ensaios para a vigilância de resistência a drogas em parasitos. Além disso, no contexto da iniciativa de eliminação da LV, seria desejável ter melhores marcadores para a detecção de infecção por *Leishmania* em nível populacional (Boelaert et al., 2007).

Três estratégias para a descoberta de antígenos têm sido usadas com a caracterização de diversos alvos potenciais, os quais foram obtidos por: separação bioquímica de proteínas secretadas (TSA), purificação de proteínas de superfície (gp63, gp46/PSA/M2, KMP-11) e avaliação imunológica de bibliotecas de expressão (cDNA e DNA genômico) contra soro de pacientes infectados (kinesina, cisteína-proteinase - CPA/B/C, LACK, A2, LeIF; proteínas de choque térmico - HSP70, HSP83, GRP94, HSP20, STI1, proteínas ribossomais - P2a/b, LiP0; e histonas - H1/H2A/H2B/H3/H4) (Soto et al., 2009). Contudo, somente o rK39 tem se mostrado útil no diagnóstico de leishmaniose visceral.

A tecnologia de *Phage Display* tem se mostrado uma poderosa ferramenta para a seleção e engenharia de peptídeos (Park et al., 2009), sendo amplamente utilizada nos últimos anos na área da parasitologia, tanto na busca de novos alvos diagnósticos (da Silva Ribeiro et al., 2010), como no melhor entendimento das relações parasito-hospedeiro (Van Nieuwenhove et al., 2011)

Uma abordagem importante e complementar para a descoberta de antígenos é a análise *in silico* que tem sido usada para determinar características protéicas, que são importantes para a seleção de antígenos, e podem também levar à identificação de potenciais candidatos vacinais (Prudencio et al., 2009). Nosso grupo tem trabalhado neste intuito, mapeando antígenos relacionados às leishmanioses e buscando possíveis associações diagnósticas, vacinais e/ou terapêuticas (Almeida, 2005; Goulart, 2010).

Este trabalho teve como objetivos selecionar competitivamente peptídeos recombinantes ligantes a anticorpos de pacientes acometidos pelas leishmanioses, caracterizar motivos protéicos que mimetizam regiões antigênicas de proteínas de *Leishmania* e antígenos de interesse diagnóstico e vacinal para

as doenças causadas por parasitos deste gênero, gerando assim um banco de peptídeos com potencial imunogênico e diagnóstico.

2. Material e Métodos

2.1. Seleção e caracterização de peptídeos recombinantes

2.1.1. Material Biológico: Imunoglobulinas (IgG) e Proteína total e recombinante

A purificação de imunoglobulinas foi realizada por imunocromatografia a partir de um *pool* de soros de pacientes com Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar (Laboratório de Biologia Molecular – Universidade Federal de Uberlândia) utilizando coluna montada com proteína A sepharose (Sigma). A coluna foi equilibrada com 10 volumes de tampão fosfato (0,1 M, pH 8,0).

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

As proteínas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram obtidas por ruptura dos parasitos com 6 ciclos rápidos de congelamento e descongelamento (nitrogênio líquido e 37°C), seguido de breve sonicação entre um ciclo e outro. O extrato protéico obtido foi centrifugado 11.500 x g por 30 min no intuito de remover debris particulados. A proteína recombinante rK39 (proteína de *L. chagasi*) foi obtida por doação (DiaMed Latino América). Todas as proteínas foram aliquotadas e armazenadas a -20°C.

2.1.2. *Biopanning: Seleção de Peptídeos Recombinantes*

Para a seleção dos peptídeos recombinantes (peptídeos expressos na proteína pIII de fagos filamentosos) foi utilizada uma biblioteca comercial de 12 aminoácidos (Ph.D. – 12TM mer - New England Biolabs). Os procedimentos experimentais foram baseados no protocolo disponibilizado pelo fabricante, com adequações no intuito de aumentar a especificidade para os alvos analisados. Para seleção de peptídeos contra os anticorpos purificados de pacientes com Leishmaniose Visceral foi adotado um planejamento de seleção específica para proteína total de *L. chagasi* e para a proteína recombinante rK39. No caso dos experimentos envolvendo a Leishmaniose Tegumentar, foram realizados dois tipos de seleção, o primeiro com eluição ácida dos peptídeos recombinantes frente a antígenos de *L. amazonensis*, o segundo com eluição específica. Tais procedimentos são detalhados a seguir:

- Seleção Competitiva de Peptídeos recombinantes – Leishmaniose Visceral

No primeiro ciclo de seleção, um poço de uma placa de microtitulação (Corning Incorporated Costar®) foi sensibilizado com 150 µL de anticorpos do tipo IgG de um *pool* de soros de pacientes com Leishmaniose Visceral numa concentração de 100 µg/mL em tampão carbonato (NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,6). A incubação ocorreu por toda a noite a 4°C, sob agitação em ambiente umidificado.

Após o descarte da solução, a placa foi bloqueada com 300 µL de solução de bloqueio (NaHCO₃ 0.1 M, pH 8,6, 5 mg/mL BSA) por 1 hora a 4°C. A solução foi descartada e a placa lavada por 6 vezes com TBST (TBS - Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,1% de Tween 20) para então acrescentar 4 x 10¹⁰ partículas virais (10 µL da biblioteca comercial original) diluídas em 100 µL de TBST, sendo a placa mantida sob agitação por uma hora a temperatura ambiente. Os fagos não ligantes aos anticorpos foram retirados e a placa lavada por 10 vezes com TBST para a adição de 100 µL de uma solução 100 µg/mL de anticorpos do tipo IgG de pacientes controle saudáveis, para a eluição dos fagos ligantes a esses anticorpos, denominada eluição negativa. Esta mistura foi incubada por uma hora em temperatura ambiente, sob agitação. Os fagos contidos no sobrenadante foram descartados e a placa lavada por mais 10 vezes com TBST.

Para os anticorpos relacionados à Leishmaniose Visceral uma segunda

eluição foi realizada, utilizando o antígeno recombinante rK39 na concentração de 100 µg/mL em um volume de 100 µL, com incubação de uma hora a temperatura ambiente. Os fagos contidos no sobrenadante, ligantes ao rK39, foram coletados para posterior amplificação e a placa foi novamente lavada por mais 10 vezes para realização da terceira eluição com 100 µL de uma solução (100 µg/mL) de antígeno total de *L. chagasi*, a incubação foi de uma hora a temperatura ambiente, e os fagos em sobrenadante foram também coletados para posterior amplificação.

Os fagos provenientes das eluições com os antígenos foram utilizados nos ciclos posteriores da seleção. Uma pequena alíquota (1 µL) de ambos eluatos foram titulados para que se pudesse mensurar o número de partículas virais e os fagos restantes foram amplificados para serem utilizados nos ciclos posteriores.

A partir do segundo ciclo de seleção, dois poços foram sensibilizados com anticorpos purificados de pacientes positivos para Leishmaniose Visceral como anteriormente descrito. Para cada um destes poços foi feita a eluição negativa e específica, sendo uma com o antígeno recombinante rK39 (Seleção Específica do Tipo 1) e outra com o antígeno total de *L. chagasi* (Seleção Específica Tipo 2).

Todos os procedimentos de bloqueio e lavagem foram semelhantes ao descrito anteriormente, exceto a concentração do tampão de lavagem que passou a ser TBST 0,5% (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, água, 0,5% volume/volume de Tween 20) no segundo e demais ciclos. Desta forma, foram realizados quatro ciclos, e então o eluato não amplificado foi titulado e os clones individualizados em placas “Deep Well” contendo 1,2 mL meio de cultura LB (20 µg/mL de tetraciclina) contendo bactérias ER2738 em fase inicial de crescimento. A cultura foi incubada sob agitação vigorosa (250 rpm/min) durante 5 horas. Após este período foram feitas alíquotas para “back-up” e as placas com a cultura restante permaneceram em incubação durante toda a noite para extração de DNA dos clones.

- Seleções ácida e competitiva de peptídeos recombinantes - Leishmaniose Tegumentar

Como substrato para a realização deste processo, foram utilizados 50 µL de proteína G agarose em 50% de solução aquosa (Recombinat Protein G

Agarose – InvitrogenTM), que foram lavados por ressuspensão em microtubo com 1mL de TBS-T (Tris-HCl 50 mM – pH 7.5, NaCl 150 mM – Tween 20 0,1%), o sobrenadante foi retirado cuidadosamente após centrifugação à 4.000 rpm por 30 segundos em centrífuga refrigerada. Em seguida, a resina foi bloqueada por uma hora com tampão de bloqueio (NaHCO₃ 0,1M, pH 8,6; BSA 5mg/mL; NaN₃ 0,02%) a 4°C, sendo misturada de 15 em 15 minutos. Após a incubação, a mesma foi lavada por quatro vezes, conforme descrito anteriormente e incubada com 300 ng de anticorpo purificado (Leishmaniose Tegumentar), juntamente com $1,5 \times 10^{11}$ partículas virais em um volume final de 200 µL de TBS-T 0,1%, previamente incubados à temperatura ambiente por 20 minutos.

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

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

Os fagos amplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo ($2,0 \times 10^{11}$ ufc) e assim subsequentemente por um total de quatro ciclos, sendo que a partir do segundo ciclo a estringência do tampão de lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5%, utilizando-se então, 0,5% de Tween-20 em todas as lavagens. Ao término das seleções, os fagos contendo os peptídeos recombinantes foram isolados e sequenciados.

O mesmo procedimento foi realizado, eluindo-se os fagos ligantes com proteína total de *L. amazonensis*, sendo o procedimento realizado basicamente como descrito anteriormente e a eluição realizada com proteína total (100 µg/mL a temperatura ambiente.

2.1.3. Amplificação e Precipitação dos Bacteriófagos Recombinantes

Para todos os processos de amplificação e precipitação dos fagos recombinantes foi utilizado o seguinte procedimento: a cultura foi centrifugada durante 10 min. a 4.000 rpm. As células residuais foram descartadas e o sobrenadante transferido para um novo tubo e re-centrifugado. Foi pipetado 80% do sobrenadante superior para um tubo limpo, onde foi adicionado 20% do volume de PEG-NaCl (20% peso/volume de polietileno glicol-8000; NaCl 2,5 M) e a mistura permaneceu em repouso durante toda a noite a 4°C. No dia seguinte, o produto da precipitação foi centrifugado por 15 min a 10.000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi novamente centrifugado, nas mesmas condições anteriores por mais 5 minutos para que o sobrenadante residual pudesse ser removido. O “pellet” de fagos foi ressuspensionado em 1 mL de TBS 1X, que foi transferido para um microtubo e centrifugado (5 min, 10.000 rpm, 5 min) para retirada das células residuais. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, para a adição de PEG-NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada por 1 hora em gelo e então centrifugada (15 min, 14.000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o tubo re-centrifugado por mais 5 minutos para retirada do sobrenadante residual. O “pellet” foi ressuspensionado em 200 µL de TBS 1X, estando prontos para a titulação.

2.1.4. Titulação dos Bacteriófagos Recombinantes

O procedimento de titulação tanto para os eluatos amplificados como para os não amplificados foi o seguinte: foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} e de 10^{-8} a 10^{-11} , respectivamente. Foram adicionados 200 µL de bactérias ER2738 ($OD_{600} > 0,5$) a nove µL de cada diluição e a mistura incubada por 5 minutos, antes que fosse plaqueada em meio LB (Tetracilina: 20 µg/mL, IPTG: 0,5 mM e X-gal 40 µg/mL), juntamente com 3 mL de Agarose Top (10 g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ / litro). As placas foram incubadas a 37°C por toda noite, e as colônias azuis representantes das colônias infectadas por fagos foram contadas para obtenção do número de partículas infectantes (pfus) para entrada nos ciclos posteriores.

2.1.5. Extração de DNA dos Fagos

Para a extração de DNA dos fagos recombinantes, as colônias provenientes da titulação do eluato não amplificado do último ciclo de seleção foram isoladas em placas “deep well” contendo um mL de meio de cultura com *E. coli* ER2738 ($OD_{600} > 0,3$) e incubadas sob agitação a 37°C por 24 horas. Após o período de cultura, as placas foram centrifugadas por 10 minutos a 3.700 rpm a 4°C, e 800 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa, onde foi acrescentado 350 µL de PEG-NaCl e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente.

A mistura foi centrifugada por 40 minutos a 3.700 rpm, a 20°C. O sobrenadante foi descartado e a placa foi invertida sobre papel absorvente para retirar o excesso de meio de cultura. O precipitado foi ressuscitado em 100 µL de tampão iodeto (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaI 4 M) e foi adicionado 250 µL de Etanol Absoluto, incubando a mistura por mais 10 minutos a temperatura ambiente antes de submetê-la novamente a centrifugação por 40 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 150 µL de Etanol 70%, e centrifugado por mais 15 minutos a 20°C. Todas as centrifugações ocorreram com rotação de 3.700 rpm. O DNA foi solubilizado em 20 µL de água ultrapura estéril e qualificado por eletroforese em gel de Agarose 0,8%, comparando-o com padrão de DNA de fago M13 disponibilizado pelo fabricante da biblioteca.

2.1.6. Sequenciamento de DNA

As amostras isoladas foram submetidas a sequenciamento automático utilizando o Kit *Big Dye Terminator* (GE Healthcare) e sequenciador automático *MegaBace 1000* (GE Healthcare). Na reação de sequenciamento, utilizou-se aproximadamente 3 µL de DNA (dependendo da quantificação média dada por leitura espectrofotométrica), 4 µL de *prémix* e 10 pmoles do *primer* – 96 M13 – (5'-_{HO}CCCTCATAGTTAGCGTAACG –3'- GE Healthcare), que amplifica a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados nos fagos M13 recombinantes, sendo o volume da reação completado para 10 µL. A reação ocorreu em termociclador (Mastercycler, Eppendorf) por 35 ciclos, com desnaturação de 30 segundos a 95°C, anelamento dos primers por 30 segundos a 50°C e extensão por 30 segundos a 60°C.

2.1.7. Predição das sequências e alinhamento dos aminoácidos

As sequências de DNA foram deduzidas pelo programa DNA2PRO (<http://relic.bio.anl.gov/programs.aspx>), gerando as sequências de 12 peptídeos esperadas. Os alinhamentos entre as sequências distintas foram feitos pelo programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) para delinear prováveis consensos. Os alinhamentos das sequências com proteínas de *Leishmania* foram realizados pelo programa BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.1.8. Ensaio de imunorreatividade

Os fagos mais freqüentes nas populações das seleções específicas (Seleção Tipo 2 e Seleção Tipo 3) para Leishmaniose Visceral e os controles (fago selvagem e antígeno recombinante rK39) foram submetidos a ensaios de dot-blot competitivo com antígeno total de *L. chagasi* e fago selvagem.

Os 33 clones com sequências distintas foram testados em ensaio de dot-blot contra anticorpos purificados de pacientes com Leishmaniose Visceral, Tegumentar e Controle saudável, juntamente com os seguintes controles: Fago selvagem, Fago irrelevante (selecionado a partir de outra seleção) e antígeno recombinante rK39.

As membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com fagos ($5,0 \times 10^9$ partículas virais diluídas em dois μL de TBS), deixando que secassem por 2 minutos a temperatura ambiente. Cada membrana foi bloqueada com um mL de solução de bloqueio (TBS-M Molico 5%), incubada sob agitação por duas horas e posteriormente lavada por três vezes com tampão de lavagem (TBST - 0,5% de Tween 20). Foram adicionados a cada membrana, 500 μL do respectivo anticorpo purificado (Visceral, Tegumentar, Negativo) na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ diluído em bloqueio, e em seguida, incubou-se por uma hora. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas por seis vezes com tampão de lavagem e incubadas com 500 μL de anticorpo secundário (anti-IgG marcado com fosfatase alcalina) diluído em solução de bloqueio e incubadas por uma hora. Em seguida, as membranas foram lavadas por mais 6 vezes, reveladas com solução de NBT/BCIP e posteriormente lavadas com água. Todas as incubações foram realizadas a temperatura ambiente e sob agitação lenta.

Os clones com maior reatividade no ensaio anterior foram submetidos a um novo ensaio competitivo (14 clones) juntamente com os controles (Fago Selvagem, Fago Irrelevante, Antígeno total de *L.chagasi* e antígeno recombinante rK39). Os antígenos (fagos e controles) foram adicionados sobre as tiras de membrana de nitrocelulose, deixando em repouso para secagem por dois minutos e em seguida foi acrescentado um mL de solução de bloqueio (TBS-M – Molico 5%) que agiu por duas horas. Durante este período, a solução de anticorpo purificado de pacientes com Leishmaniose Visceral foi incubada com antígeno total de *L. chagasi* diluído serialmente (de 400 µg/mL a 0,5 µg/mL, incluindo controle sem anticorpo). Após o período de bloqueio, as membranas foram lavadas por três vezes com tampão de lavagem (TBS-T – 0,5% de Tween 20) e foi então adicionada uma mistura pré-incubada de anticorpos e antígenos, que permaneceram em contato com a membrana por uma hora. As membranas foram lavadas por mais seis vezes com o tampão de lavagem e adicionou-se 500 µL de anticorpo secundário anti- IgG marcado com fosfatase alcalina (1:5000 em bloqueio) e incubou-se por uma hora. Foram feitas seis lavagens como descritas acima e posteriormente, procedeu-se a revelação com um mL de solução reveladora (NBT/BCIP). As membranas foram lavadas com água e secadas para digitalização das imagens. Todas as incubações citadas ocorreram à temperatura ambiente, sob agitação lenta.

Quanto a Leishmaniose Tegumentar, os peptídeos recombinantes selecionados foram submetidos a ensaios de ELISA, comparando-se a reatividade destes frente a anticorpos purificados de pacientes saudáveis e com as duas formas da doença (Visceral e Tegumentar). Placas de ELISA (Nunc – Polysorb) foram sensibilizadas com 1 µg/poço de anticorpos purificados por toda noite a 4°C. A placa foi lavada por 3 vezes com PBST (0,05% de Tween-20) e bloqueada (PBST na mesma concentração anterior e 3% de leite em pó desnatado) por uma hora a temperatura ambiente. Após mais três lavagens, os fagos foram adicionados 1×10^{10} partículas virais diluídas em PBST/poço e mantidos a 37°C por uma hora. A placa foi lavada por mais seis vezes e incubada com anticorpo secundário (Anti-M13 HRP) diluído 1:5000 em PBST por uma hora a 37°C. Seis lavagens foram realizadas e a reação foi revelada com OPD.

2.2. Ensaios de funcionalidade in vitro de peptídeo recombinante

2.2.1. Material Biológico: Parasitos e Macrófagos

Formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (MCER/BR/79/M6445) foram mantidas a 25°C em meio de cultura para insetos (Schneider's Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico (Gentamicina 50 µg/mL). Os parasitos foram lavados duas vezes em PBS, sendo sedimentados por centrifugação a 0,6 x g por 10 min a temperatura ambiente. Os parasitos foram ressuspensos e o número de parasitos/mL determinado por contagem em câmara de Neubauer.

A linhagem celular de macrófagos J774A.1, foi adquirida no banco de células do Rio de Janeiro e mantida em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) em câmara umidificada com 5% de CO₂ a 37°C.

2.2.2. Marcação dos parasitos com CFDA-SE

Os parasitos foram marcados com CFDA-SE (carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl Ester – Molecular Probes) (Lang et al., 2009). A marcação dos parasitos foi realizada após os parasitos serem sedimentados e lavados por duas vezes em PBS, diluídos em dois mL do mesmo tampão (1×10^7 /ml) e em seguida incubados com CFDA-SE (5 µM) e mantidos a 37°C por 15 min, com agitação. A reação de marcação foi bloqueada utilizando o mesmo volume de soro fetal bovino em gelo. Os parasitos foram sedimentados novamente, e em seguida lavados por três vezes com PBS. Em seguida foram diluídos, e o número de parasitos estimados em câmara de Neubauer.

2.2.3. Preparação do peptídeo sintético

O peptídeo GLHKLAGLNLR proveniente de *biopanning* com proteínas de *L. chagasi* (Almeida, 2005) foi sintetizado (GeneScript – Piscataway, NJ, USA) contendo amidação N-Terminal. O peptídeo foi diluído em água na concentração de 4 mg/mL, aliquoteado para uso posterior e mantido a -20°C.

O peptídeo denominado irrelevante utilizado neste trabalho refere-se a um peptídeo também selecionado por meio da tecnologia de *Phage Display*, tendo como alvo anticorpos policlonais de pacientes com Malária. Tanto a síntese como a diluição deste peptídeo foram feitas de maneira idêntica à mencionada para o peptídeo teste.

2.2.4. Infecção de macrófagos *in vitro*

Culturas de J774A.1 com aproximadamente 80% de confluência, foram coletadas utilizando “cell scraper” e em seguida submetidas a duas lavagens em meio RPMI-1640 incompleto (2000 x g por 10 min a temperatura ambiente) antes de terem o número de células estimado por contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram distribuídas em uma placa de cultura celular de 96 poços (1 x 10⁵ células/poço) e mantidas nas mesmas condições de cultura acima mencionadas por 4h, a fim de permitir a aderência celular.

As células não aderidas foram removidas e os macrófagos foram então tratados com o peptídeo sintético por 2 h, nas condições acima referidas para cultura celular. Em seguida, os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. chagasi* na razão parasita: macrófagos de 5:1 por 4 h a temperatura ambiente.

Os parasitos não internalizados em macrófagos foram retirados lavando os poços gentilmente com meio RPMI por 3 vezes, e a cultura foi novamente levada à incubadora, nas mesmas condições anteriores. A concentração inicial do peptídeo sintético foi de 100 µM nos testes preliminares, e variou de 10 a 0,6 µM em diluições seriadas, dependendo do teste a ser realizado. As células tratadas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂.

2.2.5. Teste de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada mensurando a clivagem do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)-Sigma Aldrich. Após o período de incubação, 50 µL de uma solução estoque a 5mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich) foi adicionado em cada poço, sendo a placa incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas. Os cristais formados foram solubilizados com 100µL de dimetilformamida e SDS a 20%. A absorbância foi obtida em leitora de

microplacas a 590 nm. Cada amostragem foi analisada em triplicata. Para cálculo da viabilidade celular foi utilizada a fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = [(DO_{\text{células tratadas}} - DO_{\text{branco}})] / [(DO_{\text{controle negativo}} - DO_{\text{branco}})] \times 100.$$

Considerando-se: células tratadas: aquelas tratadas com peptídeo teste ou peptídeo irrelevante; controle negativo: as células sem tratamento; branco: meio de cultura sem células.

2.2.6. Mensuração de nitrito

A produção de nitrito foi estimada pela acumulação de NO_2^- , como descrito por Green et al. (1981). Em resumo, 50 μL do reagente de Griess (1% sulfanilamida em 2.5% H_3PO_4 e 0.1% NEED in 2.5% H_3PO_4) foram adicionados a 50 μL de cada amostra em placas de 96 poços. Os controles e a curva padrão para referência (NaNO_3) foram também determinados. A absorbância foi mensurada a 570 nm usando leitora de microplacas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.7. Análise de macrófagos infectados

Após o período de infecção, as células foram analisadas para determinação da porcentagem de infecção e média de parasitos por macrófagos infectados. As análises foram feitas analisando-se a fluorescência emitida pelas células marcadas com CFDA-SE, utilizando-se das imagens capturadas em microscópio (EVOS fl- AMG). O índice de infecção foi expresso pela porcentagem de macrófagos infectados em 50 células analisadas (Santos et al., 2005).

2.2.8. Análises estatísticas

Comparações entre os grupos tratados e controles foram feitas por análise de variância (ANOVA). As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Bonferroni (GraphPad Prism 5) considerando-as significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Peptídeos recombinantes relacionados à Leishmaniose Visceral

Dois tipos de eluição foram utilizados para a seleção destes peptídeos recombinantes, sendo eluições específicas (antígeno recombinante – rK39 ou antígeno total), ambas tendo como alvo anticorpos do tipo IgG de pacientes acometidos pela Leishmaniose Visceral.

A eluição específica frente ao antígeno recombinante rK39 apresentou um total de 30 clones, 18 deles distintos entre si. Enquanto a eluição específica realizada frente a antígenos totais de *Leishmania chagasi* apresentou um total de 29 clones, sendo 15 deles sequências distintas entre si. A Figura 1 apresenta as sequências peptídicas alinhadas de cada uma destas seleções. Para efeitos comparativos, os dados de uma seleção realizada anteriormente para o mesmo alvo, com um esquema de eluição menos específica (eluição ácida) são igualmente mostrados (Almeida, 2005).

Ao observar-se o alinhamento dos clones entre si em cada uma das seleções, foi possível observar a existência de sequências consenso comuns dentro de cada grupo, e interessante também se pode notar a presença de determinado consenso nas três diferentes seleções realizadas (Figura 1).

A		B		C	
Seq. LV1	---AFTDKASAPKA----	Seq. LV31	----GTPRSQIQYAAP--	Seq. LV43	-----ATPFSIHDSSETL-
Seq. LV17	-SVSVGMKPSPP-----	Seq. LV33	----ITPRSNQATYLL--	Seq. LV54	-----ATPFSIHGFWR--
Seq. LV7	-----ATPFSMHPLPDL	Seq. LV32	----VTPFSNLNVDPSR--	Seq. LV48	-----ATINNIQTFFMV-
Seq. LV8	-----ATPFSMIAPPTA	Seq. LV29	--TTTLTSLPLIH---	Seq. LV46	----SDWTTMRAFRIT---
Seq. LV20	-----TTPFSIPIPII	Seq. LV36	--HHFTHISLPLV---	Seq. LV50	-----ATPFRFMILRPL-
Seq. LV9	-----ATPFSLLPQSQI	Seq. LV42	---ASPSSFLLEKA---	Seq. LV49	-----SATVTIKRLQYT-
Seq. LV10	-----ATPFSVHSTAQP	Seq. LV39	---SFHLPREWHASP---	Seq. LV45	----HMSHQDDVRLQ---
Seq. LV23	---YAATPFSHLTTEL---	Seq. LV30	NLDTRFWLSLYT-----	Seq. LV51	-----TPFMKTVLLTSA
Seq. LV12	---YAATPFSHLTGTP---	Seq. LV34	---ATPQNSILVQS---	Seq. LV55	---GKAPTITALEPQA-----
Seq. LV5	-----ATPFSHMLASSS	Seq. LV37	---ATQFNAYPSGPH---	Seq. LV56	-----GTAIRNAQVPLH-
Seq. LV6	-----ATPFSISTVISI	Seq. LV35	YASANTSPTIYT-----	Seq. LV52	---YPTKASGNDLRG----
Seq. LV4	-----ATPDNSRIESRL	Seq. LV26	--EKSSGTSLHGVP---	Seq. LV46	-SLNLNLFVTSPAV-----
Seq. LV3	-----ATLFWIPPSST	Seq. LV25	---LTQKFSGIDIKR---	Seq. LV53	-YDLNVHYLEPPKF-----
Seq. LV22	---VQSATLFWIAS---	Seq. LV28	---IGTAPMLFAGYR---	Seq. LV44	---LSPHALEKDRFV-----
Seq. LV16	---FNAATLFWTLKQI---	Seq. LV38	-INHSTAESRYFM-----		
Seq. LV19	---TSAATMLLKSD---	Seq. LV41	---INPSYHPFRMPA---		
Seq. LV18	TPSSASSVATL-----	Seq. LV40	---MNAGSNAFSCILT-		
Seq. LV13	---HKLAGLNLNDHL---	Seq. LV27	---VVTRYNDNIRHS---		
Seq. LV14	---HKLAGLNLNDQL---				
Seq. LV12	-GLHKLAGLNLNLS-----				
Seq. LV11	-----FALKEDAQSLS-				
Seq. LV2	-----ATEAHPTTLARK				
Seq. LV15	---LPMHESPKTDQP----				
Seq. LV21	--VFCGYETESQE-----				

Figura 1: Alinhamento das sequências dos peptídeos recombinantes relacionados à Leishmaniose Visceral nas diferentes seleções: A: Eluição Ácida, B: Eluição específica com o antígeno rK39 e C: Eluição específica com antígeno total de *L. chagasi*. Em amarelo, sequência consenso principal.

Como observado, a sequência consenso principal (ATPRS) foi obtida em todos os tipos de eluições realizadas, sendo a principal sequência observada na eluição menos específica (eluição ácida), que foi mantida em ambas as eluições competitivas.

Os peptídeos recombinantes selecionados nos ensaios específicos apresentados neste trabalho foram submetidos a ensaios de *dot-blot* para demonstração de sua especificidade em relação a anticorpos de pacientes com Leishmaniose visceral, tegumentar e controles sadios (Figura 2). Dos 33 clones testados, 13 mostraram-se reativos aos anticorpos de pacientes com Leishmaniose Visceral, sendo que nenhum deles apresentou reatividade cruzada para com os anticorpos utilizados como controles.

Os clones que apresentaram reatividade nos ensaios de *dot blot* anterior foram submetidos a uma segunda reação competitiva na qual os anticorpos foram pré-incubados com proteína total de *L. chagasi*. Desta forma, foi possível observar a inibição da reatividade, visualizada nos *spots* com maiores concentrações de proteína como mostrado na Figura 3.

Como apresentado na Tabela 1, pode-se observar que a maioria dos clones com reatividade confirmada pelo *dot blot*, são clones diferenciados pelas frequências, bem como pela presença dos aminoácidos presentes na sequência consenso e perda da reatividade no ensaio competitivo. Nove clones que apresentaram perda na reatividade quando os anticorpos foram pré-incubados com antígeno total de *L.chagasi* e oito deles apresentaram região consenso acima descrita.

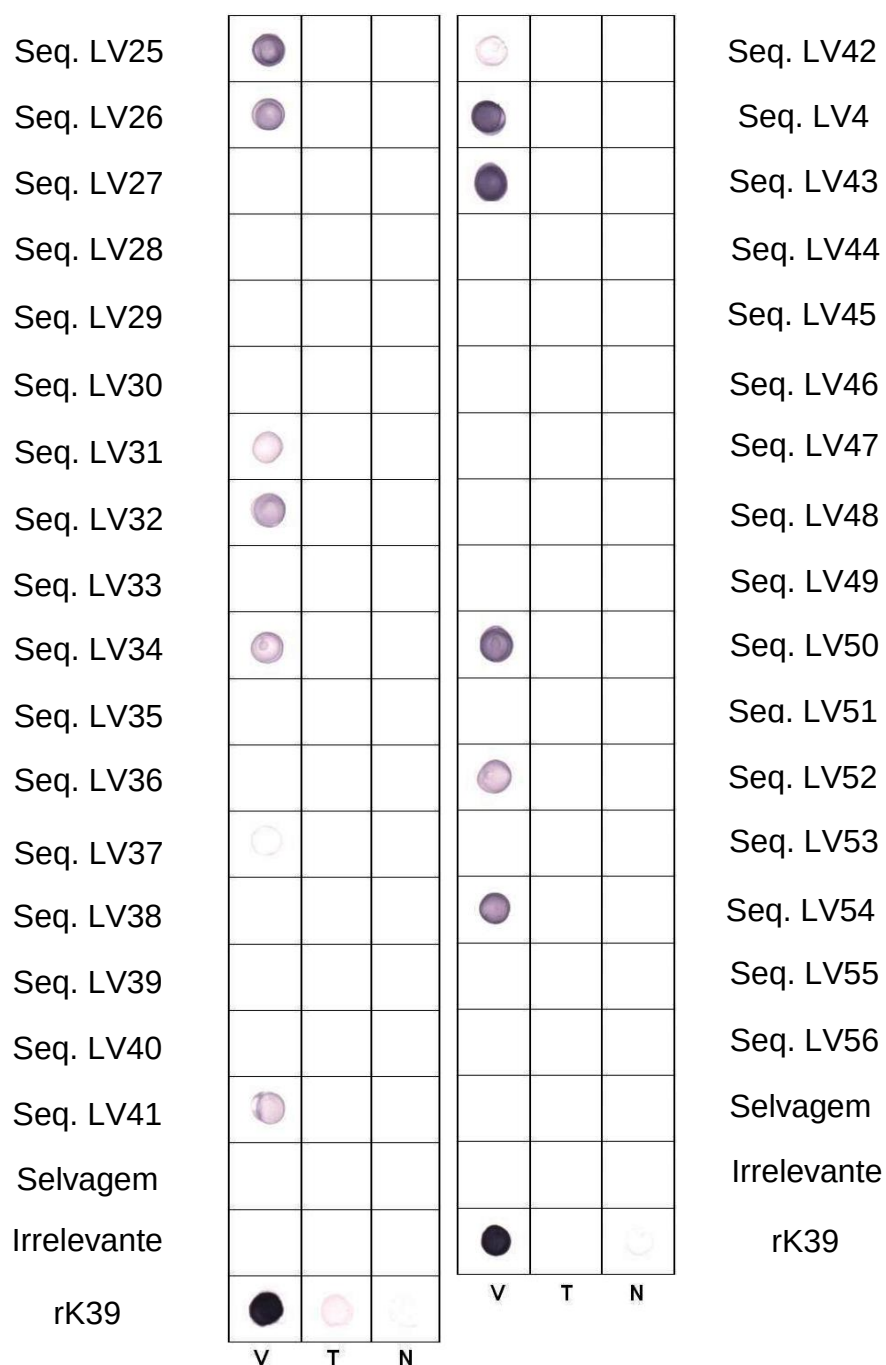


Figura 2: Ensaio de *dot-blot* realizado para os peptídeos recombinantes selecionados nas eluições específicas frente anticorpos de pacientes portadores de Leishmaniose Visceral (V), Leishmaniose Tegumentar (T) e controles saudáveis (N). Selvagem e Irrelevante referem-se aos controles negativos: fago sem expressão de peptídeo recombinante e proveniente de seleção irrelevante, respectivamente. A reação do anticorpo secundário anti-IgG foi revelada com DAB.

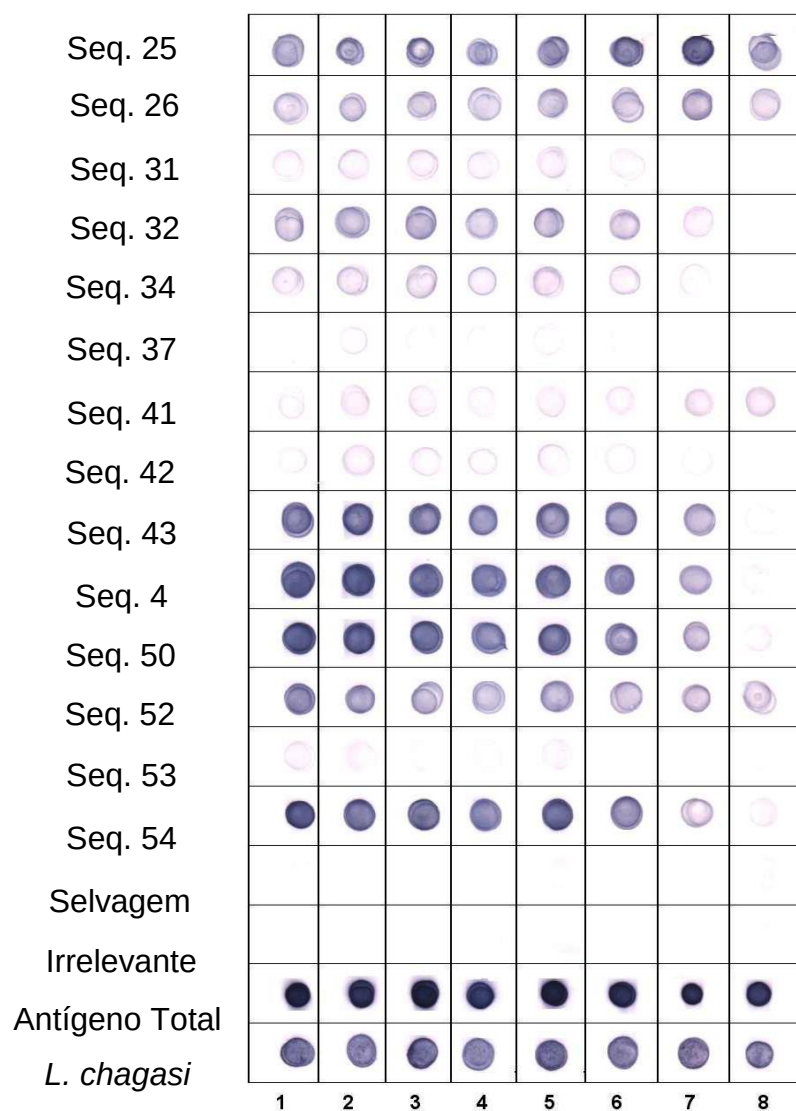


Figura 3: Ensaio de “dot-blot” competitivo para os clones de maior relevância na seleção específica para Leishmaniose Visceral, os anticorpos de pacientes acometidos pela Leishmaniose Visceral foram pré-incubados com antígeno total de *Leishmania chagasi*. 1- controle sem antígeno, 2 - 0,5 µg/mL, 3 - 1,3 µg/mL, 4 - 4,9 µg/mL, 5 - 14,8 µg/mL, 6 - 44,4 µg/mL, 7 - 133,3 µg/mL e 8 - 400 µg/mL. A reação do anticorpo secundário anti-IgG foi revelada com DAB.

Tabela 4: Relação da reatividade dos clones selecionados nas seleções específicas com a suas frequências, positividade em teste de dot-blot, presença de sequência consenso e inibição de reatividade em testes de dot-blot competitivo contra antígeno total de *Leishmania chagasi*.

Eluição Específica com Antígeno Recombinante rK39					
Identificação	Sequência	Frequência (%)	Dot Blot	Consenso	Inibição
Seq. LV25	LTQKFSGIDIKR	16,67	+		
Seq. LV26	EKSSGTSLHGVP	3,33	+	+	
Seq. LV27	VVTRYNDNIRHS	3,33			
Seq. LV28	IGTAPMLFAGYR	6,67			
Seq. LV29	TTTLTRSLPLIH	3,33			
Seq. LV30	NLDTRTWLSLYT	3,33			
Seq. LV31	GTPRSQIQYAAP	10,0	+	+	+
Seq. LV32	VTPRSLNVDPSR	3,33	+	+	+
Seq. LV33	ITPRSNQATYLL	3,33			
Seq. LV34	ATPQRNSILVQS	20,0	+	+	
Seq. LV35	YASANTSRTIYT	3,33			
Seq. LV36	HHFTHISLPLVR	3,33			
Seq. LV37	ATQRNAYPSGPH	3,33	+	+	+
Seq. LV38	INHSTAESRYFM	3,33			
Seq. LV39	SFHLPREWHASP	3,33			
Seq. LV40	MNAGSNAFSCLT	3,33			
Seq. LV41	INPSYHPFRMPA	3,33	+	+	
Seq. LV42	ASPRSSFLEKA	3,33	+	+	+
Eluição Específica com Antígeno total de <i>Leishmania Chagasi</i>					
Identificação	Sequência	Frequência (%)	Dot Blot	Consenso	Inibição
Seq. LV43	ATPRSIHDSETL	31,03	+	+	+
Seq. LV 4	ATPDRSRIESRL	6,9	+	+	+
Seq. LV44	LSPHALEKDRFV	3,45			
Seq. LV45	HMSHQDPDVRLQ	3,45			
Seq. LV46	SDWTTMRAFRIT	3,45			
Seq. LV47	SLLNLFVTSPAV	3,45			
Seq. LV48	ATIRNIQTFPMV	3,45			
Seq. LV49	SATVTIKRLQYT	3,45			
Seq. LV50	ATPRRFMILRPL	3,45	+	+	+
Seq. LV51	TPFMKTVLLTSA	3,45			
Seq. LV52	YPTKASGNDLRG	20,69	+		
Seq. LV53	YDLNVHYLPPKP	3,45	+		+
Seq. LV54	ATPRSIHGFWRR	3,45	+	+	+
Seq. LV55	GKAPTITALPQA	3,45			
Seq. LV56	GTAIRNAQVPLH	3,45			

Os experimentos com eluições específicas (rk39 e antígeno de *L. chagasi*) puderam confirmar a relevância do consenso; mesmo com o aumento da especificidade da eluição, estes peptídeos consenso mantiveram uma frequência considerável na população de clones sequenciados.

Com o intuito de mapear os prováveis alvos protéicos relacionados aos peptídeos recombinantes de maneira geral, foi realizado o alinhamento de cada uma das sequências de peptídeos obtidas na seleção específica com o antígeno recombinante rk39, que possibilitou identificar as proteínas com as quais os clones selecionados possuem maior similaridade. Tal análise mostrou-nos que os peptídeos recombinantes agruparam-se em várias proteínas descritas como de grande interesse diagnóstico e vacinal, sendo elas em ordem de importância nos alinhamentos: as proteínas de superfície de promastigotos GP46 e GP63; cisteína protease; proteína de choque térmico – HSP-80; DNA polimerase alfa, e assim por diante sendo que a proteína do tipo kinesina, alvo do biopanning em questão, apresentou número mínimo de alinhamentos.

As proteínas associadas a *L. chagasi* e o número de clones na população que se alinharam a tal proteína, bem como a identificação do peptídeo recombinante e o número de posições onde eles se alinharam na proteína em questão, com um número mínimo de cinco alinhamentos são mostradas na Tabela 2.

Tabela 1: Proteínas mimetizadas pela população de peptídeos recombinantes em seleção específica contra rK39.

Proteína Associada	N	ID - Peptídeos Recombinantes*
<i>Promastigote Surface Antigen GP46 [Leishmania Chagasi]</i>	19	39 (6), 42, 28, 29(4), 30(3), 31, 32, 42, 36
<i>GP63 [Leishmania Chagasi]</i>	15	41(5), 42(4), 27, 32, 40, 36, 37, 38
<i>Cysteine Protease [Leishmania Chagasi]</i>	11	40(2), 26, 27, 28, 32(2), 33, 34, 38, 37(2)
<i>83 Kda Heat Shock Protein [Leishmania Chagasi]</i>	10	39, 40, 42 (5), 27(2), 37
<i>DNA Polymerase Alpha [Leishmania Chagasi]</i>	9	26, 29(2), 30, 33, 35(2), 42
<i>Cathepsin B Cysteine Protease [Leishmania Chagasi]</i>	7	39, 40, 26, 31, 32, 39, 37
<i>Leishmanolysin Precursor (Cell Surface Protease) (Major Surface Glycoprotein) (Protein Gp63)</i>	7	28(3), 33, 36, 26, 41
<i>Major Surface Protein Associated Protein [Leishmania Chagasi]</i>	7	31(2), 32, 33(2), 41, 42
<i>Zeta-Crystallin/NADPH-Oxidoreductase-Like Protein [Leishmania Chagasi]</i>	7	40, 42, 26, 37, 29
<i>Cathepsin L-Like Cysteine Protease [Leishmania Chagasi]</i>	6	26, 32, 33, 37(2), 40
<i>DNA Topoisomerase 2 (DNA Topoisomerase II)</i>	6	27, 32, 36(3), 37
<i>K26 [Leishmania Chagasi]</i>	6	30(5), 40
<i>Alpha-Tubulin [Leishmania Chagasi]</i>	5	42, 27(2), 29, 32
<i>Casein Kinase II Alpha Subunit [Leishmania Chagasi]</i>	5	29, 30, 38, 40, 42
<i>Dhfr-Ts [Leishmania Donovanii Chagasi]</i>	5	26, 27, 28, 29, 30, 31
<i>Kinesin-Like Protein K39</i>	5	26, 30, 31, 32, 33

* N. representa o número de alinhamentos para a proteína relacionada. O número mostrado entre parênteses representa o número de posições em que o peptídeo recombinante identificado apresentou similaridade com a proteína em questão.

3.2. Peptídeos recombinantes relacionados à Leishmaniose Tegumentar

Após a análise de sequenciamento de DNA e dedução das sequências de aminoácidos, observou-se que: a eluição ácida apresentou um total de 12 clones cada um representando 8,33% da população, enquanto a eluição específica permitiu identificar 20 clones, sendo 14 deles diferentes dos da eluição ácida (Tabela 3).

Estes clones quando alinhados apresentam regiões de similaridade entre si para os clones da eluição ácida, como é mostrado na Tabela 4.

Resultados preliminares em ELISA contra anticorpos purificados demonstraram alta reatividade dos clones para como os anticorpos de pacientes com leishmaniose tegumentar, quando comparados com o grupo visceral e controle negativo (dados não mostrados). Estes resultados demonstram a efetividade do processo de seleção e abre perspectivas para a utilização dos fagos no diagnostico específico da leishmaniose tegumentar.

O banco de peptídeos gerados neste trabalho foi analisado na busca de similaridade com proteínas de *L. amazonensis*, o que possibilitou a identificação das proteínas com maior similaridade para a população de fagos apresentada neste trabalho (Tabela 3).

Tabela 2 Peptídeos recombinantes selecionados contra relacionados com Leishmaniose tegumentar. Eluição ácida e específica com antígeno recombinante de *L. amazonensis*.

Peptídeos		Frequência (%)
Seleção Tipo 1 – Eluição Ácida – 12 clones		
Seq. LT 1	DLIQTMTRTAG	8,33%
Seq. LT 2	DLIQTMTRTAG	8,33%
Seq. LT 3	LRLIDEVPAELV	8,33%
Seq. LT 4	IPSTTEPIILGL	8,33%
Seq. LT 5	DQTLFSMTRTPP	8,33%
Seq. LT 6	SSALHAATQAPQ	8,33%
Seq. LT 7	SSALSAATTAHR	8,33%
Seq. LT 8	KIESSWLLSDKR	8,33%
Seq. LT 9	QPDMNILAMSRP	8,33%
Seq. LT 10	QTANNVIASMTR	8,33%
Seq. LT 11	QNKVIDAMSRHP	8,33%
Seq. LT 12	SSPYSMRLAKLE	8,33%
Seleção Tipo 2 – Eluição Específica – 14 clones		
Seq. LT 2	DLIQTMTRTAG	8,33%
Seq. LT 6	DLIQTMTRTAG	8,33%
Seq. LT 7	SSALSAATTAHR	16,67%
Seq. LT 9	QPDMNILAMSRP	2,78%
Seq. LT 10	QTANNVIASMTR	2,78%
Seq. LT 12	SSPYSMRLAKLE	5,56%
Seq. LT 13	TPSGAQLWDILH	5,56%
Seq. LT 14	MAPDGAQWWEAR	5,56%
Seq. LT 15	TPSGAQLWNNLH	2,78%
Seq. LT 16	TMKTELYNLQLL	2,78%
Seq. LT 17	YSMKTQGWLSAL	8,33%
Seq. LT 18	YKLDSSHLLRGK	2,78%
Seq. LT 19	MRAIDHGGIRPP	2,78%
Seq. LT 20	QTLLINIQGATK	2,78%
Seq. LT 21	LKQDLVISYMAR	2,78%
Seq. LT 22	DLITMSMSRSPR	2,78%
Seq. LT 23	QRMIDSVFPVPSA	2,78%
Seq. LT 24	DPVILSITRLLK	2,78%
Seq. LT 25	SPFDQVLSSMTR	5,56%
Seq. LT 26	DPLITMMTRTFP	2,78%

Tabela 3: Alinhamento dos peptídeos recombinantes relacionados a Leishmaniose Tegumentar. Eluição ácida e específica com antígeno de *L. amazonensis*.

Eluição ácida		
Seq. LT6	---	SSALHAATQAPQ
Seq. LT7	---	SSALSAATTAHR
Seq. LT1	---	DLIQTVMTRTAG
Seq. LT5	---	DQTLFSMTRTPP
Seq. LT10		QTANNVIASMT---
Seq. LT11		Q--NKVIDAMSRHP-
Seq. LT9		QP-DMNILAMSR-P-
Seq. LT3	---	LRLIDEVPAELV
Seq. LT12	---	MRAIDSYPEPSV
Seq. LT4	--	IPSTTEPIILGL-
Seq. LT8	---	KIESSWLLSDKR
Seq. LT2	---	SSPYSMRLAKLE
Eluição Específica		
Seq. LT21	-LKQDLVISY-MAR----	
Seq. LT25	-SPFDQVLSS-MTR----	
Seq. LT24	----DPVILS-ITRLLK-	
Seq. LT22	----D-LITMSMSRS-PR	
Seq. LT26	----DPLITM-MTRTFP-	
Seq. LT13	-TPSGAQLWD-ILH----	
Seq. LT15	-TPSGAQLWN-NLH----	
Seq. LT14	MAPDGAQWWE-AR-----	
Seq. LT16	--TMKTELYN-LQLL---	
Seq. LT20	----QTLLIN-IQGATK-	
Seq. LT17	---YSMKTQGWSAL---	
Seq. LT18	---YKLDSSHLLRGK---	
Seq. LT19	---MRAIDEHGIRPP---	
Seq. LT23	---QRMIDSVVPVPSA---	

Tabela 4: Proteínas mimetizadas pela população de peptídeos recombinantes em seleção contra *Leishmania amazonensis*.

Proteína Associada	N*	Peptídeos Recombinantes
<i>Telomerase Reverse Transcriptase [Leishmania amazonensis]</i>	19	2(2), 6(3), 7(7), 8, 11(2), 19, 24, 25, 26
<i>LAMDR2 [Leishmania amazonensis]</i>	15	5, 6, 9, 12, 19(2), 20, 22(3), 23(3), 25, 26
<i>Hypothetical Protein [Leishmania amazonensis]</i>	12	5(5), 9, 10, 11, 12, 22, 25(2)
<i>TTAGGG Repeat-Binding Factor 2 [Leishmania amazonensis]</i>	12	6, 7(3), 8, 12, 13, 14, 15, 18, 23(3)
<i>Carbamoyl-Phosphate Synthetase [Leishmania amazonensis]</i>	10	4(2), 6, 7(2), 8, 11, 20, 21, 23, 24
<i>Histone H3 [Leishmania amazonensis]</i>	10	5(2), 7(2), 9(2), 20(2), 26(2)
<i>Organelle-Type Ca²⁺-Atpase [Leishmania amazonensis]</i>	10	2(2), 4, 7, 11(3), 12, 15, 26
<i>Aminophospholipid Translocase [Leishmania amazonensis]</i>	9	4, 5(2), 10, 13, 15, 21, 25, 26
<i>Heat Shock Protein 70 [Leishmania amazonensis]</i>	9	2(2), 6(4), 7(2), 9
<i>LAMDR1 [Leishmania amazonensis]</i>	9	4, 7(2), 9, 10, 13, 15, 23(2),
<i>N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase [Leishmania amazonensis]</i>	9	6(2), 7(2), 9(2), 21, 25(2)
<i>Antigenic WD Protein [Leishmania amazonensis]</i>	8	6, 7, 9, 13, 14, 15, 23, 26
<i>ATP-Dependent RNA Helicase [Leishmania amazonensis]</i>	8	5, 6, 7, 19, 22, 24, 26(2)
<i>Phosphatidylserine Synthase [Leishmania amazonensis]</i>	8	7, 9(2), 12, 14, 19(2), 24
<i>Chitinase [Leishmania amazonensis]</i>	7	6,, 7, 11, 13, 15, 18, 23
<i>Aldoketoreductase [Leishmania amazonensis]</i>	6	2, 6, 7, 9, 11 (2)
<i>Cytosolic Leucyl Aminopeptidase [Leishmania amazonensis]</i>	6	4, 6, 7, 9(2), 24
<i>Dihydroorotase [Leishmania amazonensis]</i>	6	6, 7, 18, 11, 22, 26
<i>Ferric Reductase [Leishmania amazonensis]</i>	6	5, 7, 13, 15, 22, 25
<i>Leucine-Rich Protein [Leishmania amazonensis]</i>	6	7, 11, 18(2), 23, 25
<i>Oligopeptidase B [Leishmania amazonensis]</i>	6	4, 7, 25(3), 6
<i>Recname: Full=Bifunctional Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase; Short=DHFR-TS; Includes: Recname: Full=Dihydrofolate Reductase; Includes: Recname: Full=Thymidylate Synthase >Emb CAA36020.1 Unnamed Protein Product [Leishmania amazonensis]</i>	6	8(2), 23(2), 25(1),26
<i>Recname: Full=Heat Shock 70 Kda Protein >Gb AAA53690.1 Heat Shock Protein 70 [Leishmania amazonensis]</i>	6	2, 6(2), 7, 9, 24
<i>Recname: Full=Heat Shock Protein 83; Short=HSP 83 >Gb AAA29250.1 Heat Shock Protein 83 [Leishmania amazonensis]</i>	6	13, 15, 18, 21, 24, 25, 26
<i>Cp36 [Leishmania amazonensis]</i>	5	7, 6, 23, 24 (2)
<i>Guanosine Permease [Leishmania amazonensis]</i>	5	2, 4, 15, 22, 24
<i>Mannose Phosphate Isomerase [Leishmania amazonensis]</i>	5	5, 6, 22, 24, 26
<i>NADH Dehydrogenase Subunit 1 [Leishmania amazonensis]</i>	5	25, 9, 20, 24, 19

Proteína Associada	N*	Peptídeos Recombinantes
P4 Nuclease [Leishmania amazonensis]	5	6, 7(2), 21, 25
Putative Amino Acid Transporter [Leishmania amazonensis]	5	4, 9(2), 11, 19
Putative Lanosterol C-14 Demethylase [Leishmania amazonensis]	5	2, 15, 20, 21, 26
Putative Mitogen-Activated Protein Kinase [Leishmania amazonensis]	5	9, 11, 6, 7, 21, 22
Recname: Full=Probable Quinone Oxidoreductase; Altname: Full=NADPH:Quinone Reductase; Altname: Full=P36 >Gbl AAA73554.1 Zeta-Crystallin NADPH-Oxidoreductase [Leishmania amazonensis]	5	6, 7, 12, 23, 24
Zeta-Crystallin/NADPH-Oxidoreductase-Like Protein [Leishmania amazonensis]	5	6, 7, 12, 23, 24

* N. representa o número de alinhamentos para a proteína relacionada. O número mostrado entre parênteses demonstra o número de posições em que o peptídeo recombinante identificado apresentou similaridade com a proteína em questão.

3.3. Efeito do peptídeo recombinante relacionado à *L. chagasi* em macrófagos J774A.1

3.3.1. Viabilidade Celular

Análises preliminares de viabilidade celular foram realizadas a fim de determinar a concentração de peptídeo sintético a ser utilizada nos tratamentos (Seq. LV12 relacionada a Seq. LV52, sequência de maior frequência na seleção específica contra proteínas de *L. chagasi*). Tais análises mostraram queda na viabilidade celular em concentrações acima de 10 μ M (dados não mostrados), sendo esta concentração determinada o ponto inicial para as demais diluições em série. A Figura 4 demonstra a análise de viabilidade celular das células J774A.1 tratadas com o peptídeo recombinante e peptídeo sintético, ambas infectadas ou não infectadas com *L. chagasi*.

De acordo com os testes realizados, o peptídeo sintético aqui testado não apresentou efeito significativo na cultura de células J774A.1 quando comparado com o controle do diluente; portanto, na cultura tratada com peptídeo sintético e infectada com *L. chagasi*, observando-se um incremento na viabilidade das células, com a redução da concentração do peptídeo até a concentração de 1,25 μ M. Pode-se observar diferença significativa entre os grupos tratados com 2,5 e 1,25 μ M quando comparados ao diluente e entre os grupos tratados com 5 e 1,25 μ M quando analisados entre si (Fig. 4A), sendo que não houve diferença

significativa quando os grupos de células infectadas e não infectadas com *L. chagasi* quando foram analisados perante as mesmas concentrações de peptídeo sintético.

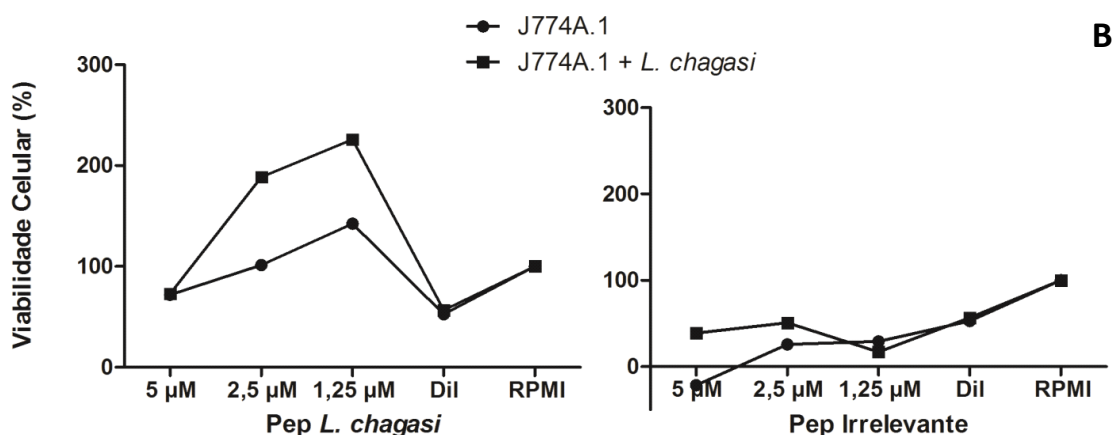


Figura 4: Ensaio da redução de MTT em macrófagos J774A.1 tratados com peptídeo sintético, infectados ou não infectados com *L.chagasi*. A: Peptídeo sintético teste. B: Peptídeo sintético irrelevante.

Seguindo os mesmos parâmetros de análises, foi analisado o efeito de um peptídeo irrelevante em relação às células J774A.1 (Fig. 4B), o qual não apresentou qualquer diferença estatisticamente relevante nem quando comparadas as diferentes concentrações de peptídeo tão pouco quanto aos grupos infectado e não infectado com *L. chagasi*.

3.3.2. Avaliação da produção de nitrito

Ao mensurar a produção de nitrito pelas células J774A.1 tratadas com o peptídeo sintético e peptídeo irrelevante, infectadas ou não por *L. chagasi* (Figura 2) foi possível observar um incremento na produção deste metabólito nas células tratadas com peptídeo teste quando infectadas com este parasito. Todas as concentrações utilizadas foram capazes de estimular de forma significativa a produção de tal metabólito, mostrando diferenças significativas nas células tratadas na presença de *L. chagasi* (Fig. 5A). Quanto ao peptídeo irrelevante, observou-se diferença estatisticamente significativa somente na maior concentração do tratamento (Fig 5B).

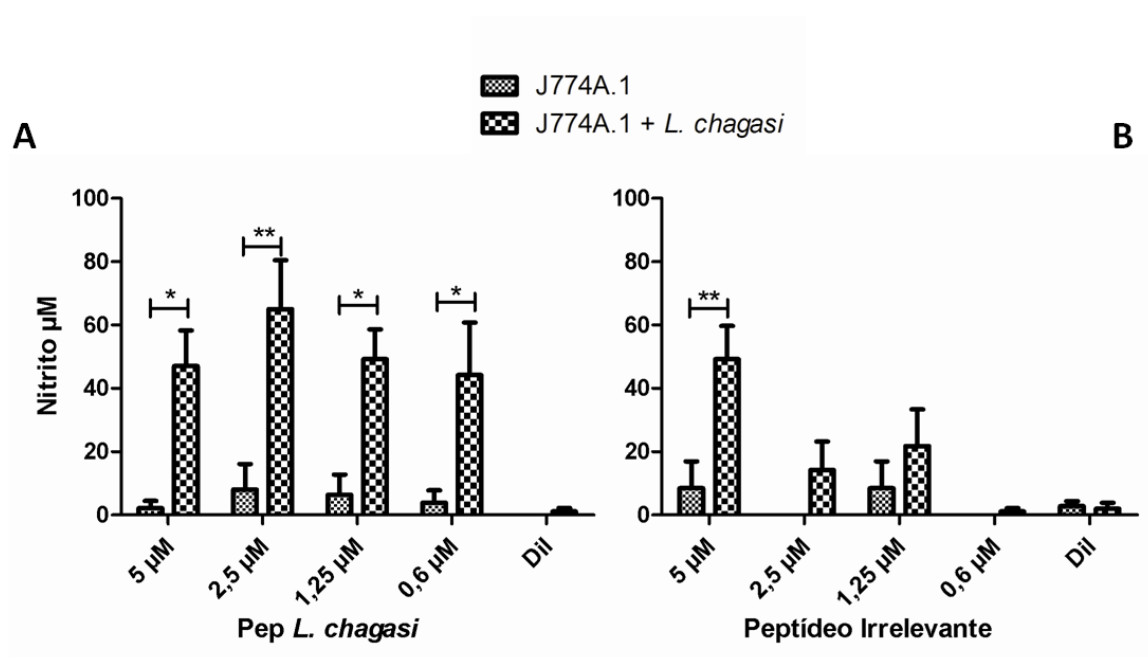


Figura 5: Produção de NO por células J774A.1 tratadas com peptídeo sintético. A: tratamento com peptídeo *L. chagasi*; B: tratamento com peptídeo sintético irrelevante (5×10^4 células/poço). Ambas as reações foram feitas com e sem infecção com *L. chagasi* ($2,5 \times 10^5$ células/poço). Dados mostrados como média $\pm$ SEM da concentração de NO (estimada por nitrito). ** $p < 0.001$; * $p < 0.005$.

3.3.3. Índice de infecção por *L. chagasi* nas células tratadas com peptídeo recombinante

A marcação de *L. chagasi* com CFDA-SE foi eficiente para que se pudesse avaliar a porcentagem de infecção dos macrófagos. A Figura 3 exemplifica as células tratadas com peptídeo recombinante (Fig. 6A) e controle com o diluente (Fig. 6B). A partir da contagem do número de células infectadas na análise de 100 células em duplicata, estimou-se a % de infecção dos macrófagos J774A.1 pela *L. chagasi* marcada com CFDA-SE (Figura 7).

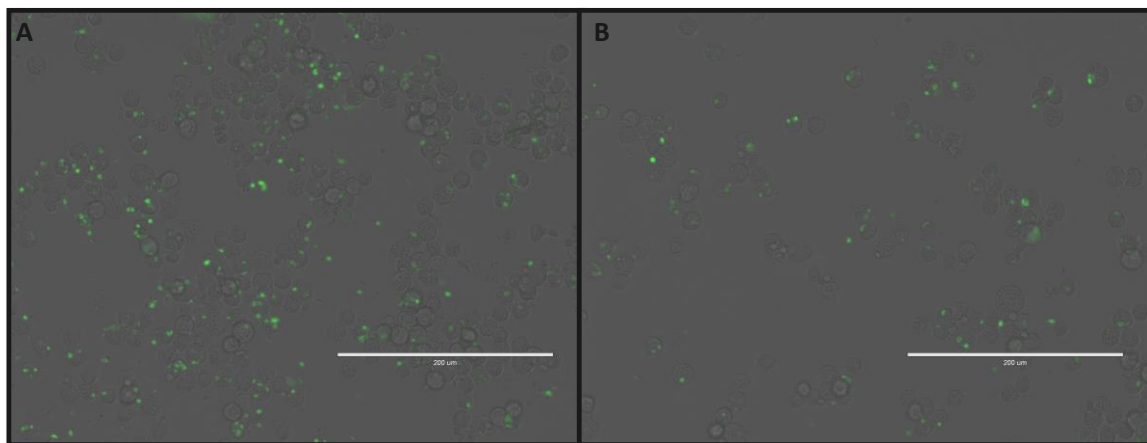


Figura 6: Macrófagos J774A.1 infectados com *L. chagasi* marcadas com CFDA-SE. (A) células tratadas com peptídeo sintético na concentração de 10mM. (B) células cotrole tratadas com diluente.

Tal análise demonstra que número de células infectadas a partir da concentração de 5 μ M decresce acompanhando a queda da concentração de peptídeo mimético à *L. chagasi* presente no tratamento

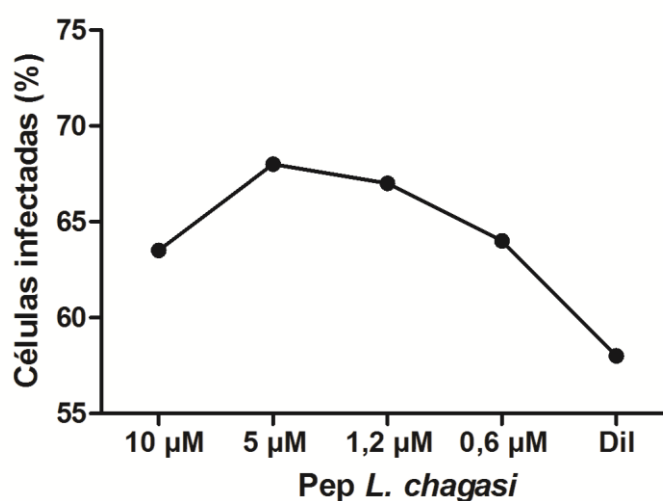


Figura 7: Porcentagem de infecção de células J774A.1 infectadas com *L. chagasi* ($2,5 \times 10^5$ células/poço) marcadas com CFSE-DA ($2,5 \times 10^5$ células/poço). Os dados representam a media de macrófagos infectados em 100 células.

Ao analisar-se o número de parasitos internalizados nos macrófagos tratados com peptídeo sintético em relação aos controles, observou-se que o número de leishmanias internalizadas nos macrófagos após o período de infecção

foi maior para os macrófagos tratados com peptídeo sintético em relação aos controles.

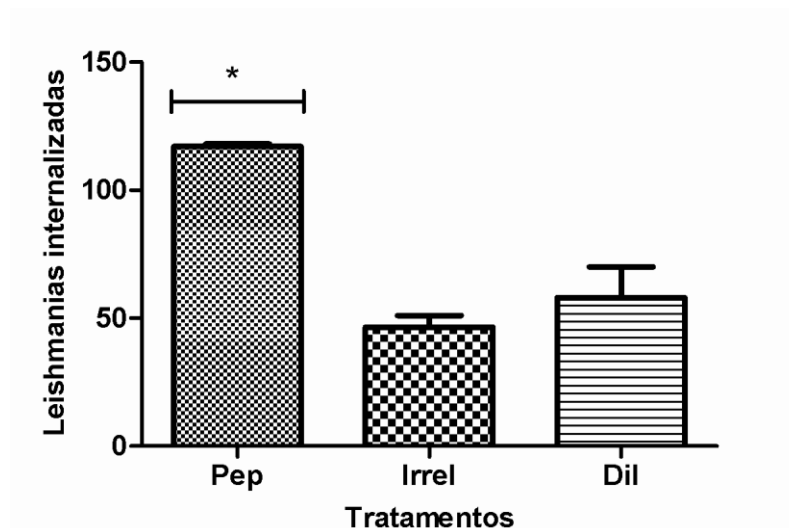


Figura 8: Media do numero de *L.chagasi* internalizadas por 50 macrófagos J774A.1 infectados. Pep – Peptideo sintético teste; Irrel - Peptídeo sintético irrelevante; Dil. Controle com diluente; RPMI – Controle com meio de cultura. * $p < 0.005$

4. Discussão

Este trabalho descreve a seleção e caracterização *in vitro* e *in silico* de antígenos recombinantes miméticos a proteínas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* para o mapeamento de regiões antigênicas e para a descoberta de novos antígenos ou mimotopos que possam ser aplicados em processos terapêuticos, vacinais ou em diagnósticos.

Utilizando a tecnologia de *Phage Display* na seleção de peptídeos recombinantes que mimetizassem proteínas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*, com diferentes formas de seleção, foi possível identificar neste trabalho um total de 33 diferentes peptídeos recombinantes para a forma visceral da doença e 26 peptídeos para a forma tegumentar os quais definimos como alvos potenciais.

Ao analisar os peptídeos recombinantes selecionados frente aos anticorpos de pacientes com leishmaniose visceral em seleções específicas foi possível identificar uma sequência consenso (ATPRS) que coincide com a sequência anteriormente identificada pelo nosso grupo em um “biopanning” de menor

especificidade (Almeida, 2005), e os clones que apresentaram inibição quando reagem competitivamente com proteína total de *L. chagasi* em sua maioria são portadores deste motivo proteico, o qual mimetiza antígenos imunodominantes na resposta imune humoral.

O mapeamento de antígenos utilizando *Phage Display* foi descrito anteriormente (Mayrose et al., 2007) e especificamente neste trabalho as análises *in silico* dos peptídeos recombinantes eluídos com rk39 permitiram a identificação de proteínas pelas quais a população de clones teve maior afinidade baseando-se em alinhamentos lineares, especificamente às proteínas de superfície de promastigotos, GP46 e GP63, cisteína protease e HSP83. Isto implica em co-imunoprecipitação de antígenos, ou no reconhecimento de epítomos comuns, ou que os epítomos verdadeiros são conformacionais, demonstrando que os alinhamentos lineares *in silico* podem ter pouco significado. Contudo, ensaios desnaturantes indicam que provavelmente os epítomos são lineares. É importante enfatizar que a proteína do tipo kinesina, que contem a sequência rk39, foi utilizada com o intuito de selecionar peptídeos miméticos deste alvo, mas interessante as análises mostraram um número menor de sítios similares nos alinhamentos.

Os alvos identificados como prováveis, as proteínas GP63, GP46 e o antígeno LACK, têm sido amplamente utilizadas em vacinas (Handman, 2001), tanto na forma recombinante como sintética. Além do mais, as GP63 e GP46 são importantes na relação parasita-hospedeiro por serem imunodominantes na superfície de promastigotos, o que as torna alvos preferenciais vacinais (Kedzierski et al., 2006 and Soto et al., 2009). Adicionalmente, determinantes antigênicos da proteína LACK também têm sido amplamente utilizados como efetores na resposta imunológica contra este antígeno (Jensen et al., 2009 and Lanouis et al., 2007). Já o antígeno rk39, amplamente utilizado no diagnóstico da leishmaniose visceral (Srivastava et al., 2011), foi por nós utilizado para eluir antígenos recombinantes que tivessem afinidade pelos mesmos alvos, mas interessante esta eluição se mostrou mais abrangente, e abriu novas perspectivas para o estudo destas proteínas que podem ter epítomos comuns, o que justifica a melhor detecção deste antígeno no diagnóstico da Leishmaniose

visceral, o qual apresenta uma sequência repetitiva com uma pequena variação em resíduos carregados negativamente (Burns, 1993).

Quanto às seleções realizadas contra *L. amazonensis*, o mapeamento protéico utilizando os anticorpos recombinantes mostrou como alvos principais proteínas associadas à telomerase reversa, que possui alta homologia com outras proteínas de cinetoplastídeos e eucariotos (Giardini et al., 2006), e a LAMDR2, que é um membro da subfamília de resistência a multidrogas, envolvida na extrusão de xenobióticos (Katakura et al., 2004). Promastigotos que superexpressam esta proteína mostram resistência a antibióticos. Os peptídeos, gerados a partir de anticorpos de pacientes, são prováveis epítomos de células B, o que sugere o reconhecimento de anticorpos circulantes nos pacientes infectados, abrindo perspectivas para novos diagnósticos e biomarcadores que podem ser empregados no estudo das populações afetadas e para um melhor diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

Neste trabalho, como forma de validação adicional dos potenciais antígenos, aprofundamos os ensaios biológicos e funcionais com foco na Leishmaniose Visceral por ser a forma clínica mais importante e geralmente fatal. Os processos de validação apresentados evidenciam o potencial dos mimotopos selecionados, que de certa maneira apresentam importantes homologias parciais às sequências lineares das moléculas depositadas no NCBI, sendo que muitas já foram descritas na literatura (Soto et al., 2009), mas pouco ou ainda não exploradas utilizando epítomos específico.

Neste trabalho, nós analisamos a interferência do peptídeo sintético GLHKLAGLNLR em macrófagos murinos, buscando verificar a sua capacidade de ativação destas células na ausência e na presença do parasito (*L. chagasi*) por meio de testes de viabilidade celular e produção do óxido nítrico, conforme está descrito em ensaios funcionais com antígenos (Ferreira et al., 2008). Este peptídeo recombinante, relativo à seleção menos específica contra anticorpos de pacientes com leishmaniose visceral, apresentou alta afinidade aos soros de pacientes nos ensaios imunoenzimáticos (Almeida, 2005), e teve sua sequência correlacionada com o peptídeo de maior frequência na eluição específica contra *L. chagasi*, por este motivo, optamos por testá-lo como forma de avaliar a resposta celular frente a este antígeno e ao parasito. Sabe-se que alguns

epítomos são capazes de gerar tanto resposta imune humoral como celular, como por exemplo, epítomos da proteína gp63 (Russo, 1995), Leish111f (Bertholet et al., 2009) e KMP-11 que induzem a produção de anticorpos em pacientes com a doença ativa assim como a expansão de células T específicas em pacientes curados (Jensen et al., 1988). Os resultados aqui observados da interação entre peptídeo sintético e macrófagos J774A.1 mostraram um aumento significativo da viabilidade celular destas células quando infectadas com *L. chagasi*, o que pode demonstrar um aumento no metabolismo celular frente ao antígeno, que foi mais efetivo na presença de *L. Chagasi*, sendo também observado um número aumentado de parasitos nos macrófagos tratados, bem como um maior índice de infecção. É sabido que o aumento da viabilidade em macrófagos infectados com leishmania pode facilitar o desenvolvimento da infecção aumentando o número de células do hospedeiro disponíveis para serem parasitadas (Moores and Matlashewski, 1994). Interessantemente, as células tratadas por este peptídeo também demonstraram um aumento significativo na produção de óxido nítrico, o que deve ser melhor investigado. Estes resultados corroboram com a inferência de que o peptídeo mimetiza proteínas de interesse no parasito e que podem estar participando sinergisticamente da interação parasito-hospedeiro, podendo ser um alvo importante na geração de imunidade específica ao parasito.

Por fim, este trabalho apresenta novos peptídeos que mimetizam vários antígenos de leishmaniose visceral e tegumentar, os quais apresentam profundas e importantes implicações diagnósticas e terapêuticas para a doença e que subsidiarão as futuras investigações neste sentido.

5. Bibliografia

Almeida, J.F., 2009. Identificação de peptídeos recombinantes ligantes a anticorpos policlonais (igg) provenientes de pacientes com leishmaniose visceral via “phage display”. 69 f. Tese (Mestrado) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

Bertholet, S., Goto, Y., Carter, L., Bhatia, A., Howard, R.F., Carter, D., Coler R.N., Vedvick, T.S., Reed, S.G., 2009. Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine*. 27-703670-45.

Boelaert, M Sujit Bhattacharya, François Chappuis, Sayda H. El Safi, Asrat Hailu, Dinesh Mondal, Suman Rijal, Shyam Sundar, Monique Wasunna and Rosanna W. Peeling. 2007. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nature Rev. Microbiol.*, doi:10.1038/nrmicro1766

Boelaert, M., Rijal, S., Regmi, S., Singh, R., Karki, B., Jacquet, D., Chappuis, F., Campino, L., Desjeux, P., Le Ray, D., Koirala, S., Van der Stuyft, P., 2004. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 72–7.

Burns, J.M. Jr., Shreffler, W.G., Benson, D.R., Ghalib, H.W., Badaro, R., Reed, S.G., 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci, U S A.* 90, 775-779.

da Silva Ribeiro, V., Manhani, M. N., Cardoso, R., Vieira, C. U., Goulart, L. R., Costa-Cruz, J. M., 2010. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. *Immunol. Lett.* 129, 94-99.

De Doncker, S., Hutse, V., Abdellati, S., Rijal, S., Singh Karki, B.M., Decuyper, S., Jacquet, D., Le Ray, D., Boelaert, M., Koirala, S., Dujardin, J.C., 2005. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 25–31.

Ferreira, A.S., de Souza, M.A., Barbosa, N.R., da Silva, S.S., 2008. *Leishmania amazonensis*: xylitol as inhibitor of macrophage infection and stimulator of macrophage nitric oxide production. *Exp Parasitol.* 119, 74-79.

Giardini, M.A., Lira, C.B., Conte, F.F., Camillo, L.R., de Siqueira Neto, J.L., Ramos, C.H., Cano, M.I., 2006. The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitol Res.* 98, 447-454.

Goulart, L.R., Vieira, C.U., Freschi, A.P., Capparelli, F.E., Fujimura, P.T., Almeida, J.F., Ferreira, L.F., Goulart, I.M., Brito-Madurro, A.G., Madurro, J.M., 2010. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. *Crit. Rev. Immunol.* 30, 201-222.

Green, L.C., Tannenbaum, S.R., Goldman, P., 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science.* 212, 56-8.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnor, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126, 131).

Handman, E., 2001. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. Society. 14, 229-243.

Jensen, A.T., Gasim, S., Ismail, A., Gaafar, A., Kurtzhals, J.A., Kemp, M., El Hassan, A.M., Kharazmi, A., Theander. T.G., 1998: Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. Scand. J. Immunol. 48,103-109.

Jensen, K.D.C, Sercarz, Eli.E., Gabaglia, Claudia Raja 2009. Altered peptide ligands can modify the Th2 T cell response to the immunodominant 161-175 peptide of LACK (*Leishmania* homolog for the receptor of activated C kinase). Mol. Immunol. 46, 366-374.

Katakura, K., Fujise, H., Takeda, K., Kaneko, O., Torii, M., Suzuki, M., Chang, K.P., Hashiguchi, Y., Overexpression of LaMDR2, a novel multidrug resistance ATP-binding cassette transporter, causes 5-fluorouracil resistance in *Leishmania amazonensis*. FEBS Lett. 12, 207-212.

Kedzierski, L., Zhu, Y. Handman, E. 2006. *Leishmania* vaccines: progress and problems. Parasitol.133, 87-112.

Lang, T., Lecoecur, H., Prina, E., 2009. Imaging *Leishmania* development in their host cells.Trends Parasitol. 25, 464-473.

Launois, P., Pingel, S., Himmelrich, H., Locksley, R., Louis, J. 2007. Different epitopes of the LACK protein are recognized by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells in H-2b and H-2d mice susceptible to *Leishmania major*. Microbes Infect. 9, 1260-1266.

Mayrose, I., Shlomi, T., Rubinstein, N.D., Gershoni, J.M., Ruppin, E., Sharan, R., Pupko, T., 2007. Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. Nucleic Acids Res. 35, 69-78.

Moore, K.J., Matlashewski, G., 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. J. Immunol. 152, 2930-2937.

Park, H.Y., Park, H.C., Yoon, M.Y., 2009. Screening for peptides binding on *Phytophthora capsici* extracts by phage display. J. Microbiol. Methods. 78, 54-58.

Pearson, R. D., Sousa, A. Q., 1996. Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin. Infect. Dis. 22:1.

Prudencio, C. R., Nascimento, R., Filho, M. M., Marra de O., de Souza, G. R., Almeida, J. F., Cardoso, R., Szabo, M. P., Goulart, L. R., 2009. In silico analysis

for identification of tick phagotopes selected by phage-displayed libraries. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18, 39-41.

Roberts M.T.M., 2006. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Medical Bulletin*, 75 and 76: 115–130.

Russo, D.M., Turco, S.J., Burns, J.M., Reed, S.G., 1992. Stimulation of human T lymphocytes by *Leishmania* lipophosphoglycan-associated proteins. *J. Immunol.* 148,202–207.L

Santos, J.C., Pinto, I.R.G., Carvalho, W., Mancilha, I.M., Felipe, M.G.A., Silva, S.S., 2005. Sugarcane bagasse as raw material and immobilization support for xylitol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121, 673–683.

Soto, M., Ramírez, L., Pineda, M.A., González, V. M., Entringer, P. F., Nascimento, I.P., Souza, A.P., Corvo,L., Alonso,C., Bonay, P., Brodskyn, C., Barral, A., Barral-Netto, M., Iborra, S., 2009. Searching Genes Encoding *Leishmania* Antigens for Diagnosis and Protection. *Scholarly Res. Exchange.* 1-25.

Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., Sundar, S., 2011. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105,1-6.

Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R. A., Maes, L., Cos, P., 2011. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free radical bio med.* 51, 337-351.

Van Nieuwenhove, L.C., Rogé, S., Balharbi, F., Dieltjens, T., Laurent, T., Guisez, Y., Büscher, P., Lejon, V. 2011. Identification of Peptide Mimotopes of *Trypanosoma brucei* gambiense Variant Surface Glycoproteins. *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 5, 1189.

Zijlstra, E.E., Ali, M.S., el-Hassan, A.M., el-Toum, I.A., Satti, M., Ghalib, H.W., Kager, P.A., 1992. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 505–7.