



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNORREATIVO DE PEPTÍDEOS  
RECOMBINANTES SELECIONADOS POR *PHAGE DISPLAY* CONTRA IgG  
HUMANA DE PACIENTES COM A DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

FLÁVIA FIGUEIRA MESSIAS

FEVEREIRO 2010

Flávia Figueira Messias

**Avaliação do Perfil Imunorreativo de Peptídeos Recombinantes  
selecionados por *Phage Display* contra IgG Humana de Pacientes com a  
Doença de Chagas Crônica**

Dissertação apresentada à Coordenação  
do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal de  
Uberlândia, como parte das exigências  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia - MG  
Fevereiro – 2010

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

M585a Messias, Flávia Figueira, 1984-

Avaliação do perfil imunorreativo de peptídeos recombinantes selecionados por Phage Display contra IgG humana de pacientes com a doença de Chagas crônica [manuscrito] / Flávia Figueira Messias. - 2010.  
64 f.: il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

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

Inclui bibliografia.

1. Chagas, Doença de - Teses. 2. Peptídios - Teses I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 616.937.3

---

Flávia Figueira Messias

**Avaliação do Perfil Imunorreativo de Peptídeos Recombinantes  
selecionados por *Phage Display* contra IgG Humana de Pacientes com a  
Doença de Chagas Crônica**

Dissertação apresentada à Coordenação  
do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal de  
Uberlândia, como parte das exigências  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências da Saúde.

**Banca examinadora:**

**Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza**  
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

**Prof. Dr. Marcelo Simão Ferreira**  
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

**Prof. Dr. Virmondes Rodrigues**  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

**Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**  
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Uberlândia - MG  
Fevereiro - 2010

*Dedico este trabalho aos meus amados pais Carlos e Neida,  
à minha querida irmã Viviane e à pequena Nina, com muito amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

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

*À minha mãe querida, Neida, por sempre ter sido um exemplo de vida para mim, me apoiando e cuidando de mim com um amor incondicional.*

*Ao meu pai, Carlos, que mesmo não estando comigo neste momento, deixou-me lições e amor para a vida inteira. À minha irmã Viviane e ao meu cunhado Luciano, que são pessoas únicas, e que, a todo momento, estiveram à disposição me auxiliando em tudo que precisei.*

*Aos meus avós, tios e primos que tanto se orgulham de mim, principalmente a tia Mariza que sempre deu muito valor a todas as minhas conquistas profissionais.*

*Ao meu namorado Dullio, pelas demonstrações de amor e compreensão. Obrigada por tornar os meus dias mais doces.*

*Ao orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, por tornar possível meu sonho de participar de sua equipe, para que pudesse exercer um trabalho almejado a vida inteira. Muito obrigada por ter me acolhido, sua confiança em mim foi indispensável para que eu mesma pudesse acreditar em meu potencial.*

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

*À Ângela, que esteve a todo momento pronta a me ajudar com a estatística. Muito obrigada, sem sua luz o trabalho não teria o mesmo valor. À Yara, que me ajudou muito com suas palavras doces, carinho e otimismo. À Patrícia, que compartilhou sempre sua sabedoria e esforço comigo, me ajudando com palavras amigas e me incentivando.*

*À querida amiga Thaíse, de quem fiquei mais próxima nos últimos tempos. Foi muito bom te conhecer melhor, obrigada pela companhia e pelo exemplo.*

*À Fabiana, por ter contribuído muito com a realização de todo este trabalho.*

*Ao querido amigo Carlos Roberto, que mesmo não estando mais em nosso Laboratório, sempre me auxiliou com suas opiniões e conversas científicas.*

*A todos meus amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU: Janaína Lobato, Érica Reis, Paula Cristina, Paula Souza, Rone Cardoso, Fausto Capparelli, Karina Marangoni, Ana Paula Carneiro, Carolina Reis, Washington Carvalho, Tiago Barbosa, Márcia Nunes, Rafael Nascimento, Ana Carolina Siquieroli, Galber Araujo, Tamires Aparecida, Larissa Minari, Larissa Goulart e Luciana Machado. Vocês todos tornaram os meus dias mais felizes, fazendo do Laboratório muito mais do que um ambiente de trabalho.*

*À Direção, Professores e Funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica e do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, e à Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio.*

*À Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza, ao Prof. Dr. Marcelo Simão Ferreira e ao Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira por todas as contribuições na banca de qualificação.*

*Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues da Universidade Federal do Triângulo Mineiro por ceder amostras biológicas para realização dos experimentos.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro.*

*Às minhas inseparáveis amigas de graduação: Alice, Mariana, Rita e Patrícia, que tornaram os quatro anos de faculdade inesquecíveis. Agradeço principalmente à Alice, que mesmo não entendendo muito dos meus procedimentos no Laboratório, sempre se interessou em saber do meu desempenho, dos meus resultados e dificuldades, além de ser uma pessoa com quem sempre pude contar.*

*À Dolores, minha amiga de sempre, com quem convivi desde a infância, e que faz parte de tudo que consegui e de tudo que sou. Às amigas Fernanda, Janayne, Sabrina e Ana Laura, que mesmo tendo seguido caminhos diferentes do meu, sempre estiveram ao meu lado.*

*À minha querida dindinha Raquel e à “tia” Vera por serem a família que pude escolher. Muito obrigada pela torcida, a presença de vocês na minha vida é essencial.*

*Aos padrinhos Paulo e Fia por serem tão corujas comigo, acolhendo-me em todos os momentos.*

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

## RESUMO

### **Avaliação do Perfil Imunorreativo de Peptídeos Recombinantes selecionados por *Phage Display* contra IgG Humana de Pacientes com a Doença de Chagas Crônica**

A doença de Chagas foi descoberta e descrita por Carlos Chagas em 1909, e representa uma importante doença parasitária crônica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Depois de adquirida, a tripanossomíase americana pode apresentar-se sob duas fases: aguda e crônica, sendo esta dividida em três formas principais: indeterminada, digestiva e cardíaca. Objetivamos avaliar o perfil imunorreativo de peptídeos recombinantes selecionados contra IgG humana purificada de pacientes com as formas cardíaca, digestiva e indeterminada da fase crônica da doença de Chagas por *Phage Display*, a fim de avaliar a possibilidade de um padrão diferenciado de resposta imunológica entre as três formas da doença e buscar clones com potencial diagnóstico. Os ELISAs foram realizados com todos os 50 clones distintos obtidos pelos quatro ciclos de seleção, utilizando-se sobrenadante dos fagos como antígenos no sistema de captura. Além disso, foi realizado teste de redução em placas com os clones com melhor desempenho de reatividade nos ELISAs, a fim de demonstrar a especificidade de ligação dos anticorpos com esses epítomos. Os testes realizados demonstraram que o perfil imunorreativo de alguns clones sugere a propensão de indivíduos portadores da forma indeterminada a evoluírem para a forma cardíaca ou digestiva da doença, além de demonstrarem clones potenciais para o diagnóstico diferencial entre as formas cardíaca e digestiva, bem como epítomos para detecção geral da doença de Chagas.

**Palavras-chave:** doença de Chagas, peptídeos, fase crônica, diagnóstico.

## **ABSTRACT**

### **Evaluation of the Immunoreactivity Profile of Recombinant Peptides selected by Phage Display against Human IgG from Chronic Chagas Disease Patients**

Chagas disease, an American trypanosomiasis caused by *Trypanosoma cruzi*, was discovered by Carlos Chagas in 1909, and presents a broad spectrum of clinical manifestations, including the acute and chronic phases. The latter is divided into three main forms: digestive, cardiac and indeterminate. The purposes of this study were to evaluate the immunoreactivity profile of recombinant peptides selected against purified human IgG from chronic chagas disease patients by Phage Display, to assess differential recognition patterns in the immune response among disease clinical forms, and to select mimotopes with potential use in diagnostics. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was conducted with all 50 clones obtained after four rounds of selection. The trials were performed with phages supernatant. In order to evaluate the specific antibody response, plaque reduction tests were performed with clones that showed better performance in ELISAs. ELISA tests showed that the immune profile of some clones suggested the tendency of patients with the indeterminate form to develop cardiac or digestive form. Phage display approach has generated specific mimotopes that present differential recognition patterns of the immune response between the cardiac and digestive clinical forms of Chagas disease, and these mimotopes may become potential targets for vaccine development and for differential diagnostics of clinical forms.

**Keywords:** Chagas disease, peptides, chronic phase, diagnosis.

## SUMÁRIO

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE TABELAS                                                      | 1  |
| LISTA DE FIGURAS                                                      | 3  |
| INTRODUÇÃO                                                            | 6  |
| Doença de Chagas                                                      | 6  |
| <i>Phage Display</i>                                                  | 11 |
| JUSTIFICATIVA                                                         | 15 |
| OBJETIVO GERAL                                                        | 16 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                 | 16 |
| MATERIAL E MÉTODOS                                                    | 17 |
| Amostras de soro                                                      | 17 |
| Seleção de peptídeos – <i>Biopanning</i> em placa                     | 17 |
| Amplificação dos clones                                               | 19 |
| Ensaio imunoenzimático                                                | 19 |
| Análise estatística – ELISA                                           | 20 |
| Purificação dos fagos                                                 | 20 |
| Teste de redução em placas                                            | 21 |
| RESULTADOS                                                            | 23 |
| Identificação dos clones obtidos pelo <i>Biopanning</i>               | 23 |
| Caracterização dos clones sequenciados obtidos pelo <i>Biopanning</i> | 24 |
| Ensaio Imunoenzimático (ELISA)                                        | 26 |
| Teste de Redução em Placas                                            | 38 |
| DISCUSSÃO                                                             | 44 |
| CONCLUSÕES                                                            | 50 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                            | 51 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Identificação dos clones obtidos pelo <i>Biopannig</i> e respectivas sequências.....                                                                                                                                                                                                                         | 23 |
| <b>Tabela 2.</b> Sequências de aminoácidos dos clones selecionados, frequência observada, frequência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.....                                                                                                                                                           | 24 |
| <b>Tabela 3.</b> Média das DOs em triplicatas, de cada clone selecionado para a forma cardíaca da doença de Chagas submetido aos <i>pools</i> de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao <i>pool</i> de soros dos pacientes controles, subtraída da média das DOs em triplicatas do fago selvagem.....      | 27 |
| <b>Tabela 4.</b> Análise estatística da diferença de reatividade dos clones selecionados para a forma cardíaca da doença de Chagas submetidos ao <i>pool</i> de soros da mesma forma contra todos os outros <i>pools</i> (formas digestiva e indeterminada) e <i>pool</i> de soros de pacientes controles.....                | 28 |
| <b>Tabela 5.</b> Média das DOs em triplicatas, de cada clone selecionado para a forma digestiva da doença de Chagas submetido aos <i>pools</i> de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao <i>pool</i> de soros dos pacientes controles, subtraída da média das DOs em triplicatas do fago selvagem.....     | 30 |
| <b>Tabela 6.</b> Análise estatística da diferença de reatividade dos clones selecionados para a forma digestiva da doença de Chagas submetidos ao <i>pool</i> de soros da mesma forma contra todos os outros <i>pools</i> (formas cardíaca e indeterminada e controle).....                                                   | 31 |
| <b>Tabela 7.</b> Média das DOs em triplicatas, de cada clone selecionado para a forma indeterminada da doença de Chagas submetido aos <i>pools</i> de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao <i>pool</i> de soros dos pacientes controles, subtraída da média das DOs em triplicatas do fago selvagem..... | 33 |
| <b>Tabela 8.</b> Análise estatística da diferença de reatividade dos clones selecionados para a forma indeterminada da doença de Chagas submetidos ao <i>pool</i> de soros da mesma forma contra todos os outros <i>pools</i> (formas cardíaca e digestiva e controle).....                                                   | 34 |
| <b>Tabela 9.</b> Contagem do número de colônias presentes em placas com diferentes clones submetidos ao <i>pool</i> de soros das formas para as quais foram mais reativos no ELISA e ao TBS, com respectivas taxas de redução.....                                                                                            | 38 |
| <b>Tabela 10.</b> Contagem do número de colônias presentes em placas com diferentes clones submetidos aos <i>pools</i> de soros das três formas da fase crônica da doença de Chagas, ao <i>pool</i> de soros de pacientes controles e ao TBS, com respectivas taxas de redução.....                                           | 39 |

**Tabela 11.** Contagem do número de colônias presentes em placas contendo o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 17 adicionado de *pool* de soros da forma cardíaca em diferentes diluições.....40

**Tabela 12.** Contagem do número de colônias presentes em placas contendo o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 21 adicionado de *pool* de soros da forma digestiva em diferentes diluições.....40

**Tabela 13.** Contagem do número de colônias presentes em placas contendo o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 29 adicionado de soro da forma cardíaca em diferentes diluições.....40

**Tabela 14.** Contagem do número de colônias presentes em placas contendo o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 34 adicionado de *pool* de soros da forma indeterminada em diferentes diluições.....40

**Tabela 15.** Contagem do número de colônias presentes em placas contendo o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 35 adicionado de *pool* de soros da forma digestiva em diferentes diluições.....40

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Ciclo de vida do *Trypanosoma*. A parte superior da figura (azul) mostra o desenvolvimento das formas tripomastigotas no intestino do barbeiro e sua transmissão aos hospedeiros vertebrados. A parte inferior (amarela) ilustra a fase de desenvolvimento das formas amastigotas no homem ou em outros reservatórios vertebrados.....7

**Figura 2.** Esquema representativo de um bacteriófago de classe Ff ilustrando as proteínas do capsídeo viral e três modelos de exposição de peptídeos respectivamente nas proteínas pIII, pVIII e simultaneamente nas proteínas pVII e pIX.....12

**Figura 3.** Esquema representativo do processo de *Biopanning*. Imobilização do alvo e incubação da biblioteca de fagos, retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas, eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli*, amplificação dos fagos eluídos e sequenciamento da população de fagos com maior afinidade pelo alvo.....14

**Figura 4.** Descrição esquemática dos quatro ciclos de seleção (*Biopanning*) realizados.....18

**Figura 5.** Clones que apresentaram afinidade significativamente maior perante o *pool* de soros da forma cardíaca da doença de Chagas. (A) **a:** Reatividade do clone Seq 17/ soro forma cardíaca vs fago selvagem/ soro forma cardíaca  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 17/ soro forma cardíaca vs demais formas e grupo controle  $p < 0,001$ . (B) **a:** Reatividade do clone Seq 24/ soro forma cardíaca vs fago selvagem/ soro forma cardíaca  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 24/ soro forma cardíaca vs demais formas e grupo controle  $p < 0,001$ . (C) **a:** Reatividade do clone Seq 25/ soro forma cardíaca vs fago selvagem/ soro forma cardíaca  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 25/ soro forma cardíaca vs demais formas e grupo controle  $p < 0,001$ .....29

**Figura 6.** Clones que apresentaram afinidade significativamente maior perante o *pool* de soros da forma digestiva da doença de Chagas. (A) **a:** Reatividade do clone Seq 21/ soro forma digestiva vs fago selvagem/ soro forma digestiva  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 21/ soro forma digestiva vs demais formas e grupo controle  $p < 0,001$ . (B) **a:** Reatividade do clone Seq 23/ soro forma digestiva vs fago selvagem/ soro forma digestiva  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 23/ soro forma digestiva vs demais formas e grupo controle  $p < 0,001$ .....32

**Figura 7.** Clones que apresentaram afinidade significativamente igual perante os *pools* de soros da forma indeterminada e por uma das outras formas (cardíaca ou digestiva) da doença de Chagas. (A) **a:** Reatividade do clone Seq 29/ soros formas indeterminada e cardíaca vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 29/ soro forma indeterminada vs clone Seq 29/ soro forma cardíaca  $p > 0,05$ ; **c:** Reatividade do clone Seq 29/ soros formas indeterminada e cardíaca vs clone Seq 29/ soros forma digestiva

e indivíduos controles  $p < 0,001$ . (B) **a**: Reatividade do clone Seq 35/ soros formas indeterminada e digestiva vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b**: Reatividade do clone Seq 35/ soro forma indeterminada vs clone Seq 35/ soro forma digestiva  $p > 0,05$ ; **c**: Reatividade do clone Seq 35/ soros formas indeterminada e digestiva vs clone Seq 35/ soros forma cardíaca e indivíduos controles  $p < 0,001$ .....35

**Figura 8.** Clones que apresentaram afinidade significativamente igual perante os *pools* de soros das três formas da doença de Chagas. (A) **a**: Reatividade do clone Seq 3/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b**: Reatividade do clone Seq 3/ soro forma cardíaca vs clone Seq 3/ soro forma digestiva vs clone Seq 3/ soro forma indeterminada  $p > 0,05$ ; **c**: Reatividade do clone Seq 3/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs clone Seq 3/ soro indivíduos controles  $p < 0,001$ . (B) **a**: Reatividade do clone Seq 14/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b**: Reatividade do clone Seq 14/ soro forma cardíaca vs clone Seq 14/ soro forma digestiva vs clone Seq 14/ soro forma indeterminada  $p > 0,05$ ; **c**: Reatividade do clone Seq 14/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs clone Seq 14/ soro indivíduos controles  $p < 0,001$ . (C) **a**: Reatividade do clone Seq 27/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b**: Reatividade do clone Seq 27/ soro forma cardíaca vs clone Seq 27/ soro forma digestiva vs clone Seq 27/ soro forma indeterminada  $p > 0,05$ ; **c**: Reatividade do clone Seq 27/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs clone Seq 27/ soro indivíduos controles  $p < 0,001$ . (D) **a**: Reatividade do clone Seq 34/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b**: Reatividade do clone Seq 34/ soro forma cardíaca vs clone Seq 34/ soro forma digestiva vs clone Seq 34/ soro forma indeterminada  $p > 0,05$ ; **c**: Reatividade do clone Seq 34/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs clone Seq 34/ soro indivíduos controles  $p < 0,001$ .....37

**Figura 9.** Teste de redução em placa realizado com cinco clones diferentes. (A) A placa do clone Seq. ID Nº 17 adicionado de TBS está sendo mostrada à esquerda; enquanto a placa do clone Seq. ID Nº 17 adicionado de soro da forma cardíaca da doença de Chagas (diluição 1:8) está sendo mostrada à direita. (B) A placa do clone Seq. ID Nº 21 adicionado de TBS está sendo mostrada à esquerda; enquanto a placa do clone Seq. ID Nº 21 adicionado de soro da forma digestiva da doença de Chagas (diluição 1:8) está sendo mostrada à direita. (C) A placa do clone Seq. ID Nº 29 adicionado de TBS está sendo mostrada à esquerda; enquanto a placa do clone Seq. ID Nº 29 adicionado de soro da forma cardíaca da doença de Chagas (diluição 1:8) está sendo mostrada à direita. (D) A placa do clone Seq. ID Nº 34 adicionado de TBS está sendo mostrada à esquerda; enquanto a placa do clone Seq. ID Nº 34 adicionado de soro da forma indeterminada da doença de Chagas (diluição 1:8) está sendo mostrada à direita. (E) A placa do clone Seq. ID Nº 35 adicionado de TBS está sendo mostrada à esquerda; enquanto a placa do clone Seq. ID Nº 35 adicionado de soro da forma digestiva da doença de Chagas (diluição 1:8) está sendo mostrada à direita.....41

**Figura 10.** Demonstração gráfica da relação entre a DO e a taxa de redução correspondentes aos diferentes clones submetidos a todos os *pools* de soros.....42

## INTRODUÇÃO

### Doença de Chagas

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

De acordo com informações de 21 países, onde a doença de Chagas é endêmica, o número estimado de indivíduos infectados atualmente é 8 milhões, o que representa uma redução de 50% nas taxas de infecção de 1990 até a atualidade. Anualmente, é estimado que 41.200 indivíduos sejam infectados pelo *Trypanosoma cruzi* via transmissão vetorial, e que aproximadamente 14.385 indivíduos sejam acometidos pela doença de Chagas congênita (WHO, 2007).

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

A transmissão da doença de Chagas para os humanos e para outros hospedeiros mamíferos ocorre principalmente por meio de fezes infectadas de triatomíneos hematófagos, embora já tenham sido descritas outras rotas de transmissão, que incluem transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão vertical e ingestão de alimentos contaminados (DUMONTEIL, 2009).

O protozoário *Trypanosoma cruzi* possui ciclo de vida heteroxênico e pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, podendo apresentar-se sob três formas principais: amastigota, epimastigota e tripomastigota (REY, 1992).

A transmissão vetorial da doença de Chagas aos hospedeiros vertebrados susceptíveis inicia-se por meio da picada de barbeiros; assim, as

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

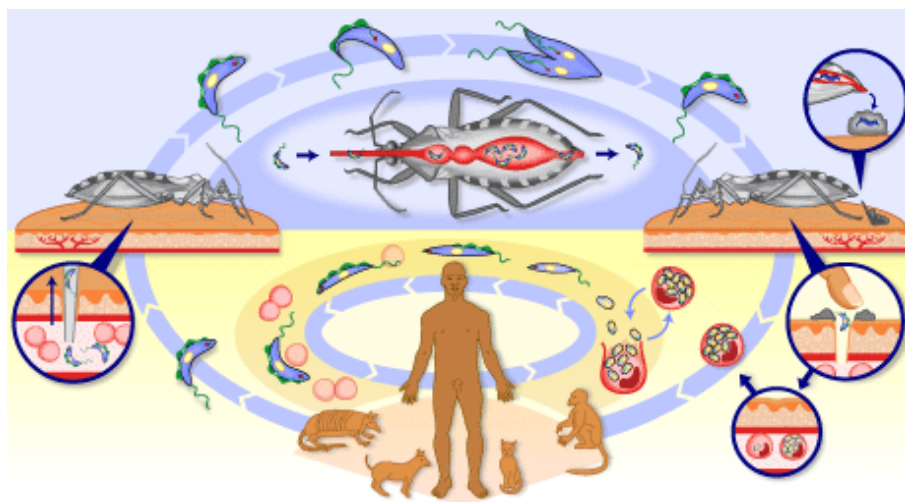


**Figura 1.** Ciclo de vida do *Trypanosoma*. A parte superior da figura (azul) mostra o desenvolvimento das formas tripomastigotas no intestino do barbeiro e sua transmissão aos hospedeiros vertebrados. A parte inferior (amarela) ilustra a fase de desenvolvimento das formas amastigotas no homem ou em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

Depois de adquirida, a doença de Chagas pode se apresentar sob duas fases: a aguda e a crônica (CHAGAS, 1911). A fase aguda caracteriza-se por febre, mal estar, edemas, hepatoesplenomegalia, infartamento ganglionar generalizado, taquicardia e pela presença de tripanosomas no sangue

periférico (ANDRADE, 1958). Porém, na maioria, a doença se desenvolve de maneira favorável, passando a uma fase de cronicidade mais ou menos assintomática (LARANJA; DIAS; NOBREGA, 1948; ANDRADE, 1958).

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

A doença entra na fase crônica, geralmente começando com um longo período assintomático, denominado de forma indeterminada, que acomete a maioria dos doentes (70 a 80%) e persiste de dez a trinta anos ou por toda a vida. Em 20% a 30% dos indivíduos infectados, a doença resulta em cardiopatia grave ou megaesôfago e megacólon (WHO, 2007).

A estratégia de controle para a eliminação da doença de Chagas é baseada no controle de vetores; rastreamento sistemático dos doadores de sangue em todos os países endêmicos; detecção e tratamento da transmissão congênita; e tratamento de crianças infectadas e de casos agudos (WHO, 2007).

Entre os diversos aspectos intrigantes relacionados à doença de Chagas, sua evolução clínica diferencial em indivíduos cronicamente infectados assume um papel de grande destaque. Enquanto a maioria dos pacientes chagásicos crônicos não apresenta sintomas ou sinais clínicos da doença, sendo classificados como indeterminados, as formas clínicas digestiva e cardíaca são caracterizadas por lesões teciduais de intensidade variável na rede neuronal mioentérica e nos tecidos cardíacos, respectivamente, e são associadas à morbidade e mortalidade da doença. Fatores relacionados ao parasito, como por exemplo, o tropismo tecidual específico de diferentes isolados de *Trypanosoma cruzi*, podem influenciar de maneira decisiva a evolução clínica da doença de Chagas. No entanto, o fato de que isolados semelhantes de parasitos podem ser associados a formas clínicas distintas da doença aponta para a importância de outros fatores, especialmente a resposta imune dos pacientes (FIOCRUZ; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A eficiência e o caráter da resposta imune na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* dependem do hospedeiro, da cepa do parasito envolvida e da fase da doença (ABATH, 1983). Respostas imunes inata e adaptativa

coordenadas, efetuadas por macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e citocinas controlam a parasitemia na fase aguda, mas o parasito permanece indefinidamente nos tecidos do hospedeiro. Componentes clássicos da imunidade inata, como células dendríticas (DC), macrófagos e células *natural killer* (NK) parecem ter papel crucial na imunidade anti-*T. cruzi*. Além disso, diferentes moléculas de superfície do parasito têm sido identificadas como indutoras da imunidade inata, dentre elas destacam-se as âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), as GPI ligadas covalentemente às glicoproteínas semelhantes a mucinas, as GPI-mucinas, e a enzima trans-sialidase (TS) (FIOCRUZ; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

No homem, a infecção por *T. cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasito; afinal, considerando-se a complexidade das interações parasito-hospedeiro, é improvável que apenas um braço do sistema imunológico esteja associado à evolução da doença (BRODSKYN; BARRAL-NETO, 2000).

Tem sido descrito em diferentes estudos, que a forte participação do sistema imune ocorre durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi*, na qual há ativação inespecífica de macrófagos (ORTIZ-ORTIZ et al., 1976) e células NK (HATCHER et al., 1981) acompanhada pela ativação policlonal de linfócitos B e T e por hipergamaglobulinemia (MINOPRIO et al., 1986; MINOPRIO et al., 1987). O mecanismo preciso dessa ativação inicial é pouco entendido (BRENER; GAZZINELLI, 1997).

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

Foi constatado que a imunização experimental com frações de parasitos fixados induz proteção parcial ou ausência de infecção. Os anticorpos protetores (anticorpos líticos), aumentados durante a fase crônica da doença, reconhecem epítomos na superfície de tripomastigotas vivos, que são rompidos em um ensaio *in vitro*, em uma lise mediada pelo complemento (BRENER; GAZZINELLI, 1997).

Os primeiros estudos relacionados à resposta imune dos pacientes chagásicos focalizaram-se na resposta humoral. A detecção de anticorpos reativos ao parasito foi e é uma importante ferramenta para diagnóstico da infecção em humanos e, diante dessa associação, pesquisas têm sido realizadas para melhor caracterizar a resposta humoral dos pacientes chagásicos crônicos (FIOCRUZ; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Assim, na doença de Chagas, os anticorpos constituem importantes componentes nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra *Trypanosoma cruzi*. Muitos antígenos do parasito já foram estudados de forma a possibilitar a síntese de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos com potencial uso clínico e epidemiológico: proteínas internas, como o antígeno-30, CRA, JL8, TCR27, as proteínas P ribossomais e a proteinase de cisteína de *Trypanosoma cruzi*, que é encontrada nos lisossomos e possivelmente na superfície da célula. Outros antígenos estão localizados no flagelo, como o antígeno I, FRA, JL7. Sabendo-se que frações flagelares protegem camundongos contra infecção fatal, tais antígenos podem ter implicações na sorologia e imunoproteção. Outros antígenos localizam-se na superfície do parasito como os antígenos 2, 13 e SAPA (revisado por FRASCH et al., 1991).

O diagnóstico de indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* é realizado principalmente por testes sorológicos, o que poderia ocasionar reação cruzada com outras infecções. Por isso, nos últimos dez anos, muitas proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos relacionados ao parasito *Trypanosoma cruzi* têm sido descritos, e alguns já estão no mercado (SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001).

Na fase crônica da infecção, a detecção do parasito no sangue é feita por exame parasitológico direto, hemocultura ou xenodiagnóstico, os quais são altamente específicos, mas possuem uma sensibilidade que varia de 34% a 85%, dependendo das condições técnicas. Assim, a detecção de anticorpos séricos contra antígenos de *Trypanosoma cruzi* (sondas) tem sido o principal método para o diagnóstico da doença de Chagas (RABELLO et al., 1999). Estes anticorpos são geralmente detectados por uma série de testes sorológicos, principalmente ensaios imunoenzimáticos. Destes testes convencionais, os mais utilizados são hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*),

devido à sua simplicidade, baixo custo e bom desempenho, tanto em termos de especificidade como de sensibilidade. No entanto, a variação na reprodutibilidade e confiabilidade dos testes já foi relatada e explicada pela fraca padronização dos reagentes. Além disso, existe o problema da reatividade cruzada, que ocorre principalmente com anticorpos produzidos contra patógenos do gênero *Leishmania* (SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001).

Sabendo que muitas doenças infecciosas, como a doença de Chagas, carecem de diagnósticos mais confiáveis, rápidos e precisos, existe uma grande busca por novos antígenos com aplicações diagnósticas, bem como a caracterização dos mesmos.

### ***Phage Display***

Uma ferramenta muito eficiente e amplamente utilizada para identificação de novos peptídeos é o *Phage Display*, ou exposição de biomoléculas na superfície de bacteriófagos filamentosos M13, que foi desenvolvida por Smith em 1985. Esta técnica foi originalmente utilizada para construir bibliotecas de anticorpos com o propósito de selecionar fagos que se ligavam fortemente em antígenos específicos (SMITH, 1985). Desde sua criação, esta metodologia tem apresentado uma crescente utilização em diversas áreas das Ciências, por ser um potente método de seleção de polipeptídeos ligantes a diversos alvos biológicos (BARBAS et al., 2001).

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 uma fita simples de DNA que é envolta em uma cápsula protéica (RUSSEL, 1991). O bacteriófago é composto por cinco proteínas estruturais: pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX, sendo que a proteína pVIII constitui o corpo cilíndrico do capsídeo (Figura 2). A incorporação de proteínas exógenas na superfície dos fagos filamentosos faz-se fusionando esses peptídeos às proteínas estruturais das partículas virais, sendo que as duas principais proteínas utilizadas para esse fim são a proteína pVIII e a pIII. (BRIGIDO; MARANHÃO, 2002).

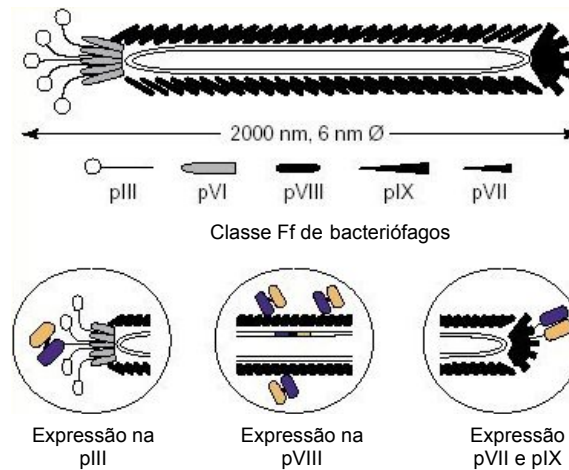


**Figura 2.** Esquema representativo de um bacteriófago de classe Ff ilustrando as proteínas do capsídeo viral e três modelos de exposição de peptídeos respectivamente nas proteínas pIII, pVIII e simultaneamente nas proteínas pVII e pIX. (Disponível em: <http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html>)

Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que fagos filamentosos não geram uma infecção lítica em *E. coli*, mas preferencialmente induzem um estado no qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise. A infecção é iniciada pelo acoplamento da pIII do fago ao *pilus F* de uma *E. coli*. Somente o DNA de fita simples e circular do fago penetra na bactéria, onde é convertido pela maquinaria de replicação do DNA bacteriano em uma forma replicativa de plasmídeo de fita dupla. Esta forma replicativa sofre constantes replicações para gerar DNA de fita simples e ainda servir como molde para expressão das proteínas de fago pIII e pVIII. A progênie do fago é montada por empacotamento do DNA de fita simples em capsídeos protéicos e expulsos da bactéria por meio da membrana no meio (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

A exposição em fagos filamentosos é baseada na clonagem de fragmentos de DNA codificantes de milhões de variantes de certos ligantes (BENHAR, 2001), como proteínas, incluindo anticorpos ou peptídeos. As sequências de DNA de interesse são inseridas em uma determinada localização no genoma dos bacteriófagos filamentosos, de modo que a proteína codificada é expressa fusionada a uma das proteínas de superfície do fago (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002). Esta ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado mostra a evolução dos ligantes

selecionados até moléculas otimizadas, sendo uma vantagem crucial desta tecnologia (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

O peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago possibilita a seleção de sequências baseada na afinidade de ligação de uma molécula alvo em um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (PARMLEY; SMITH, 1988).

A seleção, ou *biopanning*, é realizada pela incubação da biblioteca de peptídeos ou anticorpos expostos em fagos contra o alvo. O alvo é imobilizado em suportes sólidos tais como placas de ELISA, microesferas magnéticas ou de afinidade, resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas, e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O *pool* de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica ou *biopanning* (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com sequências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens, os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA (Figura 3) (SMITH, 1985).

Bibliotecas de peptídeos têm sido utilizadas na determinação de epítomos aos quais os anticorpos se ligam. Os anticorpos reconhecem motivos de peptídeos baseados somente em três ou quatro resíduos conservados. Por esse motivo, é possível a determinação da região de uma proteína que está sendo reconhecida por um anticorpo utilizando-se *Phage Display* (SCOTT; SMITH, 1990).

Bibliotecas de peptídeos randômicos lineares e cíclicos (MICELI; DEGRAAF; FISCHER, 1994) e bibliotecas de fragmentos de antígenos e genes (CHRISTMANN et al., 2001) têm sido utilizadas no mapeamento de epítomos de anticorpos monoclonais. Bibliotecas combinatórias de peptídeos, as quais podem ser construídas para conter bilhões de cópias de um único peptídeo, têm sido utilizadas como fonte de moléculas com diferentes potenciais de ligação (UCHIYAMA et al., 2005).

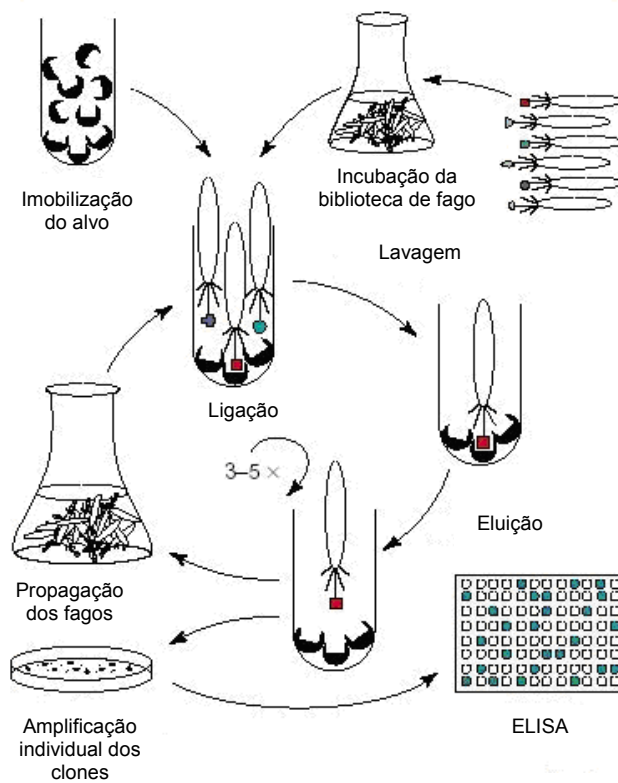


**Figura 3.** Esquema representativo do processo de *Biopanning*. Imobilização do alvo e incubação da biblioteca de fagos, retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas, eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli*, amplificação dos fagos eluídos e sequenciamento da população de fagos com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

Embora a tecnologia de *Phage Display* tenha sido criada há mais de 20 anos, as aplicações e desenvolvimento desta técnica estão apenas começando a ser exploradas. A otimização da tecnologia de *Phage Display* potencializará a produção de uma enorme gama de ligantes, incluindo anticorpos recombinantes e peptídeos, com especificidades pré-definidas, que podem atuar, por exemplo, na melhoria do diagnóstico de uma variedade de doenças humanas (HELL et al., 2009).

## JUSTIFICATIVA

Apesar do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas em muitos países da América Latina, ainda necessita-se de um método diagnóstico mais preciso capaz de detectar a presença de infecção por *Trypanosoma cruzi*, principalmente para a utilização em Bancos de Sangue. Ainda não está definido se há um padrão de resposta imune predominante nas formas clínicas cardíaca, digestiva e indeterminada e se esse possível padrão pode ser o responsável pelas manifestações clínicas da fase crônica.

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

## **OBJETIVO GERAL**

O intuito deste trabalho foi caracterizar o perfil imunorreativo de peptídeos recombinantes selecionados por *Phage Display* contra IgG humana de pacientes com a doença de Chagas crônica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar peptídeos para aplicação diagnóstica na doença de Chagas;
- Validar a hipótese de que existem peptídeos primordialmente expressos em cada uma das principais formas da fase crônica da doença de Chagas, a fim de caracterizar epítomos potenciais para diagnóstico diferencial entre as formas cardíaca e digestiva;
- Delinear o perfil imunorreativo dos peptídeos selecionados para a forma indeterminada da fase crônica da doença de Chagas, a fim de que estes possam ser utilizados como potenciais marcadores para indicar propensão de pacientes portadores da forma assintomática a desenvolverem sintomas relacionados à forma cardíaca ou à forma digestiva.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras de soro

Os soros utilizados para execução dos experimentos, devidamente caracterizados de acordo com a I Reunião de pesquisa aplicada em doença de Chagas em 1985, foram cedidos pela Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética, protocolo 343 (CEP UFTM). Foram fornecidos soros de pacientes com diagnóstico positivo para a doença de Chagas, sendo esses pacientes enquadrados na fase crônica e separados, de acordo com os sintomas, em formas cardíaca, digestiva e indeterminada; soros de pacientes negativos para a doença de Chagas também foram cedidos.

Foram feitos *pools* de soros de 10 pacientes positivos para cada forma da doença (cardíaca, digestiva e indeterminada) e um *pool* de soros de 10 pacientes controles.

### Seleção de peptídeos – *Biopanning* em placa

Em um estudo anterior, cujos dados ainda não foram publicados, foram selecionados peptídeos para as formas cardíaca, digestiva e indeterminada da fase crônica da doença de Chagas.

Para a seleção dos peptídeos recombinantes foi utilizada uma Biblioteca combinatória de Peptídeos randômicos de 12-mers fusionados na proteína pIII do fago M13 (*Ph.D<sup>TM</sup> - 12 Phage Display Peptide Library – New England Biolabs*).

Os anticorpos humanos (IgG) utilizados nesse experimento foram purificados com microesferas magnéticas ativadas com proteína G conforme protocolo de purificação do fabricante (*DYNAL BIOTECH, Dynabeads Protein G*).

O *Biopanning* foi realizado utilizando-se placa de alta afinidade (*Nunc MaxiSorp<sup>TM</sup>*), a qual teve três poços sensibilizados com anticorpos humanos (IgG) purificados provenientes de cada forma da doença (digestiva, cardíaca e indeterminada), com posterior incubação da biblioteca original ( $4 \times 10^{10}$  partículas virais). Os fagos não ligantes foram retirados por lavagens sucessivas e os fagos ligantes foram eluídos. No caso da seleção de peptídeos

para as formas cardíaca e digestiva foram feitas eluições negativa (IgG purificada de soros de pacientes controles), invertida (IgG purificada de soros de pacientes com a forma digestiva para eluição no processo de seleção dos peptídeos para a forma cardíaca; IgG purificada de soros de pacientes com a forma cardíaca para eluição no processo de seleção dos peptídeos para a forma digestiva) e ácida (glicina); já para a seleção de peptídeos para a forma indeterminada, foram feitas eluições negativa e ácida.

Este procedimento foi realizado por três vezes, de maneira que foram realizados três ciclos de seleção idênticos; além disso, um ciclo alternativo foi realizado a partir do eluato amplificado do 2º ciclo, com eluição de todos os poços com antígeno total de *Trypanosoma cruzi* (Figura 4).

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

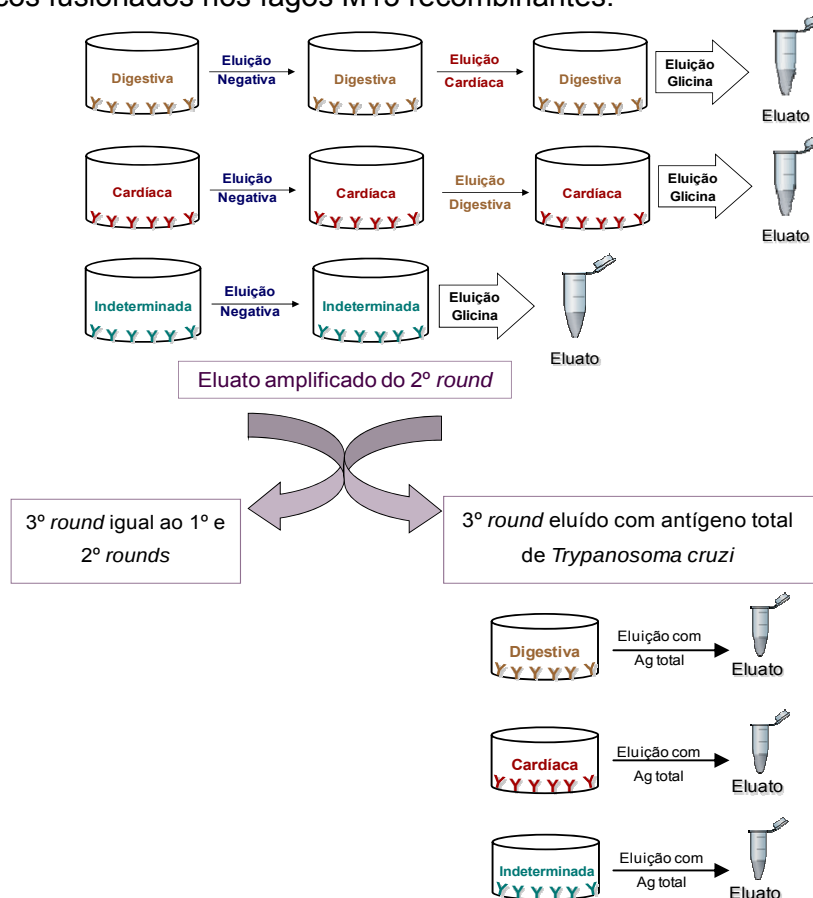


**Figura 4.** Descrição esquemática dos quatro ciclos de seleção (*Biopanning*) realizados.

### **Amplificação dos clones**

Após os quatro ciclos de seleção (*Biopanning*), foram obtidos 50 clones distintos, os quais foram amplificados em *E. coli* (ER2738). Em uma placa *deep well* foram adicionados 1 mL de meio de cultura líquido (LB- Bacto-Triptona, extrato de levedura, NaCl- em água *MilliQ*) contendo *E. coli* (ER2738) com densidade óptica (DO) de 0,3, e 5 µL de fago. A placa foi incubada durante toda a noite, a 37°C, sob agitação no *shaker* (150 rpm).

### **Ensaio Imunoenzimático**

Os Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados com sobrenadante de fagos e, para tanto, amplificou-se os clones em placa *deep well*, adicionando-se 1 mL de meio de cultura contendo *E. coli* (ER2738), com densidade óptica (DO)= 0,3 e 5 µL de fagos. A placa foi incubada durante toda a noite, a 37°C, sob agitação (150 rpm).

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

Placas de alta afinidade (*NUNC*) foram sensibilizadas com 1 µg/poço de anticorpo monoclonal anti-proteína pVIII do fago (*Amersham Biosciences*) diluídos em 50 µL de tampão carbonato ( $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, pH=8,6) e incubadas durante toda a noite sob agitação, a 4°C. Posteriormente, foram adicionados a cada poço, 200 µL de bloqueio (tampão TBS – 0,5 M Tris/ 1,5 M NaCl + soroalbumina bovina – BSA 2,5%), deixando as placas incubarem durante uma hora, a 37°C. As placas foram lavadas por três vezes com TBS + solução detergente *Tween* 20 (0,05%) em lavadora automática de microplacas (*Thermo Plate*) e, em seguida, adicionou-se 50 µL de meio de cultura contendo fagos. Após incubação durante uma hora, a 37°C, as placas foram lavadas seis vezes com TBS-*Tween* 20 (0,05%) e adicionou-se 50 µL/poço de *pool* de soros de dez pacientes portadores da forma cardíaca da doença de Chagas, 50 µL /poço de *pool* da forma digestiva, 50 µL/poço de *pool* da forma indeterminada e 50 µL/poço de *pool* de dez soros de pacientes negativos para a doença (diluição em bloqueio de 1:50). Todos os clones sequenciados foram testados frente a todos os tipos de soros, em triplicatas. Após incubação de uma hora, a 37°C,

as placas foram lavadas por mais seis vezes com TBS-*Tween* 20 (0,05%). Foram adicionados 50  $\mu$ L/poço de anticorpo conjugado, Anti-IgG humana marcada com peroxidase (IgG, *Fc HRP-USBiological*), diluída em bloqueio, em uma concentração de 1:5000. Houve incubação durante uma hora, a 37°C. As placas foram lavadas por mais seis vezes com TBS-*Tween* 20 (0,05%).

Os ensaios foram revelados com 50  $\mu$ L/poço da solução reveladora (2 mg de OPD e 2 mL de peróxido de hidrogênio para 10 mL de tampão citrato 0,05 M (*Sigma Chemical*) e o processo de coloração foi interrompido com 10  $\mu$ L de Ácido Sulfúrico 2M. A leitura da absorbância foi feita em leitora de microplacas, com filtro de 492 nm (*Thermo Plate*).

### **Análise estatística - ELISA**

A média das DOs em triplicatas de cada clone submetido aos *pools* de soros de cada forma da doença (cardíaca, digestiva e indeterminada), bem como ao *pool* de soros de pacientes controles, foi subtraída da média das DOs em triplicatas do fago selvagem, submetido aos mesmos *pools* de soros. Posteriormente, os peptídeos foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa *GraphPad Prism 4*, com o teste *One-way ANOVA* e o pós teste *Bonferroni* (intervalo de confiança de 99%) para demonstrar quais clones reagiram significativamente diferente perante os soros para os quais foram selecionados.

### **Purificação dos fagos**

Os clones com melhor desempenho de reatividade nos testes anteriores foram purificados. Foram adicionados 30mL de meio de cultura contendo *E. coli* (ER2738) com DO de 0,3, e 10 $\mu$ L de fago em recipientes com oxigenação, os quais foram incubados durante a noite, a 37°C, sob agitação (150 rpm). Posteriormente, os meios contendo bactérias e fagos foram centrifugados por 10 minutos, a 9000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos de centrífuga e novamente centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram novamente transferidos para tubos limpos e, a cada tubo, foi adicionado 1/6 do volume total de PEG-NaCl (20% peso/volume de polietileno glicol-8000; NaCl 2,5 M), e as suspensões foram mantidas a 4°C, durante a noite, para precipitação dos fagos. Os tubos foram centrifugados

durante 15 minutos a 3000 rpm, e os sobrenadantes descartados. Houve mais uma centrifugação a 3000 rpm por cinco minutos e o restante dos sobrenadantes foram retirados com pipeta. Os precipitados foram ressuspensos em um mL de TBS (Tris-HCl 50 mM – pH 7,5; NaCl 150 mM) e as suspensões centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm, transferidas para tubos limpos e precipitadas novamente com 1/6 do volume total de PEG-NaCl. Os tubos foram mantidos no gelo durante uma hora e posteriormente centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm. Os sobrenadantes foram retirados e os precipitados foram ressuspensos em 200µL de TBS, as suspensões transferidas para tubos limpos e armazenadas a 4°C.

### **Teste de redução em placas**

- Experimento piloto

Os clones com melhor desempenho de reatividade nos testes ELISA foram submetidos ao piloto do teste de redução de colônias em placas. Para tanto, misturou-se 10 µL do fago purificado (diluição  $10^{-7}$  – aproximadamente 500 unidades formadoras de colônias- pfu) com 10 µL de *pool* de soros da forma para a qual foram selecionados (diluição em TBS 1:8); em outro tubo, foram adicionados 10 µL do fago purificado com TBS.

As misturas foram incubadas a 37°C durante uma hora e adicionadas de 200 µL de *E. coli* (ER2738) com DO de 0,3 em meio LB, com incubação de cinco minutos, em temperatura ambiente. As suspensões foram acrescidas de 3 mL de agarose top (LB; MgCl<sub>2</sub>; Agarose em água *MilliQ*) e colocadas em placas contendo LB-Bacto agar-IPTG-Xgal. As placas foram então incubadas durante a noite e posteriormente o número de colônias produzidas nas placas foi estimado. A taxa de redução foi calculada com base no trabalho de Yang e Shiuan (2003) para cada um dos peptídeos submetidos às duas condições (fago + TBS; fago + soro).

- Teste de redução em placas

Os clones que tiveram redução satisfatória no piloto realizado anteriormente foram submetidos ao teste de redução de colônias em placas, para tanto, misturou-se 10 µL de fago purificado (diluição  $10^{-7}$  – aproximadamente 500 unidades formadoras de colônias- pfu) com 10 µL de

*pools* de soros das três formas da fase crônica da doença de Chagas (cardíaca, digestiva e indeterminada) e *pool* de soros de pacientes controles diluídos em TBS (1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256), bem como com TBS. As suspensões foram incubadas a 37°C durante uma hora e adicionadas de 200 µL de *E. coli* (ER2738) com DO de 0,3 em meio LB, com incubação de cinco minutos, em temperatura ambiente. As misturas foram acrescidas de 3mL de agarose top (LB; MgCl<sub>2</sub>; Agarose em água *MilliQ*) e colocadas em placas contendo LB-Bacto agar-IPTG-Xgal. As placas foram então incubadas durante a noite e posteriormente o número de colônias produzidas nas placas foi estimado.

A taxa de redução foi calculada com base no trabalho de Yang e Shiuan (2003) para cada um dos peptídeos submetidos às diferentes condições. As taxas foram analisadas estatisticamente utilizando-se o programa *GraphPad Prism 4*, com o teste *One-way ANOVA* e o pós teste *Bonferroni* (intervalo de confiança de 99%) para demonstrar quais clones reduziram significativamente quando adicionados do *pool* de soros para os quais foram selecionados.

## RESULTADOS

### Identificação dos clones obtidos pelo *Biopannig*

A partir das sequências de DNA dos clones foram realizadas predições das sequências de aminoácidos obtidas pelos quatro ciclos de seleção, gerando 67 sequências íntegras, sendo 50 distintas entre si. Estas sequências foram devidamente nomeadas e demonstradas na Tabela1.

**Tabela 1.** Identificação dos clones obtidos pelo *Biopannig* e respectivas sequências.

| ID Clones     | Sequências   | ID Clones     | Sequências    |
|---------------|--------------|---------------|---------------|
| Seq. ID Nº 1  | GPRPPTADIWSQ | Seq. ID Nº 26 | GPRPHHTFATSP  |
| Seq. ID Nº 2  | NPISSYFPSKSS | Seq. ID Nº 27 | IRQIDPTPQSYW  |
| Seq. ID Nº 3  | LRQIDSPAERIL | Seq. ID Nº 28 | IRQIDELSPRPI  |
| Seq. ID Nº 4  | GPRPVAPHFLDI | Seq. ID Nº 29 | HTMERTKFMLLR  |
| Seq. ID Nº 5  | IRLIDDRDYLLL | Seq. ID Nº 30 | SPPRPPDSPKYT  |
| Seq. ID Nº 6  | GPRPASPSFPAT | Seq. ID Nº 31 | FRQIDAPPIQYH  |
| Seq. ID Nº 7  | MRSIDHAPLSPL | Seq. ID Nº 32 | VFLKPNTGPSST  |
| Seq. ID Nº 8  | THLQTAPFETAM | Seq. ID Nº 33 | NPYVFSTAVSIK  |
| Seq. ID Nº 9  | WHWTYGWRPPAM | Seq. ID Nº 34 | IRMIDSPSEASR  |
| Seq. ID Nº 10 | IRQIDTPTHLQV | Seq. ID Nº 35 | IRQIDHPVDLLL  |
| Seq. ID Nº 11 | HTSQHPHRWPF  | Seq. ID Nº 36 | TSVNPPPTLPSL  |
| Seq. ID Nº 12 | NPLDQYLRPTSA | Seq. ID Nº 37 | IRNIDIWPND SH |
| Seq. ID Nº 13 | GPLYHLLAAPEH | Seq. ID Nº 38 | AEEKLSHRADTL  |
| Seq. ID Nº 14 | IRAIDEPYATLS | Seq. ID Nº 39 | VERLEREYVAPW  |
| Seq. ID Nº 15 | SPASPRSEAPPP | Seq. ID Nº 40 | FRPAVHNMP SLQ |
| Seq. ID Nº 16 | FRMIDYPAPDNP | Seq. ID Nº 41 | GPRPTTHTVPIM  |
| Seq. ID Nº 17 | HLANSPGLQQRH | Seq. ID Nº 42 | GPRPALPPTPFP  |
| Seq. ID Nº 18 | GHKANLLPTFND | Seq. ID Nº 43 | IRSIDQPPSSPT  |
| Seq. ID Nº 19 | MRMIDVPDEIIL | Seq. ID Nº 44 | LRSIDLVLPPTV  |
| Seq. ID Nº 20 | MRLIDGPATPEY | Seq. ID Nº 45 | LTSHNMGLYGDR  |
| Seq. ID Nº 21 | GPRPPSLPPDPA | Seq. ID Nº 46 | GPRPAWPTMDFL  |
| Seq. ID Nº 22 | GPRPMVYFGPLA | Seq. ID Nº 47 | IRQIDPRVPAP   |
| Seq. ID Nº 23 | VDMKENNGVLLP | Seq. ID Nº 48 | HSLGPSRPLLLP  |
| Seq. ID Nº 24 | FRQIDTPHPLLT | Seq. ID Nº 49 | HSTAQWSALT KP |
| Seq. ID Nº 25 | IRQIDYQPPRGS | Seq. ID Nº 50 | LRLIDEVPAELV  |

### Caracterização dos clones sequenciados obtidos pelo *Biopannig*

Os clones obtidos pelo *Biopannig* foram analisados de acordo com os seguintes parâmetros: sequências de aminoácidos obtidas; frequência dos peptídeos selecionados (FO); frequência esperada desses peptídeos na biblioteca original (FE), que é a probabilidade de sequência randômica; amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à frequência esperada dos peptídeos da biblioteca original (FO/FE); grau de informação de cada peptídeo ( $I(m)$ ); e número provável de clones independentes dentro da biblioteca ( $\lambda$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sequências de aminoácidos dos clones selecionados, frequência observada, frequência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.

| Clones        | Frequência Observada | *Frequência Randômica  | **Amplificação        | *** $I(m)$ | **** $\lambda$         |
|---------------|----------------------|------------------------|-----------------------|------------|------------------------|
| Seq. ID Nº 1  | 1/67                 | $1,08 \times 10^{-17}$ | $4,59 \times 10^{15}$ | 39,1       | $2,17 \times 10^{-8}$  |
| Seq. ID Nº 2  | 1/67                 | $1,64 \times 10^{-14}$ | $3,04 \times 10^{12}$ | 31,7       | $3,28 \times 10^{-5}$  |
| Seq. ID Nº 3  | 3/67                 | $3,83 \times 10^{-13}$ | $1,30 \times 10^{11}$ | 28,6       | $7,66 \times 10^{-4}$  |
| Seq. ID Nº 4  | 3/67                 | $9,04 \times 10^{-17}$ | $5,53 \times 10^{13}$ | 34,6       | $1,81 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID Nº 5  | 2/67                 | $3,80 \times 10^{-13}$ | $1,32 \times 10^{11}$ | 28,6       | $7,59 \times 10^{-4}$  |
| Seq. ID Nº 6  | 1/67                 | $7,07 \times 10^{-18}$ | $7,07 \times 10^{15}$ | 39,5       | $1,41 \times 10^{-8}$  |
| Seq. ID Nº 7  | 1/67                 | $9,86 \times 10^{-15}$ | $5,07 \times 10^{12}$ | 32,3       | $1,97 \times 10^{-5}$  |
| Seq. ID Nº 8  | 1/67                 | $7,32 \times 10^{-16}$ | $6,82 \times 10^{13}$ | 34,9       | $1,46 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID Nº 9  | 1/67                 | $1,62 \times 10^{-17}$ | $3,09 \times 10^{15}$ | 37,4       | $3,23 \times 10^{-8}$  |
| Seq. ID Nº 10 | 4/67                 | $1,48 \times 10^{-12}$ | $3,38 \times 10^{10}$ | 27,2       | $2,96 \times 10^{-3}$  |
| Seq. ID Nº 11 | 1/67                 | $4,05 \times 10^{-15}$ | $1,23 \times 10^{13}$ | 33,1       | $8,10 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID Nº 12 | 1/67                 | $2,46 \times 10^{-16}$ | $2,03 \times 10^{14}$ | 35,9       | $4,93 \times 10^{-7}$  |
| Seq. ID Nº 13 | 1/67                 | $7,23 \times 10^{-15}$ | $6,91 \times 10^{12}$ | 32,6       | $1,45 \times 10^{-5}$  |
| Seq. ID Nº 14 | 1/67                 | $3,42 \times 10^{-15}$ | $1,46 \times 10^{13}$ | 33,3       | $6,83 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID Nº 15 | 1/67                 | $1,04 \times 10^{-18}$ | $4,82 \times 10^{16}$ | 41,4       | $2,07 \times 10^{-9}$  |
| Seq. ID Nº 16 | 1/67                 | $8,97 \times 10^{-17}$ | $5,57 \times 10^{14}$ | 37,0       | $1,79 \times 10^{-7}$  |
| Seq. ID Nº 17 | 2/67                 | $4,23 \times 10^{-16}$ | $1,18 \times 10^{14}$ | 35,4       | $8,45 \times 10^{-7}$  |
| Seq. ID Nº 18 | 1/67                 | $9,71 \times 10^{-13}$ | $5,15 \times 10^{10}$ | 27,7       | $1,94 \times 10^{-3}$  |
| Seq. ID Nº 19 | 1/67                 | $7,27 \times 10^{-13}$ | $6,88 \times 10^{12}$ | 28,0       | $1,45 \times 10^{-3}$  |
| Seq. ID Nº 20 | 2/67                 | $1,02 \times 10^{-12}$ | $4,89 \times 10^{10}$ | 27,6       | $2,04 \times 10^{-3}$  |
| Seq. ID Nº 21 | 2/67                 | $3,24 \times 10^{-18}$ | $1,54 \times 10^{16}$ | 40,3       | $6,49 \times 10^{-9}$  |
| Seq. ID Nº 22 | 1/67                 | $4,95 \times 10^{-15}$ | $1,01 \times 10^{13}$ | 32,9       | $9,89 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID Nº 23 | 1/67                 | $7,40 \times 10^{-16}$ | $6,76 \times 10^{13}$ | 34,8       | $1,48 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID Nº 24 | 3/67                 | $4,89 \times 10^{-15}$ | $1,02 \times 10^{13}$ | 33,0       | $9,79 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID Nº 25 | 1/67                 | $3,32 \times 10^{-15}$ | $1,51 \times 10^{13}$ | 33,3       | $6,63 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID Nº 26 | 1/67                 | $1,11 \times 10^{-23}$ | $4,48 \times 10^{21}$ | 52,9       | $2,23 \times 10^{-14}$ |
| Seq. ID Nº 27 | 2/67                 | $1,25 \times 10^{-13}$ | $4,00 \times 10^{11}$ | 29,7       | $2,50 \times 10^{-4}$  |
| Seq. ID Nº 28 | 1/67                 | $6,53 \times 10^{-14}$ | $7,66 \times 10^{11}$ | 30,4       | $1,31 \times 10^{-4}$  |

| Clones                    | Frequência Observada | *Frequência Randômica  | **Amplificação        | ***I(m) | ****λ                  |
|---------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|---------|------------------------|
| Seq. ID N <sup>o</sup> 29 | 1/67                 | $5,00 \times 10^{-11}$ | $1,00 \times 10^9$    | 23,7    | $0,99 \times 10^{-1}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 30 | 1/67                 | $2,66 \times 10^{-19}$ | $1,88 \times 10^{17}$ | 42,8    | $5,32 \times 10^{-11}$ |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 31 | 2/67                 | $9,76 \times 10^{-15}$ | $5,12 \times 10^{12}$ | 32,3    | $1,95 \times 10^{-5}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 32 | 1/67                 | $1,21 \times 10^{-16}$ | $4,13 \times 10^{14}$ | 36,7    | $2,42 \times 10^{-7}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 33 | 1/67                 | $3,66 \times 10^{-15}$ | $1,36 \times 10^{13}$ | 33,2    | $7,33 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 34 | 1/67                 | $1,08 \times 10^{-13}$ | $4,65 \times 10^{11}$ | 29,9    | $2,15 \times 10^{-4}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 35 | 2/67                 | $1,32 \times 10^{-14}$ | $3,79 \times 10^{12}$ | 32,0    | $2,64 \times 10^{-5}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 36 | 1/67                 | $2,33 \times 10^{-14}$ | $2,15 \times 10^{12}$ | 31,4    | $4,66 \times 10^{-5}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 37 | 1/67                 | $1,01 \times 10^{-13}$ | $4,93 \times 10^{11}$ | 29,9    | $2,03 \times 10^{-4}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 38 | 1/67                 | $9,71 \times 10^{-13}$ | $5,15 \times 10^{10}$ | 27,7    | $1,94 \times 10^{-3}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 39 | 1/67                 | $4,29 \times 10^{-14}$ | $1,16 \times 10^{12}$ | 30,8    | $8,58 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 40 | 1/67                 | $3,40 \times 10^{-21}$ | $1,47 \times 10^{19}$ | 47,1    | $6,80 \times 10^{-12}$ |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 41 | 1/67                 | $4,39 \times 10^{-15}$ | $1,14 \times 10^{13}$ | 33,1    | $8,77 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 42 | 1/67                 | $5,55 \times 10^{-21}$ | $9,00 \times 10^{18}$ | 46,6    | $1,11 \times 10^{-11}$ |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 43 | 1/67                 | $9,79 \times 10^{-16}$ | $5,11 \times 10^{13}$ | 34,6    | $1,96 \times 10^{-6}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 44 | 1/67                 | $8,19 \times 10^{-13}$ | $6,10 \times 10^{10}$ | 27,8    | $1,64 \times 10^{-3}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 45 | 1/67                 | $5,72 \times 10^{-13}$ | $8,74 \times 10^{10}$ | 28,2    | $1,14 \times 10^{-3}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 46 | 1/67                 | $9,62 \times 10^{-17}$ | $5,20 \times 10^{14}$ | 36,9    | $1,92 \times 10^{-7}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 47 | 2/67                 | $9,36 \times 10^{-18}$ | $5,34 \times 10^{15}$ | 39,2    | $1,87 \times 10^{-8}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 48 | 1/67                 | $1,25 \times 10^{-17}$ | $4,00 \times 10^{15}$ | 38,9    | $2,50 \times 10^{-8}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 49 | 1/67                 | $2,50 \times 10^{-18}$ | $2,00 \times 10^{16}$ | 40,5    | $5,00 \times 10^{-9}$  |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 50 | 1/67                 | $3,26 \times 10^{-12}$ | $1,53 \times 10^{10}$ | 26,5    | $6,51 \times 10^{-3}$  |

\*Probabilidade de sequência randômica = frequência esperada na biblioteca (FE);

\*\*Amplificação = frequência observada/frequência esperada; \*\*\*I(m) = grau de informação =  $-\ln$  (probabilidade de sequência randômica); \*\*\*\*λ = número provável de clones independentes na biblioteca = complexidade x FE, onde complexidade da biblioteca é  $2,7 \times 10^9$  (Ph.D.-12).

Estes parâmetros foram obtidos mediante cálculos a partir das frequências dos aminoácidos para cada posição no clone, sendo a frequência esperada calculada pela multiplicação das frequências de todos os aminoácidos observados, como consta nas orientações apresentadas pelo fabricante para cada tipo de biblioteca de fagos. Todos os outros parâmetros são fórmulas que se originam desta FE, conforme apresentadas na publicação de Rodi, Soares e Makowski (2002).

Ao analisar a Tabela 2, deve-se relacionar todos os dados de cada peptídeo selecionado, assim um peptídeo que apresenta um baixo valor de FE e λ, e alto valor para I(m) e FO/FE possui uma baixa probabilidade de ser selecionado, a menos que a seleção seja de fato específica.

Ao observar os clones Seq. ID N<sup>o</sup> 26, Seq. ID N<sup>o</sup> 30, Seq. ID N<sup>o</sup> 40 e

Seq. ID N<sup>o</sup> 42, por exemplo, vimos que eles possuem os maiores valores para I(m) e FO/FE, e os menores para FE e  $\lambda$ , mas mesmo assim foram selecionados durante o *Biopanning*, o que comprova a eficiência da seleção.

Os aminoácidos arginina (R) e cisteína (C) nas sequências de peptídeos randômicos atuam na secreção de Proteína III e podem interferir na infectividade dos fagos. Consequentemente, clones com peptídeos contendo estes aminoácidos podem ser menos frequentes durante a seleção (NOREN; NOREN, 2001). De acordo com os resultados obtidos, nenhum peptídeo apresenta C, enquanto 40 possuem R (Seq. ID N<sup>os</sup> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50), demonstrando não só sua importância nos motivos protéicos, quanto a sua baixa interferência na frequência de peptídeos com este aminoácido. Observou-se, ainda, que houve um grande enriquecimento de todos os peptídeos selecionados em relação às suas frequências esperadas na biblioteca de fagos, sugerindo que os fagos são específicos para as formas cardíaca, digestiva e indeterminada da fase crônica da doença de Chagas.

### **Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

Os Ensaio Imunoenzimáticos foram realizados para a caracterização do perfil imunorreativo dos clones obtidos pelo *Biopanning*. Cada uma das 50 sequências foi testada perante *pool* de soros de cada forma da doença (cardíaca, digestiva e indeterminada) e o *pool* de soros negativos para a doença de Chagas, em triplicatas. A Tabela 3 demonstra a média das DOs em triplicatas, de cada clone selecionado para a forma cardíaca da doença de Chagas submetido aos *pools* de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao *pool* de soros dos pacientes controles, subtraída da média das DOs em triplicatas do fago selvagem.

Os clones Seq. ID N<sup>os</sup> 11, 30 e 45 não demonstraram um perfil de reatividade satisfatório, pois a média das DOs do fago selvagem submetido ao *pool* de soros da forma cardíaca superou a média das DOs dos referidos fagos submetidos ao *pool* de soros da mesma forma, evidenciando que a seleção dessas sequências não foi por especificidade ao alvo. Portanto, esses fagos não foram considerados para as próximas análises.

**Tabela 3.** Média das DOs em triplicatas, de cada clone selecionado para a forma cardíaca da doença de Chagas submetido aos *pools* de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao *pool* de soros dos pacientes controles, subtraída da média das DOs em triplicatas do fago selvagem.

| Clones Card               | Média Card - Selv | Média Dig - Selv | Média Ind - Selv | Média Neg- Selv |
|---------------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Seq. ID N <sup>o</sup> 11 | 0,000             | 0,009            | 0,018            | 0,008           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 17 | 0,151             | 0,010            | 0,021            | 0,020           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 18 | 0,010             | 0,005            | 0,014            | 0,008           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 24 | 0,141             | 0,110            | 0,116            | 0,031           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 25 | 0,083             | 0,067            | 0,061            | -0,003          |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 30 | -0,001            | -0,017           | 0,026            | 0,028           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 31 | 0,100             | 0,120            | 0,149            | 0,047           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 32 | 0,039             | 0,009            | 0,015            | 0,077           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 36 | 0,015             | 0,020            | 0,015            | 0,018           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 37 | 0,074             | 0,085            | 0,090            | 0,055           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 38 | 0,009             | 0,009            | 0,020            | 0,018           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 39 | 0,003             | 0,024            | 0,110            | 0,138           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 43 | 0,109             | 0,115            | 0,108            | 0,014           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 45 | -0,001            | 0,009            | 0,026            | 0,047           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 50 | 0,113             | 0,130            | 0,158            | 0,028           |

A leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas, com filtro de 492 nm (*Thermo Plate*).

Para as análises posteriores, não foram considerados os clones cujo valor da diferença entre a média das DOs do fago submetido ao soro da forma cardíaca e a média das DOs do fago selvagem submetido ao soro da mesma forma tenha sido menor ou igual a zero.

O restante dos clones selecionados para a forma cardíaca foram submetidos à análise estatística, a fim de mostrar quais desses peptídeos realmente reagem melhor perante o *pool* de soros da forma cardíaca (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise estatística da diferença de reatividade dos clones selecionados para a forma cardíaca da doença de Chagas submetidos ao *pool* de soros da mesma forma contra todos os outros *pools* (formas digestiva e indeterminada) e *pool* de soros de pacientes controles.

| Clones Card   | vs forma Dig |             | vs forma Ind |             | vs controle |             |
|---------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
|               | P            | ≠<br>Médias | P            | ≠<br>Médias | P           | ≠<br>Médias |
| Seq. ID Nº 17 | P < 0,001    | 0,140       | P < 0,001    | 0,136       | P < 0,001   | 0,138       |
| Seq. ID Nº 18 | P < 0,05     | 0,004       | P > 0,05     | 0,002       | P < 0,001   | 0,010       |
| Seq. ID Nº 24 | P < 0,001    | 0,030       | P < 0,001    | 0,031       | P < 0,001   | 0,118       |
| Seq. ID Nº 25 | P < 0,001    | 0,016       | P < 0,001    | 0,029       | P < 0,001   | 0,094       |
| Seq. ID Nº 31 | P < 0,001    | -0,022      | P < 0,001    | -0,043      | P < 0,001   | 0,061       |
| Seq. ID Nº 32 | P < 0,001    | 0,029       | P < 0,001    | 0,030       | P < 0,001   | -0,031      |
| Seq. ID Nº 36 | P < 0,05     | -0,006      | P < 0,05     | 0,006       | P < 0,05    | 0,006       |
| Seq. ID Nº 37 | P < 0,01     | -0,012      | P < 0,01     | -0,010      | P < 0,001   | 0,028       |
| Seq. ID Nº 38 | P > 0,05     | -0,002      | P < 0,05     | -0,006      | P > 0,05    | -0,002      |
| Seq. ID Nº 39 | P < 0,001    | -0,021      | P < 0,001    | -0,101      | P < 0,001   | -0,127      |
| Seq. ID Nº 43 | P < 0,001    | -0,007      | P < 0,001    | 0,007       | P < 0,001   | 0,103       |
| Seq. ID Nº 50 | P < 0,001    | -0,018      | P < 0,001    | -0,039      | P < 0,001   | 0,092       |

Não foram aceitos para posteriores análises os clones cuja reatividade perante o *pool* de soros da forma cardíaca tenha sido significativamente menor do que para qualquer uma das outras formas, ou seja, clones cuja diferença entre médias da reatividade (forma cardíaca vs outros grupos) for negativa, serão excluídos. Os clones cuja reatividade perante ao *pool* de soros da forma cardíaca for igual ( $p > 0,05$ ) às formas digestiva e/ou indeterminada e/ou controle negativo também serão excluídos.

Os fagos ID Nºs 17, 24 e 25, os quais foram selecionados para a forma cardíaca da fase crônica da doença de Chagas apresentaram estatisticamente, maior reatividade quando submetidos ao *pool* de soros de pacientes acometidos pela mesma forma. Os perfis de reação foram demonstrados graficamente (Figura 5).

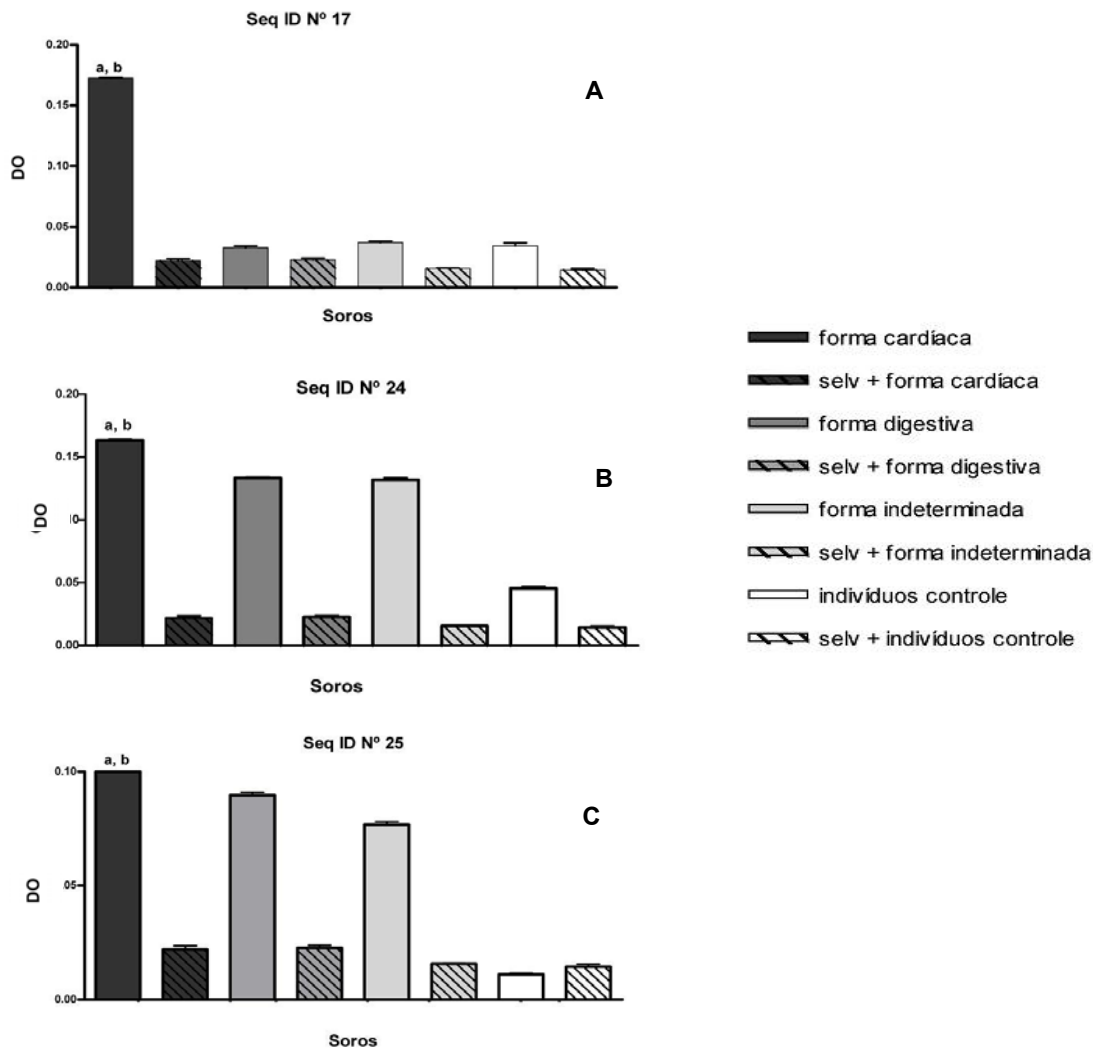


**Figura 5.** Clones que apresentaram afinidade significativamente maior perante o *pool* de soros da forma cardíaca da doença de Chagas. (A) **a**: Reatividade do clone Seq 17/ soro forma cardíaca vs fago selvagem/ soro forma cardíaca  $p < 0,001$ ; **b**: Reatividade do clone Seq 17/ soro forma cardíaca vs demais formas e grupo controle  $p < 0,001$ . (B) **a**: Reatividade do clone Seq 24/ soro forma cardíaca vs fago selvagem/ soro forma cardíaca  $p < 0,001$ ; **b**: Reatividade do clone Seq 24/ soro forma cardíaca vs demais formas e grupo controle  $p < 0,001$ . (C) **a**: Reatividade do clone Seq 25/ soro forma cardíaca vs fago selvagem/ soro forma cardíaca  $p < 0,001$ ; **b**: Reatividade do clone Seq 25/ soro forma cardíaca vs demais formas e grupo controle  $p < 0,001$ .

A Tabela 5 demonstra a média das DOs em triplicatas, de cada clone selecionado para a forma digestiva da doença de Chagas submetido aos *pools* de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao *pool* de soros dos pacientes controles, subtraída da média das DOs em triplicatas do fago selvagem.

**Tabela 5.** Média das DOs em triplicatas, de cada clone selecionado para a forma digestiva da doença de Chagas submetido aos *pools* de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao *pool* de soros dos pacientes controles, subtraída da média das DOs em triplicatas do fago selvagem.

| Clones Dig                | Média Card - Selv | Média Dig - Selv | Média Ind - Selv | Média Neg- Selv |
|---------------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Seq. ID N <sup>o</sup> 3  | 0,146             | 0,138            | 0,141            | 0,016           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 7  | 0,066             | 0,066            | 0,083            | 0,017           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 8  | 0,010             | 0,018            | 0,014            | 0,016           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 9  | 0,014             | 0,000            | -0,002           | -0,004          |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 10 | 0,123             | 0,113            | 0,102            | 0,017           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 14 | 0,154             | 0,143            | 0,141            | 0,018           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 15 | 0,001             | -0,001           | 0,018            | 0,016           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 16 | 0,165             | 0,099            | 0,092            | 0,017           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 21 | 0,016             | 0,054            | 0,024            | 0,028           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 22 | 0,008             | 0,013            | 0,000            | 0,019           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 23 | 0,012             | 0,023            | 0,002            | 0,000           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 26 | 0,020             | 0,023            | 0,012            | 0,045           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 27 | 0,125             | 0,115            | 0,118            | 0,009           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 40 | 0,031             | 0,021            | 0,031            | 0,008           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 42 | 0,005             | 0,002            | 0,002            | 0,015           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 44 | 0,109             | 0,094            | 0,089            | 0,007           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 47 | 0,123             | 0,112            | 0,110            | 0,018           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 48 | 0,003             | -0,005           | 0,004            | 0,020           |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 49 | 0,012             | 0,027            | 0,020            | 0,026           |

Para as análises posteriores, não foram considerados os clones cujo valor da diferença entre a média das DOs do fago submetido ao soro da forma digestiva e a média das DOs do fago selvagem submetido ao soro da mesma forma tenha sido menor ou igual a zero.

Os clones Seq. ID N<sup>os</sup> 9, 15 e 48 não demonstraram um perfil de reatividade satisfatório, pois a média das DOs do fago selvagem submetido ao *pool* de soros da forma digestiva superou a média das DOs dos referidos fagos submetidos ao *pool* de soros da mesma forma. Portanto, esses fagos também não serão considerados para as próximas análises.

O restante dos clones selecionados para a forma digestiva foram submetidos à análise estatística, a fim de mostrar quais desses peptídeos realmente reagem melhor perante o *pool* de soros da forma digestiva (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise estatística da diferença de reatividade dos clones selecionados para a forma digestiva da doença de Chagas submetidos ao *pool* de soros da mesma forma contra todos os outros *pools* (formas cardíaca e indeterminada e controle).

| Clones Dig                | vs forma Card |             | vs forma Ind |             | vs controle |             |
|---------------------------|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
|                           | P             | ≠<br>Médias | P            | ≠<br>Médias | P           | ≠<br>Médias |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 3  | P > 0,05      | 0,003       | P > 0,05     | -0,002      | P < 0,001   | 0,121       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 7  | P < 0,001     | 0,012       | P < 0,001    | -0,016      | P < 0,001   | 0,048       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 8  | P < 0,001     | 0,020       | P < 0,01     | 0,006       | P > 0,05    | 0,001       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 10 | P > 0,05      | 0,002       | P < 0,001    | 0,012       | P < 0,001   | 0,095       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 14 | P > 0,05      | 0,000       | P > 0,05     | 0,003       | P < 0,001   | 0,124       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 16 | P < 0,001     | -0,055      | P < 0,01     | 0,008       | P < 0,001   | 0,080       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 21 | P < 0,001     | 0,049       | P < 0,001    | 0,031       | P < 0,001   | 0,025       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 22 | P < 0,001     | 0,016       | P < 0,001    | 0,014       | P < 0,001   | -0,007      |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 23 | P < 0,001     | 0,022       | P < 0,001    | 0,022       | P < 0,001   | 0,022       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 26 | P < 0,001     | 0,014       | P < 0,001    | 0,012       | P < 0,001   | -0,024      |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 27 | P > 0,05      | 0,002       | P > 0,05     | -0,002      | P < 0,001   | 0,105       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 40 | P > 0,05      | 0,001       | P < 0,001    | -0,010      | P < 0,001   | 0,012       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 42 | P > 0,05      | 0,009       | P < 0,001    | 0,001       | P < 0,001   | -0,014      |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 44 | P < 0,001     | -0,004      | P > 0,05     | 0,006       | P < 0,001   | 0,086       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 47 | P > 0,05      | 0,000       | P < 0,05     | 0,003       | P < 0,001   | 0,093       |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 49 | P > 0,05      | 0,026       | P > 0,05     | 0,008       | P > 0,05    | 0,001       |

Não foram aceitos para posteriores análises os clones cuja reatividade perante o *pool* de soros da forma digestiva tenha sido significativamente menor do que para qualquer uma das outras formas, ou seja, clones cuja diferença entre médias da reatividade (forma digestiva vs outros grupos) for negativa, serão excluídos. Os clones cuja reatividade perante o *pool* de soros da forma digestiva for igual ( $p > 0,05$ ) às formas cardíaca e/ou indeterminada e/ou controle negativo também serão excluídos.

Os fagos Seq ID N<sup>os</sup> 21 e 23 apresentaram, estatisticamente, maior afinidade pelo *pool* de soros da forma digestiva da doença de Chagas. Como esses clones foram selecionados para esta forma, conclui-se que os referidos peptídeos realmente apresentam maior afeição pelo soro da forma para a qual foram selecionados e, portanto, serão demonstrados graficamente (Figura 6).

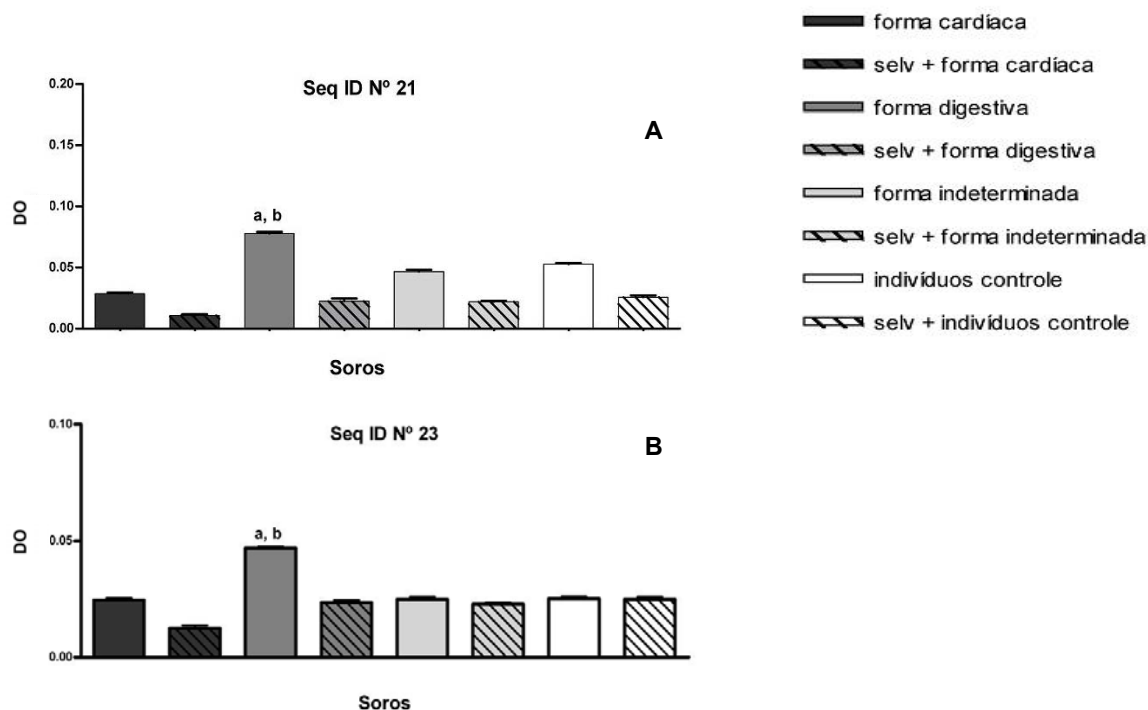


**Figura 6.** Clones que apresentaram afinidade significativamente maior perante o *pool* de soros da forma digestiva da doença de Chagas. (A) **a:** Reatividade do clone Seq 21/ soro forma digestiva vs fago selvagem/ soro forma digestiva  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 21/ soro forma digestiva vs demais formas e grupo controle  $p < 0,001$ . (B) **a:** Reatividade do clone Seq 23/ soro forma digestiva vs fago selvagem/ soro forma digestiva  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 23/ soro forma digestiva vs demais formas e grupo controle  $p < 0,001$ .

A Tabela 7 demonstra a média das DOs em triplicatas, de cada clone selecionado para a forma indeterminada da doença de Chagas submetido aos *pools* de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao *pool* de soros dos pacientes controles, subtraída da média das DOs em triplicatas do fago selvagem.

Os clones Seq. ID N°s 2, 4, 6, 13 e 33 não foram selecionados de forma satisfatória, pois a média das DOs do fago selvagem submetido ao *pool* de soros da forma indeterminada superou a média das DOs dos referidos fagos submetidos ao *pool* de soros da mesma forma. Esses clones foram, portanto, excluídos das próximas análises.

**Tabela 7.** Média das DOs em triplicatas, de cada clone selecionado para a forma indeterminada da doença de Chagas submetido aos *pools* de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao *pool* de soros dos pacientes controles, subtraída da média das DOs em triplicatas do fago selvagem.

| Clones Ind                | Média Card - Selv. | Média Dig - Selv. | Média Ind - Selv. | Média Neg - Selv. |
|---------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Seq. ID N <sup>o</sup> 1  | 0,110              | 0,012             | 0,008             | 0,004             |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 2  | -0,017             | 0,000             | -0,002            | -0,012            |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 4  | -0,022             | -0,006            | 0,000             | 0,011             |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 5  | 0,093              | 0,084             | 0,068             | -0,010            |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 6  | -0,012             | 0,002             | -0,007            | -0,007            |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 12 | 0,013              | 0,044             | 0,038             | 0,008             |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 13 | -0,008             | -0,021            | -0,013            | -0,007            |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 19 | 0,074              | 0,065             | 0,050             | -0,016            |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 20 | -0,017             | 0,094             | 0,086             | -0,015            |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 28 | 0,090              | 0,089             | 0,079             | -0,007            |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 29 | 0,107              | -0,025            | 0,100             | -0,010            |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 33 | -0,022             | -0,031            | -0,031            | -0,022            |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 34 | 0,097              | 0,094             | 0,092             | 0,001             |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 35 | -0,008             | 0,098             | 0,096             | 0,001             |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 41 | 0,013              | -0,003            | 0,011             | 0,013             |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 46 | 0,020              | 0,010             | 0,013             | 0,014             |

Para as análises posteriores, não foram considerados os clones cujo valor da diferença entre a média das DOs do fago submetido ao soro da forma indeterminada e a média das DOs do fago selvagem submetido ao soro da mesma forma tenha sido menor ou igual a zero.

Os clones restantes selecionados para a forma indeterminada foram submetidos à análise estatística, a fim de mostrar quais desses peptídeos realmente reagem melhor perante o *pool* de soros da forma indeterminada (Tabela 8).

**Tabela 8.** Análise estatística da diferença de reatividade dos clones selecionados para a forma indeterminada da doença de Chagas submetidos ao *pool* de soros da mesma forma contra todos os outros *pools* (formas cardíaca e digestiva e controle).

| Clones Ind                | vs forma Card |          | vs forma Dig |          | vs controle |          |
|---------------------------|---------------|----------|--------------|----------|-------------|----------|
|                           | P             | ≠ Médias | P            | ≠ Médias | P           | ≠ Médias |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 1  | P < 0,001     | -0,098   | P > 0,05     | -0,002   | P < 0,01    | -0,011   |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 5  | P < 0,001     | -0,021   | P < 0,001    | -0,013   | P < 0,001   | 0,063    |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 12 | P < 0,001     | 0,029    | P < 0,05     | -0,004   | P < 0,001   | 0,014    |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 19 | P < 0,001     | -0,020   | P < 0,001    | -0,013   | P < 0,001   | 0,051    |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 20 | P < 0,001     | 0,107    | P < 0,01     | -0,005   | P < 0,001   | 0,085    |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 28 | P < 0,05      | -0,007   | P < 0,01     | -0,008   | P < 0,001   | 0,071    |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 29 | P > 0,05      | -0,003   | P < 0,001    | 0,127    | P < 0,001   | 0,107    |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 34 | P > 0,05      | -0,002   | P > 0,05     | 0,000    | P < 0,001   | 0,075    |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 35 | P < 0,001     | 0,108    | P > 0,05     | 0,000    | P < 0,001   | 0,079    |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 41 | P < 0,001     | 0,003    | P < 0,001    | 0,016    | P < 0,001   | -0,018   |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 46 | P > 0,05      | -0,003   | P > 0,05     | 0,005    | P < 0,001   | -0,017   |

Não serão aceitos para posteriores análises os clones cuja reatividade perante o *pool* de soros da forma indeterminada tenha sido significativamente menor do que para qualquer uma das outras formas, ou seja, clones cujo p for menor que 0,001 ou 0,05 e que a diferença entre médias da reatividade (forma indeterminada vs outros grupos) for negativa, serão excluídos.

Os clones selecionados para a forma indeterminada da doença de Chagas apresentam um perfil de reação singular, o que poderia justificar a evolução de pacientes portadores da forma indeterminada da doença de Chagas para uma das outras principais formas: cardíaca ou digestiva. Por isso, os peptídeos desse grupo foram analisados de forma diferente dos demais, levando-se em consideração não apenas a boa reatividade perante o soro para o qual foram selecionados, mas também perante o *pool* de soros de uma das outras formas da fase crônica da doença de Chagas.

O clone Seq ID N<sup>o</sup> 29 foi selecionado para a forma indeterminada, tendo apresentado alta avidéz pelo *pool* de soros desta forma e também pelo *pool* de soros da forma cardíaca, não demonstrando, portanto, diferença significativa de reatividade entre estes dois soros, mas sendo significativamente maior do que perante o *pool* de soros da forma digestiva e de pacientes controles. O peptídeo Seq. ID N<sup>o</sup> 35, que também foi selecionado para a forma indeterminada, apresentou reatividade estatisticamente igual, quando submetido aos *pools* de soros das formas indeterminadas e digestiva, porém,

significativamente maior do que perante o *pool* de soros da forma cardíaca e de pacientes controles. Esses clones serão, portanto, demonstrados graficamente (Figura 7).

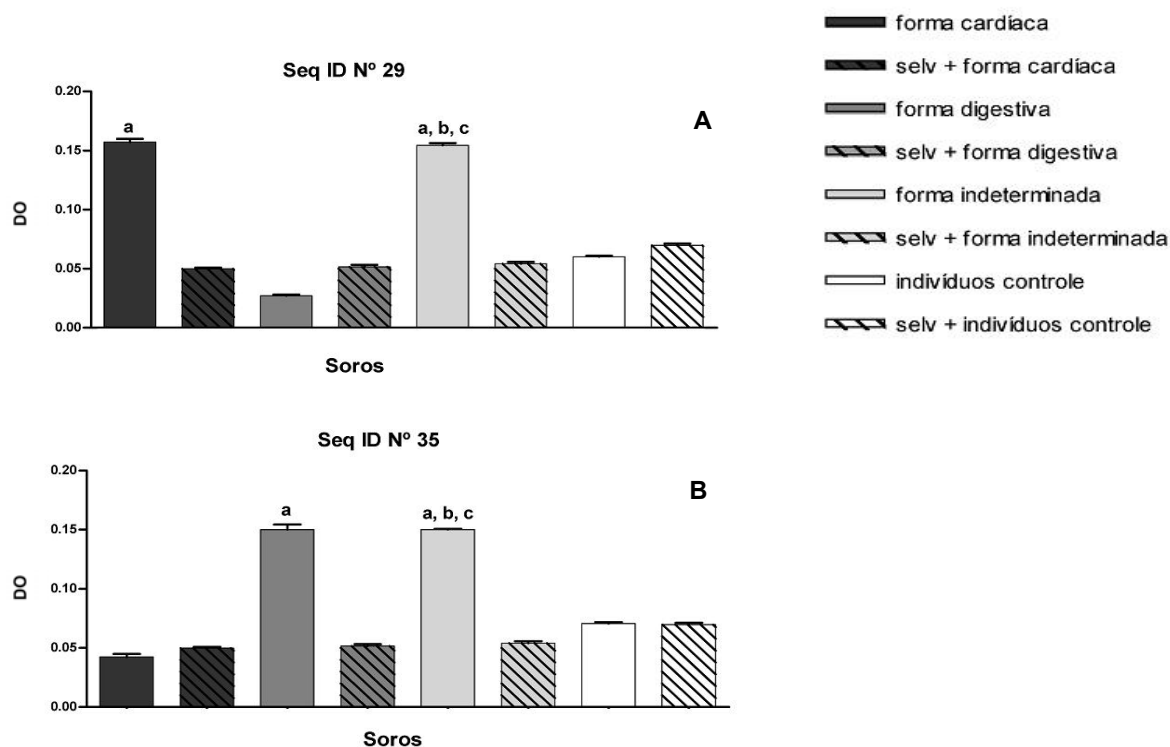


**Figura 7.** Clones que apresentaram afinidade significativamente igual perante os *pools* de soros da forma indeterminada e por uma das outras formas (cardíaca ou digestiva) da doença de Chagas. (A) **a:** Reatividade do clone Seq 29/ soros formas indeterminada e cardíaca vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 29/ soro forma indeterminada vs clone Seq 29/ soro forma cardíaca  $p > 0,05$ ; **c:** Reatividade do clone Seq 29/ soros formas indeterminada e cardíaca vs clone Seq 29/ soros forma digestiva e indivíduos controles  $p < 0,001$ . (B) **a:** Reatividade do clone Seq 35/ soros formas indeterminada e digestiva vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 35/ soro forma indeterminada vs clone Seq 35/ soro forma digestiva  $p > 0,05$ ; **c:** Reatividade do clone Seq 35/ soros formas indeterminada e digestiva vs clone Seq 35/ soros forma cardíaca e indivíduos controles  $p < 0,001$ .

Embora os clones Seq ID N°s 3, 14 e 27, os quais forma selecionados para a forma digestiva da doença de Chagas, não tenham obedecido os critérios de inclusão acima mencionados, eles apresentaram reatividade semelhante quando submetidos a todas as formas da doença e reatividade significativamente menor perante o *pool* de soros de pacientes controles, sendo potenciais marcadores para a doença de Chagas. Da mesma forma, o clone Seq. ID N° 34, selecionado para a forma indeterminada da doença, apresentou reatividade semelhante perante os soros das três formas da fase crônica da

doença de Chagas, tendo sido estatisticamente menor apenas quando submetido ao *pool* de soros de pacientes controles, sendo também, importante marcador para o diagnóstico geral da doença de Chagas. O perfil de reatividade desse clone também foi demonstrado graficamente (Figura 8).

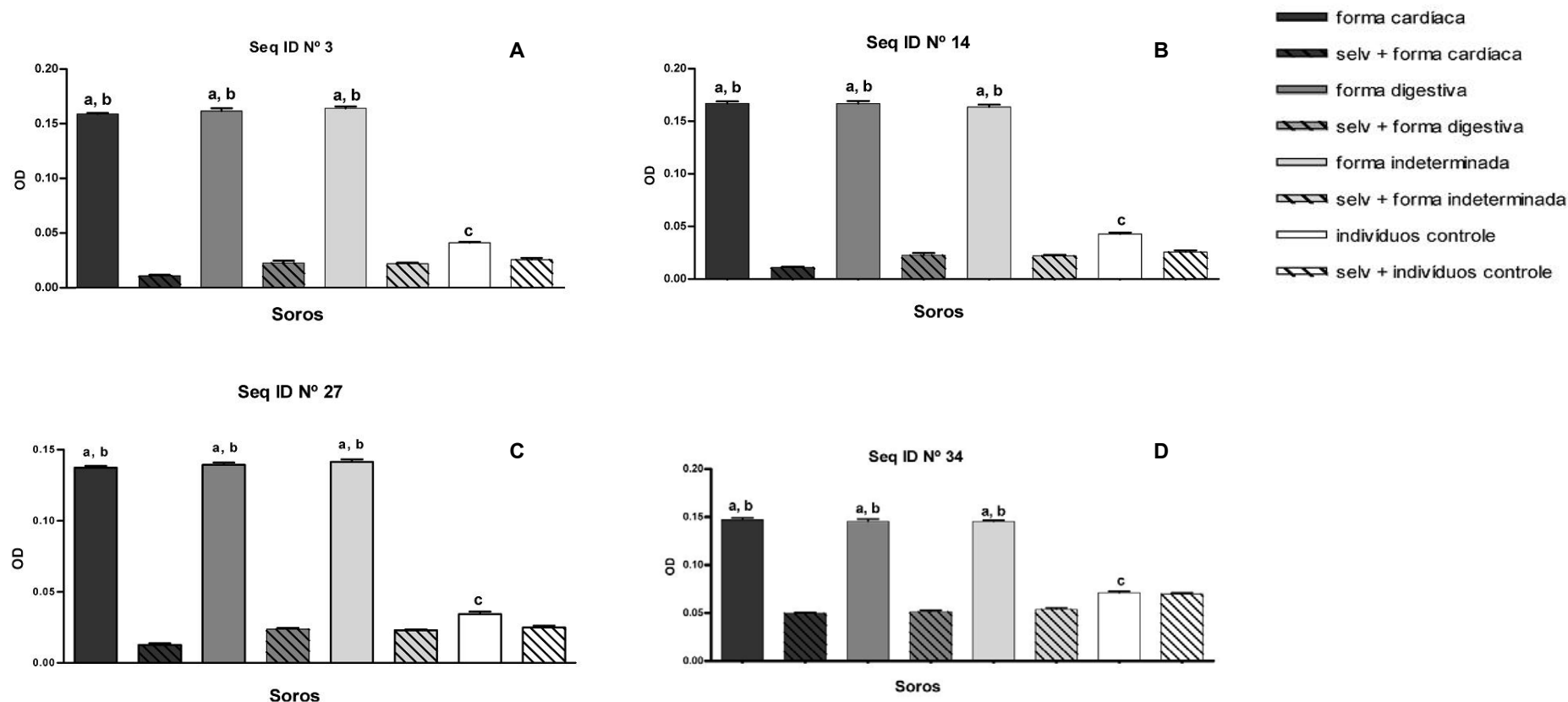


**Figura 8.** Clones que apresentaram afinidade significativamente igual perante os *pools* de soros das três formas da doença de Chagas. (A) **a:** Reatividade do clone Seq 3/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 3/ soro forma cardíaca vs clone Seq 3/ soro forma digestiva vs clone Seq 3/ soro forma indeterminada  $p > 0,05$ ; **c:** Reatividade do clone Seq 3/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs clone Seq 3/ soro indivíduos controles  $p < 0,001$ . (B) **a:** Reatividade do clone Seq 14/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 14/ soro forma cardíaca vs clone Seq 14/ soro forma digestiva vs clone Seq 14/ soro forma indeterminada  $p > 0,05$ ; **c:** Reatividade do clone Seq 14/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs clone Seq 14/ soro indivíduos controles  $p < 0,001$ . (C) **a:** Reatividade do clone Seq 27/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 27/ soro forma cardíaca vs clone Seq 27/ soro forma digestiva vs clone Seq 27/ soro forma indeterminada  $p > 0,05$ ; **c:** Reatividade do clone Seq 27/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs clone Seq 27/ soro indivíduos controles  $p < 0,001$ . (D) **a:** Reatividade do clone Seq 34/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs fago selvagem/ soros respectivas formas  $p < 0,001$ ; **b:** Reatividade do clone Seq 34/ soro forma cardíaca vs clone Seq 34/ soro forma digestiva vs clone Seq 34/ soro forma indeterminada  $p > 0,05$ ; **c:** Reatividade do clone Seq 34/ soros formas cardíaca, digestiva e indeterminada vs clone Seq 34/ soro indivíduos controles  $p < 0,001$ .

### Teste de redução em placas

- Piloto do teste de redução em placas

No teste piloto realizado com os clones com melhor desempenho de reatividade nos Ensaios de ELISA (Seq. ID N<sup>o</sup> 3, Seq. ID N<sup>o</sup> 14, Seq. ID N<sup>o</sup> 17, Seq. ID N<sup>o</sup> 21, Seq. ID N<sup>o</sup> 24, Seq. ID N<sup>o</sup> 25, Seq. ID N<sup>o</sup> 27, Seq. ID N<sup>o</sup> 29, Seq. ID N<sup>o</sup> 34 e Seq. ID N<sup>o</sup> 35) observou-se redução significativa apenas para os clones Seq. ID N<sup>o</sup> 17, Seq. ID N<sup>o</sup> 21, Seq. ID N<sup>o</sup> 29, Seq. ID N<sup>o</sup> 34 e Seq. ID N<sup>o</sup> 35 quando submetidos aos *pools* de soros citados na Tabela abaixo:

**Tabela 9.** Contagem do número de colônias presentes em placas com diferentes clones submetidos ao *pool* de soros das formas para as quais foram mais reativos no ELISA e ao TBS, com respectivas taxas de redução.

| Clones<br>(Diluição 10 <sup>7</sup> ) | Número de Unidades Formadoras de Colônia<br>(pfu) |                        | *Taxa de Redução<br>(%) |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------|-------------------------|
|                                       | TBS                                               | Soro                   |                         |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 17             | 63                                                | 22 (Soro Cardíaco)     | 65%                     |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 21             | 100                                               | 25 (Soro Digestivo)    | 75%                     |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 29             | 175                                               | 22 (Soro Cardíaco)     | 87%                     |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 34             | 24                                                | 3 (Soro Indeterminado) | 87%                     |
| Seq. ID N <sup>o</sup> 35             | 17                                                | 9 (Soro Digestivo)     | 47%                     |

\*A taxa de redução foi calculada subtraindo-se o número de unidades formadoras de colônia encontradas na placa contendo o fago adicionado de TBS do número de unidades formadoras de colônia na placa contendo fago adicionado de soros das formas para as quais foram mais reativos no ELISA na diluição de 1:10. Essa diferença foi dividida pelo número de unidades formadoras de colônia contabilizadas na placa contendo fago e TBS e o resultado multiplicado por 100 (YANG; SHIUAN, 2003).

- Teste de Redução em Placas

Os fagos que apresentaram redução significativa no teste piloto foram novamente testados, comprovando a efetiva redução dos clones Seq. ID N<sup>o</sup> 17 (selecionado para a forma cardíaca), Seq. ID N<sup>o</sup> 21 (selecionado para a forma digestiva), Seq. ID N<sup>o</sup> 29, Seq. ID N<sup>o</sup> 34 e Seq. ID N<sup>o</sup> 35 (selecionados para a forma indeterminada) como demonstrado na Tabela 10.

**Tabela 10.** Contagem do número de colônias presentes em placas com diferentes clones submetidos aos *pools* de soros das três formas da fase crônica da doença de Chagas, ao *pool* de soros de pacientes controles e ao TBS, com respectivas taxas de redução.

| Clones<br>(Diluição 10 <sup>7</sup> ) | Número de Unidades Formadoras de Colônia (pfu) / Taxa de Redução (%) |                     |                      |                          |               |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------------|---------------|
|                                       | TBS                                                                  | Soro Forma Cardíaca | Soro Forma Digestiva | Soro Forma Indeterminada | Soro Controle |
| Seq. ID N° 17                         | 4721                                                                 | 304 (94%)           | 2356 (50%)           | 1889 (60%)               | 3579 (24%)    |
| Seq. ID N° 21                         | 5000                                                                 | 2120 (58%)          | 591 (88%)            | 2130 (57%)               | 3250 (35%)    |
| Seq. ID N° 29                         | 4558                                                                 | 317 (93%)           | 1689(63%)            | 870 (81%)                | 2654 (42%)    |
| Seq. ID N° 34                         | 2436                                                                 | 68 (97,2%)          | 71 (97%)             | 62 (97,5%)               | 1046 (57%)    |
| Seq. ID N° 35                         | 4000                                                                 | 2356 (41%)          | 121 (97%)            | 215 (95%)                | 2328 (42%)    |

\*A taxa de redução foi calculada subtraindo-se o número de unidades formadoras de colônia encontradas na placa contendo o fago adicionado de TBS do número de unidades formadoras de colônia de cada placa contendo fago adicionado de *pool* de soros de uma das formas da fase crônica da doença de Chagas e de *pool* de soros de pacientes controles (diluição 1:8). Essa diferença foi dividida pelo número de unidades formadoras de colônia contabilizadas na placa contendo fago e TBS e o resultado multiplicado por 100 (YANG; SHIUAN, 2003).

O clone Seq ID N° 17, quando submetido ao *pool* de soros da forma cardíaca apresentou taxa de redução significativamente maior ( $p<0,001$ ) do que quando submetido a qualquer outro soro. De maneira semelhante, o clone Seq ID N° 21, apresentou taxa de redução estatisticamente maior ( $p<0,001$ ) frente ao *pool* de soros da forma digestiva.

O peptídeo Seq ID N° 29 apresentou taxas de redução significativamente maiores diante dos *pools* de soros das formas cardíaca e indeterminada quando comparado ao *pool* de soros da forma digestiva e ao *pool* de soros de pacientes controles ( $p<0,001$ ). A taxa de reatividade do referido clone diante dos *pools* de soros das formas cardíaca e indeterminada foram estatisticamente diferentes ( $p<0,001$ ), tendo sido maior para o *pool* de soros da forma cardíaca.

O peptídeo Seq ID N° 34 apresentou taxas de redução significativamente maiores perante os *pools* de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada do que quando submetido ao *pool* de soros de pacientes controles ( $p<0,001$ ). Não foi constatada nenhuma diferença estatística nas taxas de redução quando o referido clone foi submetido aos *pools* de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada ( $p>0,05$ ).

O clone Seq ID N° 35 apresentou taxas de redução significativamente maiores diante dos *pools* de soros das formas digestiva e indeterminada quando comparado ao *pool* de soros da forma cardíaca e ao *pool* de soros de pacientes controles ( $p<0,001$ ). A taxa de reatividade do referido clone diante

dos *pools* de soros das formas digestiva e indeterminada foram estatisticamente iguais ( $p>0,05$ ).

As Tabelas 11, 12, 13, 14 e 15 demonstram que a redução é mais efetiva quando os *pools* de soros foram preparados em uma concentração maior, sendo a taxa de redução diretamente proporcional à concentração das amostras de soros.

**Tabela 11.** Contagem do número de colônias presentes em placas contendo o clone Seq. ID Nº 17 adicionado de *pool* de soros da forma cardíaca em diferentes diluições.

| Seq. ID<br>Nº 17 | Número de Colônias e Taxa de Redução     |       |       |       |       |       | TBS  |
|------------------|------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|                  | Fator de Diluição Soro da Forma Cardíaca |       |       |       |       |       |      |
|                  | 1:8                                      | 1:16  | 1:32  | 1:64  | 1:128 | 1:256 |      |
|                  | 304                                      | 523   | 1556  | 3017  | 3994  | 4138  | 4721 |
|                  | (94%)                                    | (89%) | (67%) | (36%) | (15%) | (12%) |      |

**Tabela 12.** Contagem do número de colônias presentes em placas contendo o clone Seq. ID Nº 21 adicionado de *pool* de soros da forma digestiva em diferentes diluições.

| Seq. ID<br>Nº 21 | Número de Colônias e Taxa de Redução      |       |       |       |       |       | TBS |
|------------------|-------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
|                  | Fator de Diluição Soro da Forma Digestiva |       |       |       |       |       |     |
|                  | 1:8                                       | 1:16  | 1:32  | 1:64  | 1:128 | 1:256 |     |
| 591              | 615                                       | 1301  | 2974  | 3911  | 4426  | 5000  |     |
| (88%)            | (88%)                                     | (74%) | (40%) | (22%) | (11%) |       |     |

**Tabela 13.** Contagem do número de colônias presentes em placas contendo o clone Seq. ID Nº 29 adicionado de soro da forma cardíaca em diferentes diluições.

| Seq. ID<br>Nº 29 | Número de Colônias e Taxa de Redução     |       |       |       |       |       | TBS  |
|------------------|------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|                  | Fator de Diluição Soro da Forma Cardíaca |       |       |       |       |       |      |
|                  | 1:8                                      | 1:16  | 1:32  | 1:64  | 1:128 | 1:256 |      |
|                  | 317                                      | 1156  | 2987  | 3052  | 3821  | 4396  | 4558 |
|                  | (93%)                                    | (75%) | (34%) | (33%) | (16%) | (4%)  |      |

**Tabela 14.** Contagem do número de colônias presentes em placas contendo o clone Seq. ID Nº 34 adicionado de *pool* de soros da forma indeterminada em diferentes diluições.

| Seq. ID<br>Nº 34 | Número de Colônias e Taxa de Redução          |       |       |       |       |       | TBS  |
|------------------|-----------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|                  | Fator de Diluição Soro da Forma Indeterminada |       |       |       |       |       |      |
|                  | 1:8                                           | 1:16  | 1:32  | 1:64  | 1:128 | 1:256 |      |
|                  | 62                                            | 84    | 170   | 322   | 624   | 1300  |      |
|                  | (97,5%)                                       | (96%) | (93%) | (87%) | (74%) | (47%) | 2436 |

**Tabela 15.** Contagem do número de colônias presentes em placas contendo o clone Seq. ID Nº 35 adicionado de *pool* de soros da forma digestiva em diferentes diluições

| Seq. ID<br>Nº 35 | Número de Colônias e Taxa de Redução      |       |       |      |       |       | TBS |
|------------------|-------------------------------------------|-------|-------|------|-------|-------|-----|
|                  | Fator de Diluição Soro da Forma Digestiva |       |       |      |       |       |     |
|                  | 1:8                                       | 1:16  | 1:32  | 1:64 | 1:128 | 1:256 |     |
| 121              | 741                                       | 1562  | 2787  | 3835 | 4097  | 4000  |     |
| (97%)            | (81%)                                     | (61%) | (30%) | (4%) | (0%)  |       |     |

A Figura 9 (9A, 9B, 9C, 9D e 9E) demonstra a efetividade do teste de redução em placas para os clones Seq ID N<sup>os</sup> 17, 21, 29, 34 e 35, ilustrando o maior número de colônias em placas nas quais os clones foram adicionados apenas de tampão TBS, e número menor de unidades formadoras de colônias nas placas com clones misturados aos *pools* de soros.

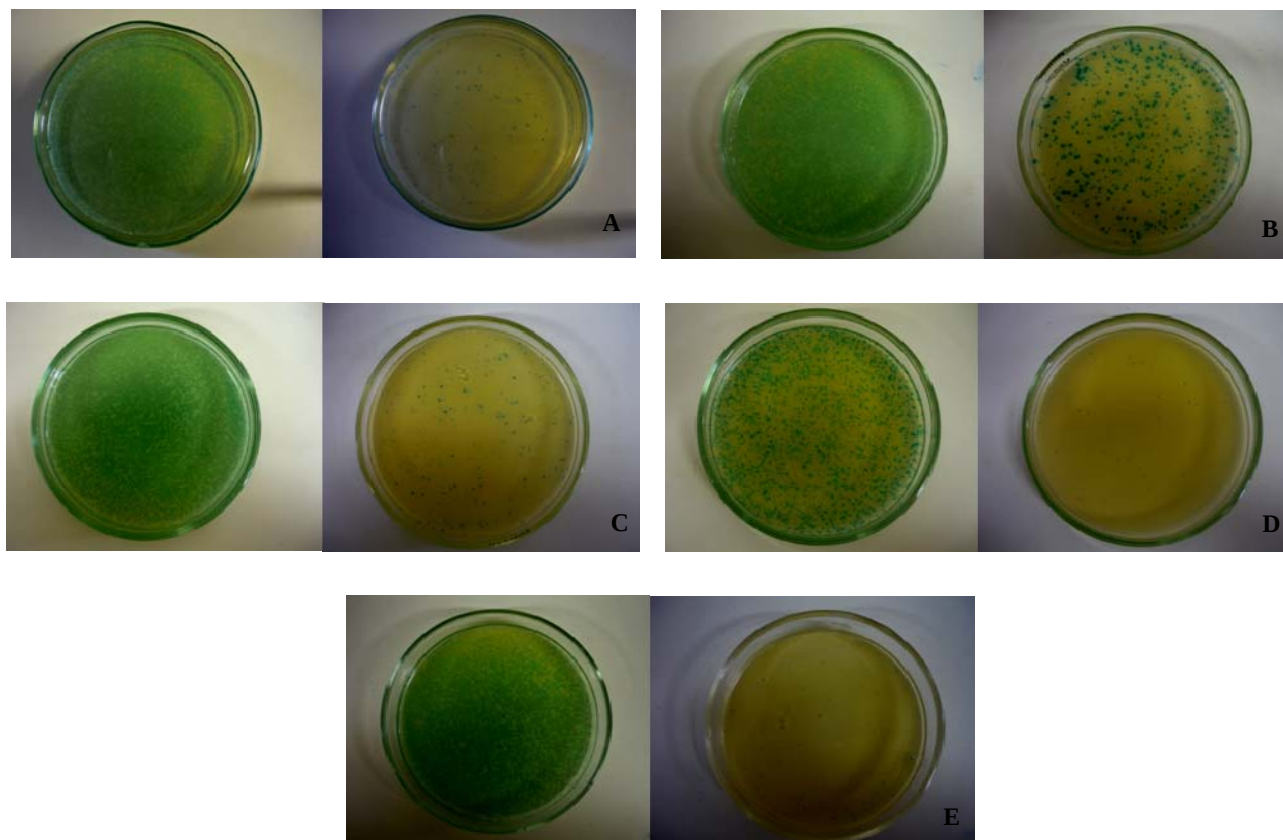


**Figura 9.** Teste de redução em placa realizado com cinco clones diferentes. (A) A placa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 17 adicionado de TBS está sendo mostrada à esquerda; enquanto a placa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 17 adicionado de soro da forma cardíaca da doença de Chagas (diluição 1:8) está sendo mostrada à direita. (B) A placa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 21 adicionado de TBS está sendo mostrada à esquerda; enquanto a placa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 21 adicionado de soro da forma digestiva da doença de Chagas (diluição 1:8) está sendo mostrada à direita. (C) A placa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 29 adicionado de TBS está sendo mostrada à esquerda; enquanto a placa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 29 adicionado de soro da forma cardíaca da doença de Chagas (diluição 1:8) está sendo mostrada à direita. (D) A placa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 34 adicionado de TBS está sendo mostrada à esquerda; enquanto a placa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 34 adicionado de soro da forma indeterminada da doença de Chagas (diluição 1:8) está sendo mostrada à direita. (E) A placa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 35 adicionado de TBS está sendo mostrada à esquerda; enquanto a placa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 35 adicionado de soro da forma digestiva da doença de Chagas (diluição 1:8) está sendo mostrada à direita.

Embora não tenha havido forte correlação (Coeficiente de correlação de Pearson –  $p > 0,8$ ) entre as variáveis DO (teste ELISA) e taxa de redução (teste de redução em placas) correspondentes aos diferentes clones submetidos aos *pools* de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao *pool* de soros de pacientes controles, graficamente pode-se perceber que a maior taxa de redução foi alcançada nas mesmas condições em que a maior DO foi lida para todos os peptídeos (Figura 10).

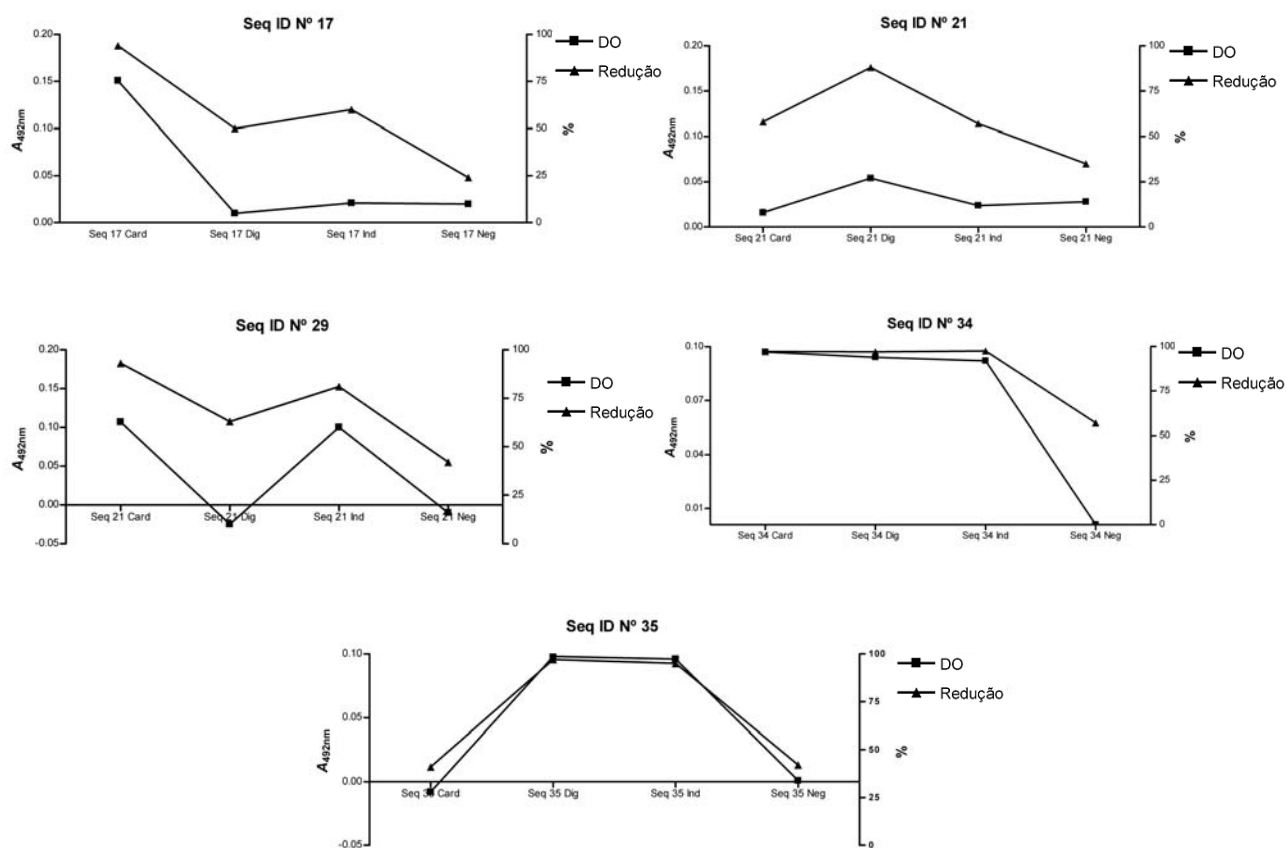


**Figura 10.** Representação gráfica da relação entre as DOs dos clones Seq ID N°s 17, 21, 29, 34 e 35 submetidos aos *pools* de soros das formas cardíaca, digestiva e indeterminada e ao *pool* de soros de pacientes controles em testes ELISA e as taxas de redução dos referidos clones submetidos às mesmas condições em testes de redução em placas.

O clone Seq ID N° 17 alcançou maior taxa de redução e o maior valor de DO quando este peptídeo foi submetido ao *pool* de soros da forma cardíaca; assim como o clone Seq ID N° 21, quando submetido ao *pool* de soros da forma digestiva, alcançou maior DO e maior taxa de redução. O clone Seq ID

Nº 29 demonstrou maior DO e maior taxa de redução frente o *pool* de soros da forma cardíaca; o peptídeo Seq ID Nº 34 apresentou DOs e taxas de redução muito similares diante aos *pools* de soros das três formas; e o clone Seq ID Nº 35 alcançou maior taxa de redução e maior valor de DO quando submetido ao *pool* de soros da forma digestiva, demonstrando a coerência do perfil imunorreativo desses peptídeos nos dois testes.

## DISCUSSÃO

Muitos antígenos de *Trypanosoma cruzi* já foram estudados de forma a possibilitar a síntese de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos com potencial uso clínico e epidemiológico (PERALTA et al., 1994; GRUBER; ZINGALES, 1993; GARCIA et al., 2003; MONCAYO; LUQUETTI, 1990; LEVIN et al., 1991; UMEZAWA et al., 1999; SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001).

Embora estes trabalhos tenham contribuído para a descoberta de novos peptídeos para o diagnóstico geral da doença de Chagas, ainda permanecem dúvidas acerca da predominância dos sintomas, bem como com relação à evolução de pacientes portadores da forma indeterminada da fase crônica da doença para a forma cardíaca ou para a forma digestiva. O presente estudo visa, portanto, oferecer ferramentas moleculares que possibilitem desvendar os mecanismos pelos quais os pacientes portadores da fase crônica são acometidos pela forma cardíaca, digestiva ou indeterminada da doença e elucidar questões relacionadas à evolução dos pacientes acometidos pela forma indeterminada para uma das outras formas. Neste contexto, nossa hipótese está centrada na possibilidade de que padrões antigênicos específicos sejam reconhecidos especificamente em cada forma da doença.

Diante da resposta imune diferencial dos pacientes, optamos por empregar a tecnologia *Phage Display*, uma técnica proteômica subtrativa que nos permitiu selecionar padrões antigênicos específicos contra imunoglobulinas purificadas em cada grupo de pacientes, identificando perfis de resposta comuns dentro de cada grupo. Estes peptídeos diferencialmente reconhecidos podem nos ajudar em um futuro próximo a entender a evolução da doença, especificamente sobre os mecanismos da resposta imune.

A doença de Chagas possui um curso clínico variável, podendo evoluir para uma infecção caracterizada por sintomas leves, ou para uma doença crônica grave, que pode acometer o sistema cardiovascular ou o sistema gastrointestinal.

Porém, os fatores que influenciam essa variabilidade clínica ainda não foram totalmente elucidados. Já foi visto que a variação geográfica, tanto do hospedeiro, quanto do parasito pode ser determinante da gravidade dos

sintomas e da prevalência da forma da doença, á medida que a forma digestiva da doença de Chagas é predominante no Chile e Brasil Central, sendo relativamente rara em outras áreas endêmicas do Brasil e praticamente ausente na América Central. É sugerido, portanto, que fatores genéticos inerentes ao parasito e ao hospedeiro podem ser importantes na fisiopatologia da doença (MACEDO; PENA, 1998). Todavia, um estudo recente mostrou cepas diferentes de *Trypanosoma cruzi* em isolados de pacientes com a mesma forma clínica (LAGES-SILVA et al., 2006).

Apesar de características como a cepa do parasito envolvida na infecção, o tropismo tissular, o momento da infecção, a resposta imunológica elaborada e fatores genéticos inerentes ao hospedeiro serem indiscutivelmente relevantes para o estabelecimento da doença de Chagas (DUTRA; GOLLOB, 2008), sabe-se que muitas moléculas presentes nas células dos hospedeiros e na superfície dos parasitos ativam o processo de invasão celular (ANDRADE; ANDREWS, 2005) e são capazes de simular uma resposta imunológica inata no primeiro contato com o antígeno (TARLETON, 2007).

A invasão e a destruição de células do hospedeiro representam a primeira manifestação de danos teciduais associados à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Porém, há evidências de que as formas mais graves da doença são definidas por danos a tecidos vitais geralmente causados por processos inflamatórios (KIERSZENBAUM, 2007).

Assim, em resposta à permanência de parasitos em órgãos-alvo da infecção, a resposta imune específica resulta em processo inflamatório exagerado com consequentes efeitos deletérios nestes tecidos. Dentre os componentes exacerbados neste processo inflamatório, parece ser chave, a presença de altos níveis de IFN- $\gamma$  (FIOCRUZ; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A citocina inflamatória IFN- $\gamma$  contribui para defesa do hospedeiro contra infecção por *Trypanosoma cruzi*, mas ao mesmo tempo, pode induzir uma produção exagerada de Óxido Nítrico e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), que são moléculas tóxicas e podem causar danos teciduais (KIERSZENBAUM, 2007). Gomes e colaboradores (2003) demonstram comparativamente menor frequência de células T produtoras de IFN- $\gamma$  em pacientes com a forma indeterminada (sem sintomas significativos).

Além disso, células T ativadas são componentes mais encontrados em infiltrados inflamatórios observados em pacientes com a forma cardíaca do que em pacientes com a forma digestiva, demonstrando o envolvimento dessas células ativadas com o desenvolvimento da patologia (DUTRA; GOLLOB, 2008).

Estudos recentes demonstraram ainda, que monócitos provenientes de pacientes acometidos pela forma indeterminada da doença exibem maior expressão de IL-10 quando entram em contato com o parasito, enquanto monócitos de pacientes com a forma cardíaca submetidos à mesma cepa de parasito expressam preferencialmente TNF- $\alpha$  (SOUZA et al., 2004).

A forma indeterminada da fase crônica da doença de Chagas caracteriza-se por demonstrar altos níveis de anticorpos líticos, os quais são protetores, o que poderia explicar o caráter mais ou menos assintomático desta forma. Foi visto que epítomos de galactose estimulam a produção desses anticorpos que podem mediar a lise de formas tripomastigotas (FIOCRUZ; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Esses dados sugerem que diferentes epítomos estimulam respostas inflamatórias também distintas e que existem particularidades durante o processo de reconhecimento do antígeno entre os pacientes portadores das formas cardíaca, digestiva e indeterminada da doença de Chagas.

No presente estudo, o perfil imunorreativo de peptídeos selecionados por *Phage Display* foi avaliado, demonstrando potenciais peptídeos para a detecção geral da doença de Chagas, bem como peptídeos com possível aplicação para diagnóstico diferencial entre as formas. Da mesma forma, foram estudados peptídeos selecionados para a forma indeterminada que podem indicar propensão ao desenvolvimento de alguma das outras duas formas.

Os clones correspondentes às sequências Seq. ID N<sup>os</sup> 3, 14, 27 e 34, apresentaram reatividade significativa perante o *pool* de soros de pacientes das três formas da doença de Chagas, e reatividade baixa quando submetidos ao *pool* de soros de pacientes controles, em testes ELISA, sendo epítomos potenciais para aplicação diagnóstica no que se refere à detecção geral da infecção por *Trypanosoma cruzi*. O teste de redução em placas confirmou a reatividade significativa do clone Seq. ID N<sup>o</sup> 34, o qual, quando submetido aos *pools* de soros das três formas da doença sofreu redução acima de 95% em

todos os casos, tendo sido inferior a 60% quando o peptídeo foi submetido ao *pool* de soros de pacientes controles. Os resultados indicam que as colônias de bactérias infectadas por fagos são formadas em menor quantidade quando os anticorpos bloqueiam o domínio N-terminal da proteína pIII do bacteriófago M13. Em contraste, as colônias de bactérias infectadas pelos fagos proliferam pela placa quando *pool* de soros não são adicionados. Quando os *pools* de soros estão muito diluídos, não há redução significativa do número de colônias, o que demonstra que a concentração dos soros não foi suficiente para neutralizar a infecção das bactérias *E. coli* pelos fagos contendo os peptídeos. Pode-se deduzir então, que a ligação do anticorpo ao peptídeo está ligada à infectividade do fago (YANG, SHIUAN, 2003), a qual é iniciada pelo acoplamento da pIII do fago ao f *pilus* de uma *E. coli* (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

Os peptídeos representados pelas sequências Seq. ID N<sup>os</sup> 17, 24 e 25 foram selecionados para a forma cardíaca da doença de Chagas, tendo sido altamente reativos quando submetido ao *pool* de soros de pacientes portadores da forma cardíaca da doença e pouco reativos com os *pools* de soros das formas digestiva, indeterminada e de pacientes controles, indicando epítomos com potencial utilização diagnóstica diferencial entre as formas cardíaca e digestiva. O fato do peptídeo Seq. ID N<sup>o</sup> 17 possuir uma frequência de 2/67, juntamente com a sua alta reatividade nos testes ELISA, são dados que corroboram com a afirmativa de que a seleção foi realmente específica para este clone. O teste de redução em placas é mais uma evidência de que o peptídeo Seq. ID N<sup>o</sup> 17 possui reatividade diferencial e maior perante o *pool* de soros da forma cardíaca, uma vez que apresentou uma redução superior a 90% quando adicionado deste soro, tendo sido a redução significativamente menor nos outros casos: 50% para o *pool* de soros da forma digestiva, 60% para o *pool* de soros da forma indeterminada e 24% para o *pool* de soros de pacientes controles.

O clone Seq. ID N<sup>o</sup> 21, selecionado para a forma digestiva da doença de Chagas nos testes ELISA, quando submetido aos *pools* de soros das três formas da doença e ao *pool* de soros de pacientes controles, apresentou DO elevada apenas frente ao *pool* de soros provenientes de pacientes com a forma digestiva da doença, representando um peptídeo importante para uso potencial

no diagnóstico diferencial entre as formas cardíaca e digestiva. De acordo com a variabilidade da biblioteca comercial utilizada, havia uma improbabilidade de seleção do referido clone em função dos aminoácidos que o compõe, a menos que a seleção fosse efetivamente específica, o que é comprovado pela frequência observada do clone (2/67), bem como seu alto grau de informação ( $I(m)=40,3$ ). No teste de redução em placas, este clone apresentou redução de 88% frente ao *pool* de soros da forma digestiva da doença, 58% diante do *pool* de soros da forma cardíaca, 57% quando submetido ao *pool* de soros da forma indeterminada e 35% perante o *pool* de soros de pacientes controles, comprovando a especificidade da ligação de anticorpos contidos nos soros de pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas com o peptídeo Seq. ID Nº 21.

Os clones correspondentes às sequências Seq. ID Nº<sup>25</sup> 29 e 35 foram selecionados para a forma indeterminada da doença de Chagas. O peptídeo Seq. ID Nº 29 apresentou DO elevada e estatisticamente igual quando submetido aos *pools* de soros provenientes de pacientes com as formas indeterminada e cardíaca da doença, nos testes ELISA. Este epítipo apresenta potencial prognóstico no que se refere à propensão dos pacientes enquadrados na forma indeterminada e com este tipo de resposta a evoluírem para a forma cardíaca da fase crônica da tripanosomíase americana, o que deve ser investigado em uma análise imunológica continuada destes pacientes. No teste de redução em placas, o clone Seq. ID Nº 29 apresentou redução de 81% quando submetido ao *pool* de soros da forma indeterminada, 93% perante o *pool* de soros da forma cardíaca, 63% diante o *pool* de soros da forma digestiva e 42% frente ao *pool* de soros de pacientes controles, evidenciando que as maiores taxas de redução ocorreram diante dos soros das formas indeterminada e cardíaca, confirmando a potencial utilização deste clone para indicar evolução da doença da forma assintomática para uma forma caracterizada pelo comprometimento do sistema cardiovascular.

O clone Seq. ID Nº 35 apresentou reatividade significativamente igual e elevada frente aos *pools* de soros de pacientes com as formas indeterminada e digestiva da doença, no teste ELISA, podendo ser utilizado para delinear o perfil evolutivo dos pacientes portadores da forma indeterminada para a forma digestiva da doença de Chagas. O teste de redução em placas evidenciou que

este clone realmente exibe maior reatividade perante aos *pools* de soros das formas indeterminada e digestiva, o que é expresso pela significativa taxa de redução: 95% e 97%, respectivamente. Esses achados confirmam o uso potencial do clone Seq. ID Nº 35 para indicar propensão ao desenvolvimento da forma digestiva de pacientes portadores da forma indeterminada da doença de Chagas.

Os resultados nos testes ELISA e testes de redução em placas, para os clones Seq. ID Nºs 17, 21, 29, 34 e 35, quando relacionados, demonstraram que há uma coerência no perfil de imunorreatividade dos referidos peptídeos, revelando a especificidade destes perante os soros para os quais foram selecionados.

Todos os resultados combinados tornam os peptídeos selecionados prováveis biomarcadores para ensaios diagnósticos, uma vez que mesmo aqueles peptídeos que não apresentaram DO muito elevada nos teste ELISA e redução significativa nos testes de redução em placas, podem ser utilizados em conjunto com os demais para a constituição de uma proteína recombinante formada por vários mimetopos. Este tipo de abordagem foi demonstrada por Peralta e colaboradores (1994), os quais descrevem a melhor eficiência dos seus peptídeos quando utilizados de forma combinada, corroborando com a hipótese de utilização dos peptídeos aqui descritos em conjunto, a fim de melhorar o desempenho dos mesmo em testes de imunorreatividade.

Esses achados validam a hipótese de que existem antígenos primordialmente expressos em cada forma da doença de Chagas, sendo um dado importante para o desenvolvimento de diagnóstico geral da doença de Chagas, bem como diferencial entre as formas cardíaca e digestiva, indicando ainda, no caso da forma indeterminada, propensão à evolução para uma das formas clínicas.

## CONCLUSÕES

- A Tecnologia de *Phage Display* demonstrou-se eficiente para a identificação de peptídeos imunorreativos contra anticorpos alvo circulantes em pacientes portadores das formas cardíaca, digestiva e indeterminada da fase crônica da doença de Chagas;
- Os testes de imunorreatividade demonstraram que alguns peptídeos apresentaram reatividade significativamente diferente e maior frente a determinados soros, sugerindo que existem peptídeos primordialmente expressos em cada uma das principais formas da fase crônica da doença de Chagas;
- Foram selecionados peptídeos com grande potencial para aplicação diagnóstica, tanto para detecção geral da doença, como diferencial entre as formas cardíaca e digestiva da doença de Chagas, embora esses epítomos ainda necessitem de melhor caracterização;
- A análise dos peptídeos selecionados para a forma indeterminada demonstrou a importância de se realizar mais estudos envolvendo essa forma da doença, a fim de que sejam desenvolvidas ferramentas capazes de indicar a propensão de pacientes aparentemente assintomáticos a desenvolverem sintomas da forma cardíaca ou digestiva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATH, F. G. C. Imunologia da doença de Chagas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Brasília DF, v. 35, n. 7, p. 101-108, 1983.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p.819–823, 2005.
- ANDRADE, Z. A. Anatomia patológica da doença de Chagas. **Revista Goiana de Medicina**, Goiânia, v. 4, n. 2, p. 103-119, 1958.
- AZZAZY, H.M., HIGHSMITH, W.E. Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 425-445, 2002.
- BARBAS, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. Phage Display: **A Laboratory Manual**. Plain view, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 8.4-8.7. 2001.
- BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, v. 19, p.1-33, 2001.
- BRIGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 26, p. 41, 2002.
- BENTO, C. A.; MELO, M. B.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PECANHA, L. M. Glycoinositolphospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production in vitro. **The Journal of Immunology**, v. 157, p. 4996-5001, 1996.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, p. 103-110, 1997.
- BRODSKY, C. I.; BARRAL-NETO, M. Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 10, p. 170-176. 2000.
- CAMARGO, M. M.; ALMEIDA, I. C.; PEREIRA, M. E. E.; FERGUSON, M. A. J.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiated the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 158, p. 5890-5891, 1997.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

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

CHRISTMANN, A.; WENTZEL, A.; MEYER, C.; MEYERS, G.; KOLMAR, H. Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by *Escherichia coli* cell surface display of gene-derived random peptide libraries. **Journal of Immunological Methods**, v.257, p.163–173, 2001.

DaROCHA, W.D.; BARTHOLOMEU, D.C.; MACEDO, C.D.; HORTA, M.F.; CUNHA-NETO, E.; DONELSON, J.E.; TEIXEIRA, S.M. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Parasitology Research**, v.88, p. 292-300, 2002.

DUMONTEIL, E., Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the postgenomic era. **Infection, Genetics and Evolution**, 2009, doi:10.1016/j.meegid.2009.02.009.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 287–292, 2008.

FRASCH, A. C. C.; CAZZULLO, J. J.; ASLUND, L.; PETTERSON, U. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. **Parasitology Today**, v. 7, n. 6, p. 148-151, 1991.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas**. 2005. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid = 163>. Acesso em: 27 outubro. 2009.

GARCÍA, G. A.; JOENSEN, L. G.; BÚA, J.; AINCIART, N.; PERRY, S. J.; RUIZ, A. M. *Trypanosoma cruzi*: Molecular identification and characterization of new members of the Tc13 family. Description of the interaction between the Tc13 antigen from Tulahuén strain and the second extracellular loop of the b1-adrenergic receptor. **Experimental Parasitology**, v. 103, p. 112–119, 2003.

GOMES, J. A.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; ROCHA, M. O.; MARTINS-FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v.71, n. 3, p.1185-1193, 2003.

GRUBER, A.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas disease. **Experimental Parasitology**, v.76, p. 1-12, 1993.

HATCHER, F. M.; KUHN R. E., CERRONE M. C.; BURTON R.C. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. **The Journal of Immunology**, v. 127, p. 1126-1130, 1981.

HELL, R. C. R.; AMIM, P.; DE ANDRADE, H. M.; DE AVILA, R. A. M.; FELICORI, L.; OLIVEIRA, A. G.; OLIVEIRA, C. A.; NASCIMENTO, E.; TAVARES, C. A. P.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. **Clinical Immunology**, v.131, p.129-38, 2009.

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

I REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS. Validade do conceito de forma indeterminada de doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 18: 46, 1985.

KIERSZENBAUM, F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. **Acta Parasitologica**, v. 52, p. 1-12, 2007.

LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L. E.; PEDROSA, A. L.; CREMA, E.; GALVÃO, M. C.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2167–2171, 2006.

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

LEVIN, M. J.; FRANCO DA SILVEIRA, J.; FRASCH, A. C. C.; CAMARGO, M. E.; LAFON, S.; DEGRAVE, W. M.; RANGEL-ALDAO, R. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas disease diagnosis: analysis of a workshop. **FEMS Microbiology Immunology**, v. 89, p. 11-20, 1991.

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

MICELI, R. M.; DEGRAAF, M. E.; FISCHER, H. D. Two-stage selection of sequences from a random phage display library delineates both core residues and permitted structural range within an epitope. **Journal of Immunological Methods**, v. 167, p. 279–287, 1994.

MINOPRIO, P.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. I. Quantification of both T and B responses. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 24, p. 661-668, 1986.

- MINOPRIO, P.; EISEN, H.; JOSKOWICZ, M.; PEREIRA, P.; COUTINHO, A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 139, p. 545-550, 1987.
- MONCAYO, A.; LUQUETTI, A. O. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 489-495, 1990.
- NOREN, K.A.; NOREN, C.J. Construction of High-Complexity Combinatorial Phage Display Peptide Libraries. **Methods**, v. 23, p.169-178, 2001.
- ORTIZ-ORTIZ, L.; ORTEGA, T.; CAPIN, R.; MARTÍNEZ, T. Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 50, p. 232-242, 1976.
- PARMLEY, S., SMITH, G. Antibody-selectable filamentous fd phagevectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, p. 305-318, 1988.
- PERALTA, J. M.; TEIXEIRA, M. G. M.; SHREFFLER, W. G.; PEREIRA, J. B.; BURNS, J. M.; SLEATH, P. R.; REED, S. G. Serodiagnosis of Chagas' Disease by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Two Synthetic Peptides as Antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 971-974, 1994.
- RABELLO, A.; LUQUETTI, O. A.; MOREIRA, E. F.; GADELHA, M. F.; DosSANTOS, J. A.; DeMELO, L.; SCHWIND, P. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection Using the New Particle Gel Immunoassay - ID-PaGIA Chagas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 77-82, 1999.
- REY, L. Parasitologia Médica. **Tripanossomíase devido ao *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas**. RJ: Guanabara Koogan S.A. Pp. 25-27. 1992.
- RODI, J. D.; SOARES, A. S.; MAKOWSKI, L. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide *phage display* libraries. **Journal of Molecular Biology**, v. 322, p.1039-1052, 2002.
- RUSSEL, M. Filamentous phage assembly. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 1607-1613, 1991.
- SCOTT, J.K.; SMITH, G.P. Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. **Science**, v. 249, p. 386-390, 1990.
- SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 6, p. 286-291, 2001.
- SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

SOUZA, P. E.; ROCHA, M. O.; ROCHA-VIEIRA, E.; MENEZES, C. A. S.; CHAVES, A. C. L.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5283–5291, 2004.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, R. E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 1301-1310, 2008.

TARLETON, R.L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 430–434, 2007.

UCHIYAMA, F.; TANAKA, Y.; MINARI, Y.; TOKUI, N. Designing scaffolds of peptides for phage display libraries. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 448–456, 2005.

UMEZAWA, E. S.; BASTOS, S. F.; CAMARGO, M. E.; YAMAUCHI, L. M.; SANTOS, M. R.; GONZALEZ, A.; ZINGALES, B.; LEVIN, M. J.; SOUSA, O.; RANGEL-ALDAO, R.; DA SILVEIRA, J. F. Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chagas' Disease in South and Central America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1554-1560, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **TDR Publications: Reporte sobre la enfermedad de Chagas**. 2007. Disponível em: [http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/report-enfermedad-chagas/pdf/swg\\_chagas.pdf](http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/report-enfermedad-chagas/pdf/swg_chagas.pdf). Acesso em: 09 agosto. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **TDR Strategic Direction: Chagas Disease**. 2002. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>. Acesso em: 25 setembro. 2009.

YANG, W. J.; SHIUAN, D. Plaque reduction test: an alternative method to assess specific antibody response to pIII-displayed peptide of filamentous phage M13. **Journal of Immunological Methods**, v. 276, p. 175– 183, 2003.