



PHAGE DISPLAY E SUA APLICAÇÃO EM MEDICINA VETERINARIA

Greyciele Rodrigues de Almeida^{1*}, Greice Japolla¹, Ivan Torres Nicolau de Campos², Luiz Artur Mendes Bataus², Guilherme Rocha Lino de Souza²

¹Doutoranda, Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

²Doutor, Docente, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Brasil.

*greycci_almeid@hotmail.com

Recebido em: 08/09/2015 – Aprovado em: 14/11/2015 – Publicado em: 01/12/2015

DOI: http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_208

RESUMO

A expressão de peptídeos na superfície de bacteriófagos (*phage display*) foi descrita inicialmente em 1985. Desde então, moléculas recombinantes diferentes, tais como pequenos peptídeos ou fragmentos de anticorpos são expressos em proteínas externas de fagos, expandindo grandemente as aplicações desta técnica. Diferentes métodos de prospecção permitem o isolamento e caracterização *in vitro* ou *in vivo* de peptídeos ligantes a uma vasta gama de alvos biológicos. Este trabalho teve como objetivo uma revisão dos princípios da técnica de *phage display* e seu potencial como ferramenta importante para a caracterização de biomoléculas e suas aplicações no diagnóstico e na terapêutica de doenças de interesse veterinário.

PALAVRAS-CHAVE: Bibliotecas de peptídeos, diagnóstico, doenças veterinárias, terapêutica.

PHAGE DISPLAY AND THEIR APPLICATION IN VETERINARY MEDICINE

ABSTRACT

The phage display technology was first described in 1985. Since that time, different recombinant molecules, such as small peptides or antibody fragments are displayed on the surface of filamentous phage proteins, expanding greatly the applications of this technique. Different prospection methods allow the isolation and characterization, whether *in vitro* and *in vivo*, of peptides that are reactive to a wide range of biological targets. This paper aims to review the principles of the phage display technique and its potential as an important tool for the characterization of biomolecules and their applications in the diagnosis and therapy of veterinary diseases.

KEYWORDS: diagnosis, peptide library, therapy, veterinary diseases.

INTRODUÇÃO

O *phage display* é uma técnica poderosa para a identificação e seleção de peptídeos, proteínas ou anticorpos com elevada afinidade e especificidade para um alvo específico (SMITH, 1985). A tecnologia influenciou trabalhos e descobertas feitas nos campos da biologia celular, imunologia, farmacologia e descoberta de drogas, além de permitir o estudo das interações moleculares de uma única

molécula ou célula, sem necessidade de qualquer conhecimento prévio sobre a natureza da mesma (HUANG et al., 2012). Essa técnica representa uma poderosa ferramenta para obtenção de moléculas com grande potencial de aplicação biotecnológica (DIAS-NETO et al., 2009).

GEORGE SMITH (1985) utilizou bacteriófagos (vírus de bactéria) geneticamente modificados para expressar sequências de peptídeos na sua superfície, permite ao pesquisador varrer células, tecidos ou órgãos em busca de pares receptores-ligantes (BENHAR, 2001). Os ligantes são os peptídeos identificados que se ligam a receptores presentes no alvo em estudo. Como a informação codificadora da sequência do peptídeo está contida no genoma do bacteriófago, uma única partícula viral ligada a superfície de uma célula ou tecido pode ser recuperada por infecção bacteriana, e o peptídeo responsável identificado (PANDE et al., 2010). Esta revisão descreve a tecnologia de *phage display* e apresenta os últimos avanços desenvolvidos em medicina veterinária a partir da utilização da técnica.

A TECNOLOGIA DE PHAGE DISPLAY

Inicialmente, genes que codificam milhões de proteínas são inseridos no genoma de bacteriófagos gerando uma biblioteca de fagos. Após a inserção os fagos expressam essas proteínas na superfície viral, fusionadas a uma proteína do capsídeo. Uma maior variedade de peptídeos na biblioteca gera uma maior probabilidade de seleção de fagos expondo proteínas que interajam com o alvo-ligante (POSNER et al., 1994).

Em um processo de seleção por afinidade denominado *biopanning*, a biblioteca é então apresentada às moléculas-alvo, que geralmente se encontram imobilizadas em um suporte sólido (placa de imunoensaio, membrana, *beads*, microesfera, etc.) (Figura A). Interações fracas entre os fagos expressando proteínas e o alvo são desfeitas por lavagens sucessivas, enquanto aqueles fagos que expõem moléculas com elevada afinidade pelo alvo são recuperados por eluição. Estes representam o resultado da bioprospecção. (PANDE et al., 2010). A eluição é feita com a utilização de tampões ácidos ou de elevada força iônica, que desestabilizam de modo inespecífico interações entre proteínas (Figura A) (VODNIK et al., 2011).

A próxima etapa é amplificar os fagos eluidos em cultivo bacteriano e submete-los a novos ciclos de seleção (ligação, eluição e amplificação) (Figura A). O processo é monitorado através da titulação dos fagos adicionados (entrada) e recuperados (saída) em cada ciclo, além da realização de imunoensaios. De três a cinco ciclos são suficientes para obtenção de um quantitativo de saída com fagos expondo moléculas com elevada afinidade pelo alvo-ligante. Peptídeos de clones isolados desse quantitativo de saída e podem ser sequenciados e analisados quanto à sensibilidade e especificidade, e eventualmente obtidos na forma não fusionada a um fago (solúvel), sendo destinados a diversas aplicações, tanto em diagnóstico quanto em terapêutica (VODINIK et al., 2011).

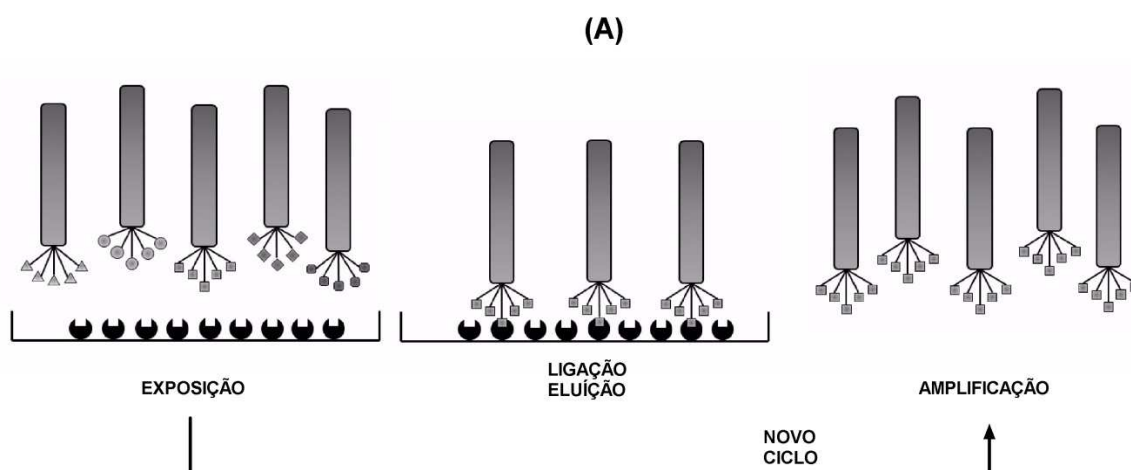


FIGURA A - Representação esquemática de um processo de seleção por *phage display*. Uma biblioteca de peptídeos é exposta ao alvo imobilizado na placa de microtitulação (**EXPOSIÇÃO**). Fagos contendo peptídeos ligantes são selecionados e fagos com baixa afinidade ao alvo são descartados (**LIGAÇÃO**). Fagos ligantes com alta afinidade ao alvo são eluídos da placa (**ELUIÇÃO**). Os clones reativos são amplificados (**AMPLIFICAÇÃO**) em *Escherichia coli* e o processo repetido por vários ciclos. Fonte: Adaptado de NEB, (2011).

VETORES (FAGOS FILAMENTOSOS)

Os bacteriófagos (fagos) são vírus da família *Inoviridae*, gênero *Inovirus*, que infectam bactérias (ICTV, 2014). Os fagos utilizados no *phage display* são filamentosos e infectam enterobactérias como *Escherichia coli*. A utilização de fagos filamentosos como vetores de clonagem tem como vantagens a estabilidade em ampla faixa de pH, de temperatura e ainda podem se acumular em elevada concentração nas células bacterianas infectadas sem causar lise às células (HEMMINGA et al., 2010; PANDE et al., 2010).

O fago filamentoso mais utilizado é o M13 (Figura B). Ele tem uma estrutura em forma de haste flexível com um genoma circular de DNA-fita simples de cerca de 6400 bases, envolta em um capsídeo composto pelas proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. Embora estas cinco proteínas possam ser utilizadas para apresentação de moléculas, pVIII e pIII são as mais empregadas para este fim (BAZAN et al., 2012).

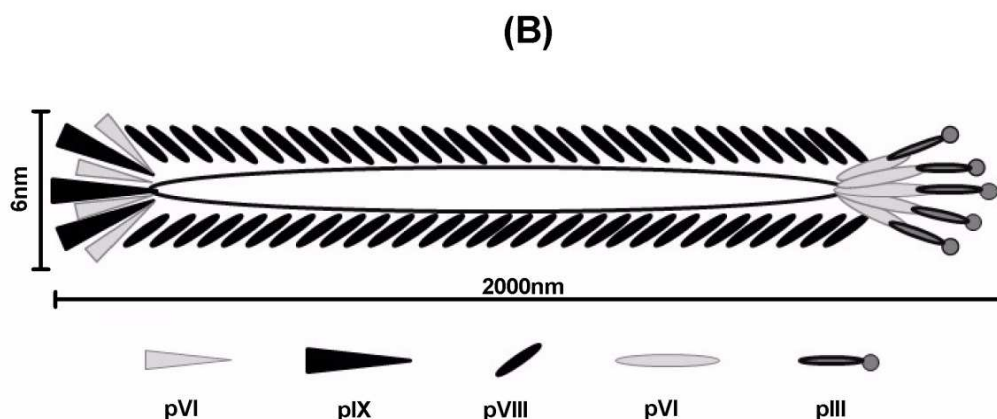


FIGURA B - Representação esquemática do bacteriófago M13. Desenho mostrando as proteínas constituintes da capa proteica do vírus: pIII, pVI, pVIII, pIX e pVII. FONTE: adaptado de KONTHUR & WALTER, (2002).

A proteína de revestimento pIII tem cerca de 406 aminoácidos e está envolvido na interação fago-célula durante a infecção. Ela está presente de três a cinco cópias por fago e suporta a inserção de proteínas tão grandes quanto um fragmento de anticorpo scFv (250 aminoácidos, 27kDa) (RUSSEL et al., 2004). Já a proteína de revestimento pVIII compõe o corpo do fago e possui apenas 50 aminoácidos. Apesar de presente em milhares de cópias por vírion, a pVIII permite a apresentação de grandes quantidades da molécula de interesse, porém, essas moléculas devem ter sequências menores que oito aminoácidos já que se forem maiores podem desestabilizar a partícula viral. (SMITH, 1985; RUSSEL et al., 2004).

O fago M13 possui uma rápida propagação e não necessita de seleção por antibiótico ou superinfecção por fago auxiliar (*helper*). Além disto, o gene *lacZ*, presente neste vetor, facilita a seleção entre colônias bacterianas infectadas com fagos de bibliotecas (colônias azuis) e colônias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (colônias brancas), pois o gene *lacZ* faz com que as bactérias infectadas expressem a enzima β -galactosidase que ocasiona a hidrólise do substrato X-Gal presente no meio de cultivo. O fago M13 permite facilmente a construção e propagação de bibliotecas de *phage display* – fagos expressando biomoléculas. Para pequenos insertos, a biblioteca pode ser amplificada repetidamente com pouca perda de sequências e diversidade (NEB, 2011).

BIBLIOTECAS DE PEPTÍDEOS

O *phage display* é uma técnica versátil, ela permite a expressão de peptídeos fusionados à qualquer proteína do fago M13, preferencialmente nas pIII e pVIII, porém, os peptídeos devem ter no máximo 30 aminoácidos. A pIII apresenta massa molecular aproximada de 42 KDa e três domínios separados por resíduos de glicina. Esta proteína é sintetizada sob a forma de um precursor contendo peptídeo sinal que é clivado durante a passagem através da membrana. Sua porção N-terminal participa na infectividade viral e sua porção C-terminal atua na morfogênese das partículas virais (CRISSMAN & SMITH, 1984). As bibliotecas de peptídeos recombinantes fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas com as bibliotecas de peptídeos recombinantes fusionados na pVIII (BRÍGIDO & MARANHÃO, 2002).

As bibliotecas de peptídeos randômicos são as mais utilizadas. Os peptídeos podem ser expressos em forma linear ou conformacional, e são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítopos contínuos ou descontínuos. Porém, sabe-se que as imunoglobulinas interagem preferencialmente com epítopos não lineares, dessa forma a introdução de cisteínas nas extremidades da sequência randômica impõe ao peptídeo uma conformação circular pela formação de uma ponte dissulfeto (SMITH & PETRENKO, 1997).

Os aminoácidos que constituem os peptídeos randômicos são codificados pelos códons degenerados NNK e NNS (N: A, C, T ou G; K: G ou T; S: G ou C), que representam 32 códons e todos os 20 aminoácidos naturais: há três códons para arginina, leucina, e serina, dois para valina, prolina, treonina, alanina e glicina, e um para os demais aminoácidos. Após a seleção, os peptídeos podem ser sintetizados quimicamente ou clonados e expressos em um sistema adequado (SMITH & PETRENKO, 1997).

As bibliotecas de peptídeos comerciais constituem-se de monômeros (-mer) compostos por sete ou 12 resíduos de aminoácidos, que apresentam uma complexidade de dois bilhões de clones independentes. As bibliotecas de sete

aminoácidos lineares (7-mer) e sete aminoácidos flanqueados por cisteínas (C7C-mer) apresentam aproximadamente $1,28 \times 10^9$ possíveis sequências enquanto que as bibliotecas compostas por 12 resíduos lineares (12-mer) apresentam aproximadamente $4,1 \times 10^{11}$ sequências (NEB, 2011).

Além das bibliotecas de peptídeos, existem atualmente vários tipos de bibliotecas utilizadas com diferentes finalidades. As bibliotecas de anticorpos possibilitam estudar e mapear as respostas imunológicas e produção de anticorpos terapêuticos. Há ainda bibliotecas de receptores de células T (TCR) (CAMACHO et al., 2013), de peptídeos-MHC (LØSET et al., 2015) e cDNA (UENO et al., 2012).

APLICAÇÕES

O *phage display* permite a prospecção de epítomos por meio da sua interação com anticorpos específicos. Os anticorpos podem reconhecer motivos peptídicos com apenas três ou quatro resíduos conservados. Portanto, é possível definir a região de uma proteína que é reconhecida por um anticorpo com base no motivo identificado pelo *phage display* (ARAP, 2005). Além disso, outras biomoléculas podem ser selecionadas pela técnica e com diversas finalidades, dentre elas a identificação de motivos de ligação de receptores bioquímicos, mapeamento de superfícies celulares e teciduais, aplicações em genômica e proteômica, obtenção de medicamentos, vacinas e inibidores enzimáticos (SIDHU & KOIDE, 2007; WANG & YU, 2009; LI & CHO, 2010).

Os peptídeos selecionados por meio da técnica de *phage display* a partir de epítomos naturais possuem pelo menos dois usos. Primeiramente, como mimetopos, ou seja, peptídeos que não se assemelham ao ligante natural, porém mimetizam o epítomo natural. As similaridades físico-químicas, de organização conformacional tridimensional ou de sequência linear possibilitam esse mimetismo (SMITH & PETRENKO, 1997). Os mimetopos possuem as mesmas propriedades imunogênicas do determinante que deu origem à especificidade do anticorpo em questão e podem, portanto, ser destinados a aplicações de diagnóstico (CASEY et al., 2009) e terapêutica (LIU et al., 2005). A segunda utilização de peptídeos identificados a partir de epítomos naturais seria como componente de vacinas sintéticas. Nesse caso, somente aqueles peptídeos antigênicos seriam úteis no desenvolvimento de preparados vacinais, uma vez que, os anticorpos produzidos contra estes mimetopos devem reconhecer o epítomo natural do patógeno real (SMITH & PETRENKO, 1997).

Bactérias gram-positivas do gênero *Staphylococcus* spp. resistentes ao antibiótico metilina isoladas de animais domésticos têm sido documentados desde a década de 70 (DEVRIESE et al., 1972). E dentro do gênero, a espécie *S. aureus* apresenta maior relevância, haja vista que muitas infecções são causadas por *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA). Cepas MRSA costumam apresentar multirresistência (resistência a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos) e concomitantemente muitas o são para a vancomicina, considerada como último recurso na terapia antimicrobiana contra MRSA's (WEIGEL et al., 2003). Vários trabalhos identificaram pequenos peptídeos ligantes ao *S. aureus*, às suas proteínas de membrana ou toxinas, porém pouca pesquisa sobre MRSA ou outras estirpes bacterianas resistentes para identificação de peptídeos com a utilização do *phage display* foram realizados (BARBU et al., 2010; YANG et al., 2011). Estudos futuros, com a utilização do *phage display*, podem e devem estender-se às bactérias gram-

positivas de interesse veterinário, pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus* e *Clostridium*.

Dentre as infecções de origem alimentar, as listerioses, relacionados a alimentos industrializados, apresentam elevada taxa de mortalidade para o homem (20 a 30%) (FAI et al., 2011). E para evitar infecções por *Listeria monocytogenes*, é importante que se faça a detecção dos níveis desse patógeno em amostras de alimentos. PAOLI e colaboradores (2004), identificaram por meio de *phage display* um anticorpo scFv que se liga a *L. monocytogenes*. Três anos mais tarde, NANDURI e colaboradores (2007) desenvolveram um biossensor ótico (*surface plasmon resonance* - SPR) imobilizando na superfície do sensor o fago-scFV, específico para detectar a *L. monocytogenes*. Na indústria alimentícia, os biossensores têm a função de determinar o grau de contaminação dos alimentos (MELLO & KUBOTA 2002). Peptídeos podem ser prospectados para outras doenças de veiculação alimentar para compor biossensores óticos, permitindo a detecção imediata e eficiente de micro-organismos patogênicos em amostras ambientais e alimentares.

O mecanismo de ligação e invasão às células hospedeiras por *L. monocytogenes* não é claro, o que limita o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas apropriadas. Dessa forma, utilizando uma biblioteca de peptídeos de 12 resíduos de aminoácidos apresentados em fagos, GASANOV e colaboradores (2006) demonstraram que a invasão por *L. monocytogenes* nas células hospedeiras ocorre pela ligação ao receptor da somatomedina ou fator de crescimento semelhante à insulina (IGF2R). No ano seguinte, peptídeos adicionais, de nove (9-mer) e doze (12-mer) resíduos de aminoácidos, que se ligam à *L. monocytogenes* foram identificados por prospecção a partir de uma biblioteca de *phage display* por CARNAZZA e colaboradores (2007).

Bactérias gram-negativas possuem uma membrana celular composta por lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é um dos principais alvos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Vários anticorpos (MERTENS et al., 2001) e peptídeos (MATSUMOTO et al., 2010) contra o LPS já foram selecionados e identificados por *phage display* para diferentes bactérias gram-negativas. Além disso, THOMAS e colaboradores (2003) utilizaram o fosfolipídio A purificado, um dos componentes do LPS da membrana bacteriana, como um alvo para a prospecção de anticorpos ou peptídeos expressos em fagos.

Peptídeos (KNURR et al., 2003; TURNBOUGH, 2003) e anticorpos (ZHOU et al., 2002) com alta afinidade por esporos de *Bacillus* spp também já foram identificados com *phage display*. Os esporos são uma forma de resistência ambiental que viabiliza o desenvolvimento do micro-organismo em condições ambientais favoráveis. Para o *B. anthracis*, micro-organismo com potencial para ser utilizado como arma biológica, BRIGATI e colaboradores (2004) e WILLIAMS e colaboradores (2003) selecionaram vários peptídeos ligantes específicos a seus esporos e WAN e colaboradores (2007) desenvolveram um biossensor acústico para detecção desses esporos utilizando os peptídeos prospectados. Eles imobilizaram os fagos expondo os peptídeos ligantes aos esporos na superfície do biossensor. Quando os esporos se ligam há um aumento de massa que é verificado pela frequência de ressonância dos biossensores. Com esta mesma finalidade, os biossensores compostos por peptídeos ou anticorpos específicos para esporos de diferentes micro-organismos patogênicos podem ser desenvolvidos e aprimorados para utilização na área industrial (indústrias agroalimentares, indústrias farmacológicas, produção de material estéril descartável).

A Leptospirose é uma doença infecciosa, aguda, endêmica, que acomete o homem e os animais, causada por bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*. Transmitida através do contato do homem com a bactéria presente na urina de animais domésticos e silvestres de modo direto ou indireto, com a penetração do microrganismo em pele com lesões ou, pele íntegra quando imersa em água contaminada por longo tempo ou mucosas (ZAHORCAK & CHRISTO, 2014). SOUZA e colaboradores (2014) selecionaram peptídeos ligantes a anticorpos anti-*Leptospira interrogans* sorovar Hardjo com o *phage display*. Utilizaram uma biblioteca randômica de peptídeos de 12 resíduos de aminoácidos contra anticorpos comerciais e após uma análise *in silico* identificaram mimetópos que interagem com anticorpo monoclonal de *L. interrogans* sorovar Hardjo, de forma que os peptídeos selecionados podem futuramente serem testados em vacinas ou em ensaios de diagnóstico para leptospirose.

Dentro da virologia, há vários trabalhos com mapeamento de epítomos virais a procura de anticorpos específicos. SCHOFIELD e colaboradores (2000) isolaram dois anticorpos monoclonais (mAbs) neutralizantes contra o vírus da hepatite E (HEV) através do *phage display* a partir de uma biblioteca de fragmentos gênicos codificantes de anticorpos gama1/kappa de chimpanzés. A hepatite E é a única hepatite viral zoonótica, sendo os suínos considerados reservatórios dos vírus (MENG, 2010; SANTOS et al., 2013). YIN e colaboradores (2014) rastrearam peptídeos com elevada estabilidade e afinidade para o vírus da Peste Suína Clássica (CSFV). Eles conseguiram obter quatro clones de fagos carreando peptídeos específicos para a proteína E2 do CSFV com potencial antiviral. De maneira similar, LIU e colaboradores (2012) também identificaram peptídeos com atividade antiviral contra o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória de suínos (PRRSV), e um deles – o P9, além da atividade antiviral e baixa citotoxicidade demonstrada consegue ligar-se à membrana celular entrando na célula. Os resultados sugeriram que o peptídeo P9 tem potencial para ser utilizado na terapêutica contra a infecção pelo PRRSV.

Os vírus da Influenza A, são conhecidos por sua capacidade de realizar mutações conhecidas como *drift* e *shift* antigênico, e o desenvolvimento de novos métodos são necessários para diagnosticar fenótipos emergentes. Em 2011, WU e colaboradores identificaram três peptídeos, utilizando uma biblioteca de *phage display* 12-mer, que se ligavam ao vírus H5N1, os peptídeos também diferenciavam o vírus H5N1 de outros vírus aviários em ensaio imunoenzimático. Da mesma forma, RAJIK e colaboradores (2009a) e RAJIK e colaboradores (2009b) conseguiram identificar um novo peptídeo com propriedades antivirais contra o vírus da gripe H9N2 a partir da utilização de uma biblioteca de peptídeos apresentadas em fagos. O estudo demonstrou que o peptídeo inibe a replicação do vírus, ao impedir a ligação à célula hospedeira. Este novo peptídeo pode ter o potencial para ser utilizado como um agente terapêutico no tratamento e controle de infecções causadas pelo vírus da influenza aviária (H9N2).

O estudo de KIRSCH e colaboradores (2008) selecionou anticorpos contra o vírus encefalite equina venezuelana (VEEV) a partir de uma biblioteca de fragmentos scFV de anticorpos presentes no soro de pessoas que foram imunizadas com o vírus completo da VEEV. O estudo pode e deve estender-se às outras encefalites de importância em medicina veterinária, tais como as causadas pelos vírus do gênero *Alphavirus* (encefalite equina do leste, oeste e venezuelana) e gênero *Flavivirus* (Encefalite Japonesa, febre do Nilo Ocidental e *Louping ill*). GAZARIAN e colaboradores (2011) mapearam dois epítomos, um deles inédito, da glicoproteína de

envelope 135 (gp135) do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV). Eles utilizaram uma biblioteca comercial de peptídeos, compostos por sete resíduos de aminoácidos, expressos em fagos contra IgG's de uma cabra infectada pelo CAEV.

ZHAO e colaboradores (2008) identificaram anticorpos neutralizantes contra uma glicoproteína (G5) do vírus da raiva. Esses anticorpos possuem potencial para serem incluídos em uma combinação de anticorpos utilizados na profilaxia pós-exposição (PEP) da raiva. LEHMANN e colaboradores (2004) utilizaram mAbs contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) para pesquisar dentro de uma biblioteca de peptídeos apresentados em fagos mimetopos da glicoproteína E do BoHV-1. O trabalho caracterizou os epítomos da gE que são reconhecidos pelos mAbs. De maneira similar, porém utilizando anticorpos policlonais contra o BoHV-1, ALMEIDA e colaboradores (2015) identificaram um novo epítomo descontínuo na glicoproteína B de envelope (Env B) do BoHV-1 após selecionarem por *phage display* um dodecapeptídeo que possui potencial para ser utilizado como reagente para o diagnóstico virológico por imunensaio, o peptídeo selecionado é capaz de discriminar amostras de soro positivas de negativas.

A aplicação do *phage display* para pesquisa de anticorpos e mimetopos do BoHV-1 é interessante, haja vista que os herpesvírus possuem a capacidade de se manter latentes em neurônios sensoriais após a infecção aguda, permitindo que ocorra, de forma silenciosa, a persistência do agente no rebanho (KIT et al., 1985). Além de que as vacinas atualmente existentes ou causam latência ou não evitam que ocorra a infecção a campo ou ainda não permitem a diferenciação entre animais vacinados e infectados, exceto as vacinas com o princípio DIVA (diferenciação entre animais infectados e vacinados).

SANTOS e colaboradores (2012) utilizaram uma biblioteca de *phage display* para isolar peptídeos com potencial para diagnosticar a anemia infecciosa equina (AIE), uma doença equina cosmopolita causada por um retrovírus. Dentro deste estudo, identificaram um peptídeo mimetopo de um epítomo da glicoproteína 45 do envelope viral, que pode ser utilizado como antígeno em imunossaios para o diagnóstico da AIE. SANTOS e colaboradores (2012) identificaram também peptídeos miméticos antigênicos de epítomos imunodominantes do vírus da leucose enzoótica bovina (BLV). Eles utilizaram as sequências dos peptídeos selecionados por *phage display* para síntese química, obtendo um peptídeo mimético sintético que pode ser utilizado para o diagnóstico sorológico da BLV.

Além de vírus, a técnica de *phage display* também já foi utilizada para mapear epítomos em carrapatos. O trabalho de PRUDENCIO e colaboradores (2009) identificaram epítomos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* como potenciais imunógenos com a possibilidade de desenvolvimento de vacinas, eles associaram o *phage display* com uma análise de bioinformática. Em 2015, BECKER e colaboradores utilizaram a técnica para identificar proteínas imunogênicas na glândula salivar de carrapatos *Ixodes scapularis* que seriam reconhecidas por anticorpos presentes no soro humano. Obtiveram oito oligopeptídeos imunogênicos dentre os quais selecionaram e clonaram três para produzirem proteínas recombinantes com potencial para desenvolvimento de vacinas.

O *phage display* também já foi utilizado em alguns trabalhos com protozoários de interesse em medicina veterinária. CUNHA-JUNIOR e colaboradores (2010) identificaram um epítomo linear de *Toxoplasma gondii* que é reconhecido por um mAb específico para SAG2A. A SAG2A é uma proteína imunodominante que aparentemente modula a virulência de infecção por *T. gondii* induzindo a resposta imune do hospedeiro contra os taquizoítos durante a fase aguda. DA SILVA e

colaboradores (2002) usaram esporozoítos de *Eimeria acervulina* como alvo de ligação para peptídeos expostos em fagos de uma biblioteca comercial. Um dos peptídeos obtidos, o PW2 apresentou alta especificidade e atividade contra *E. acervulina* e *E. tenella*. O PW2 consegue romper a película dos esporozoítos sem causar efeitos prejudiciais para as células do hospedeiro, o que indica que o peptídeo pode ser utilizado no desenvolvimento de novos medicamentos para o controle das coccidioses aviárias.

Uma das utilizações mais recentes da tecnologia de *phage display*, voltada para a medicina veterinária, foi no desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina. TOLEDO-MACHADO e colaboradores (2015) selecionaram peptídeos imunodominantes a partir da afinidade dos peptídeos expressos em fagos pelas imunoglobulinas presentes no soro de animais infectados naturalmente por *Leishmania infantum*. Depois da biosseleção, os peptídeos foram acoplados em uma membrana (*spot-synthesis*) e submetidos a avaliações por ELISA para validar a reatividade com soro de animais infectados. O peptídeo 5 (pep5), selecionado nos imunoenaios, foi utilizado em uma formulação vacinal composta por hidróxido de alumínio e lipossomas e procedeu-se a imunização de camundongos da linhagem BALB/c. Após o desafio constatou-se que o pep5 provocou uma proteção significativa associada com a indução de linfócitos T *helper*, tanto Th1 quanto Th2, pelo sistema imune dos camundongos. O trabalho concluiu que o pep5 é um promissor candidato a uma formulação vacinal a partir de peptídeos selecionados por *phage display*, o próximo passo deve ser o teste em cães para confirmar a eficácia do peptídeo como um bom imunógeno.

Outros agentes patogênicos tiveram proteínas imunogênicas identificadas por *phage display*, dentre estes patógenos têm-se espécies de *Mycoplasma* (KÜGLER et al., 2008; BEGHETTO et al., 2009) o vírus *Blue Tong* (BTV) (FEHRSEN & DU PLESSIS, 1999), *Mycobacterium avium* (NAGATA et al., 2013) e *M. tuberculosis* (LIU et al., 2011) *Salmonella Typhimurium* (MEYER et al., 2012), além de organismos eucarióticos superiores como *Taenia solium* (GONZÁLEZ et al., 2010).

O *phage display* pode ser utilizado *in vivo* para identificar biomoléculas expressas em fagos capazes de se ligarem a um tecido ou órgão específico. A biblioteca de fagos é administrada por via endovenosa a um animal, os fagos circulam na corrente sanguínea por um tempo e se ligam a aqueles órgãos ou tecidos pelo qual possuem maior afinidade. Há um processo de recuperação dos fagos a partir de um órgão/tecido de escolha, seguido de amplificação e sequenciamento. Os fagos específicos, com alta afinidade pelo órgão/tecido de escolha podem ser utilizados como ferramentas de diagnóstico ou como tratamento de doenças via conjugação a um fármaco ou pelo acoplamento de nanopartículas contendo o fármaco (HAMZEH-MIVEHROUD et al., 2013).

Para além da utilização do *phage display* no mapeamento de epítomos ou identificação de peptídeos miméticos, os bacteriófagos já foram utilizados como terapia antimicrobiana em casos de mastite bovina, uma doença inflamatória da glândula mamária de bovinos (GILL et al., 2006). A terapia por fagos se mostra como um modelo orgânico sustentável de controle da mastite, com pouco ou nenhum efeito prejudicial sobre o meio ambiente ou o próprio animal afetado. A fagoterapia também já foi utilizada no controle microbiológico de alimentos (ATTERBURY et al., 2007; GUENTHER et al., 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão englobou conceitos básicos da estrutura e utilização do *phage display* enfocando a utilização de bibliotecas de peptídeos expressos em fagos. É importante lembrar que os fagos podem ser utilizados para expressar fragmentos de anticorpos e outras pequenas moléculas acopladas às suas proteínas externas para diversas finalidades.

Independente do mecanismo utilizado pelo agente patogênico para provocar uma infecção, os componentes de sua superfície externa são determinantes principais para a progressão da doença e/ou reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. A elucidação dos mecanismos envolvidos no estabelecimento das doenças infecciosas centra-se na descoberta de moléculas, tanto do patógeno quanto do hospedeiro. O *phage display* expande a área de estudo dessa relação parasita-hospedeiro. Ele permite explorar os mecanismos da doença, melhorar os métodos de diagnóstico e terapêutico já existente, além de conceber candidatos potenciais a vacinas. As aplicações da técnica estão sendo ativamente exploradas a fim de descobrir novos mimetótipos potenciais para as aplicações na saúde animal, além de estudar as interações proteína-proteína, identificar e estudar epítomos naturais, mapear toxinas, sítios de ligação ao receptor ou mesmo identificação de possíveis candidatos a fármacos.

Por ser uma técnica robusta, versátil e precisa, o *phage display* tornou-se o objeto de interesse de muitos pesquisadores. Os antígenos expressos em fagos podem ser produzidos em larga escala e a um custo relativamente baixo, pois os fagos carreadores de peptídeos são amplificados em bactérias tornando a sua utilização bastante atrativa.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G. R.; GOULART, L. R.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; BATAUS, L. A. M.; JAPOLLA, J.; M.E.D. BRITO, W. M. E. D.; CAMPOS, I. T. N.; RIBEIRO, C.; SOUZA, G. R. L. A conformational epitope mapped in the bovine herpesvirus type 1 envelope glycoprotein B by phage display and the HSV-1 3D structure. **Research in Veterinary Science**, v.101, p. 34-37, 2015.

ARAP, M. A. Phage display technology - Applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.1-9, 2005.

ATTERBURY R. J.; VAN BERGEN, M. A. P.; ORTIZ, F.; LOVELL, M. A.; HARRIS, J. A.; DE BOER, A.; WAGENAAR, J. A.; ALLEN, V. M.; BARROW, P. A. Bacteriophage Therapy To Reduce Salmonella Colonization of Broiler Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.14, p.4543-4549, 2007

BARBU, E. M.; GANESH, V. K.; GURUSIDDAPPA, S.; MACKENZIE, R. C.; FOSTER, T. J.; SUDHOF, T. C.; HÖÖK, M. Beta-Neurexin is a ligand for the Staphylococcus aureus MSCRAMM SdrC. **PLoS Pathogens** [online], v.6, n.1, 2010.

BAZAN, J.; CAŁKOSIŃSKI, I.; GAMIAN, A. Phage display - A powerful technique for Immunotherapy. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.8, N.12, p.1817-1828, 2012.

BECKER, M.; FELSBERGER, A.; ANDRÉ FRENZEL, A.; SHATTUCK, W. M. C.; DYER, M.; KÜGLER, J.; ZANTOW, J.; MATHER, T. N.; HUST, M. Application of M13

phage display for identifying immunogenic proteins from tick (*Ixodes scapularis*). **BMC Biotechnology** [online], v.15, n.1, 2015.

BEGHETTO, E.; DE PAOLIS, F.; MONTAGNANI, F.; CELLESI, C.; GARGANO, N. Discovery of new *Mycoplasma pneumoniae* antigens by use of a whole-genome lambda display library. **Microbes and infection/Institut Pasteur**, v.11, n.1, p.66-73, 2009 .

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**. v.19, n.1, p.1-33, 2001.

BRIGATI, J.; WILLIAMS, D. D.; SOROKULOVA, I.B.; NANDURI, V.; CHEN, I. H.; TURNBOUGH, C. L, Jr; PETRENKO, V. A. Diagnostic probes for *Bacillus anthracis* spores selected from a landscape phage library. **Clinical Chemistry**, v.50, n.10, p.1899-1906, 2004.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.26, p.44-51, 2002.

CAMACHO, F.; HUGGETT, J.; KIM, L; INFANTE, J. F.; LEPORE, M.; PEREZ, V.; SARMIENTO, M. E.; ROOK, G.; ACOSTA, A. Phage display of functional $\alpha\beta$ single-chain T-cell receptor molecules specific for CD1b:Ac2SGL complexes from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells. **BMC Immunology** [online], v.14, n.1, 2013.

CARNAZZA, S.; GIOFFRE, G.; FELICI, F.; GUGLIELMINO, S. Recombinant phage probes for *Listeria monocytogenes*. **Journal of Physics: Condensed Matter** [online], v.19, n.39, 2007.

CASEY J.; COLEY A. M.; PARISI, K.; FOLEY, M. Peptide mimics selected from immune sera using phage display technology can replace native antigens in the diagnosis of Epstein-Barr virus infection. **Protein Engineering, Design & Selection**. v.22, n.2, p.85-91, 2009.

CRISSMAN, J. W.; SMITH, G. P. Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. **Virology**, v.132, n.2, p.445- 455, 1984.

CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SILVA, D. A.; SILVA, N. M.; SOUZA, M. A.; SOUZA, G. R.; PRUDENCIO, C. R.; PIROVANI, C. P.; CEZAR, M.; CASCARDO, J.; BARBOSA, B. F.; GOULART, L. R.; MINEO Jr. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display biotransformation. **Immunobiology**, v.215, n.1, p.26-37, 2010.

DA SILVA, A. Jr.; KAWAZOE, U.; FREITAS, F. F.; GATTI, M. S.; DOLDER, H.; SCHUMACHER R. I.; JULIANO, M. A.; DA SILVA, M. J.; LEITE, A. Avian anticoccidial activity of a novel membrane- interactive peptide selected from phage display libraries. **Molecular and biochemical parasitology**, v.120, n.1, p.53-60, 2002.

DEVRIESE, L. A.; VANDAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicillin (cloxacillin)- resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. **Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Riehe B. Berlim**, v.19, n.7, p.598-605, 1972.

DIAS-NETO, E.; NUNES, D. N.; GIORDANO, R. J.; SUN, J.; BOTZ, G..H.; YANG, K.; SETUBAL, J. C.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Next-Generation Phage Display: Integrating and Comparing Available Molecular Tools to Enable Cost-Effective High-Throughput Analysis. **PLoS ONE**, v.4, n.12, p.e8338, 2009.

FAI, A. E. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; VERDIN, S. E. F.; PINHEIRO, N. M. S.; BRAGA, A. R. C.; STAMFORD, T. L. M. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva** [online], v.16, n.2, p.657-662, 2011.

FEHRSEN, J.; DU PLESSIS, D. H. Cross-reactive epitope mimics in a fragmented genome phage display library derived from the rickettsia, *Cowdria ruminantium*. **Immunotechnology**, v.4, n.3-4, p.175-184, 1999.

GASANOV, U.; KOINA, C.; BEAGLEY, K. W.; AITKEN, R. J.; HANSBRO, P. M. Identification of the insulin-like growth factor II receptor as a novel receptor for binding and invasion by *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v.74, n.1, p.566-577, 2006.

GAZARIAN, K.; SETIÉN, A. A.; GAZARIAN, T.; PIERLE, S. A. Phage display identifies two Caprine Arthritis Encephalitis Virus Env Epitopes. **Veterinary Research**, v.42, n.87, 2011.

GILL, J. J.; PACAN, J. C.; CARSON, M. E.; LESLIE, K. E.; GRIFFITHS, M. W.; SABOUR, P. M. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.9, p.2912-2918, 2006.

GONZÁLEZ, E.; ROBLES, Y.; GOVEZENSKY, T.; BOBES, R.J.; GEVORKIAN, G.; MANOUTCHARIAN, K. Isolation of neurocysticercosis-related antigens from a genomic phage display library of *Taenia solium*. **Journal of Biomolecular Screening**, v.15, n.10, p.1268-1273, 2010.

GUENTHER, S.; HUWYLER, D.; RICHARD, S.; LOESSNER, M. J. Virulente Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready- To-Eat-Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p.093-100, 2009.

HAMZEH-MIVEHROUD, M.; ALIZADEH, A. A.; MORRIS, M. B.; CHURCH, W. B.; DASTMALCHI, S. Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v.18, n.23/24, 2013.

HEMMINGA, M. A.; VOS, W. L.; NAZAROV, P. V.; KOEHORST, R. B.; WOLFS, C. J.; SPRUIJT, R. B.; STOPAR, D. Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages. **European Biophysics Journal**, v.39, n.4, p.541-550, 2010.

HUANG, J. X.; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPERA, M. A. Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.9, p.4569-4582, 2012.

ICTV, 2014. **International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy.** Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 13 de junho de 2015.

KONTHUR, Z.; WALTER, G. Automation of phage display for high-throughput antibody development. **Targets**. v.1, n.1, p.30-36, 2002.

KNURR, J.; BENEDEK, O.; HESLOP, J.; VINSON, R. B.; BOYDSTON, J. A.; MCANDREW, J.; KEARNEY, J. F.; TURNBOUGH, C. L. Jr. Peptide ligands that bind selectively to spores of *Bacillus subtilis* and closely related species.. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6841-6847, 2003.

KIRSCH, M. I.; HÜLSEWEH, B.; NACKE, N.; RÜLKER, T.; SCHIRRMANN, T.; MARSCHALL, H-J.; HUST, M.; DÜBEL, S. Development of human antibody fragments using antibody phage display for the detection and diagnosis of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). **BMC Biotechnology**, v.8, n.66, 2008.

KIT, S.; QAVI, H.; GAINES, J. D.; BILLINGSLEY, P.; MCCONNELL, S. Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. **Archives of Virology**, v.86, n.1-2, p.63-83, 1985.

KÜGLER, J.; NIESWANDT, S.; GERLACH, G. F.; MEENS, J.; SCHIRRMANN, T.; HUST, M. Identification of immunogenic polypeptides from a *Mycoplasma hyopneumoniae* genome library by phage display. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.80, n.3, p.447-458, 2008.

LIU, K.; FENG, X.; MA, Z.; LUO, C.; ZHOU, B.; CAO, R.; HUANG, L.; MIAO, D.; PANG, R.; HE, D.; LIAN, X.; CHEN, P. Antiviral activity of phage display selected peptides against Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vitro. **Virology**, v. 432, n.1, p.73-80, 2012.

LI, Z. J.; CHO, C. H. Development of peptides as potential drugs for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*. v.16, n.10, p.1180-1189, 2010.

LIU, J. K.; TENG, Q.; GARRITY-MOSES, M.; FEDERICI, T.; TANASE, D.; IMPERIALE, M. J.; BOULIS, N. M. A novel peptide defined through phage display for therapeutic protein and vector neuronal targeting. **Experimental Neurology**, v.19, n.3, p.407-418, 2005.

LIU, S.; HAN, W.; SUN, C.; LEI, L.; FENG, X.; YAN, S.; DIAO, Y.; GAO, Y.; ZHAO, H.; LIU, Q.; YAO, C.; LI, M. Subtractive screening with the *Mycobacterium tuberculosis* surface protein phage display library. **Tuberculosis**, v.91, n.6, p.579-586, 2011.

LEHMANN, R.; SODOYER, S. Characterization of BoHV-1 gE envelope glycoprotein mimotopes obtained by phage display D. **Veterinary Microbiology**, v.144, n.1-2, 2004.

LØSET, G. A.; BERNTZEN, G.; FRIGSTAD, T.; POLLMANN, S.; GUNNARSEN, K. S.; SANDLIE, I. Phage display engineered T cell receptors as tools for the study of tumor peptide–MHC interactions. **Frontiers in Oncology**, v.4, n.378, 2015.

MATSUMOTO, M.; HORIUCHI, Y.; YAMAMOTO, A.; OCHIAI M.; NIWA M.; TAKAGI, T.; OMI, H.; KOBAYASHI, T.; SUZUKI, M. M. Lipopolysaccharide-binding peptides obtained by phage display method. **Journal of Microbiological Methods**, v.82, n.1, p.54 -58, 2010.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 237-256, 2002.

MEYER, T.; SCHIRRMANN, T.; FRENZEL, A.; MIETHE, S.; STRATMANN-SELKE, J.; GERLACH, G.F.; STRUTZBERG-MINDER, K.; DÜBEL, S.; HUST, M. Identification of immunogenic proteins and generation of antibodies against *Salmonella Typhimurium* using phage display, **BMC Biotechnology** [online], v. 12 n.29, 2012.

MENG, X. J. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.256-65, 2010.

MERTENS, P.; WALGRAFFE, D.; LAURENT, T.; DESCHREVEL, N.; LETESSON, J. J.; DE BOLLE, X. Selection of phage-displayed peptides recognised by monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of *Brucella*. **International Reviews of Immunology**, v.20, n.2, p.181-199, 2001.

NAGATA, R.; KAWAJI, S.; MORI, Y. Use of enoyl coenzyme A hydratase of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis for the serological diagnosis of Johne's disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 155, n.4, p.253-258, 2013.

NANDURI, V.; BHUNIA, A. K.; TU, S. I.; PAOLI, G. C.; BREWSTER, J. D. SPR biosensor for the detection of *L. monocytogenes* using phage-displayed antibody. **Biosensors & Bioelectronics**, v.23, n.2, p.248-252, 2007.

NEW ENGLAND BIOLABS (NEB). **Protein Tools: Ph.D. Phage Display Libraries Instruction Manual**. Ipswich: New England Biolabs, 2011. 44p.

PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**. v.28, n.6, p.849-858, 2010.

PAOLI, G. C.; CHEN, C. Y.; Brewster JD. Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes*. **Journal of Immunological Methods**, v.147, n.1-2, p.147-155, 2004.

POSNER, B.; SMILEY, J.; LEE, I.; BENKOVIC, S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. **Trends in Biochemical Sciences**. v.19, n.4, p.145-150, 1994.

PRUDENCIO, C. R.; NASCIMENTO, R.; FILHO, M. M.; MARRA ADE, O.; DE SOUZA, G. R.; ALMEIDA, J. F.; CARDOSO, R.; SZABÓ M. P.; GOULART L. R. In silico analysis for identification of tick phagotopes selected by phage-displayed libraries. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** [online], v.18 n.1, 2009.

RAJIK, M.; JAHANSHIRI, F.; OMAR, A. R.; IDERIS, A, HASSAN S. S.; YUSOFF, K. Identification and characterisation of a novel antiviral peptide against avian influenza virus H9N2. **Virology Journal** [online], v.6, p.74, 2009a.

RAJIK, M.; OMAR, A. R.; IDERIS, A.; HASSAN, SS.; YUSOFF, K. A novel peptide inhibits the influenza virus replication by preventing the viral attachment to the host cells. **International Journal of Biological Sciences**, v.5, n.6, p.543-548, 2009b.

RUSSEL, M.; LOWMAN, H. B.; CLACKSON, T. Introduction to phage biology and phage display. In: CLACKSON, T.; LOWMAN, H. **Phage display**. Oxford: Oxford Unity Press, 2004. 1-26p.

SANTOS, D. L.; OLIVEIRA FILHO, E. F.; PINTO, M. A. Hepatite E no Brasil e no Mundo: Revisão de Literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.3, p.9-26, 2013:

SANTOS, E. M.; CARDOSO, R.; SOUZA, G. R. L; GOULART, L.R.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Selection of peptides for serological detection of equine infectious anemia. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.3, p.2182-2199, 2012.

SANTOS, E. M.; RONE CARDOSO, R.; LUIZ RICARDO GOULART FILHO, L. R.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, R. C; DOS REIS, J. K. P. Selection of ligand peptides with the ability to detect antibodies in enzootic bovine leukosis. **African Journal of Biotechnology**, v11, n.28, p.7302-7312, 2012.

SCHOFIELD, D. J.; GLAMANN, J.; EMERSON, S. U.; PURCELL, R. H. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. **Journal of Virology**, v.74, n.12, p.5548-5555, 2000.

SIDHU, S. S.; KOIDE, S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. **Current Opinion in Structural Biology**. V.17, n.4, p.481-487, 2007.

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

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage Display. **Chemical Reviews**. v.97, n.2, p.391-410, 1997.

SOUZA, M. F. S.; SOUZA, M. A.; SOARES, P. M.; LIMA, A. M. C.; CARDOSO, R.; GOULART, L. R. Seleção de peptídeos específicos de *Leptospira Interrogans* sorovar Hardjo. **Ciência & Tecnologia** [online], v.6, p.28-33, 2014.

THOMAS, C. J.; SHARMA, S.; KUMAR, G.; VISWESWARIAH S. S.; SUROLIA, A. Biopanning of endotoxin-specific phage displayed peptides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.307, n.1, p.133-138, 2003.

TOLEDO-MACHADO, C. M.; BUENO, L. L.; MENEZES-SOUZA, D.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; NGUYEN, C.; GRANIER, C.; BARTHOLOMEU, D. C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; FUJIWARA, R. T. Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/ cholesterol liposomes. **Parasites & Vectors** [online], v.8, n.133, 2015.

TURNBOUGH, C. L. Jr. Discovery of phage display peptide ligands for species-specific detection of Bacillus spores. **Journal of Microbiological Methods**, v.53, n.2, p.263-271, 2003.

UENO, S.; YOSHIDA, S.; MONDAL, A.; NISHINA, K.; KOYAMA, M.; SAKATA, I.; MIURA, K.; HAYASHI, Y.; NEMOTO, N.; NISHIGAKI, K.; SAKAI, T. In vitro selection of a peptide antagonist of growth hormone secretagogue receptor using cDNA display. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, N.28, 2012.

VODNIK, M.; ZAGER, U.; STRUKELJ, B.; LUNDER M. Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. **Molecules**. v.16, n.1, p.790-817, 2011.

WAN JH.; SHU, H. ; HUANG, S.; FIEBOR, B.; CHEN I-H.; PETRENKO, V. A.; CHIN, B. A. Phage-based magnetoelastic wireless biosensors for detecting Bacillus anthracis spores. **Sensors Journal**, IEEE [online], v.7, n.3, p. 470-477, 2007.

WANG, L. F.; YU, M. Epitope mapping using phage-display random fragment libraries. Methods. In: **Molecular Biology**. 2.ed. Humana Press. 2009; 524:315-332p.

WEIGEL, L. M.; CLEWELL, D. B.; GILL, S. R.; CLARK, N. C.; MCDUGAL, L. K.; FLANNAGAN, S. E.; KOLONAY, J. F.; SHETTY, J.; KILLGORE, G. E.; TENOVER, F. C. Genetic analysis of a high-level vancomycinresistant isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science**, v.302, n.5650, p.1569-1571, 2003.

WILLIAMS, D. D.; BENEDEK, O.; TURNBOUGH, C. L, Jr. Species-specific peptide ligands for the detection of Bacillus anthracis spores. **Applied And Environmental Microbiology**, v.69, n.10, p.6288-6293, 2003.

WU, D.; LI, G.; QIN, C.; REN, X. Phage Displayed Peptides to Avian H5N1 Virus Distinguished the Virus from Other Viruses. **PLoS ONE**, v.6, n.8, 2011.

YANG, G.; CHENG, H.; LIU, C.; XUE, Y.; GAO, Y.; LIU, N.; GAO, B.; WANG, D.; LI, S.; SHEN, B.; SHAO, N. Inhibition of *Staphylococcus aureus* pathogenesis in vitro and in vivo by RAP-binding peptides. **Peptides**, v.24, n.11, p.1823-1828, 2011.

YIN, L.; LUO, Y.; LIANG, B.; WANG, F.; DU, M.; PETRENKO, V. A.; , QIU, HUA-JI; LIU, A. Specific ligands for classical swine fever virus screened from landscape phage display library. **Antiviral Research**, v.109, p.68-71, 2014.

ZHAO, X. L.; YIN, J.; CHEN, W. Q.; JIANG, M.; YANG G.; YANG, Z. H. Generation and characterization of human monoclonal antibodies to G5, a linear neutralization epitope on glycoprotein of rabies virus, by phage display technology. **Microbiology and Immunology**, v.52, n.2, p.89-93, 2008.

ZAHORCAK, D. R. F. V.; CHRISTO, D. Relato de caso de paciente com provável quadro de leptospirose: difícil diagnóstico. **Cadernos da Escola de Saúde**, v.5, P119-135, 2014.

ZHOU, B.; WIRSCHING, P.; JANDA, K. D. Human antibodies against spores of the genus *Bacillus*: a model study for detection of and protection against anthrax and the bioterrorist threat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.8, p.5241-5246, 2002.