



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0805601-3 B1**



\* B R F I O 8 0 5 6 0 1 B 1 \*

**(22) Data do Depósito: 24/11/2008**

**(45) Data de Concessão: 05/05/2020**

---

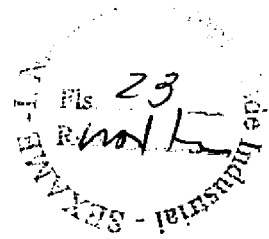
**(54) Título:** PEPTÍDEOS LIGANTES A IMUNOGLOBULINAS G PRESENTES NO SORO DE PACIENTES COM NEUROCISTICERCOSE

**(51) Int.Cl.:** C07K 7/04; G01N 33/53; A61K 38/10; A61P 33/00.

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-UFU; IMUNOSCAN ENGENHARIA MOLECULAR LTDA-ME.

**(72) Inventor(es):** JULIA MARIA COSTA CRUZ; LUIZ RICARDO GOULART FILHO; VANESSA DA SILVA RIBEIRO; MARIANNA NASCIMENTO MANHANI; RONE CARDOSO.

**(57) Resumo:** A presente invenção refere-se ao uso da técnica de Phage Display para a seleção, caracterização e utilização de novos peptídeos recombinantes e motivos protéicos que tenham interações com proteínas sorológicas (Imunoglobulinas G) específicas á neurocisticercose. Foram selecionados peptídeos ligantes a IgG de amostras de soro de pacientes portadores da doença. Os peptídeos ligam especificamente a IgG dos pacientes com NC resultando em um diagnóstico preciso, obtido de forma prática. Devido à capacidade de ligação em proteínas sorológicas específicas á doença, esses peptídeos podem ser potencialmente utilizados em Kits de imunodiagnóstico.



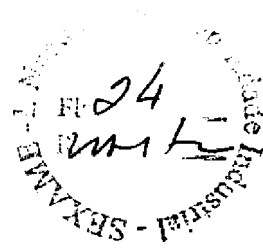
## “PEPTÍDEOS LIGANTES A IMUNOGLOBULINAS G PRESENTES NO SORO DE PACIENTES COM NEUROCISTICERCOSE”

A presente invenção refere-se à seleção, caracterização e utilização de peptídeos recombinantes e motivos protéicos que se ligam a Imunoglobulinas G (IgG) presentes no soro de pacientes com neurocisticercose (NC). Os peptídeos foram especificamente imunorreativos com o soro de pacientes com NC e podem ser potencialmente usados em imunodiagnóstico ou em composições vacinais para o controle da doença.

Na cisticercose humana o homem é hospedeiro intermediário acidental de *T. solium*, quando ingere ovos viáveis do parasito. A forma larvária pode atingir os mais variados tecidos, incluindo a musculatura esquelética e cardíaca, olhos, tecido subcutâneo, cavidade oral e o sistema nervoso central (SNC) (PUSHKER N, BAJAJ MS, BALASUBRAMANYA R. Disseminated cysticercosis involving orbit, brain and subcutaneous tissue. Journal of Infection, 51:245-248, 2005).

A neurocisticercose, patologia resultante da presença dos metacestódeos de *Taenia solium* no sistema nervoso central (SNC) constitui a forma mais grave da cisticercose, sendo a principal causa de epilepsia nos países em desenvolvimento (PATEL R, JHA S, YADAV RK. Pleomorphism of the clinical manifestations of neurocysticercosis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 100:134-141, 2006), e tem sido observada em associação á outras doenças e também á tumores (NIIZUMA K. et al., Malignant transformation of high-grade astrocytoma associated with neurocysticercosis in a patient with Turcot syndrome. Journal of Clinical Neuroscience, 14:53-55, 2007), além de casos raros com quadros de parkinsonismo (LÓPEZ IC. et al. Parkinsonismo sensible a levodopa en neurocysticercosis, Neurología, 23:3-5, 2008).

O complexo teníase-cisticercose constitui uma zoonose fonte de preocupação para profissionais da área de saúde humana e animal, no entanto não há um programa de controle efetivo por parte dos órgãos governamentais.



Este complexo está relacionado com fatores extrínsecos como temperatura ambiente, umidade e agentes dispersores dos ovos; fatores intrínsecos como potencial biótipo do parasito e imunidade natural e adquirida dos hospedeiros, além de fatores socioeconômicos como práticas de criação de suínos, comportamentos alimentares dos hospedeiros, legislação, fiscalização e nível de educação sanitária da população (SUDEWI AAR. et al. *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia: serology and mtDNA analysis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 102:96-98, 2008).

Os mecanismos de transmissão da cisticercose homem-suíno, homem-homem têm como fator primordial às condições sócio-econômicas e culturais do ser humano, uma vez que este é o único hospedeiro definitivo da teníase, não existindo reservatórios silvestres. Dentre essas condições destacam-se as sanitárias como falta de higiene pessoal e de saneamento básico, com contaminação da água e de alimentos com ovos do parasito provenientes de indivíduos infectados pela forma adulta do parasito (GARCIA HH. et al.. Seroincidence of porcine *T. solium* infection in the Peruvian highlands. Preventive Veterinary Medicine, 57:227-236, 2003). Outro fator importante para manter a endemia de cisticercose numa dada região geográfica é o sistema primitivo de criação de suínos, pois permite o contato destes animais com fezes humanas mantendo o ciclo de vida de *T. solium*. Esse fator, aliado ao hábito de ingestão de carne suína mal-cozida (cozimento ideal é por 30 minutos a 77°C), aumenta a prevalência da teníase estritamente relacionada com a cisticercose (SCIUTTO E. et al. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. Microbes and Infection, 2:1875-1890, 2000).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o complexo teníase-cisticercose acomete 50.000.000 de indivíduos em todo mundo, estima-se que, anualmente, 50 milhões de pessoas são infectadas pela cisticercose no mundo provocando aproximadamente 50.000 óbitos anualmente. O gasto estimado com o tratamento das complicações da doença no Brasil é de

aproximadamente US\$85 milhões (PAL DK, CARPIO A, SANDER JW. Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 68:137-143, 2000).

Na América Latina, calcula-se que a taxa de prevalência de NC e lesões  
5 oculares é de 100 e 30 casos por 100.000 habitantes, respectivamente,  
atingindo cerca de 350.000 pessoas (PINTO PSA. et al. Cysticercosis  
occurrence and sanitary risks in groups of inspected and non-inspected swine  
in Brazil. *Parasitologia Latinoamericana*, 57:129-133, 2002). A enfermidade foi  
10 encontrada em 17 países latino-americanos, com maiores taxas de morbidade  
no Brasil, Chile, Peru, El Salvador, Guatemala e México, tendo maior  
freqüência em áreas rurais (PFUETZENREITER MP, ÁVILA-PIRES FD.  
Epidemiologia da teníase/cisticercose por *Taenia solium* e *Taenia saginata*.  
*Ciência Rural*, 30:541-548, 2000).

A cisticercose acomete milhares de indivíduos nos países menos  
15 desenvolvidos (MEDINA MT. et al. Prevalence, incidence and etiology of  
epilepsies in rural Honduras: the Salama Study. *Epilepsia*, 46:124-131, 2005) e  
em países desenvolvidos com alta taxa de imigração de áreas endêmicas  
(SIKASUNGE CS. et al. Risk factors associated with porcine cysticercosis in  
selected districts of Eastern and Southern provinces of Zambia. *Veterinary*  
20 *Parasitology*, 143:59–66, 2007), emergindo como um sério problema na  
agricultura e na saúde pública em vários países (WILLINGHAM AL, ENGELS  
D. Control of *Taenia solium* Cysticercosis/Teniosis. *Advances in Parasitology*,  
61:509-566, 2006).

No Brasil, a neurocisticercose é encontrada com elevada freqüência nos  
25 Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás sendo o gênero feminino  
mais acometido (BENEDETI MR. et al. Perfil clínico-epidemiológico de  
pacientes com Neurocisticercose atendidos no hospital universitário regional de  
maringá, Paraná, Brasil, *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 65:124-129, 2007). A  
prevalência populacional, contudo, não é conhecida pela ausência de  
30 notificação da doença (TAKAYANAGUI OM, LEITE JP. Neurocisticercose.  
*Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34:283-290, 2001).

Incidência de cisticercose em estudos soroepidemiológicos de acordo com levantamento realizado, não considerando as comunidades indígenas, varia de 0,68 -6,2%, sendo mais freqüente em hospitais psiquiátricos (38,5%) que na população geral estudada (0,8% em crianças e 2,3% em adultos). Em comunidades indígenas, a incidência de cisticercose é 29,4% (AGAPEJEV S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. Arquivos de Neuro-psiquiatria, 61:822-828, 2003).

Não considerando as diferenças regionais, a incidência de NC nos diversos serviços de Neurologia e Neurocirurgia do Brasil, incluindo os hospitais gerais, varia de 0,03 a 13,4% nos estudos clínicos, e de 0,12 a 9% em necropsias. Exclusivamente nos hospitais gerais, a freqüência observada de NC é  $1,94 \pm 2,03\%$ , mostrando o menor valor (0,19%) no estado de São Paulo e o maior (4,8%) no estado do Paraná. Em hospitais psiquiátricos do estado de Minas Gerais, a freqüência de NC corresponde a 12,2% (AGAPEJEV S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. Arquivos de Neuro-psiquiatria, 61:822-828, 2003).

A incidência da NC tem sido considerada baixa no nordeste brasileiro, sendo freqüente nos Estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país, esse fato pode ser justificado pela falta de diagnóstico, visto que sob o ponto de vista clínico as manifestações não são características (PFUETZENREITER MP, ÁVILA-PIRES FD. Epidemiologia da teníase/cisticercose por *Taenia solium* e *Taenia saginata*. Ciência Rural, 30:541-548, 2000).

Na região Centro-Oeste, em um estudo soro-epidemiológico, demonstraram a endemicidade (11,3%) da cisticercose humana na cidade de Catalão – Goiás, localizada a 100Km de Uberlândia (OLIVEIRA, H. B. et al. Anti-*Taenia solium* metacestode IgG antibodies in serum samples from inhabitants of a Central-Western region of Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 48: 49-52, 2006).

Em pesquisa para detectar anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia, um total de 1133 amostras de soro foram analisadas pelo teste de

imunofluorescência indireta e o ELISA no Laboratório de Cisticercose da Universidade Federal de Uberlândia. A soropositividade foi de 5,6%, mostrando diferenças de acordo com suas cidades de origens: Araguari (13,5%), Tupaciguara (5,0%), Monte Alegre de Minas (4,8%) e Uberlândia (4,7%)  
5 (SILVEIRA-LACERDA EP. et al. Anti-*Taenia solium* metacestodes antibodies in serum from blood donors from four cities of Triângulo Mineiro area, Minas Gerais, Brazil, 1995. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 44: 229-231, 2002), demonstrando assim a endemicidade da cisticercose na população amostrada e a problemática do complexo teníase-cisticercose na  
10 região.

A forma metacestódea pode persistir por longos períodos, em muitos casos por anos, através das ações de seus produtos de excreção e secreção, que modulam a resposta imune do hospedeiro sem licitar uma reação inflamatória, a ausência ou redução da inflamação é resultado da secreção de  
15 serina proteases, que inibem a ativação do complemento, a ativação de linfócitos e a produção de citocinas, com destaque para as interleucinas (IL) IL-2, IL-5 e IL10 (WANG IC. et al.. Suppression of host Th1-type granulomatous inflammation by *Taenia solium* metacestodes is related to down-regulation of osteopontin gene expression. International Journal for Parasitology, 38:239–  
20 248, 2008).

Em contraste, a resposta inflamatória ao redor de um ou mais metacestódeos degenerados pode principiar uma doença sintomática, através da proliferação de linfócitos e posterior diferenciação em células efetoras tipo Th1 e Th2, com subsequente produção de várias citocinas, ou de células  
25 plasmáticas, com conseqüente produção de anticorpos específicos. Há um equilíbrio parasito – hospedeiro que é mantido como resultado da habilidade do parasito sobreviver no hospedeiro por longos períodos (SCIUTTO E. et al. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury, Parasite Immunology, 29:621–636, 2007).

30 A patologia, a clínica e a resposta imunológica ao parasito estão relacionadas e dependem tanto da localização, do número, do tamanho e da

fase de desenvolvimento em que se encontram os cisticercos, como da reação dos tecidos parasitados (DEL BRUTTO OH. Neurocysticercosis. Seminars in Neurology, 25:243- 251, 2005).

5 A severidade dos sintomas desta doença são geralmente associados com a resposta inflamatória crônica, sugerida pela persistência do antígeno, que também podem ser influenciada por glicoconjugados expressos pelos metacestódeos de *T. solium* (ALVAREZ JI, RIVERA J, TEALE JM. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. Plos Neglected Tropical Diseases, 10 2:1-12, 2008).

O conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na relação parasita-hospedeiro tem auxiliado na compreensão da patogenia desta parasitose humana. Por conseqüência, esse conhecimento tem colaborado no desenvolvimento de testes imunológicos para o diagnóstico laboratorial desta 15 doença (VAZ AJ. Diagnóstico imunológico das parasitoses. In: DE CARLI GA. (Ed). Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório das parasitoses humanas. São Paulo: Atheneu, 2001, p.505-539).

O diagnóstico da neurocisticercose é baseado na combinação de dados clínicos, epidemiológicos, radiológicos e sorológicos (HAWK MW. et al. 20 Neurocysticercosis: a review. Surgical Neurology, 63:123-132, 2005). Ressonância Magnética (RM) e/ ou Tomografia Computadorizada (TC) são as ferramentas de diagnóstico mais sensíveis e específicas. Entretanto, devido a seu alto custo e disponibilidade restrita, eles podem ser limitados ao uso nos países em desenvolvimento e com altas taxas de infecção.

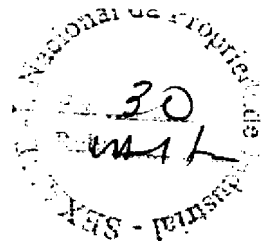
25 O critério padrão ou absoluto para o diagnóstico de NC inclui (i) demonstração histológica do parasito em biópsia ou material de operação, (ii) evidência de lesões císticas mostrando o escólex em Tomografia Computadorizada ou Ressonância Magnética e (iii) visualização fundoscópica do parasito em casos de NC intraocular (DEL BRUTTO OH. et al. Proposal of 30 diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. Journal of the Neurological Sciences, 142:1-6, 1996).

O diagnóstico clínico da cisticercose é difícil de ser realizado em pacientes assintomáticos, estando associado nos sintomáticos, à alterações fisiológicas provocadas pela localização das formas metacestódeas. No caso da NC nem sempre é fácil, devido ao polimorfismo das manifestações neurológicas, comuns a outras doenças do SNC (YANCEY LS, DIAZ-MARCHAN PJ, WHITE AC. Cysticercosis: recent advances in diagnosis and management of neurocysticercosis. Current Infectious Disease Reports, 7:7-39, 2005).

As manifestações clínicas não são específicas e não há um método fácil de confirmar o diagnóstico de NC (YANCEY LS, DIAZ-MARCHAN PJ, WHITE AC. Cysticercosis: recent advances in diagnosis and management of neurocysticercosis. Current Infectious Disease Reports, 7:7-39, 2005).

O desenvolvimento de teste imunológicos, baseados na detecção de anticorpos específicos no soro e líquor (LCR), resulta em ferramentas confiáveis para o diagnóstico da NC. Uma dificuldade para a conclusão do diagnóstico da NC é a utilização de LCR. Embora amostras de LCR apresentem excelente utilidade no imunodiagnóstico da NC em relação às amostras de soro, a colheita de LCR é um procedimento invasivo que requer profissional especializado em local adequado (MACEDO HW. et al. Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 38:93-103, 2002). A utilização de amostras de soro em testes utilizando extratos totais tem apresentado baixos índices de especificidade (MACHADO GA. et al. Assessment of antigenic fractions of varying hydrophobicity from *Taenia solium* metacestodes for the diagnosis of human neurocysticercosis. Tropical Medicine and International Health, 12:1-8, 2007).

A maioria dos testes que utilizam antígenos totais perdem em sensibilidade e especificidade, reações cruzadas ocorrem frequentemente com outras parasitoses, especialmente equinococose cística e multilocular, causadas pelo estágio larval de *Echinococcus granulosus* e *E.multilocularis*, respectivamente (Kong Y. et al. Immunoelectrophoretic analysis of major



component proteins in cystic fluid of *Taenia solium* metacestodes. Korean Journal of Parasitology, 30:209-18, **1992**).

O desenvolvimento de técnicas de imunodiagnóstico tem contribuído com significativa importância nos estudos soropidemiológicos, juntamente com os vários exames complementares que são indispensáveis no diagnóstico da NC (DORNY P et al. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis, Acta Tropica, 87:79– 86, **2003**). A observação de diversos dados, assim como a clínica, a epidemiologia e os exames complementares (neuroimagem, neurofisiológicos, anatomopatológicos e métodos imunológicos) tem sido amplamente empregados no auxílio diagnóstico da NC, uma vez que estes dados em conjunto podem definir o quadro clínico de um paciente (DEL BRUTTO OH et al. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. Neurology, 57:177-183, **2001**).

Novos conceitos no diagnóstico desta parasitose tem sido aperfeiçoados nos últimos anos; dentre os quais destaca-se a identificação e sequenciamento de antígenos específicos e o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais de diagnóstico (GARCIA HH et. al. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 72:3-9, **2005**).

O imunodiagnóstico da cisticercose humana constitui o diagnóstico indireto da infecção pela detecção de anticorpos contra antígenos da forma metacestódea de *T. solium*, em amostras de soro, líquido cefalorraquidiano (LCR), saliva ou sangue em papel de filtro, alcançando quase sempre papel central no diagnóstico da neurocisticercose (COSTA JM. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. Estudo de diferentes extratos antigênicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e líquido cefalorraqueano. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, 44:15-31, **1986**). Dentre os testes imunológicos destacam-se, a Reação de Fixação de Complemento (RFC), a Reação de Hemaglutinação Indireta (HAI), a Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI), o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) inicialmente aplicada no diagnóstico de cisticercose e o

Immunoblotting (*Enzyme-Linked Immunoelctrotransferblot* - EITB).

Dentre todos os métodos imunológicos o ELISA tem sido o ensaio mais estudado no diagnóstico da NC por apresentar significativa sensibilidade e especificidade, fácil e simples execução e baixo custo. Recomenda-se  
5 empregar dois testes imunológicos, sendo um de elevada sensibilidade e outro bastante específico, para maior segurança na interpretação dos resultados (COSTA-CRUZ JM et al. Ocorrência de cisticercose em necropsias realizadas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 53:227-232, 1995).

10 Um diagnóstico preciso é a primeira etapa para um tratamento médico adequado. Tendo em vista este objetivo várias patentes abordam a utilização de kits com antígenos homólogos (*T. solium*) MXPA02004417A ou heterólogos (*T. crassiceps*) BRPI0504527 e US005874251 para o diagnóstico da cisticercose.

15 Os extratos antigênicos totais são amplamente utilizados em estudos soropidemiológicos em áreas endêmicas, mas a identificação e purificação de glicoproteínas são o principal objetivo da maioria dos estudos sorológicos no diagnóstico da NC (BUENO EC et al. Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-  
20 linked immunosorbent assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72:278-283, 2005), uma vez que o uso de diferentes extratos antigênicos totais da forma metacestódea de *T. solium* (extrato salino total, líquido de vesícula e extrato alcalino total) resultam em diferenças significantes nos testes imunológicos (COSTA JM. Teste imunoenzimático (ELISA) no  
25 diagnóstico da neurocisticercose. Estudo de diferentes extratos antigênicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e líquido cefalorraqueano. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 44:15-31, 1986).

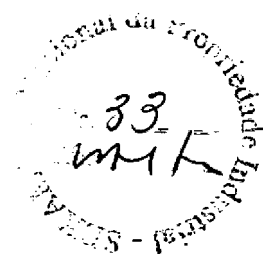
Várias técnicas de purificação já foram descritas, nas quais as taxas de sensibilidade e especificidade ficaram próximas a 100% (ASSANA E et al.  
30 Isolation of a 14 kDa antigen from *Taenia solium* cyst fluid by HPLC and its evaluation in enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of porcine



cysticercosis. *Research in Veterinary Science*, 82:370–376, **2007**; SATO MO. et al. Evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 194:1783-1790, **2006**).

5 O uso de peptídeos purificados tem demonstrado ótimos resultados nas diversas áreas de imunodiagnóstico, onde estão sendo considerados excelentes candidatos a antígenos pelos altos índices de sensibilidade e especificidade, além de demonstrarem pouquíssima reatividade cruzada. Com isso, peptídeos sintéticos vêm ser uma área de pesquisa promissora tanto  
10 para uso em testes imunológicos quanto no desenvolvimento de vacinas (FERRER E et al. Molecular cloning and characterisation os Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152:90-100, **2007**; SAKO Y. et al. Recombinant antigens for serodiagnosis of cysticercosis and  
15 echinococcosis. *Parasitology Internacional*, 55:569-573, **2006**).

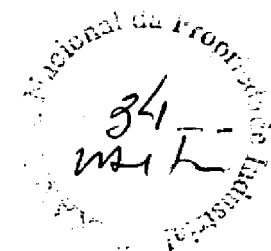
Nos últimos anos vários pesquisadores têm testado novas técnicas para diagnosticar a NC: um teste de co-aglutinação (CO-A) foi utilizado para detecção de antígenos de metacestódeos de *T. solium* na urina de pacientes com NC, encontrando sensibilidade e especificidade moderadas (PARIJA M et  
20 al. Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. *Acta Tropica*, 92:253-260, **2004**), uma proteína de 10 kDa recombinante de *T. solium* expressada em uma bactéria foi utilizada para diagnosticar esta doença por immunoblot (LEE EG et al. Feasibility of baculovirus-expressed recombinant 10-kDa antigen in the serodiagnosis of  
25 *Taenia solium* neurocysticercosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99:919-926, **2005**, ), insertos de cDNA clonados e purificados foram utilizados para detecção de NC ativa através do teste ELISA com amostras de soro e LCR, obtendo alta sensibilidade e especificidade  
30 (FERRER E et al. Molecular cloning and characterisation os Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152:90-100, **2007**),



antígenos de *T. saginata* foram testados como alternativa para o diagnóstico da NC humana, obtendo resultados bastante satisfatórios (OLIVEIRA HB et al. Application of *Taenia saginata* metacestodes as alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. Parasitology Research, 101:1007-1113, **2007**), e frações obtidas pela purificação do extrato salino de *T. solium* através do Triton X-114 foram avaliadas no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana, encontrando resultados satisfatórios (MACHADO GA et al.. Assessment of antigenic fractions of varying hydrophobicity from *Taenia solium* metacestodes for the diagnosis of human neurocysticercosis. Tropical Medicine and International Health, 12:1-8, **2007**); outros autores têm testado antígenos variados para o diagnóstico de NC pelo teste *Dot Blot* (MANDAL J et al. Evaluation of lower molecular mass (20-24 kDa) *Taenia solium* cysticercus antigen fraction by ELISA and dot blot for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. Parasitology Research, 102:1097-1101, **2008**).

Várias patentes descrevem diferentes técnicas para diagnóstico da NC com diversos antígenos totais ou fracionados, assim como proteínas purificadas. A patente US4801532 se refere a um teste para detecção de NC ativa tanto em soro quanto em amostras de LCR. Já as patentes US2006264614 e CA2526023 sem referem á proteína T 24 purificada para detecção de cisticercose e NC. A patente US5354660 trata da utilização das glicoproteínas (GP) GP50, GP42, GP24, GP21, GP18, GP14 e GP13 no diagnóstico de NC através da técnica de immunoblot. A patente CA1340196 trata da utilização de proteínas escretadas/secretadas de *Cysticercus cellulosae* no imunodiagnóstico da NC

A utilização de marcadores moleculares tem sido amplamente estudada com o objetivo de definir padrões de diversidade genética e variação interespecífica para *Taenia* sp e aprimorar os marcadores de diagnóstico e peptídeos para vacinação (HOBERG EP. *Taenia* tapeworms: Their biology, evolution and socioeconomic significance. Microbes and Infection, 4:859-866, **2002**).



O interesse imediato na aplicação terapêutica da imunidade da NC concentra-se em estimular o sistema imune contra os antígenos do parasito, na busca da produção de uma vacina a patente CN1314184 relata a utilização de extrato de *Cisticercus cellulosae* na vacinação de suínos, esta resultou em uma taxa de proteção de 94 %, além de ser segura e sem toxicidade. Já a patente CN1231339 se refere a uma vacina de ácidos nucleicos para prevenção e cura da cisticercose humana e suína, esta se constitui de um plasmídeo de expressão com três genes do cisticerco com capacidade protetora (cC1, cC3 e cC4) além de uma unidade de expressão relacionados aos genes do IFN gama e IL-5 suínos, a vacina se mostrou eficaz protegendo contra cisticercose humana e suína.

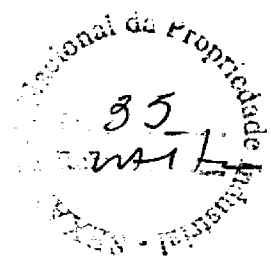
A patente CN1634596 se refere a uma vacina constituída de um vírus da hepatite B como carreador com um inserto de um gene do cisticerco com capacidade protetora em múltiplos locais entre o primeiro e o aminoácido 183, este gene foi expresso e a proteína por ele expressa purificada resultando numa vacina capaz de prevenir a cisticercose suína.

As patentes US6306365-B1, US6296832-B1, US6068829-A referem-se à identificação de peptídeos ligantes a diversos órgãos do corpo humano isolados pela injeção de bibliotecas de peptídeos em pessoas vivas. Esses peptídeos podem ser usados no diagnóstico de diferentes patologias.

As patentes WO9946284-A; EP1062232-A; WO9946284-A2; AU9930783-A; EP1062232-A2; US6174687-B1; US6232287-B1; JP2002506079-W; AU762991-B; US6610651-B1; US6784153-B1; US2005074812-A1; US6933281-B2 relatam o uso de bibliotecas administradas em camundongos vivos para isolar peptídeos ligantes a diversos órgãos.

A patente US2008124277 relata a utilização de peptídeos obtidos por bibliotecas como agentes de entrega de fármacos para inibição de angiogênese e crescimento tumoral e indução de apoptose.

As patentes US7083945, US2006068421, US2005202512, GB2408332 , US2003104604, EP1452599, US2006035223 utilizam a técnica de Phage Display com o intuito de expressar polipeptídeos recombinantes com afinidade

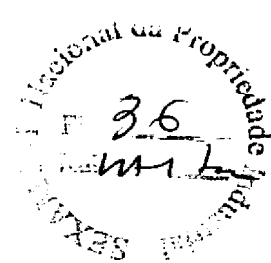


para o ligante, além de propor metodologias que tornam a técnica mais eficiente.

*Phage display* é uma técnica eficiente para identificar peptídeos ou proteínas que se ligam a outras moléculas com diversas finalidades, como identificação de peptídeos ligantes a outras moléculas. A tecnologia é baseada no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de fagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressado fica exposto na superfície da partícula fusionado a uma proteína endógena.

A tecnologia *Phage Display* pode beneficiar diagnósticos através da identificação de moléculas atualmente impossíveis de se obter por métodos tradicionais. Anticorpos recombinantes contra antígenos tóxicos ou seqüências conservadas e carboidratos podem ser isolados (Soderlind E et al., Recombining germLinederived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nature Biotechnology* 18: 852–856, 2000). A vantagem crucial dessa tecnologia está na ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas (Azzazy HM et al. *Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clinical Biochemistry* 35:425-45, 2002).

Esta técnica foi desenvolvida por George Smith em 1985, que expressou pela primeira vez a enzima de restrição *EcoRI* como uma fusão da proteína (pVIII) do capsídeo do fago. Utiliza-se o bacteriófago M13 (Sidhu SS *Engineering M13 for phage display. Biomolecular engineering* 18: 57-63, 2001), um vírus bacteriófago filamentosos que infecta bactérias gram-negativas que por sua vez apresentam *pilus F* (Rodi DJ, Makowski L. *Current Opinion in Biotechnology* 10:87-93, 1999). A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX). Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes

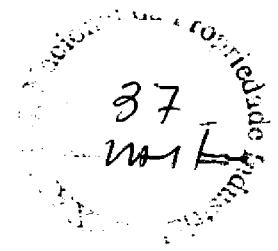


dessas duas proteínas da capa protéica do fago (Brígido MM, Maranhão AQ. Bibliotecas Apresentadas em fagos Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 26:44-55, 2002). Assim, o peptídeo é expresso na extremidade N-terminal da pIII ou pVIII.

5 As seqüências de DNA de interesse são inseridas em uma localização no genoma de bacteriófagos filamentosos, de modo que a proteína codificada é expressa na superfície do fago filamentoso como um produto de fusão a uma das proteínas da superfície do fago (Azzazy HM. et al. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clinical Biochemistry  
10 35:425-45, 2002). O peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago possibilita a seleção de seqüências baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (Parmely SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. Gene 73:305-318, 1988).

15 Através da técnica de Phage display epítomos da região N-terminal de TPmy (paramiosina de *T. solium*), que são altamente imunogênicos nesta molécula, foram mapeados. Utilizando diferentes métodos de seleção e eluição, identificaram peptídeos com homologia à proteína em questão, sugerindo a identificação de um epítipo linear e descontínuo, com prováveis  
20 propriedades de determinantes imunodominantes, reveladas análises computacionais de antigenicidade (GAZARIAN KG et al. Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. Immunology Letters, 42:191-195, 2000). Esta técnica tem sido utilizada no entendimento de doenças provocadas por vírus, bactérias, protozoários e parasitos e a interação entre  
25 seus antígenos e a resposta imune do hospedeiro, na busca de mapear epítomos ou desenvolvimento de vacinas.

Esta metodologia tem se mostrado útil não apenas para o mapeamento de interações proteína-proteína como na identificação de moléculas alvo importantes para o desenvolvimento de vacinas e drogas contra parasitos  
30 como *Plasmodium* sp, causador de malária e *Brugia malayi*, causadora de filariose linfática (LANZILLOTTI R, COETZER TL. Phage display: a useful tool



for malaria research? Trends in Parasitology, 24:18-23, **2008**; GNANASEKAR M et al. novel small heat shock protein 12.6 (HSP12.6) from *Brugia malayi* functions as a human IL-10 receptor binding protein. Molecular & Biochemical Parasitology, 159:98-103, **2008**), assim desenvolvendo veículos de entrega de vacinas por si próprios (BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. Biotechnology Advances, 19:1-33, **2001**).

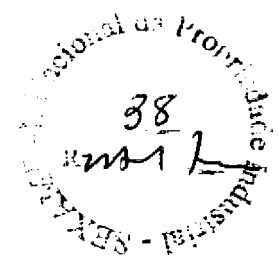
A capacidade de fagos recombinantes na entrega de antígenos para a vacinação contra cisticercose suína foi testada, demonstrando uma capacidade protetora desta vacina contra a doença (MANOUTCHARIAN, K et al. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 99:11–24, **2004**),.

Antígenos de *T. crassiceps* de um biblioteca de cDNA foram isolados e avaliados no diagnóstico da NC, foram obtidos 3 clones que reconheceram anticorpos presentes no LCR e soro de paciente com NC confirmada (ROBLES, Y. et al Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cDNA library and evaluation of their use for use for diagnosis of Neurocysticercosis. Clinical Immunology, v.116, p. 265 – 270, **2005**).

A seleção por afinidade de peptídeos de bibliotecas de fagos utilizando LCR de pacientes foi sugerida como uma ferramenta atrativa para o desenvolvimento de novos reagentes para um teste diagnóstico simples e sensível e para o entendimento dos mecanismos moleculares da patogênese da NC (MANOUTCHARIAN, K et al., Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. Clinical Immunology, United States, v. 91, n.1, p. 117–121, **1999**).

Vistas as dificuldades dos testes sorológicos, têm sido desenvolvidas nos últimos anos bibliotecas de peptídeos randômicos expressos na superfície de fagos, aumentando o interesse desta técnica (*Phage display*) como fonte de identificação de um grande número de epítomos e mimetopos.

A aplicação de bibliotecas de peptídeos em fagos para a identificação de anticorpos específicos ao nível de aminoácidos traz informações importantes

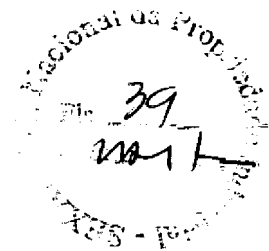


sobre mecanismos moleculares de doenças e ainda possibilita novas ferramentas úteis no diagnóstico. Uma vez que esta estratégia não requer informações detalhadas sobre o antígeno natural, é possível identificar agentes responsáveis por doenças com etiologia obscura utilizando apenas o soro do paciente e uma biblioteca de peptídeos.

Várias aplicações das bibliotecas de peptídeos randômicos expostos em fagos têm sido realizadas com sucesso, tais como mapeamento de epítomos, desenvolvimento de vacinas e identificação de peptídeos miméticos de ligantes não peptídicos e, preparação de anticorpos monoclonais pela utilização de bibliotecas de fagos geradas pela imunização in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC); estudo de interações proteína-proteína, além da utilização de fagos como veiculadores na entrega de drogas contra células cancerosas (HOF D, HOEKE MO, RAATS JMH. Multiple-antigen immunization of chickens facilitates the generation of recombinant antibodies to autoantigens. *Clinical and Experimental Immunology*, 151:367–377, **2007**; BAIR CL et al. A phage display system designed to detect and study protein-protein interactions. *Molecular Microbiology*, Article in press, **2008**; MATSUMOTO SE et al. A rapid and efficient strategy to generate antigen-specific human monoclonal antibody by in vitro immunization and the phage display method. *Journal of Immunological Methods*, Article in press, **2008**; BAR H, YACOBY I, BENHAR I. Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines. *BMC Biotechnology*, 8:37-50, **2008**).

As vantagens da utilização da técnica são a habilidade de selecionar ligantes de alta afinidade, a possibilidade de produzir proteínas solúveis, o baixo custo, o fácil manuseio e a rapidez (SMITH GP, PETRENKO VA. Phage display. *Chemical Reviews*, 97:391-410, **1997**).

*T. solium* ainda não está bem caracterizada a nível molecular e esta nova técnica (phage display) pode definir epítomos que podem ser utilizados para detecção de anticorpos presentes em amostras de pacientes com NC, para se desenvolver um teste imunodiagnóstico simples e sensível, além de prover informações sobre os mecanismos moleculares da doença



(MANOUTCHARIAN K et al. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. *Clinical Immunology*, 91:117–121, 1999).

Na busca de uma metodologia rápida, eficiente e capaz de fornecer um diagnóstico mais acurado da NC, bem como a utilização de ligantes específicos como carreadores de substâncias, a presente invenção propõe o uso da técnica de *Phage Display* para a identificação e seleção de peptídeos ligantes específicos a IgG de pacientes com NC, determinando motivos protéicos funcionais, através da interação de bibliotecas de peptídeos apresentados na superfícies de fagos filamentosos com proteínas da parasito. Em combinação com outras tecnologias faz com que essa invenção seja prontamente aceita, pois a nova tecnologia apresenta alta sensibilidade e flexibilidade de utilização em relação a outras tecnologias vigentes para identificação de novos marcadores para diagnóstico, monitoramento, prognóstico e no uso como carreadores de drogas para tratamento do câncer, bem como outras patologias.

Sabendo-se que existem atualmente poucos marcadores e com baixa eficiência para diagnósticos faz-se necessário o desenvolvimento de novos biomarcadores mais confiáveis, rápidos e precisos que auxiliarão no diagnóstico, prognóstico e tratamento da NC e outras patologias.

Dessa forma, a presente invenção propõe o uso de seqüências peptídicas, fusionadas ou não, a carreadores, tais como fagos filamentosos, fármacos, ou a qualquer outro tipo de carreador e sua utilização na detecção e identificação de IgG de pacientes com NC para testes de diagnóstico.

A invenção poderá ser melhor compreendida através da descrição detalhada mediante os exemplos para os resultados experimentais obtidos. Os procedimentos experimentais envolvidos estão detalhados na seqüência. A metodologia empregada para a seleção, caracterização e utilização de peptídeos recombinantes e motivos protéicos que interajam com IgG presentes no soro de pacientes com NC foi aplicada em diferentes amostras de soro de pacientes com NC, outras parasitoses e aparentemente saudáveis,

comprovando a eficiência da sua utilização para diagnóstico de pacientes com NC.

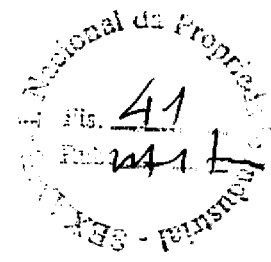
### **Exemplo 1:**

Este exemplo se refere à seleção e a caracterização dos peptídeos recombinantes e motivos protéicos que se ligam a Imunoglobulinas G de pacientes com NC. Diversos parâmetros podem ser utilizados para indicar o sucesso da seleção de cada peptídeo, como pode ser visualizado na TABELA 1. Esses mesmos parâmetros foram anteriormente utilizados (Rodi DJ et al. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide Phage Display Libraries. Journal of Molecular Biology 322: 1039-1052, 2002).

A TABELA 1 apresenta a identidade das seqüências de aminoácidos selecionadas, bem como as suas respectivas freqüências observadas (FO); freqüências esperadas (FE), que correspondem à probabilidade da seqüência randômica; amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à freqüência esperada dos peptídeos na biblioteca original; grau de informação de cada peptídeo ( $I(m)$ ), que é dado por  $-\ln$  (probabilidade de seqüência randômica); e o número provável de clones independentes dentro da biblioteca ( $\lambda$ ). Quanto maior o grau de informação, mais efetiva foi a seleção do peptídeo, conseqüentemente, mais raro ele é na biblioteca.

**TABELA 1**

Peptídeos	FO	FE	Amplificação	$I(m)$	$\lambda$
Seq. ID Nº 1	0.010	$1,37 \times 10^{-14}$	$7,3 \times 10^{10}$	31.92	0.00003
Seq. ID Nº 2	0.010	$9,3 \times 10^{-15}$	$1 \times 10^{12}$	32.31	0.00002
Seq. ID Nº 3	0.010	$4 \times 10^{-17}$	$2,4 \times 10^{13}$	37.75	0.00000008
Seq. ID Nº 4	0.010	$1,4 \times 10^{-13}$	$7,2 \times 10^9$	29.61	0.0003
Seq. ID Nº 5	0.010	$1,5 \times 10^{-15}$	$6,7 \times 10^{11}$	34.14	0.000003
Seq. ID Nº 6	0.010	$9,5 \times 10^{-15}$	$1 \times 10^{12}$	32.28	0.00002
Seq. ID Nº 7	0.010	$8,8 \times 10^{-14}$	$1,1 \times 10^{10}$	30.06	0.0002
Seq. ID Nº 8	0.010	$2 \times 10^{-12}$	$4,9 \times 10^8$	26.92	0.004



**continuação TABELA 1**

Seq. ID Nº 9	0.89	$5,4 \times 10^{-11}$	$1,6 \times 10^9$	23.63	0,2
Seq. ID Nº 10	0.010	$4,5 \times 10^{-13}$	$2,1 \times 10^9$	28.41	0.0009

Foram obtidos 10 clones com seqüências distintas (Seq. ID Nº<sup>os</sup> 1 a 10), sendo que todos eles apresentaram alto grau de informação. Peptídeos que exibem alto grau de informação são menos prováveis de ocorrer ao acaso do que aqueles que possuem baixo nível de informação (Rodi DJ et al. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide Phage Display Libraries. Journal of Molecular Biology 322: 1039-1052, 2002).

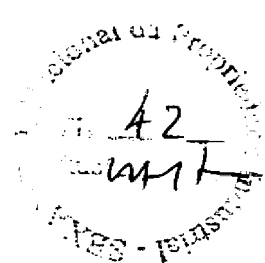
O elevado grau de informação de cada peptídeo selecionado obtido pelas análises de bioinformática validam os dados de biopanning e comprovam a eficiência da técnica de Phage Display.

Observou-se, ainda, que houve um grande enriquecimento de todos os peptídeos selecionados em relação as suas freqüências esperadas na biblioteca de fagos, sugerindo que são específicos para neurocisticercose.

Com a possibilidade de ligação dos peptídeos com alguma molécula tumoral no sentido carboxi terminal para amino terminal nós também analisamos as seqüências no seu sentido reverso, identificadas como Seq. ID 11 ao Seq. ID 20. Por exemplo, a Seq. ID Nº 1 tem a seqüência inversa Seq. ID Nº 11, a Seq. ID Nº 2 possui a seqüência inversa Seq. ID Nº 12, a assim sucessivamente, até a Seq. ID Nº 10 que possui a seqüência inversa Seq. ID Nº 20 como apresentado da TABELA 2.

**TABELA 2**

Peptídeo	Seqüência invertida
Seq. ID Nº 1	Seq. ID Nº 11
Seq. ID Nº 2	Seq. ID Nº 12
Seq. ID Nº 3	Seq. ID Nº 13
Seq. ID Nº 4	Seq. ID Nº 14



**continuação TABELA 2**

Seq. ID Nº 5	Seq. ID Nº 15
Seq. ID Nº 6	Seq. ID Nº 16
Seq. ID Nº 7	Seq. ID Nº 17
Seq. ID Nº 8	Seq. ID Nº 18
Seq. ID Nº 9	Seq. ID Nº 19
Seq. ID Nº 10	Seq. ID Nº 20

**Exemplo 2:**

Este exemplo refere-se as seqüências protéicas dos peptídeos selecionados que apresentaram similaridade com algumas proteínas de diversas espécies do gênero *Taenia*, dentre elas as mais importantes e freqüentes: *T. solium* e *T. saginata*, que estão presentes no banco de dados.

A TABELA 3 apresenta o alinhamento das seqüências protéicas dos peptídeos selecionados mostrando as homologias encontradas com as principais proteínas relacionadas às espécies de *T. solium* e *T. saginata* no banco de dados do GeneBank pelo BLAST, com os números de acesso que obtiveram similaridade com os clones selecionados.

**TABELA 3**

Peptideo	Potenciais antígenos	Acesso Banco
Seq. ID Nº 1	<p><b>1)</b> Proteína ligante de cálcio precursora de calreticulina [<i>T. solium</i>]</p> <p><b>2)</b> ATP sintase F0 subunidade 6 [<i>T. solium</i>]</p> <p><b>3)</b> ATPase subunidade 6 [<i>T. saginata</i>]</p> <p><b>4)</b> c-jun [<i>T. solium</i>]</p> <p><b>5)</b> Citocromo C subunidade 1 [<i>T. solium</i>]</p>	<p><b>1)</b> gb AAK52725.1 AF340232_1</p> <p><b>2)</b> ref NP_659229.1 </p> <p><b>3)</b> dbj BAC98841.1 </p> <p><b>4)</b> gb AAS88553.1 </p> <p><b>5)</b> dbj BAE53694.1 </p>

**continuação TABELA 3**

Seq. ID Nº 2	1) Proteína de oncosfera ativada TSO45-2A [ <i>T. solium</i> ]	1) dbj BAC98841.1
	2) TSO45-B9 [ <i>T. solium</i> ]	2) b AAM88226.1 AF523868_1
	3) TSO45- B10 [ <i>T. solium</i> ]	3) b AAM88221.1 AF523830_1
	4) TSO45-B3 [ <i>T. solium</i> ]	4) b AAM88229.1 AF523871_1
	5) TSO45-B2 [ <i>T. solium</i> ]	5) b AAM88228.1 AF523870_1
	6) TSO45-A2 [ <i>T. solium</i> ]	6) b AAM88223.1 AF523865_1
	7) TSO45-A3 [ <i>T. solium</i> ]	7) b AAM88217.1 AF523826_1
Seq. ID Nº 3	1) anexina B2 [ <i>T. solium</i> ]	1) gb AAY17503.1
	2) Ts3 protein	2) gb ABY56687.1
	3) Antígeno diagnóstico GP50 [ <i>T. solium</i> ]	3) gb AAP49284.1
	4) Antígeno diagnóstico precursor GP50c [ <i>T. solium</i> ]	4) gb AAP49288.1
	5) Antígeno diagnóstico Antígeno diagnóstico GP50 b [ <i>T. solium</i> ]	5) gb AAP49287.1
Seq. ID Nº 4	1) Paramiosina [ <i>T. solium</i> ]	1) gb AAT94289.1
	2) c-jun [ <i>T. solium</i> ]	2) gb AAS88553.1
Seq. ID Nº 5	1) Citocromo C subunidade III [ <i>T. saginata</i> ]	1) ref YP_001527634.1
	2) Citocromo C subunidade III [ <i>T. solium</i> ]	2) b AAK52959.1 AF367053_1
	3) Proteína de oncosfera Tso31 [ <i>T. solium</i> ]	3) gb ABH07376.1
	4) NADH desidrogenase subunidade 5 [ <i>T. saginata</i> ]	4) ref YP_001527645.1
Seq. ID Nº 6	1) TGTP1 [ <i>T. solium</i> ]	1) gb AAB05911.1
	2) Proteína de oncosfera Tso22b [ <i>T. solium</i> ]	2) gb AAW88552.1
Seq. ID Nº 7	1) Proteína diagnóstica TSES38 [ <i>T. solium</i> ]	1) gb AAM96903.1
	2) c-jun [ <i>T. solium</i> ]	2) gb AAS88553.1

**continuação TABELA 3**

	3) Glicoproteína TSO45W-4B [ <i>T. solium</i> ]	3) gb AAQ83444.1
	4) TSO45W-4B [ <i>T. solium</i> ]	4) b AAM88221.1 AF523830_1
	5) Paramiosina [ <i>T. solium</i> ]	5) gb AAT94289.1
Seq. ID Nº 8	1) ATPase transportadora de Sódio/Potássio subunidade alfa (TNaK1-alpha)	1) sp Q6RWA9 AT1A_TAESO
	2) Antígeno de baixo peso molecular variante 1 [ <i>T. solium</i> ]	2) dbj BAE96729.1
	3) Glicoproteína de 8 kDa precursora de TS18 [ <i>T. solium</i> ]	3) gb AAD51768.1 AF098074_1
	4) Antígeno diagnóstico 8 kDa Ts18 variante 1 [ <i>T. solium</i> ]	4) gb AAM00199.1 AF356330_1
	5) Proteína ligante de cálcio precursora de calreticulina [ <i>T. solium</i> ]	5) gb AAK52725.1 AF340232_1
Seq. ID Nº 9	1) NADH desidrogenase subunidade 1 [ <i>T. solium</i> ]	1) emb CAB77253.1
	2) Citocromo C oxidase subunidade III [ <i>T. solium</i> ]	2) gb AAK52959.1 AF367053_1
	3) ATPase subunidade 6 [ <i>T. saginata</i> ]	3) dbj BAC98841.1
	4) Anexina [ <i>T. solium</i> ]	4) gb AAF64166.1 AF239799_1
	5) Glutathione S Transferase [ <i>T. solium</i> ]	5) b AAM64045.1 AF403222_1
Seq. ID Nº 10	1) c-fos [ <i>T. solium</i> ]	1) gb AAS88555.1
	2) NADH desidrogenase subunidade 5 [ <i>T. saginata</i> ]	2) ref YP_001527645.1
	3) Proteína Ts3 [ <i>Taenia solium</i> ]	3) gb ABY56687.1

Quando se analisou os clones obtidos frente às proteínas do gênero *Taenia* encontramos similaridade com diversas proteínas com várias funções,

várias destas com potencial para alvo de drogas ou vacinas, porém foi dada maior ênfase as proteínas das espécies *T. solium* e *T. saginata*.

Os clones Seq. ID N<sup>o</sup> 4, Seq. ID N<sup>o</sup> 7 tiveram similaridade com c-jun de *T. solium* e Seq. ID N<sup>o</sup> 10 com c-fos, do mesmo parasito. Estas são altamente conservadas com relação a outros genes do parasito, sendo idênticas entre *T. solium* e *T. cracisseps*, estando relacionadas à proliferação e diferenciação celular do parasito e podem influenciar na infecção.

O clone Seq. ID N<sup>o</sup> 1 apresentou homologia com um precursor de calreticulina de uma proteína ligante de cálcio de *T. solium* com função de controlar a homeostasia do cálcio intracelular. Após ser secretada pela célula a calreticulina pode se ligar ao C1q, um subcomponente do sistema complemento, interferindo na ativação da cascata do sistema complemento no local da inflamação pela ligação com C1q, interferindo com o complexo imune associado ao anticorpo.

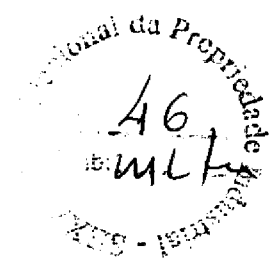
Seq. ID N<sup>o</sup> 3 e Seq. ID N<sup>o</sup> 9 se mostraram semelhantes á proteínas da família das anexinas, associadas com diversos fenômenos relacionados á membrana com transportes, organização e formações de canais iônicos e sua distribuição coincide com o grau de inflamação granulomatosa ao redor.

Seq. ID N<sup>o</sup> 4 e Seq. ID N<sup>o</sup> 7 se mostraram similares a paramiosina, também conhecida como antígeno B, que possui papel importante na sobrevivência do cisticerco já que inibe a fração C1 da cascata do complemento, esta foi identificada como candidata para vacinas contra helmintos .

Seq. ID N<sup>o</sup> 6 se alinhou á TGTP1 de *T. solium*, um transportador de glicose que está na superfície externa das formas adultas e larvais e podem ser candidatos para intervenção contra parasito, estes poderiam ser potenciais alvos para vacinas.

### **Exemplo 3:**

Este exemplo se refere aos testes ELISA para estudo da imunoreatividade dos clones de fagos recombinantes selecionados.



Os níveis de IgG sérica obtidos por ELISA frente aos clones Seq. ID N<sup>o</sup> 1 a Seq. ID N<sup>o</sup> 10, obtidos pelo processo de biopanning, com amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos dos grupos 1 (neurocisticercose n=40); 2 (pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos n=40) e 3 (indivíduos saudáveis n=40) são mostrados nas FIGURAS 1-10, onde a linha horizontal indica o IR=1 e o símbolo %, a positividade.

Na FIGURA 1, para o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 1, 80% (32/40) das amostras foram positivas para o grupo 1, 2,5% (1/40) no grupo 2 e 5 % (2/40) no grupo 3.

Na FIGURA 2, observamos que para o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 2 52,5% (21/40) das amostras foram positivas no grupo 1 e nenhuma (0/40) para os grupos 2 e 3.

A FIGURA 3 mostra a reatividade para o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 3, para o qual 95% (38/40) das amostras no grupo 1 foram positivas e respectivamente 5% (2/40) e 7,5% (3/40) nos grupos 2 e 3.

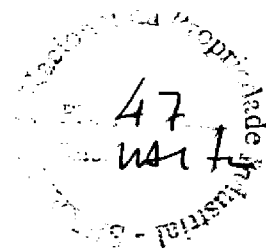
Na FIGURA 4, quando se testou o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 4 observou-se que 97,5% (39/40) das amostras do grupo 1 foram positivas, 15% (6/40) e 10% (4/40) para os grupos 2 e 3, respectivamente.

Com o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 5 , FIGURA 5, foi observada uma positividade de 97,5% (39/40) no grupo 1 e nos grupos 2 e 3 17,5% (7/40) e 10% (4/40), respectivamente.

A FIGURA 6 mostra a positividade para o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 6, o grupo 1 apresentou 70% (28/40) de amostras positivas no grupo 1 e nos grupos 2 e 3, respectivamente, 5% (2/40) e 10% (4/40).

A positividade para o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 7, como mostrado na FIGURA 7, no grupo 1 foi 65% (26/40), nenhuma amostra do grupo 2 foi positiva e no grupo 3 a positividade foi de 7,5% (3/40).

Quando se testou o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 8, 82,5% (3/40) das amostras foram positivas para o grupo 1 e respectivamente, 25% (10/40) e 2,5% (1/40)



nos grupos 2 e 3, como evidenciado na FIGURA 8.

Na FIGURA 9 observa-se que para o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 9, ocorreu uma positividade de 100% (40/40) no grupo 1, 10% (4/40) no grupo 2 e 5% (2/40) no grupo 3.

5 A FIGURA 10 mostra a positividade para o clone Seq. ID N<sup>o</sup> 10, onde 97,5% (39/40) das amostras do grupo 1 foram positivas e 7,5% (3/40) nos grupos 2 e 3.

Os resultados demonstram que os peptídeos foram específicos para o alvo utilizado na seleção. A maioria dos clones apresentou reatividade, embora  
10 com perfis diferenciados entre os fagos. Pela metodologia foi possível confirmar a especificidade da seleção em função da maioria dos clones apresentarem positividade no grupo 1 (Índice de reatividade-IR maior que 1).

Em ensaios de competição, as proteínas presentes no extrato total de metacestódeos de *T. solium* em diferentes concentrações, inibiram a ligação  
15 das IgG aos clones de adsorvidos em placas de poliestireno nos testes ELISA. Os dados demonstram que quantidades crescentes de proteínas do parasito adicionado ao soro interfere a ligação das IgG no momento do reconhecimento dos fagos na placa. O controle negativo utilizado foi vetor sem inserto, representado pelo fago selvagem M13KE e o controle positivo, foi demonstrado  
20 pela adição do pool de soros de pacientes com NC sem adição do antígeno. Estes dados indicam que os peptídeos expressos nos clones de fagos podem ser reconhecidos especificamente pelas IgG presentes no soro de pacientes com NC e estes peptídeos apresentam capacidade de mimetizar os epítomos presentes nas proteínas totais de metacestódeos de *T. solium*. Desta forma, foi  
25 possível demonstrar a inibição da reatividade por ensaios de competição para os clones obtidos.

A TABELA 4 mostra os cálculos da sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico (ED) e Índice de Youden obtidos nos testes ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de  
30 soro, utilizando os clone selecionados.



TABELA 4

Clone	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	ED (%)	IY
Seq. ID N <sup>o</sup> 1	80	96,3	86,7	0,76
Seq. ID N <sup>o</sup> 2	52,2	100	84,2	0,52
Seq. ID N <sup>o</sup> 3	95	93,8	94,2	0,88
Seq. ID N <sup>o</sup> 4	97,5	87,5	90,8	0,84
Seq. ID N <sup>o</sup> 5	97,5	86,5	90	0,83
Seq. ID N <sup>o</sup> 6	70	92,5	85	0,62
Seq. ID N <sup>o</sup> 7	65	96,3	85,8	0,61
Seq. ID N <sup>o</sup> 8	82,5	86,3	85	0,68
Seq. ID N <sup>o</sup> 9	100	92,5	95	0,92
Seq. ID N <sup>o</sup> 10	97,5	92,5	94,5	0,89

Vários autores testaram diferentes antígenos, purificados ou recombinantes, com diferentes índices de sensibilidade e especificidade. Os fagos testados neste trabalho obtiveram sensibilidade e especificidade semelhantes ou superiores àqueles demonstrados por outros autores.

A TABELA 5 mostra a reatividade das amostras de soro de pacientes do Grupo 2 (pacientes infectados com *Taenia* sp. e por outros parasitos) utilizando os clones de fagos selecionados.

Alguns clones (NC<sub>22</sub>, NC<sub>28</sub>, NC<sub>212</sub>, NC<sub>315</sub> e NC<sub>310</sub>) não reagiram com amostras de soro de pacientes infectados com *E. granulosus*, o que demonstra um grande avanço, uma vez que a reatividade cruzada com amostras de soro de pacientes infectados com este parasito são frequentemente relatadas.

O estudo dos indivíduos do Grupo 2, ou seja de indivíduos infectados por *Taenia* sp. e por outras parasitoses, é importante na análise dos dados porque representa a realidade da população, especialmente em nosso país onde as doenças parasitárias são altamente prevalentes. A reatividade cruzada pode estar relacionada à infecções concomitantes ou a presença de anticorpos remanescentes de infecções prévias.

TABELA 5

	ELISA										
	N+ (%)	NC <sub>2</sub> 2	NC <sub>2</sub> 8	NC <sub>2</sub> 12	NC <sub>2</sub> 15	NC <sub>2</sub> 23	NC <sub>3</sub> 10	NC <sub>3</sub> 15	NC <sub>3</sub> 36	NC <sub>4</sub> 1	NC <sub>4</sub> 3
<b>Grupo 2 (n=40)</b>											
Ancilostomídeo (n=5)	0	0	0	2 (40)	2 (40)	1 (20)	0	5 (100)	0	0	
<i>A. lumbricoides</i> (n=5)	1 (20)	0	0	1 (20)	1 (20)	0	0	3 (60)	0	0	
<i>E. vermicularis</i> (n=4)	0	0	1 (25)	1 (25)	3 (75)	0	0	0	1 (25)	1 (25)	
<i>S. stercoralis</i> (n=4)	0	0	1 (25)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	0	1 (25)	1 (25)	1 (25)	
<i>Taenia</i> sp. (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>H. nana</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>E. granulosus</i> (n=4)	0	0	0	1 (25)	0	0	0	1 (25)	2 (50)	1 (25)	
<i>T. trichiura</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. mansoni</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Total</b>	1	0	2	6	7	2	0	10	4	3	

Para melhor compreensão dos exemplos utilizados, segue abaixo uma descrição detalhada dos procedimentos experimentais adotados.

Na obtenção de peptídeos ligantes a IgG presentes no soro de pacientes com NC foram utilizadas 120 amostras de soro divididas em 3 grupos:

- Grupo 1: Amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de neurocisticercose, onde foram utilizadas 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de NC de acordo com os critérios propostos anteriormente (Del Brutto et al. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. Journal of the Neurological Sciences 142:1-6, 1996). Sob tais critérios, um diagnóstico definitivo de NC é realizado de duas maneiras: a primeira é pela presença de um critério absoluto que poderia ser a demonstração histológica do parasito por biópsia, visualização do escólex da forma metacestódea por TC ou RM ou a visualização direta do parasito na subretina através do exame de fundo de olho; e a outra maneira, é



a presença de dois critérios principais, um critério secundário e um critério epidemiológico. Neste estudo os pacientes com diagnóstico definitivo foram selecionados por um critério absoluto que, no presente estudo, foi à visualização por imagem do escólex da forma metacestódea de *T. solium*.

5 - Grupo 2: Amostras de soro de pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos onde o objetivo foi verificar a reatividade cruzada nos métodos imunológicos. Foram utilizadas 40 amostras de soro de pacientes infectados por: *Ancilostomideo* (n=5), *Ascaris lumbricoides* (n=5), *Echinococcus granulosus* (n=4), *Enterobius vermicularis* (n=4), *Hymenolepis nana* (n=4),  
10 *Schistosoma mansoni* (n=4), *Strongyloides stercoralis* (n=4), *Taenia* sp. (n=6) e *Trichuris trichiura* (n=4). As amostras de soro foram colhidas de indivíduos com exames parasitológicos de fezes positivos após a análise de três amostras fecais pelos métodos de HPJ (Hoffmann, WA; Pons, JA; Janer, JL. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. Journal of Public Health Tropical Medicine 9:283-291, 1934) e/ou Baermann (Baermann, S. Eine Einfache Methode zur Auffindung Von Ankylostomum (Nematoden) – Larven in Erdproben. Mededeel mit. h. Geneesk. Lab Weltevredem Feestbundel, Batavia, 41-47, 1917), sendo todas triadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU.

20 - Grupo 3: Amostras de soro controle de indivíduos aparentemente saudáveis, onde foram utilizadas 40 amostras de soro de indivíduos voluntários, assintomáticos, que em três exames parasitológicos de fezes realizados pelo método de HPJ foram negativos para parasitos intestinais e que não tinham história anterior de teníase-cisticercose.

25 Para a purificação das IgG, *pool* de soros de pacientes diagnosticados positivamente para neurocisticercose, outras parasitoses e de indivíduos aparentemente saudáveis foram utilizados.

A purificação de imunoglobulinas foi realizada através de *beads* magnéticos a partir de 100 µl do pool de soro de pacientes com NC.

30 Foram colocados em um eppendorf 100 µl de *beads* de proteína G, que foram lavados 3 vezes com tampão MES 0,1 M, pH 5,0; em seguida 100 µl do

pool de soros foi acrescentado, e incubado sob agitação por 30 minutos. Em seguida os beads foram lavados com tampão MES e a eluição se deu com a adição de 30  $\mu$ l de tampão citrato 0,1 M pH 2,0, no separador magnético o sobrenadante foi retirado com as imunoglobulinas G (IgG) remanescentes. O pH foi neutralizado com 1:3 de tampão Tris (1 M) pH 9,1.

Estimou-se a quantidade de anticorpos obtida pelo método de detecção e quantificação de proteínas (Johnstone, AP; Thorpe, R. *Immunochemistry in practice*. Blackwell Science, 318 p., 1987) onde a Concentração da amostra = Absorbância à 280 nm X Fator de diluição/ coeficiente de extinção à 280nm (1,36 para IgG).

O mesmo procedimento foi realizado para a purificação de anticorpos de pacientes com outras parasitoses intestinais e indivíduos aparentemente saudáveis.

Para eluição dos fagos específicos às IgG de pacientes com NC, foi utilizado o extrato total de metacestódeos de *T. solium* para a preparação foram utilizados 50 metacestódeos íntegros ou rompidos de *T. solium* para o preparo do extrato salino total (S) (Costa, JM. *Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. Estudo de diferentes extratos antigênicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e líquido cefalorraqueano. Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 44:15-31, 1986). Os metacestódeos foram triturados em graal e ressuspendidos em 2,5 mL de água destilada e em seguida a mistura foi submetida a homogeneizador de tecidos (Glas Col®, USA) por cinco ciclos de 1 minuto cada, em banho de gelo, e posterior tratamento de ultra-som (Thornton, Impec Eletrônica, São Paulo, Brasil) a 40 kHz por quatro ciclos de 30 segundos cada em banho de gelo. Após isotonização com 2,5 mL de solução de NaCl (0,3 M), foram empregados mais três ciclos de ultra-som. Em seguida, a mistura foi submetida a 4°C por duas horas sob agitação lenta e posteriormente centrifugada a 12.400 x g (Du Pont Sorvall® Products Newton, Conectcut, USA) por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante obtido constituiu o extrato S.

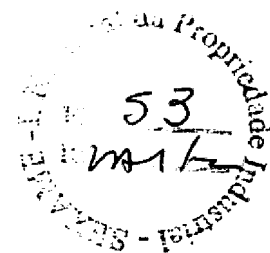
Para a seleção dos peptídeos sintéticos (expressos na proteína III do

capsídeo de fagos filamentosos), reativos com os anticorpos acima descritos, utilizou-se uma biblioteca randômica de peptídeos de 12 aminoácidos (aa) (Ph.D-12 mer- New England Biolabs). O procedimento de seleção foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, com algumas modificações.

5 A sensibilização da placa se deu pela colocação de 150 µl/poço das IgG anteriormente purificadas, a 100µg/ml, diluídas em tampão bicarbonato 0.1 M (pH 8.6 ) com posterior incubação overnight a 4°C, sob agitação lenta em câmara úmida.

10 Em seguida, a placa foi seca batendo a contra papel para remover a solução residual, para a realização do bloqueio da mesma. O bloqueio se deu pela adição de tampão de bloqueio (NaHCO<sub>3</sub> 0,1M, pH 8,6; BSA 5mg/mL) 300 µl/poço, 1 h a 4°C, sob agitação lenta. Após a incubação, lavou-se a mesma por 6 vezes com 200 µl/poço de TBS-T (tris HCl 50mM- pH 7,5, NaCl 150mM – Tween 20 0,1%) por um minuto, sendo secada, em seguida, com papel para  
15 então receber 10 µl da biblioteca de fagos em 90 µl de TBS-T, que foram colocados no poço sensibilizado com IgG de pacientes com outras parasitoses, nos outros poços foi colocado 20 µl de TBS para que estes não ficassem secos.

20 Incubou-se a mistura anticorpo - fago por 1 hora sob agitação lenta à temperatura ambiente e em seguida os fagos não ligados foram transferidos para o poço sensibilizado com IgG de indivíduos aparentemente saudáveis, e em seguida para o poço sensibilizado com IgG de indivíduos positivos para NC, passou-se os fagos por último no poço com a IgG de pacientes com NC para que àqueles que não fossem específicos à doença ficassem ligados nos outros  
25 poços, realizando desta forma seleções negativas. Os fagos não ligantes à IgG de pacientes com NC foram descartados e a placa lavada mais 10 vezes com 200 µl de TBS-T 0,1%, sendo em seguida preparada para a eluição dos fagos ligantes ao soro de pacientes com NC com 100 µl de tampão de eluição (extrato total de metacestódeos de *T. solium* 200 µg/ml em TBS-T) por 40  
30 minutos à temperatura ambiente. O eluato foi transferido para um eppendorf e mantido sob refrigeração.

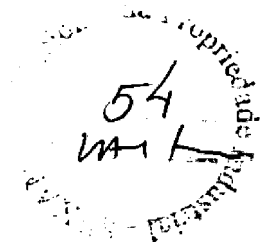


Titulou-se uma pequena quantidade de amostra deste eluato (1  $\mu$ L) e o restante, foi utilizado para re-amplificação, realizada em 20 mL de cultura contendo tetraciclina de *Escherichia coli* (ER 2738) em fase inicial de crescimento ( $OD_{600} \leq 0,3$ ) e incubada por 4,5 horas em agitador com temperatura controlada a 37°C, antes do procedimento de precipitação dos fagos para titulação posterior.

A cultura foi transferida para um tubo de centrifuga e centrifugada (10 minutos, 10.000 rpm, 4°C), as células residuais descartadas e o sobrenadante transferido para um tubo limpo e re-centrifugado. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, onde se adicionou 1/6 do volume de PEG-NaCl (20% peso/volume de polietileno glicol-8000; NaCl 2,5M) e a mistura permaneceu em repouso durante toda noite a 4°C. No dia seguinte, centrifugou-se o precipitado (15 minutos, 10.000 rpm, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o tubo novamente centrifugado, nas mesmas condições anteriores por mais 5 minutos para remoção do sobrenadante residual. O pellet de fagos foi ressuspensionado em 1mL de TBS 1X, transferido para um microtubo e centrifugado (10 minutos, 10.000 rpm, 4°C) para a retirada das células residuais e o sobrenadante transferido para um novo microtubo, para adição de PEG-NaCl (1/6 do volume). Incubou-se a mistura por 1 hora em gelo, com posterior centrifugação (15 minutos, 14.000 rpm, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o tubo re-centrifugado por mais 5 minutos para retirada do sobrenadante residual, e o pellet ressuspensionado em 200  $\mu$ L de TBS 1X e centrifugado por 1 minuto, o sobrenadante foi transferido para outro tubo estando pronto para titulação.

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

Para todas as titulações utilizou-se 1  $\mu$ L dos fagos, diluídos em 9  $\mu$ L do meio de cultura LB. As diluições foram 10<sup>1</sup> à 10<sup>6</sup>, para o eluato e eluato

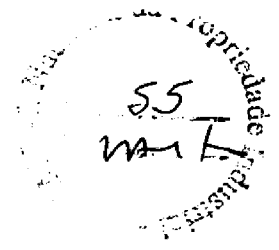


amplificado, os fagos, nos títulos conforme descrito anteriormente, foram incubados com 200  $\mu$ L de *E. coli* (ER 2738) e plaqueados em meio sólido contendo IPTG (0,5mM) e X-gal (40  $\mu$ g/mL), juntamente com 3 mL de Agarose Top (10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 1 g de MgCl<sub>2</sub> . 6 H<sub>2</sub> O/ litro).

Após incubação em estufa por toda noite a 37°C, as colônias azuis (resultantes do sistema de  $\alpha$ -complementação do vetor) foram contadas para a obtenção dos títulos de entrada e saída para todos os ciclos de seleção (número de colônias azuis X fator de diluição).

As colônias que apresentarem coloração azul, demonstrando a quebra do substrato X-gal e a expressão do gene da  $\beta$ -galactosidase dos fungos pelas bactérias ER 2738, foram re-amplificadas separadamente em microtubos para o armazenamento dos clones selecionados. Para isso, adicionou-se as colônias isoladas a 1mL de meio de cultura contendo *E. coli* (ER 2738) em fase de crescimento inicial e tetraciclina, após incubação por overnight a 37°C sob agitação vigorosa, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 segundos, para retirada do sobrenadante da cultura a ser utilizado para a extração de DNA, e posterior armazenamento do pellet juntamente com o mesmo volume de glicerol 50%. Cento e quatorze clones, devidamente identificados foram utilizados para os processos de caracterização descritos abaixo.

Para obtenção de DNA dos fagos foram utilizadas as colônias isoladas e crescidas como descrito anteriormente. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas (10 minutos 10.000 rpm, 4°C), sendo o sobrenadante utilizado para a precipitação com 1/6 do volume de PEG-NaCl (20% polietileno glicol-8000, NaCl 2,5M) por 10 min a temperatura ambiente, o material foi, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 100  $\mu$ L de tampão Iodeto de Sódio (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1mM e NaI 4M), e a precipitação de ácido nucléico foi realizada com adição de 250  $\mu$ L de etanol absoluto, este material foi deixado 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugado por 10 minutos a



14.000 rpm a 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet lavado com etanol 70%, sendo em seguida centrifugado e o pellet ressuspensionado em 20 µL de água mili-Q (Barbas, CF et al. Phage display. A laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

5 A qualidade e quantidade de DNA presente nas amostras foi avaliada por amostragem em gel de agarose 0,8 %.

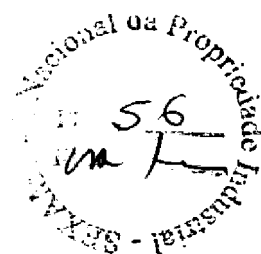
A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit *Big Dye Terminator* (Pharmacia), 3 µL do DNA obtido e 1 µL de Primer universal (96 M13 – 5' HO CCCTCATTAGTTAGCGCGTAACG 3' – Amersham Biosciences),  
10 que amplifica a região de aa codificantes dos peptídeos randômicos fusionados nos fagos M 13 recombinantes.

A reação de amplificação aconteceu em termociclador (Eppendorff). A precipitação do material amplificado se deu acrescentando-se acetato de amônio 4M e etanol absoluto às amostras, seguido de centrifugação por 40  
15 minutos a 14.000 rpm em centrifuga refrigerada e lavagem com etanol 70% com posterior centrifugação por 10 minutos nas condições anteriores. A diluição foi realizada com 10 µL de tampão de corrida apropriado (*Loading buffer*). O sequenciamento se deu utilizando-se o seqüenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

20 A análise das seqüências de DNA provenientes do seqüenciador automático foi processada em software do próprio equipamento (*Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15*). Logo após esta pré-análise, as seqüências dos vetores foram retiradas e somente aqueles insertos com resíduos perfeitos foram traduzidas.

25 Para análise dos dados as seqüências de DNA geradas pelo sequenciamento foram analisadas utilizando-se programas de bioinformática disponíveis on-line.

Para a tradução das seqüências de aminoácidos utilizou-se o programa DNA2PRO12, específico para seqüências de bibliotecas da *New England Biolabs* (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>). Para o cálculo da freqüência  
30 de cada aminoácido presente nos peptídeos seqüenciados e a diversidade dos



mesmos, foi utilizado o programa AAFREQ (<http://relic.bio.anl.gov/aafreqs3.aspx>).

Para calcular a diversidade e a derivação padrão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos utilizou-se o programa DIVAA (5 <http://relic.bio.anl.gov/divaa.aspx>). Foi utilizado o programa MOTIF2 (<http://relic.bio.anl.gov/motif2.aspx>) para a identificação de motivos de três aminoácidos dentro a população de peptídeos que foi selecionada contra IgGs de pacientes com NC.

Os motivos protéicos consenso gerados foram analisados quanto a 10 homologias com proteínas de *Taenia* sp depositadas no GENE BANK pelo programa BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

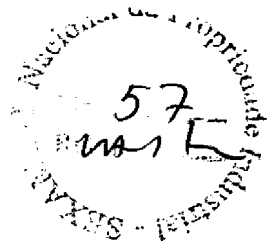
Para encontrar um ponto máximo de similaridade entre toda a população de peptídeo selecionada e uma proteína de interesse envolvida com NC ou 15 com parasito do gênero *Taenia* em especial *T. solium* e *T. saginata* ou uma proteína encontrada no BLAST por homologia, utilizou-se o programa MATCH disponível em <http://relic.bio.anl.gov/match.aspx>.

Para a realização dos testes ELISA os clones considerados mais relevantes, após análise por bioinformática, devido à presença repetida de 20 domínios consenso na população de fagos, foram utilizados.

O procedimento seguiu em linhas gerais, os mesmos parâmetros mencionados para os ensaios anteriores, portanto os clones foram re-amplificados e precipitados com PEG-NaCl, para limpeza do meio de cultura, sendo utilizados os clones NC22, NC28, NC212, NC215, NC223, NC39, 25 NC310, NC336, NC41, NC43 (isolados previamente pelo procedimento de biopanning) tendo como controle negativo em cada placa o fago helper (M13).

Placas de poliestireno (Interlab, Brasil) foram sensibilizadas com o clone a uma concentração de  $1 \times 10^{10}$  diluídos em 100  $\mu$ L de tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6) e incubadas durante toda a noite sob agitação à 4°C.

30 Após três lavagens com PBS acrescido de 0,05% Tween 20 (PBS-T) adicionou-se 300  $\mu$ L de tampão de bloqueio PBS-Tween 20 0,05% - leite



desnatado 5% (PBST-M), sendo a placa incubada por mais 1 hora a 37°C, e em seguida lavada 6 vezes. Após as lavagens as amostras de soro foram adicionadas, diluídas 1: 200 em PBST-M pré adsorvido com partículas virais de fago M13 (selvagem), sendo a placa incubada por 1 hora a 37°C.

5 Lavou-se a placa mais 6 vezes para adição do anticorpo conjugado, anti-IgG humana (IgG, Fc HRP – USBiological), diluídos 1:2000 em PBST-M, com incubação a 37°C por 1 hora. Após as lavagens revelou-se a reação utilizando-se OPD (O-Phenylenediamine dihydrochloroide – Sigma Chemical), num volume final de 100 µL de tampão apropriado contendo H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> e interrompida  
10 pela adição de 25 µL de H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 2 N. A leitura da absorbância foi feita em leitor Multiscan Plus Versão 2.03, com filtro de 492 nm.

Experimentos de inibição foram realizados da mesma forma que o teste ELISA, exceto pela adição de um passo de pré-incubação do soro com proteínas presentes no extrato total de metacestódeos de *T. solium*  
15 previamente á sua incubação na placa, logo após o bloqueio. Concentrações variadas de proteínas totais foram adicionadas na ordem de 0 a 200 µg.

O Índice ELISA (IE) foi calculado utilizando-se a média das três amostras negativas contendo o fago helper (fago sem peptídeo sintético). (IE = densidade ótica de cada amostra/ cut off do helper = média + 2 desvios  
20 padrão). As amostras com IE >1 foram consideradas positivas.

A sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico (ED) e o Índice de Youden (IY) foram determinados (Mineo, JR et al. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. Uberlândia: EDUFU: Editora da Universidade Federal de Uberlândia, 2005. 273p.).

25 A média geométrica dos valores do IR para cada extrato em cada grupo foi calculada utilizando o programa *GraphPad Prism* Versão 4.0 - Windows software.

## REIVINDICAÇÕES

1- PEPTÍDEO LIGANTE A IMUNOGLOBULINAS G PRESENTES NO SORO DE PACIENTES COM NEUROCISTICERCOSE, **caracterizado por** compreender qualquer uma das seqüências Seq ID Nº 1 a Seq ID Nº 10.

5 2- PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por ser usado em processos de imunodiagnóstico para detecção *in vitro* ou *in vivo* como sonda para detectar a presença de moléculas ligantes, como os anticorpos circulantes, que reaja contra componentes ou moléculas envolvidas direta ou indiretamente em doenças tal como a cisticercose, preferencialmente  
10 neurocisticercose.

3- USO DE AO MENOS UM PEPTÍDEO conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** por ser utilizado no diagnóstico *in vitro* de cisticercose, principalmente a neurocisticercose.

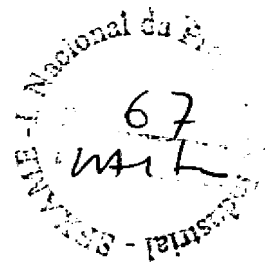


FIGURA 1

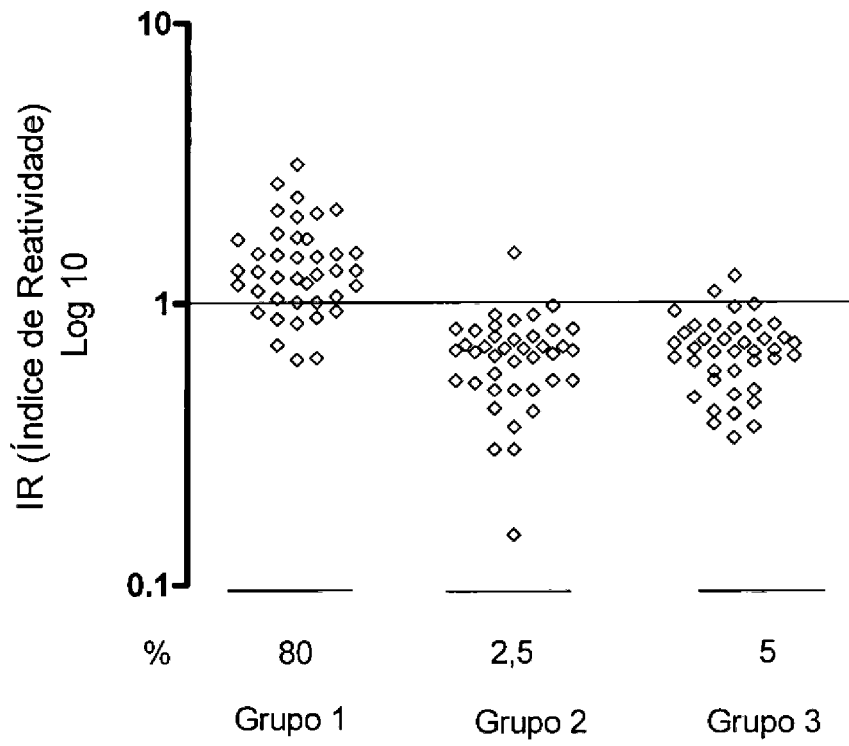


FIGURA 2

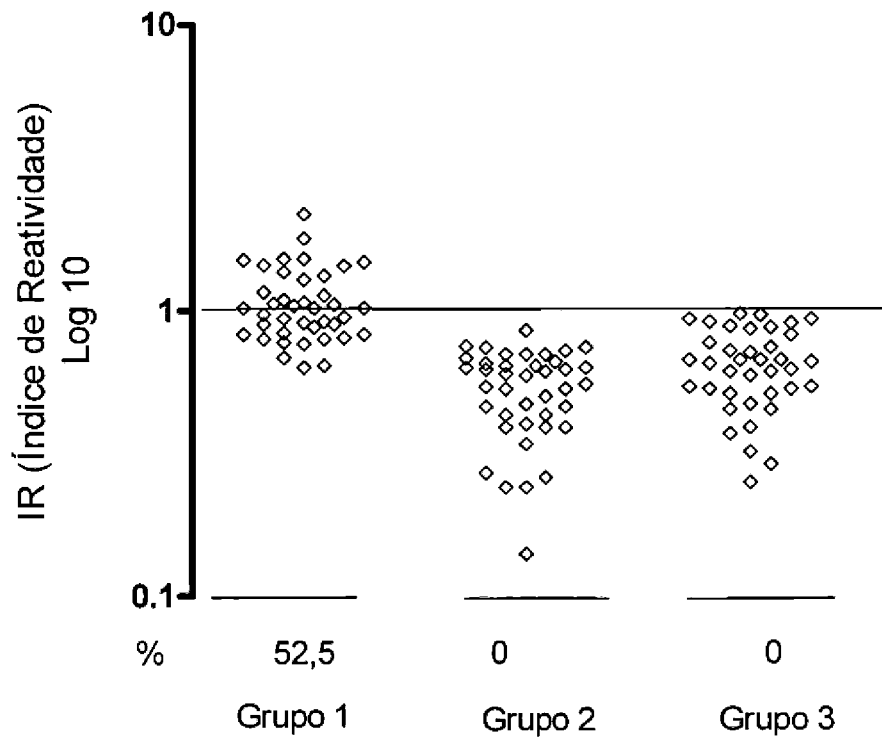




FIGURA 3

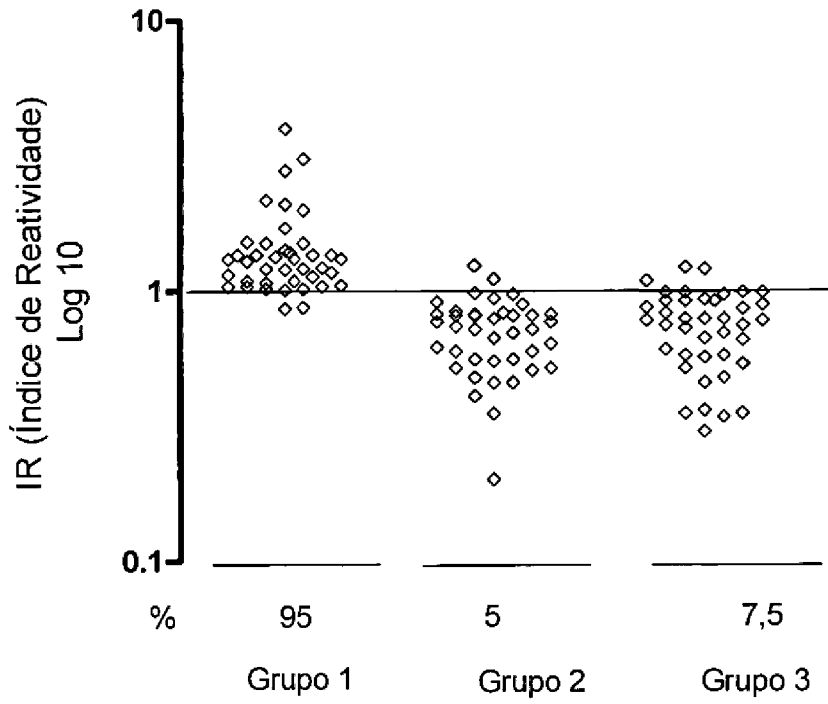


FIGURA 4

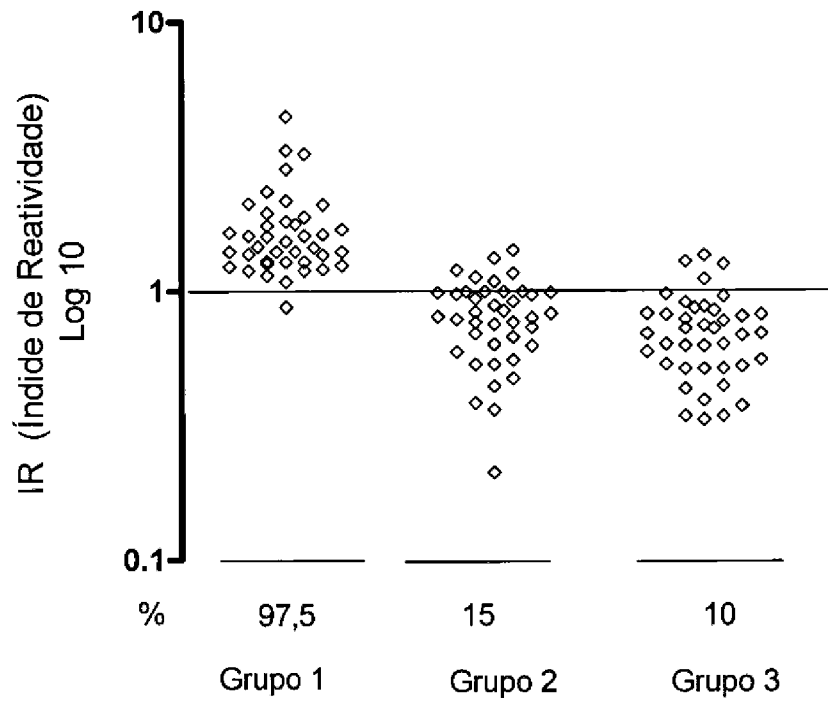




FIGURA 5

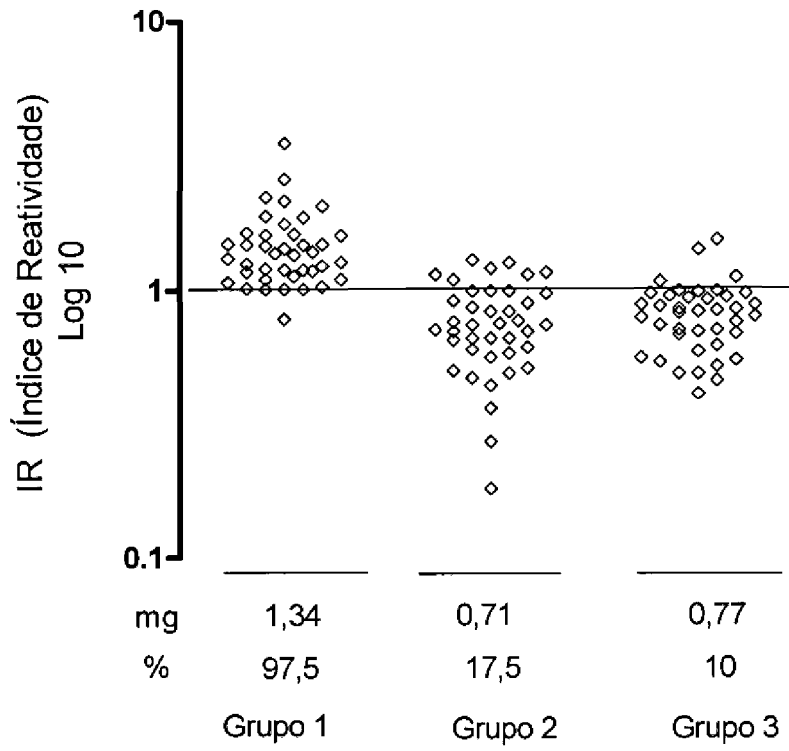


FIGURA 6

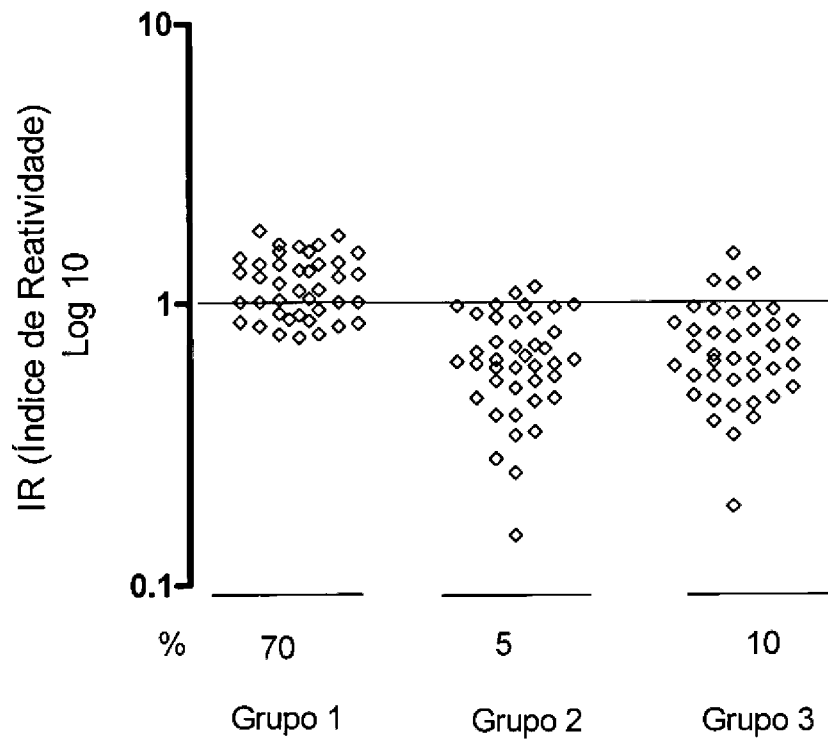




FIGURA 7

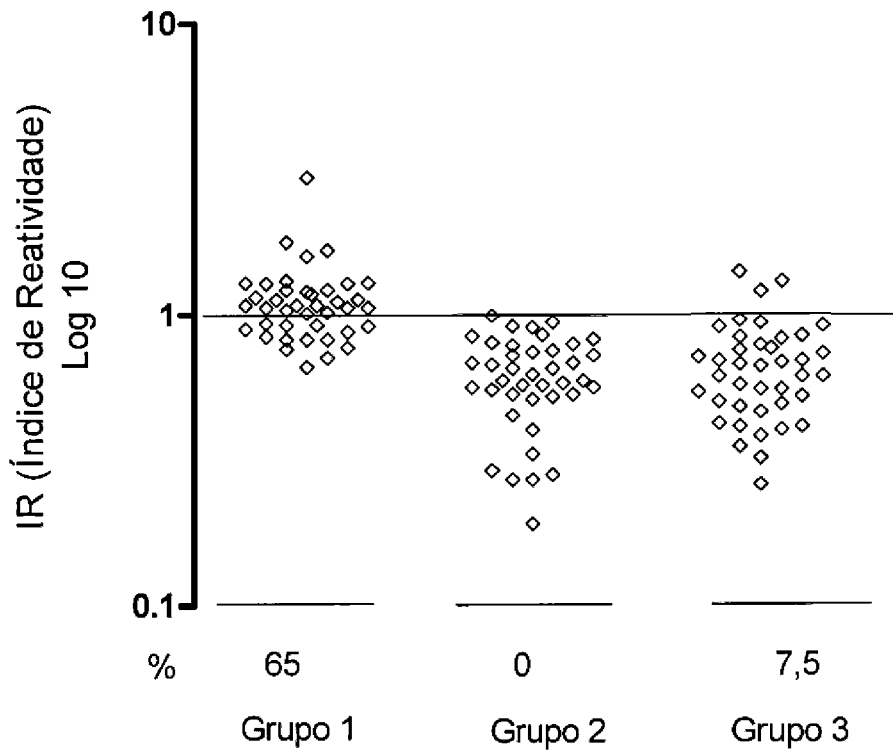
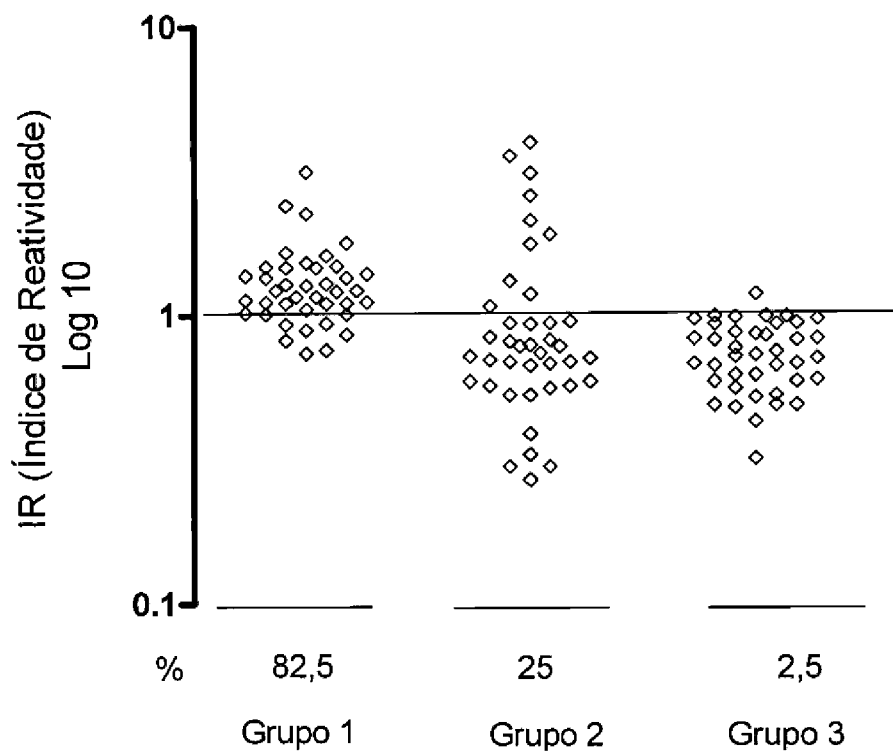


FIGURA 8



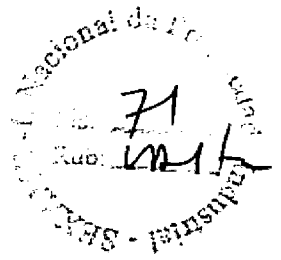


FIGURA 9

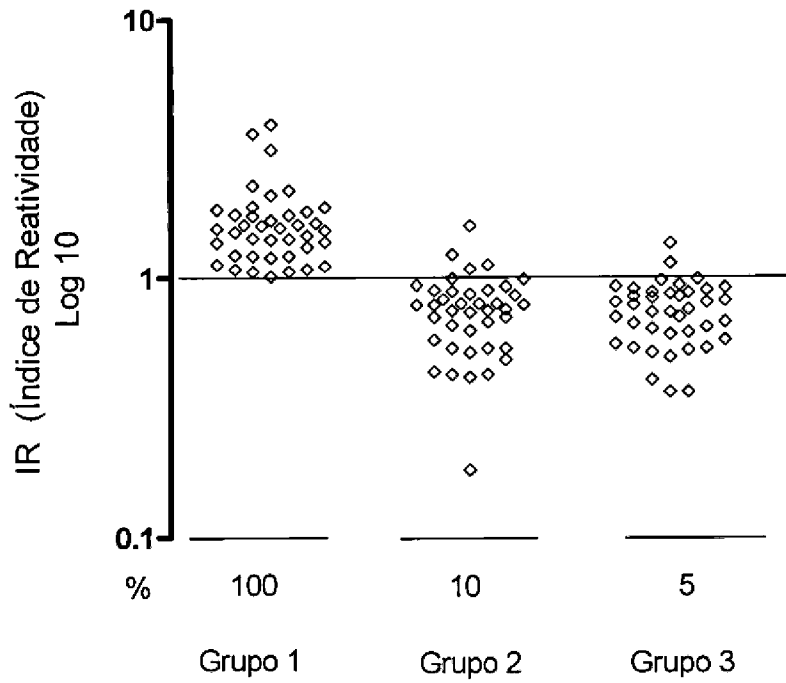


FIGURA 10

