

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES LIGANTES A  
ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PROTEÍNAS DE  
*Babesia bigemina***

Rafael Nascimento

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart, PhD.

UBERLÂNDIA – MG  
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES LIGANTES A  
ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PROTEÍNAS DE  
*Babesia bigemina***

Aluno: Rafael Nascimento

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart, PhD.

Monografia apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA – MG  
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES LIGANTES A  
ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PROTEÍNAS DE  
*Babesia bigemina***

Aluno: Rafael Nascimento

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Ph.D.

Examinadores: Ms. Fausto Emillio Capparelli

Ms. Carlos Roberto Prudêncio

Data da Defesa: 20 / 04 / 2006

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do Curso de Graduação em Ciências Biológicas para o formato foram contempladas.

  
\_\_\_\_\_  
Orientador

Uberlândia, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Solange e Nilson e às minhas irmãs, Mariana e Emília, por apoiarem a minha formação e a concretização deste trabalho.

Ao meu orientador, Luiz Ricardo e aos meus colegas do Laboratório de Genética Molecular da UFU, especialmente ao Carlos, Juliana, Fausto, Guilherme, Paula e José Geraldo pela colaboração, pelos importantes conselhos e esclarecimentos.

Aos meu amigos, Marco Lara, José Geraldo, Frederico Mameri, Rômulo Nascimento, Adriana Faria, Luciana Paranahyba e Francisco Resende pela companhia durante este percurso.

À professora Dra. Divina Queiroz e aos seus orientados Bruno e Guilherme, pela disposição do Laboratório de Virologia e pelos ensinamentos em cultura de células animais, além do apoio durante todo o curso de graduação.

Agradeço aos professores do Curso de Ciências Biológicas pela dedicação ao ensino e à pesquisa, atividades nobres que tanto nos enriquecem e a Deus por permitir-me viver.

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE AMINOÁCIDOS.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
Babesiose Bovina.....	9
Phage Display.....	13
OBJETIVO.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Anticorpos Monoclonais.....	20
Seleção de Peptídeos – Biopanning em Solução.....	20
Extração de DNA de Fagos.....	22
Seqüenciamento de DNA.....	23
Análise dos Dados por Bioinformática.....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
Seleção de Peptídeos – Biopanning.....	25
Seqüenciamento de DNA e Bioinformática.....	26
Bioinformática: Hsp20 e Peptídeos Seleccionados.....	28
Bioinformática: p58 e Peptídeos Seleccionados.....	34
CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrometro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	Gramas
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil $\alpha$ -D-tiogalactosise
kDa	Quilodalton
L	Litro
M	Molar
M13KE	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos
M13mp19	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos
ng	Nanogramas
p/v	Peso por volume
Pb	Par de base
PBS	Fosfato de sódio
PBST	Fosfato de sódio com tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Phage Display
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D	Bibliotecas de Phage Display New England Biolabs
Ph.D-12mer	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
PIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
PVIII	Proteína VIII capsídica de bacteriófagos filamentosos
RELIC	Receptor Ligants Contents

RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucléico mensageiro
TBST	Trifosfato de sódio com Tween 20
UFC	Unidades formadoras de colônias
v/v	Volume por volume
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- $\alpha$ -D-galactosideo
Hsp20	Small Heat Shock Protein
RAP-1	Proteína Associada à Roptria 1
p58	Proteína de 58 kDa de <i>Babesia bigemina</i>
BSA	Soro Albumina Bovina
LB	Meio Luria Bertani

## LISTA DE AMINOÁCIDOS

A	-	Alanina
C	-	Cisteína
D	-	Ácido aspártico
E	-	Ácido glutâmico
F	-	Fenilalanina
G	-	Glicina
H	-	Histidina
I	-	Isoleucina
K	-	Lisina
L	-	Leucina
M	-	Metionina
N	-	Asparagina
P	-	Prolina
Q	-	Glutamina
R	-	Arginina
S	-	Serina
T	-	Treonina
V	-	Valina
W	-	Triptofano
Y	-	Tirosina



## INTRODUÇÃO

### Babesiose Bovina

A babesiose bovina, doença causada pelos hemoprotozoários *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Babesia major*, *Babesia divergens* e *Babesia jakirnovi* é transmitida principalmente por ninfas e adultos do carrapato *Boophilus microplus*. Tais parasitas possuem similaridades e diferenças antigênicas que conferem importantes mecanismos na indução da resposta imunológica.

A doença caracteriza-se pela massiva destruição eritrocítica do hospedeiro decorrente do ciclo de vida intra-eritrocitário dos patógenos.

As manifestações clínicas desencadeadas nesta enfermidade são variáveis, podendo-se observar diferentes graus de gravidade, que oscilam em função da virulência e patogenicidade entre as espécies e isolados de *Babesia*. Quanto à patogenicidade, *B. bigemina* é capaz de desencadear um mecanismo pelo qual acarreta danos celulares e tissulares (Losos, 1986). Este babesídeo determina um quadro de anemia progressiva, disfunção cerebral, palidez de mucosas, hemoglobinúria, febre, edemas, inapetência e pode levar o animal à morte.

O esporozoíto, a forma infecciosa da *Babesia bigemina*, é encontrada nas glândulas salivares de *Boophilus spp.* infectados. Quando introduzidos nos tecidos do hospedeiro, os esporozoítos invadem os eritrócitos e se multiplicam, transformando-se em merozoítos. Os ciclos de invasão e lise de eritrócitos levam ao desenvolvimento da doença. Potenciais alvos de proteção imunológica ao protozoário incluem as superfícies dos esporozoítos, merozoítos e eritrócitos infectados (McElwain *et al.* 1987).

A babesiose bovina é responsável por grandes perdas na atividade agropecuária em áreas tropicais e subtropicais no mundo. No Brasil, as perdas causadas pela babesiose e anaplasmoze bovinas foram recentemente estimadas em US\$ 500 milhões anuais (Grisi *et al.*, 2002).

Em função das grandes perdas causadas pela babesiose bovina no mundo, pesquisas têm sido direcionadas no intuito de desenvolver novas drogas

quimioterápicas e eficientes estratégias de controle. Muitas drogas já utilizadas têm mostrado ineficiência em função de sua toxicidade e do desenvolvimento de resistência pelos parasitos. O uso indiscriminado de drogas anti-*Babesia* como agentes profiláticos, incluindo o uso de doses sub-letais em animais, têm atualmente contribuído com o desenvolvimento da resistência aos medicamentos (Bork *et al.*, 2003).

Entre as medidas profiláticas empregadas no controle da babesiose bovina destacam-se a vacinação, o controle do vetor e tratamento quimioterápico dos animais infectados. A prática mais comum de vacinação utilizada atualmente é a premunição, que consiste na inoculação de sangue proveniente de animais contaminados. Esta prática promove boa imunidade a cepas homólogas e heterólogas do parasito, porém apresenta algumas desvantagens, como a perpetuação dos parasitos no ambiente; a variação de virulência dos agentes infecciosos, resultando comumente em morte, aborto ou desenvolvimento da doença; altos custos e dificuldades procedimentais como estocagem, transporte e produção suficiente de vacinas; além da transmissão de outros agentes causadores de doenças (McElwain *et al.*, 1987).

Animais sobreviventes de infecção natural ou por vacinas atenuadas são protegidos dos efeitos clínicos da doença. Entretanto, a premunição é uma técnica extremamente cara, impraticável em países em desenvolvimento que não possuem a infraestrutura necessária, tornando-se uma forma comum de transmissão de outros agentes infecciosos aos animais vacinados.

A identificação de polipeptídeos de merozoítos de *Babesia bigemina* mostrou a existência de proteínas de 200, 82, 66, 58, 55, 52, 43, 36, 26, 23 e 21 kDa. Vários autores têm identificado diferentes proteínas da superfície de merozoítos, de frações de roptrias e de eritrócitos infectados (Machado *et al.*, 1997).

Similarmente ao *Plasmodium*, a invasão dos eritrócitos pela *Babesia bigemina* envolve a orientação apical posterior do parasito e é hipotetizada a utilização de proteínas de roptrias e micronemas. Embora a função de muitas proteínas de roptrias de *Plasmodium* não ser conhecida, a adesão do parasito no

eritrócito, a lise do mesmo e as atividades de inserção de lipídeos têm sido associadas a proteínas individuais de roptrias. Somente uma proteína de roptria de *Babesia* foi descrita, denominada *Babesia bovis* proteína associada à roptria 1 (roptry-associated protein 1, RAP-1 / 60 kDa). Essa proteína é codificada por dois genes pertencentes a uma família multigênica envolvendo *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. canis* e *B. ovis*. Interessantemente, existe significativa similaridade entre as seqüências de aminoácidos de RAP-1 e proteínas de roptrias de outros parasitos do grupo apicomplexa, incluindo a RAP-1 de *Plasmodium falciparum*. A maioria dos mecanismos utilizados pelas diferentes espécies de protozoários na invasão de eritrócitos é desconhecida, mas certamente inclui eventos comuns. A identificação de outras proteínas de roptrias de *Babesia* permitiria a comparação entre espécies de *Babesia* e *Plasmodium* na busca de polipeptídeos que mediem eventos comuns na invasão e parasitismo de eritrócitos (Machado *et al.*, 1993).

A proteína p58 de *Babesia bigemina* têm sido hipotetizada como sendo uma proteína de roptria em função de sua localização apical, confirmada por imunofluorescência, e sua grande similaridade com a proteína RAP-1 (60 kDa) de *B. bovis*. Similarmente à RAP-1, a proteína p58 de *B. bigemina* é expressa na superfície extracelular de merozoítos e é conservada entre diferentes cepas do parasito, sendo que ambas apresentam 45% de identidade e 65% de similaridade nos 300 primeiros aminoácidos, incluindo a conservação na localização dos resíduos de cisteína (Suarez *et al.*, 1991). Baseado nestes resultados, foi proposto que a proteína p58 de *B. bigemina* seja um membro da família RAP-1 e poderia ser designada de *Babesia bigemina* RAP-1. A proteção induzida em bovinos imunizados com esta proteína suporta o uso das proteínas de roptria como imunógenos contra doenças causadas por apicomplexas. Em adição, a exposição de ambas as proteínas RAP-1 de *B. bovis* e *B. bigemina* na superfície extracelular de merozoítos sugere que a proteína p58, similarmente a outras polipeptídeos de roptria, seja mobilizada e funcional durante eventos críticos na infecção intracelular (Machado *et al.*, 1993).

A imunidade a *Babesia* e protozoários relacionados envolve ambos os tipos de resposta imunológica, inata e adquirida, resultando em ativação de

macrófagos, mediada por IFN- $\gamma$ , na fagocitose de organismos e produção de anticorpos neutralizantes. Na infecção por *B. bovis*, linhagens celulares do tipo Th secretam IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral em resposta ao estímulo provocado pelo parasito. A ativação de macrófagos via IFN- $\gamma$  inibe o crescimento de *B. bovis* por meio de um mecanismo parcialmente dependente de óxido nítrico. A proteção imunológica conferida por anticorpos contra desafios homólogos foi demonstrada em experimentos de transferência passiva em gados de soros imunes ou imunoglobulinas IgG purificadas. Experimentos baseados no conhecimento de que células T CD4<sup>+</sup> produzem IFN- $\gamma$  em resposta à estimulação por antígenos do parasito e agem como células T *helper* na produção de IgG foram desenvolvidos como estratégia para identificação de potenciais antígenos de merozoítos de *B. bovis*. Dentre os antígenos identificados, reporta-se uma proteína de 20-kDa (Bbo20), antigenicamente e estruturalmente conservada em *B. bigemina* (Bbg20). Bbo20 induz proliferação de células T CD4<sup>+</sup> em bovinos imunizados com *B. bovis* e a estimulação de clones T CD4<sup>+</sup> Bbo20 específicos, com antígenos de *B. bovis*, levam à produção de IFN- $\gamma$ . Bbo20 e Bbg20 são relatadas como proteínas da família hsp (“small heat shock”), que inclui várias hsps de plantas,  $\alpha$ -cristalinas e hsp30/bag1 de *Toxoplasma gondii*, expressa somente na fase de bradizoíto do parasito (Brown *et al.*, 2001).

As proteínas da família HSP /  $\alpha$ -cristalina apresentam significativa homologia entre espécies do mesmo gênero, mas apresentam baixa similaridade entre espécies de gêneros diferentes.

Embora a função das proteínas HSPs não seja ainda bem esclarecida, muitos membros da família  $\alpha$ -cristalina possuem a função de chaperonas.

As proteínas de 20-kDa são altamente conservadas entre *B. bigemina* e *B. bovis*, com 86,4% de identidade nas seqüências de aminoácidos. Não surpreendentemente, epítomos de linfócitos B e T são também conservados entre cepas geograficamente distantes de *B. bovis*. Entretanto, a identificação de células T Bbo20 específicas que reconheceram *B. bovis* somente e *B. bovis* e *B. bigemina* conjuntamente, indica a presença de dois epítomos de célula T distintos em Bbo20. Epítomos de linfócitos B também são compartilhados entre *B. bovis* e *B. bigemina*.

Tais conclusões foram baseadas na reatividade de ambas as proteínas a soros anti-Bbo20 de coelho, anticorpos monoclonais específicos para Bbo20 e anticorpos de camundongos direcionados contra o peptídeo KSHDYSEKPS (aa 25-34) de Bbo20 que difere de seu homólogo em *B. bigemina* somente pelas posições dos aminoácidos 26 e 30. A conservação de epítomos de linfócitos B e T entre cepas dos parasitos é uma importante consideração no desenvolvimento de vacinas, evitando a susceptibilidade de bovinos imunizados com antígenos de determinada cepa ao desenvolvimento de infecção por cepas heterólogas (Brown *et al.*, 2001).

Estudos prévios utilizando testes de proliferação de células T e *immunoblotting* utilizando-se o anticorpo monoclonal 23/28.57, reativo à proteína Hsp20 de *Babesia bovis*, revelaram a conservação de epítomos da proteína em cepas de diferentes regiões geográficas. Com o intuito de determinar o nível de conservação de aminoácidos na proteína, o DNA genômico *hsp20* foi obtido de diferentes cepas do parasito e seqüenciado (Norimine *et al.*, 2004).

Norimine *et al.* (2004), por meio de testes com células T CD4+, mostraram a existência de reconhecimento do epítomo DEQTGLPIKS da proteína Hsp20 de *B. bovis* e do epítomo DEQTGLPVKN da mesma proteína em *B. bigemina*, diferentes apenas por dois aminoácidos.

## **Phage Display**

A tecnologia *Phage Display* foi desenvolvida por Smith, em 1985, e permite a seleção de peptídeos ou proteínas com propriedades específicas de ligação a alvos de interesse. A técnica consiste na expressão de peptídeos, proteínas ou fragmentos de anticorpos na superfície de partículas de fagos. Este processo pode ser realizado através da incorporação da seqüência de nucleotídeo codificante do peptídeo no genoma do fago ou fagomídeo fusionado ao gene responsável pela codificação das proteínas de superfície da partícula viral. A ligação física entre o fenótipo e o genótipo da expressão de proteínas, além da capacidade replicativa

dos fagos são os elementos estruturais que dão suporte a esta tecnologia. Utilizando-se da técnica *Phage Display*, é possível a construção de bibliotecas com diversidade de milhões e até bilhões de seqüências de nucleotídeos variantes que podem ser convertidas em proteínas expressas na superfície de fagos e que poderão ser convenientemente selecionadas de acordo com suas propriedades.

As seqüências de nucleotídeos a serem clonadas são inseridas na região do genoma do fago ou fagomídeo responsável pela codificação das proteínas de superfície, usualmente as proteínas pIII e pVIII (Smith & Valery, 1997).

O princípio deste método consiste no isolamento de fagos que se ligam ao alvo de interesse, geralmente moléculas biológicas, e a identificação do inserto por seqüenciamento. Dependendo da estringência do processo de seleção, pode-se obter um limitado número de clones de alta afinidade, bem como um elevado número de clones com diversos graus de afinidade.

As primeiras proteínas expressas na superfície de fagos foram os anticorpos, sendo a seqüência codante das regiões variáveis dos anticorpos (V) fusionadas a região amino-terminal da proteína PIII do fago (McCafferty & Griffiths, 1996).

Bibliotecas de Peptídeos Randômicos foram a primeira aplicação desta tecnologia. Bibliotecas em diferentes formatos, expressando fragmentos de genes, hormônios, enzimas, receptores e cDNA têm sido desenvolvidas.

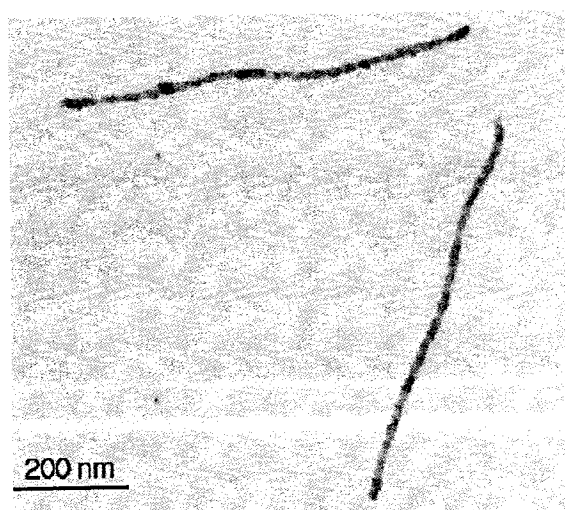
Anticorpos monoclonais utilizados na tecnologia *Phage Display* têm sido direcionados contra uma série de proteínas, muitas vezes consistindo em glicoproteínas imunodominantes de superfície de patógenos, como vírus, bactérias e protozoários, envolvidos nas mais diferentes patologias humanas e animais, como alergias, doenças auto-imunes, doenças infectocontagiosas e outras. A seleção de peptídeos por meio de anticorpos monoclonais serve a muitos propósitos, sendo o mais comum deles a identificação e mapeamento de epítomos. A localização inequívoca de epítomos envolve a identificação de homologia entre o peptídeo selecionado e o antígeno natural. O mapeamento de epítomos pode produzir, também, informações que ajudem no esclarecimento da organização

estrutural do antígeno e suas relações estruturais e funcionais (Deroo & Muller, 2001).

Muitos tipos de fagos têm sido utilizados como veículos na tecnologia *Phage Display*, incluindo o fago filamentososo Ff, fagos Lambda e T7 (Rodi & Makowski, 1999; Danner & Belasco, 2001).

Cada um dos diferentes tipos de fagos apresenta suas vantagens e desvantagens de acordo com sua aplicação. A família Ff (inclui os fagos M13, f1 e fd) são excelentes veículos de clonagem uma vez que apresentam dimensões ideais para a acomodação do inserto de DNA. Os fagos Ff fazem parte do grupo dos vírus que infectam bactérias *gram* negativas e que possuem como material genético DNA de fita simples (ssDNA). A infecção viral ocorre através do *pilus* sexual das bactérias que contêm o plasmídeo F e a liberação da partícula viral ocorre a partir da extrusão do DNA através da membrana, sem a ocorrência de lise celular. As seqüências de DNA desses três fagos mostram que eles apresentam 98% de homologia, conseqüentemente, a seqüência protéica dos produtos gênicos é praticamente a mesma (Webster, 2001).

O vetor M13KE (Figura 1), derivado do vetor de fagos m13mp19 possui uma rápida propagação e não necessita de seleção por antibiótico ou superinfecção por fago *helper*. Além disto, o gene *lacZ*, presente neste vetor, facilita a distinção entre colônias bacterianas infectadas com fagos de bibliotecas (colônias azuis) e colônias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens



**Figura 1:** Vetor M13KE (Tang *et al.*, 2002).

três domínios (D1, D2 e D3) separados por resíduos de glicina. Estudos cristalográficos estruturais dos domínios D1 e D2 mostraram uma conformação semelhante à ferradura de cavalo (Lubkowski *et al.*, 1998; Holliger *et al.*, 1999).

... em relação a pVIII, as bibliotecas de

(colônias brancas) (Messing *et al.*, 1977; Messing, 1983). O vetor M13KE permite a construção e propagação de bibliotecas de *phage display* pelo uso de técnicas padronizadas para fagos M13. Para pequenos insertos, a biblioteca pode ser amplificada repetidamente com pouca perda de seqüências e diversidade (Barbas *et al.*, 2001).

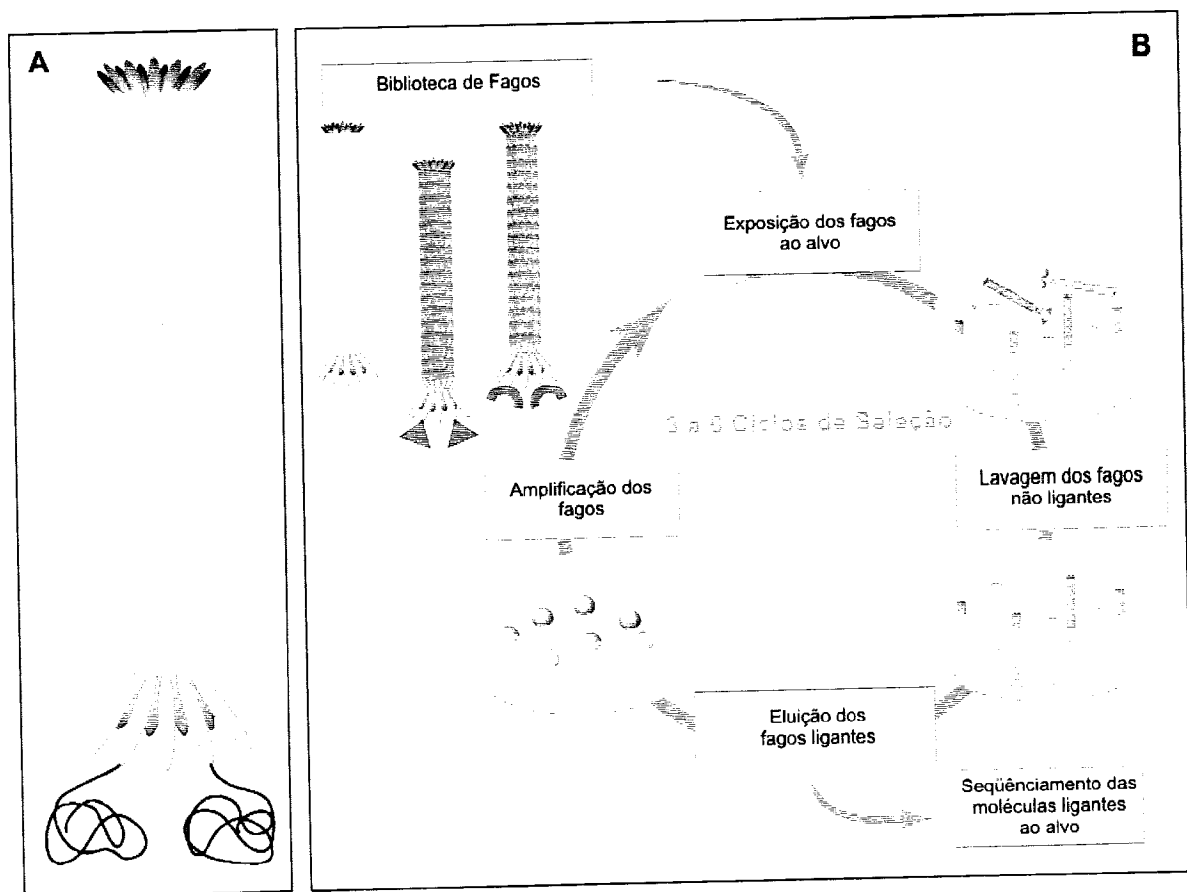
A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX). Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago (Phizicky & Fields, 1995; Brígido & Maranhão, 2002). Assim, o peptídeo é expresso na extremidade N-terminal da pIII ou pVIII. A pIII está relacionada com a infectividade do fago pela ligação ao pilus F da célula bacteriana. Ela apresenta três domínios (D1, D2 e D3) separados por resíduos de glicina. Estudos cristalográficos estruturais dos domínios D1 e D2 mostraram uma conformação semelhante à ferradura de cavalo (Lubkowski *et al.*, 1998; Holliger *et al.*, 1999). Devido a baixa representatividade da pIII em relação a pVIII, as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade (Brígido & Maranhão, 2002).

A seleção dos peptídeos ou proteínas, técnica denominada *biopanning*, consiste em um procedimento de seleção por afinidade que possibilita o enriquecimento de moléculas ligantes aos alvos de interesse. (Parmley & Smith, 1988).

Diversos protocolos de *biopanning* têm sido descritos. Eles se dividem em duas classes básicas, ambas relacionadas com a fase em que ocorre a ligação do fago ao alvo, podendo ser distinguidas em ligação em fase líquida e ligação em fase sólida. Na maioria das vezes, o alvo é retido em placas de ELISA, mas o procedimento pode ser realizado também por acoplamento em *beads*, resinas e membranas.



No procedimento de seleção, as moléculas alvo são imobilizadas em suporte sólido tais como placas de ELISA, *beads*, resinas ou membranas e são expostas aos fagos, permitindo a eliminação das partículas virais não ligantes através de lavagens sucessivas. Os fagos ligados aos alvos são eluídos posteriormente e amplificados para os ciclos posteriores de seleção biológica, possibilitando o enriquecimento do conjunto de fagos com seqüências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens, os clones individuais são caracterizados por seqüenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA.



**Figura 2:** A – Arquitetura do Fago M13KE; B – Esquema do Ciclo de Seleção por Afinidade (Adaptado de Smothers, J. F., 2002).

Várias aplicações das bibliotecas de peptídeos randômicos expostos em fagos têm sido realizadas com sucesso, tais como mapeamento de epítomos

(Jefferies, 1998), desenvolvimento de vacinas (Irving *et al.*, 2001), identificação de substratos de proteínas quinases/ligantes de SH2 (Kay *et al.*, 2001), e identificação de peptídeos miméticos de ligantes não peptídeos (Oldenburg, 1992). 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 & Petrenko, 1997). Uma particular aplicação é a identificação de novos peptídeos bioativos pela seleção contra receptores de superfícies celulares imobilizados ou em células intactas (Silva Jr. *et al.*, 2002). *Phage display* pode ser utilizado também *in vivo* para identificar peptídeos que se ligam em órgãos específicos. Neste caso, a biblioteca de fagos é injetada por via intravenosa, geralmente em roedores, e após o período de incubação os órgãos de interesse são removidos, homogeneizados e mantidos em suspensão com *E. coli* (Rajotte *et al.*, 1998).

## OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram:

Selecionar e isolar peptídeos ligantes à anticorpos monoclonais anti-proteínas de *Babesia bigemina* a partir de bibliotecas de peptídeos recombinantes por meio da tecnologia *Phage Display*.

Caracterizar por seqüenciamento e bioinformática os fagos recombinantes selecionados e determinar possíveis domínios funcionais das proteínas Hsp20 e p58 de *Babesia bigemina*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais ligantes às proteínas de superfície de merozoítos de *Babesia bigemina* foram adquiridos da empresa Veterinary Medical Research & Development, VMRD, Inc. (PO Box 502, Pullman, WA 99163 USA, www.vmr.com).

Os anticorpos de linhagens celulares 14.52.3.4, 14.16.1.7 e 14.29, todos do isotipo IgG<sub>1</sub>, são reativos às proteínas de [36, 20 e 16 kDa], [58 kDa] e [72 kDa] de *Babesia bigemina*, respectivamente.

### Seleção de Peptídeos – Biopanning em Solução

A seleção de peptídeos sintéticos reativos aos anticorpos acima descritos foi realizada utilizando-se uma biblioteca randômica de peptídeos de 12 aminoácidos (“Ph.D. – 12mer – New England Biolabs”), seguindo-se, com algumas modificações, as recomendações do fabricante.

A biblioteca é composta por doze peptídeos randômicos seguidos por uma curta seqüência espaçadora Gly-Gly-Gly fusionada à região N - terminal da proteína capsídica menor (Proteína III) de bacteriófagos M13 filamentosos. A biblioteca consistia de  $2,8 \times 10^{11}$  clones independentes, os quais representam as  $1,9 \times 10^9$  possíveis combinações contidas nos 12 resíduos de aminoácidos. Todas as cinco cópias da Proteína III capsídica dos fagos contêm peptídeos randômicos aminoterminais (Noren & Noren, 2001).

A seleção foi realizada em solução, em função de exigir uma quantidade consideravelmente menor de anticorpos, se comparada a outras formas, sendo utilizado como substrato 50 µL de proteína G agarose em 50% de solução aquosa

(Recombinant Protein G Agarose – Invitrogen™), lavados por ressuspensão em microtubo com 1 mL de TBS-T (TRIS – HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1%). Após centrifugação à 4.000 rpm por 1 minuto em centrífuga refrigerada à 4°C, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e descartado. Em seguida, a resina foi bloqueada por uma hora em solução de bloqueio (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,6; BSA 5 mg/mL; NaN<sub>3</sub> 0,02%) a 8°C, sendo misturada de 15 em 15 minutos. Após a incubação, a mesma foi lavada por quatro vezes, conforme descrito anteriormente, para então receber a mistura de 300 ng de anticorpos monoclonais (100 ng de cada anticorpo, misturados na mesma solução tamponante), seguido pela adição de  $2,0 \times 10^{11}$  partículas virais em um volume final de 200 µL de TBS-T 0,1%, previamente incubados à temperatura ambiente por 20 minutos.

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

Após a neutralização do eluato, uma amostra de 10 µL do mesmo foi ztitulada e o volume restante utilizado na reamplificação dos fagos em 30 mL de meio de cultura de *E. coli* (ER2738) contendo tetraciclina (20 mg/mL) e em fase inicial de crescimento bacteriano ( $OD_{600} \leq 0,3$ ). A cultura foi incubada por 6 horas em agitador com temperatura e rotação controladas a 37°C e 210 rpm, antes dos procedimentos de precipitação e titulação dos fagos.

A precipitação dos fagos iniciou-se pela centrifugação da cultura por 10 minutos e 4.000 rpm, a fim de extrair as células bacterianas. Após o descarte destas células, a cultura foi novamente centrifugada e as células residuais foram extraídas. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo, onde foi adicionado 20% do volume de PEG-NaCl (20% p/v de polietileno glicol – 8000 e NaCl 2,5M). A mistura permaneceu em repouso por 12 horas a 8°C e posteriormente foi

centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi novamente centrifugada por 2 minutos, para a remoção do sobrenadante residual. O "pellet" foi diluído em 200 µL de TBS 1X e os fagos foram posteriormente titulados.

Os fagos reamplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados no segundo ciclo em número de partículas de  $2,0 \times 10^{11}$  e assim subseqüentemente por três ciclos, sendo que cada ciclo envolveu os procedimentos de seleção, titulação do eluato, reamplificação e titulação dos fagos reamplificados. A partir do segundo ciclo, a estringência do tampão de lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5%, utilizando-se, então, 0,5% de Tween-20 nas lavagens.

Para todas as titulações de fagos foram utilizados 10 µL de solução contendo os fagos, diluídos em 90 µL de meio de cultura LB. As diluições seqüenciais ( $10^1$  a  $10^4$  para eluatos não amplificados e  $10^8$  a  $10^{11}$  para fagos amplificados e purificados) foram incubadas por 5 minutos com 200 µL de *E coli* (ER2738) em fase de crescimento inicial e plaqueadas em meio de cultura LB sólido contendo IPTG (0,5 mM) e X-Gal (40 µg/mL) juntamente com 3 mL de Agarose Top (10g Agarose, 10g de Bacto-Triptona, 5g de Extrato de Levedura, 5g de NaCl e 1g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  por litro de água).

As placas foram então incubadas em estufa por 18 horas a 37°C e as colônias azuis (resultantes da quebra do substrato X-Gal pela enzima β-galactosidase) foram contadas para a obtenção dos títulos de entrada e saída de partículas de fago, através da multiplicação do número de colônia azuis pelo fator de diluição, para todos os ciclos de seleção.

### **Extração de DNA de Fagos**

Para a obtenção de DNA dos fagos, 25 µL dos fagos previamente armazenados foram adicionados a 2 mL de cultura de ER2738 em fase de

crescimento inicial em tubos FALCON de 15 mL, onde permaneceram sob agitação de 210 rpm a 37°C por 12 horas. Após o crescimento a cultura foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos a fim de ocorrer a sedimentação das bactérias. Do sobrenadante, foi extraído um volume de 1 mL e adicionado a este 400 µL de PEG-NaCl. Após 10 minutos, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm e 4°C por 15 minutos e descartado o sobrenadante. Após a remoção do sobrenadante residual, foi adicionado 100 µL de Tampão Iodeto (Tris-HCl 10 mM e pH 8,0, EDTA 1 mM e NaI 4 M) e procedeu-se a agitação rápida da solução, afim de facilitar a liberação do DNA viral das partículas virais. A precipitação e lavagem do DNA foram realizadas com etanol 100% e 70%, respectivamente, conforme descrito por Barbas *et al.* (2001).

O DNA de cada amostra foi dissolvido em 15 µL de água e sua qualidade e quantidade foi avaliada por amostragem em gel de agarose 0,8% e leitura espectrofotométrica a 260 nm, respectivamente.

### **Seqüenciamento de DNA**

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o kit “Big Dye Terminator” (Pharmacia), 4 µL (~500 ng) de DNA e 10 pmoles de “primer” (96 M13 – 5' HOCCCTCATTAGTTAGCGCGTAACG 3' – Amersham Biosciences), que amplifica a região de nucleotídeos codificante dos aminoácidos referentes aos peptídeos randômicos fusionados nos fagos M13 recombinantes.

A reação de amplificação de DNA ocorreu em termociclador (Eppendorf). A precipitação do material amplificado foi feita acrescentando-se Acetato de Amônio 4 M e etanol absoluto às amostras, seguido de centrifugação por 45 minutos (3.700 rpm e 4°C), lavagem com etanol 70% e centrifugação (3.700 rpm e 4°C) por 10 minutos. A solubilização do DNA foi realizada com tampão de corrida (“Loading Buffer”) e o seqüenciamento foi realizado utilizando-se o seqüenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

## Análise dos Dados por Bioinformática

A tradução das seqüências de aminoácidos obtidas no seqüenciamento foi realizada pelo programa **DNA2PRO12**. Este programa é designado para a tradução de seqüências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs* (Ph.D.-12<sup>TM</sup> ou Ph.D.-C7C<sup>TM</sup>) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as seqüências inicial e final do vetor. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na seqüência, tais como códons inesperados ou erros na seqüência próxima (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>).

Para a análise das propriedades bioquímicas das proteínas de *Babesia bigemina*, tais como: antigenicidade, probabilidade de exposição e hidrofiliçidade, fez-se o uso do programa **DnaStar – Lasergene**, subprograma **Protean**.

As homologias de cada peptídeo, individualmente ou não, com proteínas de *Babesia bigemina* foram testadas utilizando-se os programas **MATCH** (<http://relic.bio.anl.gov/match.aspx>), **CLUSTAL W**, subprograma **Jawl View** (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) e **Supermatcher**. O programa MATCH foi usado para parear uma seqüência específica de proteína de *B. bigemina* com todas as seqüências peptídicas selecionadas, enquanto que o programa CLUSTAL W incluiu ainda na análise o pareamento entre os peptídeos recombinantes selecionados. No programa Supermatcher foi utilizado a matriz BLOSUM62 no alinhamento dos peptídeos selecionados e a proteína p58 de *Babesia bigemina*.

A predição estrutural da proteína HSP20 foi realizada no programa **Modeller**, enquanto que a predição conformacional de epítomos foi realizada pelo programa **CEP** (Conformation Epitope Prediction Server).

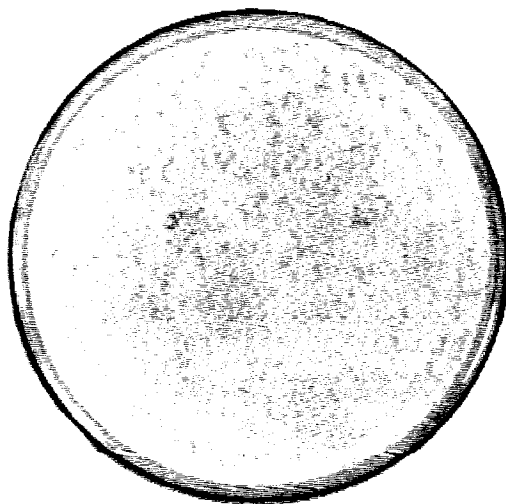


## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção dos Peptídeos – Biopanning

Os procedimentos de titulação dos fagos foram eficientes em todos os três ciclos de seleção realizados, as colônias de bactérias apresentaram coloração azulada, demonstrando a quebra do substrato X-Gal e a expressão do gene da  $\beta$ -galactosidase pelas bactérias ER2738, como mostrado na Figura 3. Não foram observados, nas titulações, colônias transparentes resultado da ausência de bactérias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (não carreadores do gene *lac Z*) (Barbas *et al.*, 2001).

A contagem do número de colônias azuis foi realizada em placas com aproximadamente 100 colônias. Após a contagem e multiplicação pelo devido valor de diluição, foram obtidos os títulos de entrada e saída para cada ciclo (Tabela 1).



**Figura 3:** Exemplo de placa de titulação. As colônias azuis representam as bactérias infectadas com os fagos M13 carreadores do gene da  $\beta$ -galactosidase.

Segundo Lowman & Wells (1993), a cada procedimento de seleção, formas mais afins dos peptídeos exógenos são obtidas, ocorrendo o processo chamado de maturação da afinidade.

Para manter a diversidade de seqüências entre os fagos ligantes, não se deve fazer mais que quatro ciclos de seleção. Ciclos de seleção adicionais podem comumente priorizar fagos que crescem, infectam ou eluem melhor do que fagos que se ligam melhor aos seus alvos (Kay *et al.*, 2001).

**Tabela 1:** Títulos obtidos nos ciclos de seleção contra anticorpos de *Babesia bigemina*.

<b>Títulos obtidos na seleção contra anticorpos monoclonais de <i>B. bigemina</i></b>		
<b>Ciclos</b>	<b>Número de partículas de fagos por <math>\mu\text{L}</math> de solução</b>	
	<b>Entrada</b>	<b>Saída</b>
Primeiro	$2,0 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^3$
Segundo	$2,0 \times 10^{10}$	$16,7 \times 10^3$
Terceiro	$2,0 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^3$

Os títulos obtidos para os fagos provenientes do eluídos amplificados foram de  $1,2 \times 10^{10}$  partículas de fagos (pfu) por  $\mu\text{L}$  para o primeiro ciclo e  $5,1 \times 10^9$  pfu por  $\mu\text{L}$  para o segundo, ambos dentro da média esperada.

### **Seqüenciamento de DNA e Bioinformática**

A análise eletroforética do DNA foi feita por amostragem e a mesma mostrou a ausência de degradação ou contaminantes, tais como RNA bacteriano, além de indicar a concentração de DNA nas amostras. A quantidade de DNA foi considerada suficiente e prosseguiu-se com o seqüenciamento.

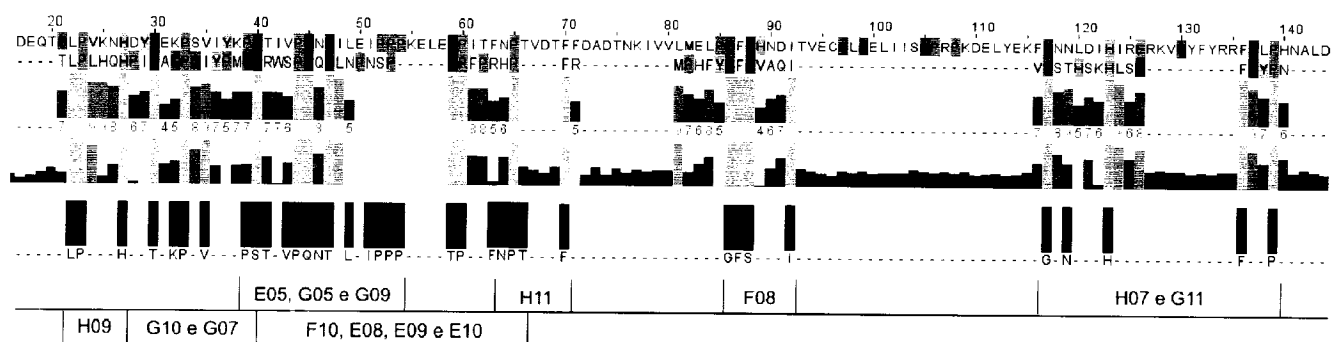
As seqüências de DNA geradas foram visualizadas pelo programa Sequencer Analyzer (“MegaBace”). Para a maximização da obtenção do número de seqüências viáveis para a análise por bioinformática, o seqüenciamento foi repetido duas vezes, utilizando-se a mesma placa de amostras. A tradução realizada pelo programa DNA2PRO12 (RELIC Softwares) gerou 27 seqüências de aminoácidos íntegras, sendo 14 delas distintas entre si.

**Tabela 2:** Seqüências dos aminoácidos selecionados contra anticorpos de *B. bigemina* e suas respectivas freqüências na população de 27 peptídeos.

ID	Peptídeos	Freqüência
E05	IKTALASPTLWP	1/27
G05	AMTRWSPQQTLN	3/27
G07	HPIWADKPTVGL	3/27
H07	VGSTHSKHLSQQ	1/27
E08	RIHSEPPHFYPT	2/27
F08	MPHFYGFSSVAQI	2/27
E09	IPNTLTPFPRHP	1/27
G09	EGAMTSLPIPPP	2/27
H09	TLPLHQHPVSP	2/27
E10	AHHTNQLSDLAP	3/27
F10	VVSTRSALPNSP	1/27
G10	KTAGPGIYPMGS	2/27
G11	NDNAHAPFRYPN	2/27
H11	QTNLNDNLSYFR	2/27

## Bioinformática: Hsp20 e Peptídeos Seleccionados

O alinhamento realizado pelo programa CLUSTAL W dos 14 peptídeos seleccionados e a proteína Hsp20 de *Babesia bigemina* pode ser visualizado na Figura 4. O alinhamento ocorreu entre a região correspondente aos aminoácidos de números 21 e 139, localizando-se principalmente entre os aminoácidos 21 e 70.



**Figura 4:** Alinhamento pelo programa CLUSTAL W, subprograma Jawl View, dos peptídeos seleccionados com a proteína Hsp20 (p20) de *Babesia bigemina*. Os blocos em preto representam os aminoácidos que tiveram 100% de homologia com a proteína.

O alinhamento realizado pelo programa MATCH pode ser visualizado nas Figuras 5, 6 e 7, onde observa-se os peptídeos G07, G05 e G09 como possuindo as maiores regiões de similaridade com a proteína em relação aos demais peptídeos.

Observa-se que as seqüências de aminoácidos **KPXV** (posições 32, 33 e 35), **PQXT** (posições 44, 45 e 47 da proteína) e **IPPP** (posições 51 a 54) geradas pelo alinhamento do programa MATCH também foram geradas pelo alinhamento no programa CLUSTAL W.

Considerando os alinhamentos gerados pelos dois programas utilizados, CLUSTAL W e MATCH, o resultado final dos alinhamentos pode ser visualizado na Figura 8.

Z

---

Maximum similarity is 241.447 at position 32

↓ Maximum similarity position= 32

```
mscimrcnnseqevvideqtlpvknhdytekpsviykpstivpcntile 50
                HPIWADKPTWGL
ippkkeletpitfnptvdtffdadtnkivvlmelpgfshnditvecglge 100
liisgprpkdelyekfgnnldihirerkvgyfyrrfkphnaldksvavs 150
ysngildiriecsqfsemrriqidgka 200
```

---

**Figura 5:** Alinhamento pelo programa MATCH (RELIC) do peptídeo **G07** e a proteína **Hsp20** (p20) de *Babesia bigemina*.

---

Maximum similarity is 217.076 at position 44

Maximum similarity position= 44

```
mscimrcnnseqevvideqtlpvknhdytekpsviykpstivpcntile 50
                AMTRWSPQOTLN
ippkkeletpitfnptvdtffdadtnkivvlmelpgfshnditvecglge 100
liisgprpkdelyekfgnnldihirerkvgyfyrrfkphnaldksvavs 150
ysngildiriecsqfsemrriqidgka 200
```

---

**Figura 6:** Alinhamento pelo programa MATCH (RELIC) do peptídeo **G05** e a proteína **Hsp20** (p20) de *Babesia bigemina*.

---

Maximum similarity is 518.980 at position 51

```

mscimrcnnseqevvideqtglpvknhdytekpsviykpstivpqntile 50
                EGAMTSLPIPPP                EGAMTSLP

↓ Maximum similarity position= 51
ipppkelptpitfnptvdtffdadtnkivvlmelpgfshnditvecglge 100
IPPF

liisgprpkdelyekfgnndihirerkvgyfyrrfklphnaldksvavs 150

ysngildiriecsqfsemrriqidgka 200

```

---

**Figura 7:** Alinhamento pelo programa MATCH (RELIC) do peptídeo **G09** e a proteína **Hsp20** (p20) de *Babesia bigemina*.

22	MSCIMRCNNSEQEVVIDEQTGLPVK <del>ND</del> HDYTEKPSVIYKPSTIVPQNTILEIPPPKEL
	ETPITFNPTVD <del>T</del> FFDADTNKIVVL <del>M</del> ELPGFSHNDITVECGLGELIISGPRPKDELYE
123	KFGNNDIHIRERKVG <del>Y</del> FYRRFKLPHNALDKSVAVSYSNGILDIRIECSQFSEM

**Figura 8:** Alinhamento final entre os peptídeos selecionados e a proteína Hsp20 de *Babesia bigemina*. Os aminoácidos destacadas em vermelho foram aqueles reconhecidos pelos peptídeos alinhados à proteína Hsp20.

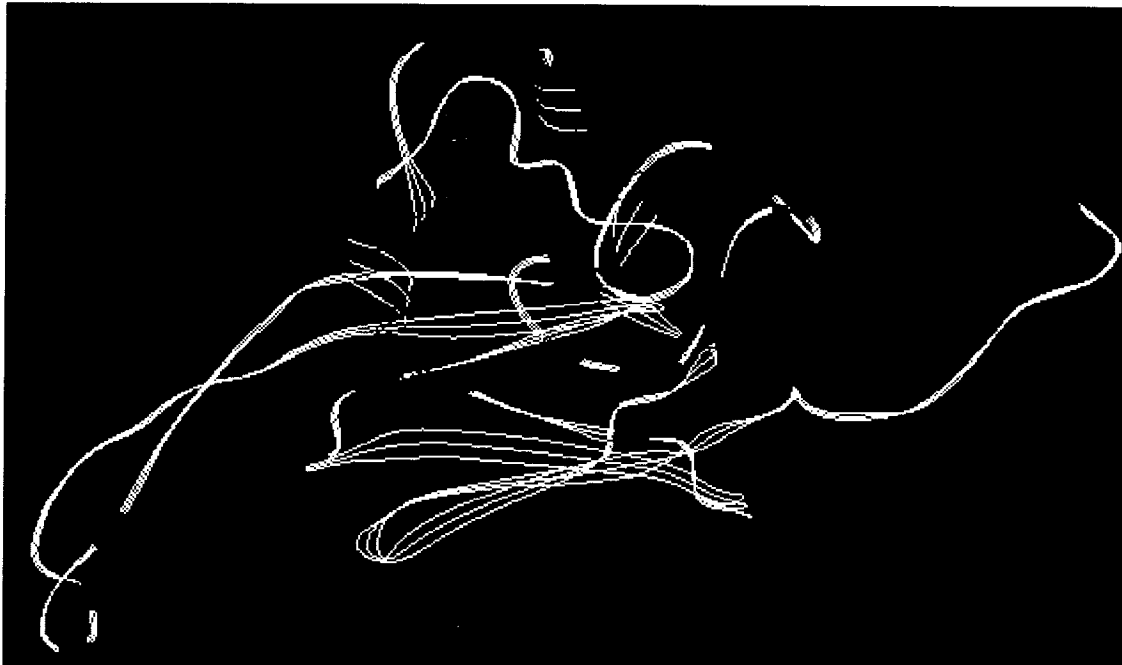
O peptídeo DEQTGLPVKN (destacado na Figura 8, com realce cinza) e descrito por Norimine *et. al* (2004) como um possível epítipo na proteína Hsp20 de *B. bigemina* foi reconhecido pelo peptídeo H09 nos aminoácidos LP (posições 22 e 23).

A seqüência de aminoácidos KSHDYSEKPS, descrito por Brown, W. C. *et al.* (2001) como um peptídeo reativo a soros anti-Bbo20 de coelho e anticorpos monoclonais específicos para Bbo20 difere-se de sua homóloga (KNHDYTEKPS,

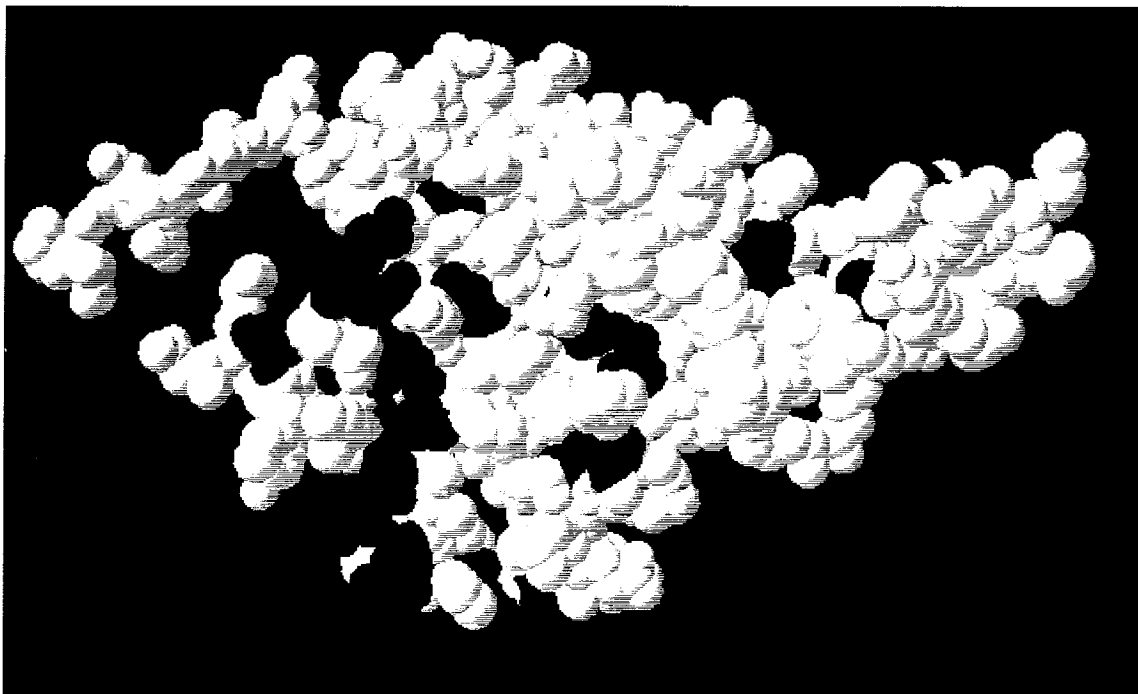
também destacada na Figura 8, com realce cinza) em *B. bigemina* somente pelas posições 26 e 30 dos aminoácidos. Em destaque na Figura 8, essa seqüência foi alinhada com os peptídeos G07, G10 e H09 nas posições **XXHXXTKPX**.

No resultado dos alinhamentos dos peptídeos selecionados e a proteína Hsp20, a seqüência **PSTXVPQNTXLXIPPP** (posições 39 a 54) destaca-se em função do grande número de aminoácidos alinhados na mesma região, apesar de não ter sido encontrado nenhuma citação desta seqüência como sendo um epítipo desta proteína.

A predição de estrutura realizada pelo programa Modeller (Figuras 9 e 10) baseou-se em bancos de dados que continham estruturas de proteína homólogas à proteína Hsp20 de *Babesia bigemina*. Tais proteínas, estruturalmente caracterizadas, serviram de modelo para a predição. Foram aceitas como modelos somente aquelas proteínas que apresentaram mais de 99% de homologia com a proteína Hsp20, a fim de se garantir maior confiabilidade à estrutura gerada. Não coincidentemente, todas as proteínas selecionadas são da família HSP (Small Heat Shock Protein).



**Figura 9:** Predição estrutural da proteína Hsp20 de *Babesia bigemina* pelo programa Modeller. As regiões destacadas em vermelho representam os aminoácidos alinhados com os 14 peptídeos selecionados.



**Figura 10:** Visualização por esferas da predição estrutural da proteína Hsp20 de *Babesia bigemina* pelo programa Modeller. As regiões destacadas em vermelho representam os aminoácidos alinhados com os 14 peptídeos selecionados.



A localização dos aminoácidos que apresentaram alinhamento com os 14 peptídeos selecionados, destacados em vermelho, localizaram-se predominantemente em uma região específica da proteína, possivelmente por sua alta antigenicidade.

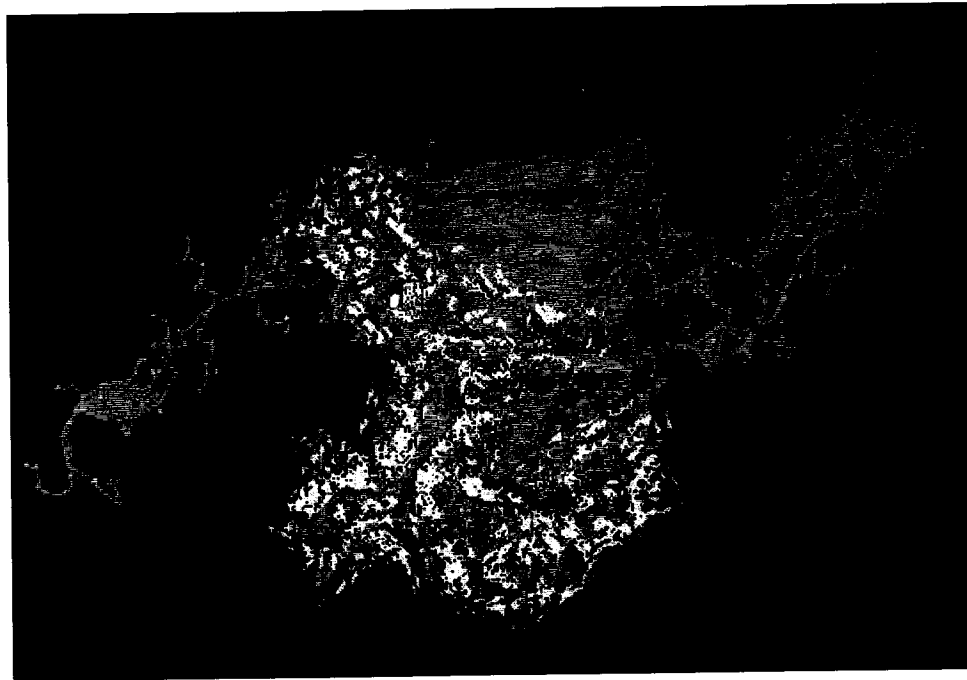
A predição de epítomos para a proteína Hsp20 gerada pelo programa CEP, que pode ser visualizada na Figura 11, mostra que na região da proteína onde ocorre a maior parte dos alinhamentos possivelmente localiza-se um epítomo.

A localização dos peptídeos selecionados em uma mesma região, aliado ao fato da mesma ser altamente exposta superficialmente e à sua predição para epítomo sugerem que essa localização da proteína Hsp20 seja antigênica e represente um importante alvo no desenvolvimento de vacinas recombinantes.

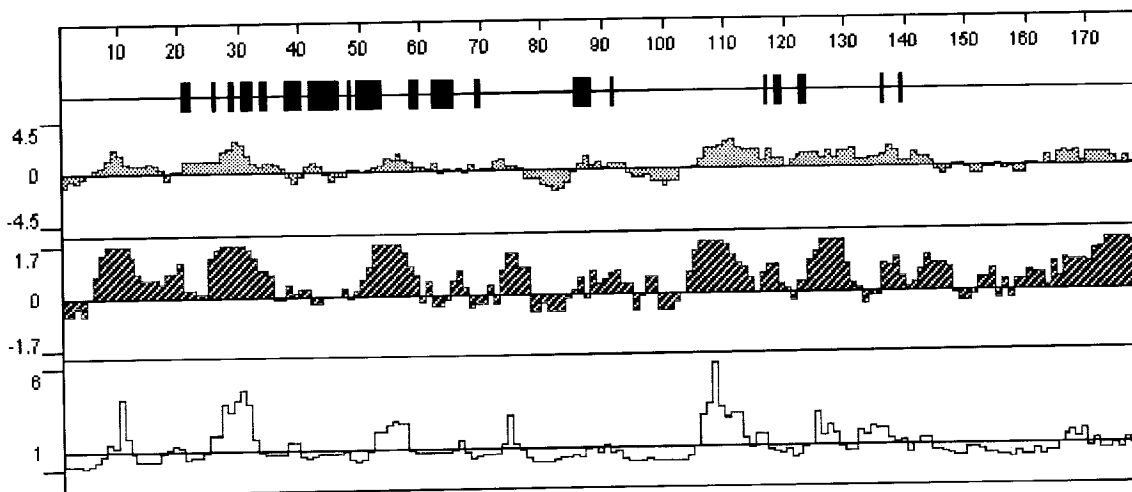
**Tabela 3:** Proteínas utilizadas como modelos na predição da estrutura da proteína Hsp20 de *Babesia bigemina* pelo programa Modeller.

Proteínas	Homologia
HSP de <i>Methanococcus jannaschii</i>	99,9%
HSP de <i>Triticum aestivum</i>	99,9%
HSP de <i>Taenia saginata</i>	99,5%

A Figura 13 mostra o alinhamento realizado pelo programa CLUSTAL W dos 14 peptídeos selecionados e a proteína p58 de *Babesia bigemina*. O mesmo ocorreu entre a região correspondente aos aminoácidos de números 114 e 466.



**Figura 11:** Predição de Epítomos na proteína Hsp20 de *B. bigemina* gerada pelo programa CEP. A região destacada em amarelo é uma possível região antigênica.



**Figura 12:** Análise das propriedades bioquímicas da proteína Hsp20 pelo programa DnaStar – Protean. Os gráficos azul, rosa e amarelo representam, respectivamente, os índices de hidrofiliidade, antigenicidade (Jamerson-Wolf) e de exposição superficial. Os blocos em cor preto representam os 14 peptídeos alinhados à proteína.

## Bioinformática: p58 e Peptídeos Seleccionados

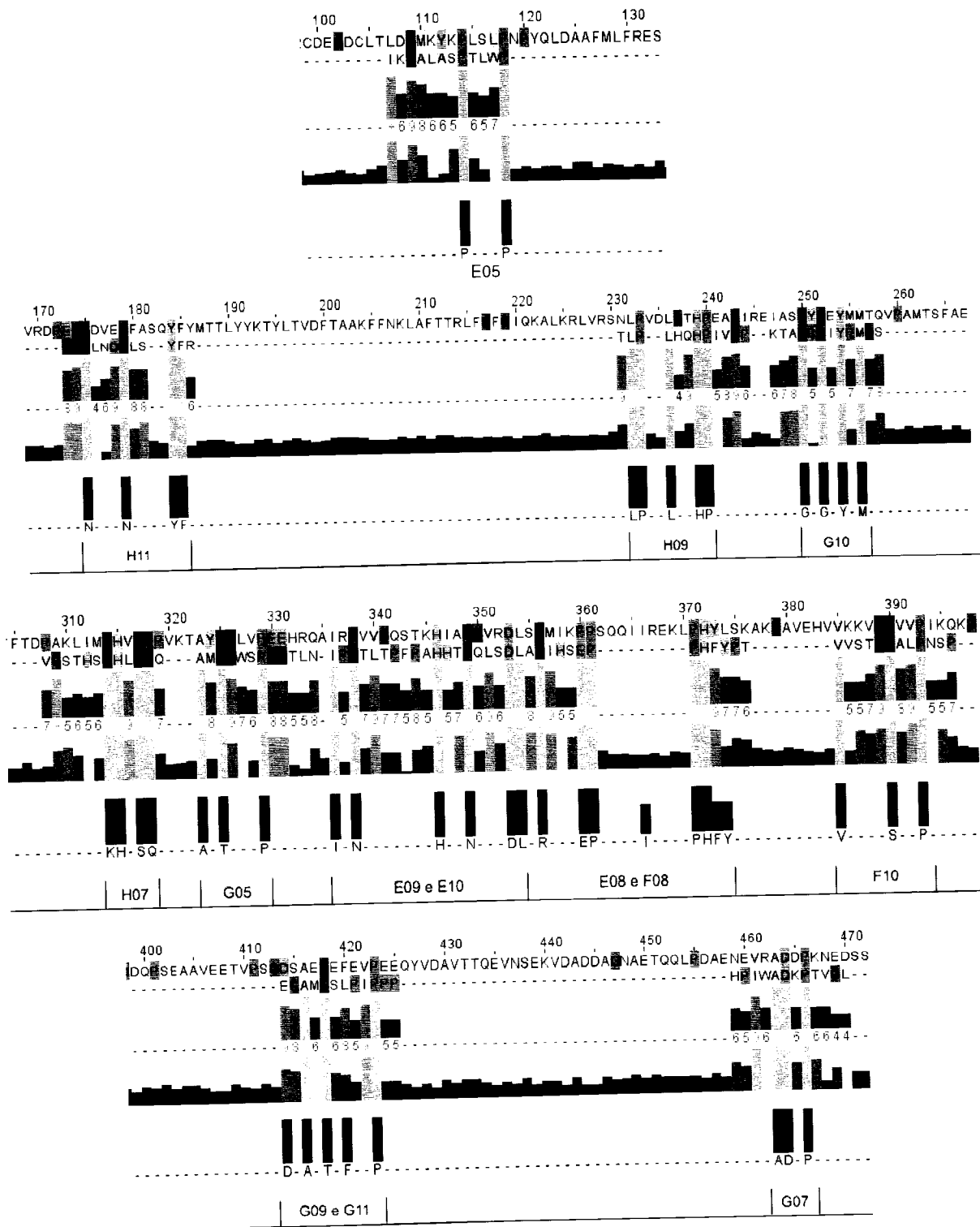


Figura 13: Alinhamentos pelo programa CLUSTAL W, subprograma Jawl View, dos peptídeos seleccionados com a proteína p58 de *Babesia bigemina*.

Segundo McGuire *et al.* (1991), os aminoácidos PLSLPNPYQLDAAF (posições entre 114 e 127 da proteína p58) são fortemente conservados nas proteínas p58 de *Babesia bigemina* e Bv60 de *Babesia bovis*. Existem ainda oligopeptídeos localizados na região amino terminal que são identicamente conservados entre as proteínas p58 e Bv60. Ambas regiões localizadas entre os aminoácidos de números 76 a 101 na p58 e 80 a 105 na Bv60 apresentam 4 resíduos de cisteína, sugerindo que ambos polipeptídeos apresentam estrutura terciária similar. Segundos os mesmos autores, pesquisas realizadas em bancos de dados computacionais não demonstraram existir similaridade entre os 14 aminoácidos conservados e funções conhecidas como a de enzimas e receptores. Portanto, o oligopeptídeo provavelmente estaria envolvido na invasão dos eritrócitos pelo parasita.

A Figura 13 revela a existência dos aminoácidos PLSLPNPYQLDAAF citados por McGuire *et al.* (1991) na proteína p58, onde observa-se também o alinhamento do peptídeo E05 nas posições 114 e 118, enquanto que o alinhamento do peptídeo F10 nas posições 117, 118 e 119 (PLSLPNPYQLDAAF), gerado pelo programa Supermatcher, pode ser visualizado na Tabela 4.

As Figuras 14, 15, 16 e 17 mostram os alinhamentos gerados pelo programa MATCH entre os peptídeos selecionados e a proteína p58 de *B. bigemina*. Nota-se que nos alinhamentos correspondentes às Figuras 14, 15 e 16, os aminoácidos **QLS** (posições 66, 67 e 68), **RS** (posições 229 e 230) e **EXXMTXXPAMTS** (posições 253, 256, 257, 260, 261, 262, 263 e 264) provenientes dos peptídeos E10, F10 e G09 respectivamente, não foram alinhados pelo programa CLUSTAL W. O peptídeo G09 foi alinhado sobreposto a si mesmo, indicando que dois clones idênticos provavelmente estiveram alinhados ao alvo lado a lado. A Figura 17 mostra o alinhamento do peptídeo H07 e a proteína p58, repetindo o alinhamento dos aminoácidos **KHXSQ** (posições 314, 315, 317 e 318) gerado pelo programa CLUSTAL W.

---

Maximum similarity is 487.095 at position 66

```
mrsflgvcfgalllvarsgsairythrsgvmsaevvgdvsktllleanevv    50

                ↓ Maximum similarity position= 66
naemeatqvnkdmqsgqlsnvketivgevcekvagnstcgesviayvnr    100
                AHHTNQLSDLAP
egdc l t l d s m k y k p l s l p n p y q l d a a f m l f r e s d s n p a k n e v k r f w m r s r    150
```

---

**Figura 14:** Alinhamento pelo programa MATCH (RELIC) do peptídeo **E10** e a proteína p58 de *Babesia bigemina*.

---

Maximum similarity is 221.265 at position 230

```
mrsflgvcfgalllvarsgsairythrsgvmsaevvgdvsktllleanevv    50

naemeatqvnkdmqsgqlsnvketivgevcekvagnstcgesviayvnr    100

egdc l t l d s m k y k p l s l p n p y q l d a a f m l f r e s d s n p a k n e v k r f w m r s r    150

sshgdyhhfvvsllkknvvr d p e s n d v e n f a s q y f y m t t l y k t y l t v d f    200

                ↓ Maximum similarity position= 230
taakffnklafttrifgfgiqkalkrlvrsnlpvdlgthpeatireiasg    250
                vvstrsalpns
ygeymmtqvpamtsfaerfskmatkllvtvgdyvhlpaykrwyrkfkef    300
```

---

**Figura 15:** Alinhamento pelo programa MATCH (RELIC) do peptídeo **F10** com a proteína **p58** de *Babesia bigemina*.

---

Maximum similarity is 43.982 at position 261

taakffnklafttrlfqfgiqkalkrlvrslpvdlgthpeatireiasg 250  
vvstrsalpnsp

↓ Maximum similarity position= 261

ygeymmtqvpamtsfaerfskmatktllvtvgdyvhlpaykrwyrkfkef 300  
egamtslpippp  
egamtslpippp  
ivnfftdpaklimkhvsqpvktaytklvpeehrqairnvvgqstkhiang 350  
vgsthskhlsqq

---

**Figura 16:** Alinhamento pelo programa MATCH (RELIC) do peptídeo **G09** com a proteína **p58** de *Babesia bigemina*.

---

Maximum similarity is 258.583 at position 315

mræflgvfcgalllvarsgsairythrsgvmsaevvgdvsktllleanevv 50  
ygeymmtqvpamtsfaerfskmatktllvtvgdyvhlpaykrwyrkfkef 300  
↓ Maximum similarity position= 315  
ivnfftdpaklimkhvsqpvktaytklvpeehrqairnvvgqstkhiang 350  
VGSTHSHKLSQQ  
vrdlærmikepsqqiireklphylskakgavehvkkvksvvpikqkgdq 400

---

**Figura 17:** Alinhamento pelo programa MATCH (RELIC) do peptídeo **H07** com a proteína **p58** de *Babesia bigemina*.

**Tabela 4:** Alinhamento dos peptídeos selecionados com a proteína p58 de *Babesia bigemina* pelo programa Supermatcher.

Peptídeo Alinhado	Posição (aa) na p58	Alinhamento
E10	65 a 70	SQLSNV :     : : NQLSDL
F10	117 a 119	SLPN :     ALPN
G09	261 a 264	AMTS     AMTS
G05	261 a 266	AMTSFA    . : : AMTRWS
G07	279 a 281	TVG     TVG
E05	320 a 323	VKTA :     IKTA
G10	321 a 329	KTAYTKLVP    . . . : .   KTAGPGIYP
H07	359 a 364	KEPSQQ  . .     KHLSQQ

Considerando os alinhamentos gerados pelos três programas utilizados, CLUSTAL W, MATCH e Supermatcher, o resultado final dos alinhamentos pode ser visualizado na Figura 18.

```

MRSFLGVCFGALLLVARSGSAIRYTHRSGVMSAEVVGDVSKTLLEANEVNAEM
      65
EATQVNKDMQSQLSNVKETIVGEVCEKVAGNSTCGESVIAYVNRCDGDCCLTD
      114
SMKYKPLSLPNPYQLDAAFMLFRESDSNPAKNEVKRFWMRSRSSHGDYHHFVV
SLLKKNVVRDPESNDVENFASQYFYMTTLYYKTYLTVDFTAAKFFNKLAFTTRLFG
FGIQKALKRLVRSNLPVDLGTHTPEATIREIASGYGEYMMTQVPAMTSFAERFSKM
ATKTLTVGDDYVHLPAYKRWRKFKFIVNFFDPAKLIMKHVSQPVKTAAYTKLV
PEEHRQAIRNVVGQSTKHIANGVRDLSRMIKEPSQQIIREKLPHYLSKAKGAVEHV
VKKVKSVVPIKQKGDQPSEAAVEETVPSGDSAETEFVPEEQYVDAVTTQEVNS
      466
EKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNEDSSSSSDSDA

```

**Figura 18:** Resultado final do alinhamento dos peptídeos selecionados e a proteína p58 de *Babesia bigemina*. Os aminoácidos destacados em vermelho foram aqueles reconhecidos pelos peptídeos alinhados à proteína Hsp20.



## CONCLUSÃO

A tecnologia *Phage Display* mostrou-se eficiente na seleção de peptídeos recombinantes ligantes a anticorpos monoclonais reativos a proteínas de *Babesia bigemina*.

A análise por seqüenciamento de DNA e bioinformática dos peptídeos selecionados identificou cinco possíveis motivos de ligação na proteína Hsp20 (LPXXXHXXTXKPXV, PSTXVPQNTXLXIPPP, TPXXFNPTXXXF, GFSXXXI e GXNXXXH) e treze na proteína p58 (XQLSX, PXXLPN, NXXXNXXXXYF, RSXLPXXLXXHP, GXGEYXMTXXPAMTS, XTVGX, KHXSQXVKTAXT, PXXXXXXIXN, HXXNXXXDLXR, KEPSQQXIXXXXPHYL, VXXXXSXXP, DXAXTXFXXP e XADXPX), que deverão ser analisados quanto às suas propriedades antigênicas e imunogênicas em estudos posteriores, a fim de caracterizar quais epítomos poderão ser utilizados no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra babesiose bovina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbas, C.F.III; Burton, D.R.; Scott, J.K.; Silverman, G.J. Phage Display: A Laboratory Manual. Plain view, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Bork, S., Yokoyama N., Matsuo, T., Claveria, F. G., Fujisaki, K., Igarashi, I., 2003. Growth inhibitory effect of Triclosan on equine and bovine *Babesia* parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68(3), 334-340.
- Brígido, M.M.; Maranhão, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em FAGOS *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. n.26, 2002.
- Brown, W. C., Ruef, B. J., Norimine, J., Kegerreis, K. A., Suarez, C. E., Conley, P. G., Stich, R. W., Carson, k. H., Rice-Ficht, A. C., 2001. A novel 20-Kilodalton protein conserved in *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* stimulates memory CD4+ T lymphocyte responses in *B. bovis*-immune cattle. *Molecular & Biochemical Parasitology* 118, 97-109.
- Danner, S. and Belasco, J.G. 2001. T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98(23): 12954–12959.
- Deroo, S., Muller, C. P., 2001. Antigenic and Immunogenic Phage Displayed Mimetopes as Substitute Antigens: Applications and Limitations. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 4, 75-110.
- Grisi L, Massard CL, Borja GEM, Pereira JB 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Veterinária* 21: 8-10.
- Holliger, P.; Williams, R. L.; Riechmann, L. Crystal structure of the two N terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: Evidence for conformational lability. *J. Mol. Biol.*, v. 288, p. 649-657, 1999.

Irving, M. B.; Pan O.; Scott, J.K. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, p. 314–324, 2001.

Jefferies, D. Selection of Novel Ligands from Phage Display Libraries: An Alternative Approach to Drug and Vaccine Discovery. *Parasitology Today*, v. 14, n. 5, 1998.

Kay, B. R., kasanov, J., Yamablai, M., 2001. Screening phage-displayed combinatorial peptides libraries. *Methods*, 24, 240-246.

Kay, B.K.; Kasanov, J.; Yamabhai, M. Screening Phage-Displayed Combinatorial Peptide Libraries. *Methods*, v. 24, p. 240–246, 2001.

Losos G.J. 1986. Babesiosis, p. 4-97. In: Losos G.J. (ed.) *Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals*. Bath Press: Avon, Great Britain.

Lowman, H. B. & Wells, J. A., 1993. Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J. Mol. Biol.*, 234, 564-578.

Lubkowski, J.; Henneke, F.; Plückthun, A.; Wlodawer, A. The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure domains of g3p. *Nature Struct. Biol.*, v. 5, p. 140-147, 1998.

Machado R. Z., McElwain T. F., Suarez, C. E., Hines S. A., Palmer G. H., 1993. *Babesia bigemina*: Isolation and Characterization of Merozoite Rhoptries. *Experimental Parasitology* 77, 315-325.

Machado, R. Z., Montassier, H. J., Pinto, A. A., Lemos, E. G., Machado, M. R. F., Valadão, I. F. F., Barci, L. G., Malheiros, E. B., 1997. Na enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Veterinary Parasitology*, 71, 17-26.

McCafferty, J. & Griffiths, J. (1996) Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual. San Diego: Academic Press.

McElwain T.F., Perryman L.E., Davis W.C., McGuire T.C. 1987. Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live *Babesia bigemina* merozoites. *The Journal of Immunology*. 138:2298-2304.

Messing, J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* v. 101, p. 20-78 1983.

Messing, J.; Gronenborn, B.; Muller, H.B.; Hans, H.P. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a *HindIII* fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, p. 3642-3646, 1977.

Noren K. A. & Noren C. J. Construction of High-Complexity Combinatorial Phage Display Peptide Libraries. *Methods*. V. 23, p.169–178, 2001.

Oldenburg, K.R. Peptide ligands for a sugar binding protein isolated from a random peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 89, p. 5393–5397, 1992.

PARMLEY, S. F. & SMITH, G. P. (1988) Antibody selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73, 305.

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

Rajotte, D.; Arap, W.; Hagedorn, M.; Koivunen, E.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display. *J. Clin. Invest.*, v. 102, p. 430-437, 1998.

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

Silva, J.R.A.; Kawazoe, U.; Freitas, F.F.T.; Gatti, M.S.V.; Dolder, H.; Schumacher, R.I.; Juliano, M.A.; Silva, M.J.; Leite, A. Avian anticoccidial activity of a novel membrane interactive peptide selected from phage display libraries. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 120, p. 53–60, 2002.

Smith, G.P.; Petrenko V.A. Phage Display. *Chem. Rev.*, v. 97, p. 391-410, 1997.

Smothers J. F., Henikoff, S., Carter, P., 2002. Affinity Selection from Biological Libraries. *Science*, 298, 621-622.

Suarez, C. E., Palmer, G. H., Jasmer, D. P., Hines, S. A., Perryman, L. E., McElwain, T. F., 1991. Characterization of the gene encoding a 60-Kilodalton *Babesia bovis* merozoite proteins with conserved and surface exposed epitopes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46, 45-52.

Tang, J. X., Janmey, P. A., Lyubartsev, A., Nordenskiöld, L., 2002. Metal Ion-Induced Lateral Aggregation of Filamentous Viruses fd and M13. *Biophysical Journal*, 83, 566–581.

Webster, R. (2001) Filamentous phage biology. In: Barbas III, C. F.; Burton, D. R.; Scott, J. R. & Silverman, G. J. (2001) *Phage Display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. C. F., pp. 1.1-1.37.