

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

MON
SIS. 24
P371 U
TESISEM

SISBI/UFU



1000218752

**UTILIZAÇÃO DO “PHAGE DISPLAY” PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR IMUNOGLOBULINAS Y POLICLONAIS
ANTI-PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO *Boophilus microplus***

Carlos Roberto Prudencio

ORIENTADOR: Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA - MG
2004

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

**UTILIZAÇÃO DO “PHAGE DISPLAY” PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR IMUNOGLOBULINAS Y POLICLONAIS
ANTI-PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO *Boophilus microplus***

ALUNO: Carlos Roberto Prudencio

ORIENTADOR: Luiz Ricardo Goulart Filho

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

UBERLÂNDIA-MG
2004

**UTILIZAÇÃO DO “PHAGE DISPLAY” PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR IMUNOGLOBULINAS Y POLICLONAIS
ANTI - PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO *Boophilus microplus***

ALUNO: Carlos Roberto Prudencio

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)

Examinadores:

Andréia Queiroz Maranhão

Foued Salmen Spíndola

Data da Defesa: 29/03 /2004

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

(Orientador)

Uberlândia, ____/____/____

Dedico ao meu pai Lilonio, o qual ensinou-me o valor da família
na constituição do indivíduo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço pelo apoio das pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe Darcy e minha namorada Ana Liza pelo equilíbrio emocional e apoio constantes nos momentos mais difíceis.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Conselho de Aprendizagem e Ensino Superior (CAPES) pelo suporte ao ensino e pesquisa de Pós Graduação.

Ao instituto de Genética e Bioquímica pela disponibilidade da infra-estrutura utilizada.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular pelo ambiente amigável e de união que proporcionaram durante este tempo de convívio mútuo.

Aos colegas dos Laboratórios de Químicas de Proteínas e Produtos Naturais, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Imunologia e Laboratório de Genética pelo auxílio prestado.

Agradeço também principalmente as pessoas que prestaram suporte técnico essencial para o desenvolvimento do trabalho como Deise da Silva, Neide Maria Aparecida, Foued Salmen Spíndola, Amélia Hamaguchi, Maria Inês Homs Brandeburgo, Andréia Marques, Milton Vieira Coelho, entre outros.

Agradecimento ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart por ter dado a chance de realizar este trabalho sob sua orientação.

Meu especial agradecimento aos colegas e parceiros Rone Cardoso e Guilherme Souza pelo senso de companheirismo e prestação de serviço ao longo do trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO GERAL	1
INTRODUÇÃO GERAL.....	2
O CARRAPATO BOVINO.....	3
Ciclo de vida.....	4
Relação Parasita-Hospedeiro	4
Resposta Imune.....	6
CONTROLE DO CARRAPATO	6
Controle químico.....	6
Controle alternativo.....	7
Controle por Vacinas.....	7
Phage Display	12
OBJETIVOS GERAIS.....	17
<i>Capítulo I</i>	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	31
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO	37
AGRADECIMENTOS	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
<i>Capítulo II</i>	40
RESUMO.....	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAIS e MÉTODOS.....	44
<i>Purificação e caracterização das imunoglobulinas Y de galinha.</i>	44
<i>Análises de "Western Blot" para detecção de atividade dos anticorpos</i> <i>purificados</i>	44

<i>Seleção da biblioteca de peptídeos fusionados em bacteriófagos filamentosos</i>	44
<i>Caracterização dos clones selecionados</i>	45
<i>Identificação dos Clones reativos</i>	45
<i>"Western Blot"</i>	46
<i>Seqüenciamento de DNA</i>	46
<i>Análise de dados pela Bioinformática</i>	46
RESULTADOS	48
<i>Seleção por Imunoafinidade</i>	49
<i>Caracterização dos clones ligantes selecionados</i>	49
<i>Seqüenciamento de DNA</i>	51
<i>Análise das seqüências</i>	52
DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CONCLUSÕES GERAIS	73
ANEXO 1	74

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais para as proteínas de larvas de *B. microplus*. Título obtido (ufc) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade (**título por 10UI**). (50)

Tabela 2 Seqüência de aminoácidos dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos policlonais de galinhas imunizadas com proteínas totais de larvas de *B. microplus*. (52)

Tabela 3 Índices de antigenicidade preditas para os peptídeos selecionados por afinidade realizado pelo Protean (Lasergene softwares). (53)

Tabela 4 Frequência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelas IgYs e a frequência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AAFREQ. (54)

Tabela 5 Alinhamento linear das seqüências de aminoácidos dos peptídeos selecionados por afinidade realizado pelo MOTIF 2. (54)

Tabela 6 Alinhamentos das seqüências consenso entre os motivos protéicos com proteínas referentes ao *Boophilus microplus* depositadas nos bancos de dados. Foi utilizado para as análises o programa FASTAcom. (55)

Tabela 7 Proteínas do *B. microplus* similares com os peptídeos alinhados pelo BLAST. (56)

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1 Estratégia do "Phage Display". (15)

Capítulo 1

Figura 1 Resultados do ELISA expressados como títulos (Título = Diluição do soro baseado no valor do "cut off"). Os títulos foram acima de 1: 48600. Galinhas (GL1 e GL2), soros pré imunes (SP1 e SP2) e o controle (PBS). (35)

Figura 2 SDS-PAGE (Gel 16%) Preparações de IgY obtidas por precipitação com sulfato de amônio e cromatografadas em resina de troca ionica. Linha A - amostra de soro total de galinhas, linha B - Fração de IgY obtida no void, linha C - IgG de coelho purificada, linhas D e E - amostras B e C reduzidas por DTT, demonstrando a presença das cadeias pesadas e leves de ambos os anticorpos, linha F - Marcador de massa molecular (Sigma). (36)

Figura 3 Western blot (SDS-PAGE 16%) para proteínas de larvas de carrapatos incubadas com diferentes diluições dos anticorpos policlonais purificados de soro de galinhas (IgY). (37)

Capítulo 2

Figura 1 SDS-PAGE (Gel 16%) de Preparações de Imunoglobulinas de galinhas obtidas através da purificação por imunoafinidade dos anticorpos com proteínas totais do *B. microplus*. A seta indica a posição das Imunoglobulinas de galinha. Linhas A e B pool das frações de IgY obtidas pela precipitação por Sulfato de amonio e cromatografadas para IgY anti-larvas. Linhas C e D representam a fração do eluído de IgY **após eluição ácida e neutralização**. (48)

Figura 2 Caracterização das Imunoglobulinas de galinhas purificadas por afinidade. Pelo experimento de Western blot (SDS-PAGE) foi possível verificar o reconhecimento das proteínas de *larvas de B. microplus* em diferentes diluições dos anticorpos policlonais (IgY) purificados **por afinidade**. (49)

Figura 3 Titulação do eluído após a terceira seleção. Colônias azuis representam a infecção de *E. coli* F' com fagos M13 carregando o gene da β -galactosidase. (50)

Figura 4 SDS-PAGE (Gel 16%) de Bacteriófagos M13 (A) e "Western Blot" para o conjunto de fagos após a terceira seleção do experimento (B). Em A as setas indicam as posições da proteína VIII e a proteína III (contém o peptídeo fusionado). As proteínas foram submetidas a condições redutoras e não redutoras. B representa bandas com intensidades crescentes de sinal (B1-B3) representando o aumento do reconhecimento dos peptídeos selecionados pelos anticorpos anti- proteínas de carrapato. (51)

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrometro
AA	Aminoácido
Ab	Anticorpo
Ag	Antígeno
BCIP	Bromochloroindolyl phosphato
Bm86	Glicoproteína antigênica de <i>Boophilus microplus</i>
Bm91	Glicoproteína antigênica de <i>Boophilus microplus</i>
Bm95	Glicoproteína antigênica de <i>Boophilus microplus</i>
BMA7	Glicoproteína antigênica de <i>Boophilus microplus</i>
BMT1	Inibidor de serino protease
BrBm2	Anticorpo Monoclonal
BSA	Soroalbumina bovina
BYC	<i>Boophilus</i> Yolk Catepsin
CYP	Genes da superfamília citocromo P450
DNA	Ácido Desoribonucleico
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	immunosorbent assay Enzyme linked
g	Gramas
GST	Glutathione S transferase
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y (Yolk)
IPTG	Isopropil α-D-tiogalactosise
kDa	Quilodalton
l	Litro
M	Molar
M13KE	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos

M13mp19	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos
mA	Miliampere
NBT	Nitroblue tetrazolium
NC	Membrana de nitrocelulose
ND	Não determinado
ng	Nanogramas
p/v	Peso por volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb	Par de base
PBS	Fosfato de sódio
PBST	Fosfato de sódio com tween 20 0.5%
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
QU1	Glicoproteína de <i>Boophilus microplus</i>
RELIC	Receptor Ligands Contents
RNAM	Ácido Ribonucléico mensageiro
SBM	Antígeno sintético do <i>Boophilus microplus</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBST	Trifosfato de sódio com Tween 20
UFC	Unidades formadoras de colônias
v/v	Volume por Volume
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosideo

RESUMO GERAL

UTILIZAÇÃO DO "PHAGE DISPLAY" PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR IMUNOGLOBULINAS Y POLICLONAIS ANTI PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO *Boophilus microplus*

Peptídeos foram selecionados por IgY policlonais específicas para proteínas totais do estágio larval do *Boophilus microplus* através da utilização de uma biblioteca de peptídeos sintéticas apresentada em fagos. Inicialmente, para a produção de soro policlonal, galinhas foram imunizadas com proteínas totais do estágio larval do parasita. A triagem foi monitorada por ELISA durante o período das injeções, para confirmação do desenvolvimento de resposta imune. Após obtenção de título satisfatório, as imunoglobulinas foram precipitadas e caracterizadas parcialmente. O processo de obtenção de imunoglobulinas a partir do soro de galinhas foi satisfatório e os anticorpos policlonais foram funcionalmente ativos quanto ao reconhecimento dos antígenos totais. Posteriormente, uma biblioteca de peptídeos fusionada na Proteína III capsídica de fagos foi submetida à seleção contra imunoglobulinas Y policlonais purificadas por afinidade ao imunógeno. O conjunto dos peptídeos foi reconhecido pelos anticorpos anti-proteínas de carrapato e a antigenicidade de cada peptídeo foi deduzida por bioinformática. As seqüências consenso NxxxKxxL e TPDKS foram identificadas em 65% e 12% dos fagos seqüenciados, respectivamente. Seqüências similares foram identificadas entre os peptídeos e as proteínas do *B. microplus* depositadas no "GENEBANK". Pelo processo de seleção foi possível a identificação de prováveis alvos protéicos. Em vista disso, testes de imunizações em animais estão sendo desenvolvidos para determinação da resposta imune geradas pelos peptídeos obtidos neste trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: anticorpos policlonais, peptídeos, "Phage Display", *Boophilus microplus*.

INTRODUÇÃO GERAL

O CARRAPATO BOVINO

No Brasil, o carrapato *B. microplus* representa um grande problema para a bovinocultura em diferentes regiões por ser um agente debilitante e também como vetor transmissor de organismos causadores de doenças. O uso de acaricidas vem sendo a medida de controle profilático e terapêutico mais comum contra esses ectoparasitos. Os principais problemas relacionados com essa prática dizem respeito ao desenvolvimento de linhagens resistentes de carrapatos, ao aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal (sendo principalmente leite e carne) devido à poluição ambiental proveniente do uso dos acaricidas no controle (BULLMAN et al., 1996).

O perfil estimado dos prejuízos causados pelos carrapatos no mundo não é otimista e, no Brasil, a estimativa aproxima-se a um bilhão de dólares (HORN, 1983). No mundo, esses valores alcançam anualmente, a cifra de 7 bilhões de dólares (DE CASTRO, 1997).

O *B. microplus* é um ectoparasita de bovinos sendo encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (WILLADSEN & JONGEJAN, 1999). Encontra-se distribuído atualmente em todo o país, variando de intensidade de acordo com as condições climáticas e os tipos raciais de bovinos explorados (GONZÁLES, 1995).

Os carrapatos são artrópodes hematófagos e importantes vetores de arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e protozoários para o homem e animais domésticos (KAUFMAN, 1989). Aproximadamente 50 espécies de carrapatos são conhecidas como causadoras de intoxicação (GOTHE, 1979). No Brasil, os dois gêneros *Rickettsia sp*, *Anaplasma sp* e o protozoário *Babesia spp* são responsáveis pelo complexo conhecido como "Tristeza parasitária bovina" responsável por importantes prejuízos ao sistema de produção. A ocorrência da tristeza parasitária está ligada a um equilíbrio entre o inóculo recebido e o nível de anticorpos dos bovinos, assim como a carência nutricional e o estresse, influenciando na resistência dos bovinos e favorecendo a doença (FARIAS, 1995)

Ao picar o animal, o carrapato causa irritação provocando desconforto

e perda de sangue, devido à sua ação hematófaga, influenciando no ganho de peso e no estado nutricional gerando conseqüências na produção de leite e carne, podendo levar à morte do animal dependendo da intensidade da infestação parasitária (HORN, 1983). A lesão causada na pele dos animais pode favorecer o aparecimento de infecções secundárias como as miíases cutâneas acarretando também prejuízos no mercado do couro (GONZALES & SERRA-FREIRE, 1992).

Ciclo de vida

O ciclo de vida do carrapato *B. microplus* divide-se em fase de vida livre e fase de vida parasitária. Para a fase de vida livre no Brasil-Central, segundo FURLONG (1993), são necessários em torno de três dias para a pré-postura, de três a seis semanas para a postura, de vinte e dois a trinta dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, transformando-as em larvas infestantes. O mesmo autor afirma que, a cada postura, uma fêmea produz de 2000 a 3000 ovos. Na fase parasitária são necessários, em média, de 18 a 26 dias para a fixação, alimentação, troca de cutícula, fase adulta e acasalamento, assim como para a alimentação, engurgitamento e queda das fêmeas. Os machos permanecem mais tempo sobre o bovino e se acasalam com outras fêmeas.

O período de larva é o mais vulnerável em baixas temperaturas. No entanto, em presença de alta umidade relativa do ar, as larvas podem sobreviver até 8 meses (HITCHCOCK, 1955). As larvas de *B. microplus* alimentam-se preferencialmente de plasma, apenas nos momentos que precedem o rápido engurgitamento das ninfas e das fêmeas, o sangue torna-se o principal constituinte alimentar (BENNETT, 1974). O acasalamento acontece a partir do 17º dia que se segue à infestação (LONDT & ARTHUR, 1975) com rápido engurgitamento após a cópula, nas horas que antecedem a queda do parasita.

Relação Parasita-Hospedeiro

A associação bem sucedida dos hematófagos com os hospedeiros está baseada na habilidade destes artrópodes em interferir nas reações anti-

hemostáticas e inflamatórias do seu hospedeiro vertebrado (AROCHA-PIÑANGO et al., 1999). A relação parasita-hospedeiro é um balanço entre as limitações do parasito pelas defesas do hospedeiro e a habilidade do parasito de modular, evadir ou restringir a resposta imune (WIKEL et al., 1994). A saliva dos artrópodes hematófagos contém substâncias que são antagonistas de muitas reações de reparação dos seus hospedeiros que poderiam impedir o fluxo sanguíneo no local de alimentação e interromper a alimentação (RIBEIRO 1995).

A resistência dos bovinos contra o *B. microplus* é um fenômeno adquirido, sendo Zebuínos e Taurinos destituídos de experiência prévia com o carrapato, sendo igualmente suscetíveis à infestação primária por larvas desta espécie de ixodídeo (WAGLAND, 1975). Os bovinos *Bos indicus* (zebu) são mais resistentes aos carrapatos do que os *Bos taurus* (europeu), sendo que os bovinos europeus apresentam em média 10,5 vezes mais carrapatos que os de cruzamentos com zebuínos (FRANCIS & LITTLE, 1964). A resistência pode ser devido à seleção natural pelo tempo maior que o *Bos indicus* conviveu com os carrapatos (GOMES, 1995). Por outro lado, existem dentre as raças européias, aquelas com maior resistência aos carrapatos, como é o caso da raça Jersey (UTECH et al., 1978). Foi observado que a variação individual em relação à resistência aos carrapatos também acontece dentro de uma mesma raça (GOMES, 1995). Além disso, outras variáveis influenciam a relação parasita-hospedeiro, como o sexo (STEAR et al., 1984), fator idade (SUTHERST et al., 1979), época do ano (GOMES et al., 1989), estado nutricional (SUTHERST et al., 1983), a coloração da pele e do pêlo (OLIVEIRA & ALENCAR, 1987), entre outras.

O gado também pode manifestar diferentes níveis de resistência em cada fase de desenvolvimento do *B. microplus*, particularmente contra a fixação larval, mais de 50% das larvas que atingem o hospedeiro não conseguem completar o ciclo parasitário (ROBERTS, 1968). Somente 12,4% das larvas infectantes de *B. microplus* que se fixam no hospedeiro conseguem chegar à fase de fêmea engurgitada (NUÑES et al., 1972).

Resposta Imune

O contato entre o hospedeiro e o carrapato por vários dias possibilita o desenvolvimento da ação da resposta imune. Porém, as medidas adotadas pelo parasita contra alvos da resposta imune controlam a expressão da imunidade adquirida do hospedeiro permitindo o desenvolvimento dos mesmos (WIKEL, 1996).

Os carrapatos são capazes de modular os macrófagos do hospedeiro e a resposta de citocinas de células T, suprimir proliferação de linfócitos T, diminuir a resposta de anticorpos e inibir as atividades dos componentes do sistema complemento. O bloqueio dessas atividades é diretamente sobre elementos da resposta imune envolvidos na aquisição e expressão da resistência adquirida pelo hospedeiro contra as infestações e, conseqüentemente, influenciando também na transmissão de patógenos (WIKEL & BERGMAN, 1997). A supressão da função das APCs e linfócitos T reduzem a habilidade de gerar e expressar imunidade efetiva para qualquer tipo de imunógeno, incluindo aqueles associados aos patógenos transmitidos pelo carrapato (WIKEL, 1996).

CONTROLE DO CARRAPATO

Controle químico

O uso de acaricidas é a principal forma de controle dos carrapatos em rebanho bovino, principalmente por meio de aspersão ou banho de solução aquosa. Os sistemas dorsal, injetável e por bolos gástricos, tem sido incrementados nos últimos anos facilitando o manejo. Novas formas de administração dos produtos vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de facilitar o manejo e aumentar a eficiência dos produtos químicos no controle do carrapato.

O extensivo uso de acaricidas leva a um número elevado de problemas como o custo do manejo e curto período de proteção. Além disso, promove a seleção de linhagens de carrapatos acaricida-resistentes, diminuindo o período de proteção dos produtos e aumentando o custo do tratamento.

No controle químico, são utilizados os derivados arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas e piretróides sintéticos. Em média, os diferentes princípios ativos utilizados para controlar o carrapato apresentaram uma vida útil de pouco mais de uma década, quando quase a totalidade das populações de carrapatos presentes no campo apresentava resistência à droga utilizada. Atualmente, as drogas mais utilizadas são os derivados de piretróides, ivermectinas e benzoil fenil uréia (DA SILVA & VAZ JR, 1997).

Controle alternativo

O controle alternativo do carrapato vem sendo estimulado apesar de sua baixa eficácia. Os métodos são os mais variados: seleção de bovinos resistentes aos carrapatos (DAVIES, 1993), cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas (SUTHERST et al.,1982), rotação de pastagens (ELDER et al.,1980), manejo de predadores naturais, como a *Egretta ibis* (ALVES BRANCO et al.,1983) e formigas (GONZALES, 1995), uso de patógenos como o fungo *Beauveria bassiana* (CORDOVÉS, 1997) e bactérias como a *Cedecea lapagei* (BRUM, 1988).

Controle por Vacinas

As vacinas são potencialmente importantes no controle de agentes causadores de doenças, principalmente por não serem agentes químicos, por terem um menor custo e o desenvolvimento de resistência é mais lento do que para os produtos químicos (WILLADSEN, 1997).

Atualmente, são exploradas duas formas distintas de abordagens no desenvolvimento de vacinas para carrapatos: a primeira delas, baseada na observação da ocorrência de resistência natural do bovino adquirida depois de repetidas infestações com o ectoparasita (ROBERTS, 1968; WAGLAND, 1975; WILLADSEN et al.,1989; BARRIGA et al.,1993) propiciou a identificação de antígenos por imunidade naturalmente adquirida ("exposed antigens"). A segunda, baseada na identificação dos antígenos ocultos ("concealed antigens"), os quais não são apresentados ao sistema imune do hospedeiro". A identificação e caracterização de novos antígenos vacinais referentes a estas

metodologias são revistas por MULENGA (2000) e WILLADSEN (2001). Nestes trabalhos, são apresentados os principais antígenos identificados: imunógenos presentes nas glândulas salivares relacionados com a indução de hipersensibilidade na pele, modulação da resposta imune no hospedeiro, inibição da hemostasia do hospedeiro, além de proteínas relacionadas com as enzimas proteolíticas.

A identificação dos antígenos ocultos "concealed antigens", conceito desenvolvido por WILLADSEN e KEMP (1988), foi baseado no fato que determinadas proteínas do parasita não entram em contato com o sistema imunológico do hospedeiro durante uma infestação e, portanto, não induzem a uma resposta imune natural. Pela imunização com estas proteínas ocultas, ocorre produção de resposta imune e no momento da ingestão de sangue pelo parasita, anticorpos e outros elementos interagem com a proteína utilizada na imunização, podendo causar danos ao parasita e interferir na sobrevivência, no desenvolvimento e na capacidade do carrapato de gerar descendência. Uma desvantagem é a contínua necessidade de estimulação antigênica para manutenção de título satisfatório. Algumas comparações referentes a estas duas metodologias são discutidas por SAHIBI (1997).

Pela identificação de um antígeno oculto Bm86, uma proteína imunogênica do tubo digestivo do carrapato, foi possível o desenvolvimento da primeira vacina de uso comercial para o controle de artrópodes parasitas, até então era possível controlar por meio de vacinas apenas vírus e bactérias (WILLADSEN & KEMP, 1988). A vacina é baseada em uma glicoproteína de 89 kDa, ligada à membrana intestinal que induziu a produção de anticorpos inibindo a endocitose das células intestinais do *B. microplus*, sem causar lise celular (WILLADSEN et al., 1989).

O gene Bm86 foi clonado e a sua proteína recombinante expressa em *Escherichia coli* (RAND et al., 1989) e *Pichia pastoris* (RODRIGUEZ et al., 1994), apresentando resultados satisfatórios em teste com bovinos. Ovinos foram sensibilizados usando plasmídeo com o gene da proteína Bm86, sendo os resultados semelhantes à vacinação com a proteína recombinante (DE ROSE et al., 1999). Em posteriores estudos, a proteína Bm86 mostrou

aumento de imunogenicidade quando associada a outros antígenos (MCKENNA et al., 1998).

Atualmente, as vacinas comerciais são desenvolvidas a partir do antígeno Bm86, conferindo proteção parcial aos bovinos contra futuras infestações por *B. microplus* proporcionando a diminuição do número de carrapatos, redução na produção de ovos e interferindo na fertilidade (RODRIGUEZ et al., 1995b). Na Austrália, a vacina baseada na proteína Bm86 é comercializada com o nome de "TickGARD" (WILLADSEN et al., 1995) e, em Cuba, "GAVAC" (DE LA FUENTE et al., 1999). Na produção bovina, em nível de campo, é essencial o uso de químicos em associação com a Bm86 nas imunizações para alcançar um controle satisfatório. Os resultados não asseguram a proteção desejada, sendo sugerido a necessidade da associação de novos antígenos protetores (WILLADSEN et al., 2001).

No Brasil, entre os trabalhos recentes, foi descoberta por ANDREOTTI (2002), uma proteína inibidora de serino proteases (BMTI) que possui um efeito protetor de 72,8%. São dadas três doses da vacina para o animal em qualquer fase de vida, sem contra-indicação. A vacina ainda não está à disposição para o mercado. Os trabalhos tem sido desenvolvidos para a criação de uma vacina poli-imunogênica visando maior eficiência no controle. Ainda, foram sintetizados quimicamente três peptídeos sintéticos correspondendo aos antígenos derivados da glicoproteína Bm86, baseados em análises de predições de antigenicidade e imunogenicidade, sendo testados em bovinos com eficiência satisfatória (PATARROYO et al., 2002).

Diversos outros antígenos são estudados, tendo por objetivo a identificação de novos alvos terapêuticos ou mesmo, complementar as propriedades antigênicas existentes dos antígenos já conhecidos. Nas revisões de MCKENNA et al., (1998) e WILLADSEN (2001), são apresentados diversos antígenos com potencial aplicação em vacinas, independentes do tipo da relação parasito-hospedeiro.

Entre os principais antígenos identificados, o antígeno Bm95 foi capaz de proteger tanto cepas de carrapatos Bm86 resistentes quanto cepas Bm86

sensíveis, sugerindo que a Bm95 poderia ser um antígeno universal para a proteção de bovinos infestados por *B. microplus* de diferentes localizações geográfica (GARCIA-GARCIA et al.,2000).

Foi também purificada uma proteína com massa molecular de 86 kDa, denominada Bm91. Com base na seqüência de aminoácidos, esta proteína apresentou similaridade com enzima conversora de angiotensina. Foi localizada em grande quantidade em células de intestino e glândulas salivares (RIDING et al.,1994).

A partir de ovos de *B. microplus*, foi purificada uma glicoproteína de massa molecular de 50kDa, denominada BYC - "Boophilus Yolk pro-Cathepsin" (LOGULLO et al.,1998). Na mesma época, o anticorpo policlonal desenvolvido contra uma proteína denominada N-acetilhexosaminidase isolada de extrato de larva de *B. microplus* reagiu com diferentes antígenos na hemolinfa (DEL PINO et al.,1998).

Além dos antígenos Bm86, Bm91, Bm95 e BmaA7, os quais são antígenos definidos para o *B. microplus*, os antígenos Pró-catepsina, B-N acetil, vitelina e o antígeno B de membrana apresentam efeitos semelhantes de antigenicidade, constituindo um grupo de antígenos promissores para o desenvolvimento de vacinas (WILLADSEN, 2001).

Todas as proteínas de *B. microplus* caracterizadas como bons imunógenos são glicoproteínas (WILLADSEN, 1997). Esta característica apresenta algumas implicações tanto científicas quanto industriais. Os estudos de glicoproteínas são mais complexos e a produção industrial é mais onerosa. Os dados indicam que a presença de glicídios na proteína Bm86 não apresenta importância maior para induzir imunoproteção. Interessantemente, nos casos da Bm91 e da BMA7, os glicídios participam, ao menos parcialmente, na indução da resposta imunológica protetora e estes dois antígenos quando usados em conjunto com a Bm86 a imunidade anticarrapato é maior (MCKENNA et al.,1998, WILADSEN, 1996).

Usualmente, a resposta imune em bovinos infestados naturalmente com carrapatos é fraca, provavelmente devido a competição entre os

antígenos. Alguns antígenos, tais como constituintes da saliva poderiam ser irrelevantes para a indução de resistência embora, competem com os antígenos protetores. A inoculação de antígenos purificados associados com um adjuvante adequado poderia produzir uma resposta imune satisfatória (BARRIGA, 1999).

Idealmente, uma vacina eficiente deveria conter dois ou mais antígenos oriundos de diferentes estágios de vida e diferentes órgãos e tecidos do carrapato, tal que a imunidade induzida por vacina no animal hospedeiro poderia conter um número maior de chances de causar danos ao parasita. Esta estratégia aumentaria a eficiência da vacina e diminuiria o potencial para o desenvolvimento de resistência pelos carrapatos (TELLAM, 2002).

No desenvolvimento de vacinas recombinantes, tem sido demonstrado que protótipos contendo mais de um antígeno são mais eficazes do que aqueles com apenas um antígeno (WILLADSEN, 1996). Em vista disso, torna-se evidente a necessidade da identificação de novos antígenos, identificação de epítomos importantes ou mesmo melhorar as vacinas existentes para o controle do carrapato bovino.

A identificação e caracterização dos epítomos importantes nos principais antígenos do *B. microplus* possibilita a utilização de peptídeos sintéticos com fins vacinais. Dessa forma, trabalha-se apenas a região antigênica, sendo desnecessária a utilização da proteína completa. Vacinas sintéticas apresentam algumas características desejáveis como alto grau de pureza, caracterização química conhecida, ausência de contaminantes, produção em larga escala, fácil armazenagem devido a alta estabilidade, ausência de enzimas proteolíticas, baixo custo e produção em escala industrial (NEURATH & KENT, 1986). Novos trabalhos são necessários para a definição de epítomos que poderiam produzir resposta de anticorpos protetores, tornando amplo o campo de estudo de vacinas sintéticas no controle do carrapato bovino.

Técnicas moleculares, como o "Phage Display", ocupam um espaço cada vez mais importante no campo da parasitologia e apresenta ser um caminho promissor. Com os estudos científicos e o desenvolvimento

tecnológico no campo da proteômica e da genômica, é possível identificar e correlacionar dados para o desenvolvimento e comercialização de novos medicamentos, minimizando custos e diminuindo o tempo gasto no desenvolvimento de novos produtos (DALTON, 2001).

Phage Display

A metodologia do "Phage Display", exposição de biomoléculas na superfície de fagos, tem apresentado uma utilização cada vez mais crescente desde o seu desenvolvimento em 1985 por SMITH. Pode-se dizer que as bibliotecas apresentadas no capsídio de fagos filamentosos, têm emergido como um poderoso instrumento em diversas áreas de pesquisa, desde as mais básicas, como o estudo de estruturas de biomoléculas, até à obtenção e o desenho de novos fármacos e vacinas contra diferentes doenças (SMOTHERS et al., 2002; HASSAN et al., 2002).

A metodologia do "Phage Display" descreve uma técnica de seleção na qual uma biblioteca de peptídeos ou proteínas com as seqüências randomizadas são expressas na superfície da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada resíduo encontra-se no genoma viral (PARMLEY & SMITH, 1988). Com isto, é possível a correlação entre cada seqüência da proteína variante e sua respectiva seqüência de DNA, com o qual permite rápida caracterização baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo. Foram expressos na superfície viral anticorpos (BARBAS III et al., 1992; HOOGENBOOM & WINTER, 1992; HOOGENBOOM, 1997; RADER ET AL., 1997), peptídeos (NOREN & NOREN, 2001), enzimas (SOUILLION, 1994), receptores de superfície celular (ROBERTSON, 1993), entre outras estruturas. As biomoléculas específicas contidas nestas bibliotecas são selecionadas ou "peneiradas" por um processo de interação proteica "in vitro" denominado "Biopanning" (PARMLEY & SMITH, 1988).

O procedimento de seleção ou "biopanning", é feito pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. Na maioria das vezes, o alvo é retido em placas de ELISA, mas também se utiliza *beads*, resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas, e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição.

A subpopulação de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica ou "biopanng" (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com seqüências específicas contra o alvo. Após 3 ou 4 passagens, os clones individuais são caracterizados por seqüenciamento de DNA, "Western blot" ou ELISA (SMITH & PETRENKO, 1997), ver figura 1.

Bibliotecas de peptídeos randômicos expostos em fagos têm sido usadas com sucesso para numerosas aplicações, incluindo mapeamento de epítomos (JEFFERIES, 1998), desenvolvimento de vacinas (IRVING, 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). Essa ampla utilização se deve a algumas vantagens: habilidade de selecionar ligantes de alta afinidade, possibilidade de produzir proteínas solúveis, baixo custo, fácil manuseio e 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). Outro desenvolvimento recente e promissor é o uso do "phage display" para selecionar peptídeos específicos "in vivo" (KOLONIN et al., 2001). Os peptídeos selecionados podem ser utilizados com sucesso para a entrega de medicamentos a células tumorais (MEDYNSKI, 1994; PASQUALINI & RUOSLAHTI, 1996; PASQUALINI et al., 2000). Utilizando-se proteínas artificiais, selecionadas por "Phage Display", já foi possível ligar e desligar genes "in vivo" de plantas (BEERLI et al., 2000).

Sistemas comumente utilizados são baseados em um vetor de clonagem de fagos M13 para a exposição de peptídeos fusionados na extremidade amino-terminal da proteína III capsídica de fagos M13 (PIII). Esta proteína modula a infectividade dos fagos pela ligação ao "pilus" F da célula bacteriana e esta presente em número de cinco cópias por extremidade de cada partícula viral madura. Em contraste com bibliotecas apresentadas na proteína PVIII, as quais tipicamente apresentam 100 cópias apresentadas por partícula viral, bibliotecas na PIII apresentam somente 5 cópias por vírion. Em virtude desta valência reduzida, bibliotecas na PIII são mais indicadas para a

descoberta de ligantes de alta afinidade (BARBAS III et al., 2001).

Os sistemas baseados na PIII foram criados para a exposição de bibliotecas de pequenos peptídeos (quando não existem cópias selvagens) pentavalentes. O sistema usa um vetor de fago, com o qual pode ser propagado rapidamente sem a necessidade de seleção por antibiótico ou superinfecção por fago auxiliar, denominado "helper phage". O vetor de clonagem M13KE é derivado do m13mp19, permitindo a construção e propagação de bibliotecas de fagos pelo uso de técnicas padronizadas para fagos M13. Para pequenos insertos, a biblioteca pode ser amplificada repetidamente com pouca perda de seqüência de diversidade (NOREN & NOREN, 2001).

A exposição em fagos apresenta vantagens sobre outras tecnologias pela facilidade de mapear grande número de clones simultaneamente. Bibliotecas de cDNA, tal como as expressas em fagos lambda, é limitada pelo número de colônias com o qual podem ser detectadas por hibridização, tipicamente na ordem de 10^4 . Tecnologias baseadas em síntese química (química combinatorial) apresentam um limite máximo de peptídeos randômicos que podem ser mapeados com 10^3 a 10^4 seqüências diferentes. Os peptídeos sintéticos expressos em fagos são mapeados em solução na qual as bibliotecas contêm em torno de 2×10^{13} possíveis seqüências, resultando em um conjunto de peptídeos com afinidades variáveis pelo alvo. Pelo sistema de bibliotecas de fagos, os peptídeos podem facilmente ser determinados e os fagos selecionados são amplificados por propagação em *E. coli* (NOREN & NOREN, 2001).

Vários experimentos identificaram motivos de seqüências consenso pela utilização deste sistema de exposição em fagos para uma variedade de proteínas, incluindo enzimas (CHEADLE et al., 1994; FERNANDEZ-GACIO et al., 2003), receptores de superfície celulares (SILVA JR et al., 2002), anticorpos monoclonais (GRIHALDE, 1995) e policlonais (CORTESE, 1994). Em todos os casos, este tipo de biblioteca foi capaz de demonstrar suficiente complexidade para produzir múltiplas seqüências de DNA codificando os motivos de peptídeos consenso. Mapeamento de epítopos foram feitos com sucesso (OLEKSIEWICZ, 2001) e mimetopos foram identificados (DEMANGEL, 1996; FOLGORI, 1994). Uma aplicação especial ocorreu na seleção de uma

biblioteca contra taxol, proteína relacionada com câncer, e as seqüências dos peptídeos selecionados foram comparadas a um banco de proteínas para identificar o alvo natural (RODI, 1999). Isto demonstra que pequenos peptídeos de uma biblioteca linear podem, imitar o local de ligação no aspecto tridimensional do ligante, demonstrando o grande potencial destas bibliotecas.

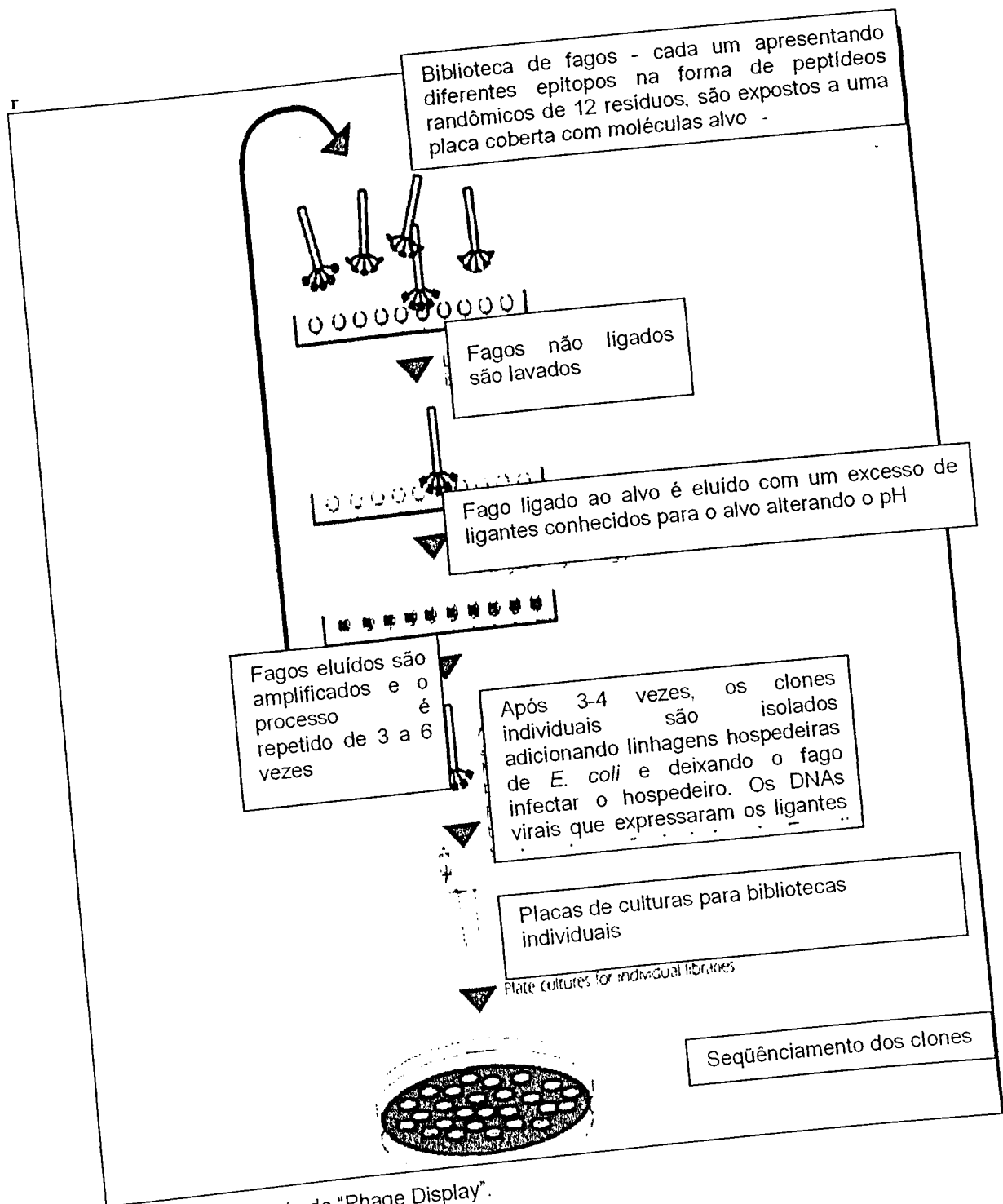


Figura 1 Estratégia do "Phage Display".

Bibliotecas de peptídeos fusionadas em fagos têm despertado o interesse como fonte de um grande número de epítomos e tem sido vastamente utilizadas em estudo de interações de ligação entre antígeno-anticorpo (CORTESE et al., 1994, BIRCH-MACHIN et al., 2000, CHRISTOPHER et al., 1999). Foi possível a obtenção de peptídeos específicos pela seleção das bibliotecas de fagos com anticorpos monoclonais e policlonais, epítomos lineares, tanto quanto mimetopos, os que imitam peptídeos lineares, descontínuos, conformacionais e até mesmo epítomos não peptídicos de antígenos.

Uma das grandes vantagens apresentadas pela técnica diz respeito a sua direta aplicação prática em teste de imunogenicidade. Fagos são comumente utilizados como partículas imunogênicas para a geração de anticorpos contra os peptídeos recombinantes expressos nas regiões aminotermiais de proteínas de superfícies e reagir cruzadamente com o alvo original, indicando que mimetopos expressos poderiam ser utilizados como candidatos a subunidades vacinais (WILLIS et al., 1993; MEOLA et al., 1995; DEMANGEL et al., 1996; YANG & SHIUAN, 2003). Recentemente, foi demonstrada a primeira utilização de fagos recombinantes como vacinas em grandes animais (MANOUTCHARIAN et al., 2004). No trabalho, foi comprovada a capacidade de indução de resposta imune em suínos por fagos contendo peptídeos recombinantes da *Taenia solium*, agente causador da cisticercose em humanos e tendo os suínos como hospedeiro natural.

O presente trabalho aborda a identificação de peptídeos epítomos específicos derivados da seleção imunológica de uma biblioteca randômica de peptídeos por anticorpos policlonais anti-proteínas totais do estágio larval do *Boophilus microplus*. O trabalho foi desenvolvido no sentido de isolar e caracterizar os peptídeos epítomos específicos potencialmente antigênicos para a obtenção de antígenos candidatos à uma vacina poliimunogênica e assim, obter-se uma efetividade tal que o controle do carrapato possa ser feito sem o uso de pesticidas químicos.

OBJETIVOS

Caracterizar peptídeos epítopos específicos do carrapato bovino (*Boophilus microplus*), por meio de investigações genômicas e proteômicas na identificação de antígenos candidatos ao controle do parasita.

Capítulo I

- Desenvolvimento da resposta imune em galinhas contra as proteínas totais de larvas do *Boophilus microplus*.
- Isolar e caracterizar parcialmente as imunoglobulinas de galinhas anti-proteínas totais do *Boophilus microplus*.

Capítulo II

- Selecionar e caracterizar peptídeos sintéticos com afinidades ligantes específicas por "Phage Display" a partir de anticorpos policlonais contra proteínas totais do estágio larval do carrapato bovino (*Boophilus microplus*), visando à identificação de antígenos vacinais.
- Elaborar um banco de seqüências epítopo-específicas do estágio larval do carrapato bovino *Boophilus microplus*

• BIBLIOGRAFIA

ALVES-BRANCO F.P.J., ECHEVARRIA F.A.M., SIQUEIRA A.S. Garça vaqueira (*Egretta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*). **Comunicado técnico EMBRAPA**. v1, p.1-4, 1983.

ANDREOTTI R., GOMES A., MALVAZI-PIZA K.C., SASAKI S.D., SAMPAIO C.A.M., TANAKA A.S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**. v. 2, p.557-563, 2002.

AROCHA-PIÑANGO C.L., MARCHI R., CARVAJAL Z., GUERRERO B. Invertebrate compounds acting on the hemostatic mechanism. **Blood Coag. Fibrinolysis**. V10, p.43-68, 1999.

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.

BARBAS III C.F., BAIN J.D., HOEKSTRA D.M., LERNER R.A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 89, p. 4457, 1992.

BARRIGA O.O., SILVA S.S., AZEVEDO J.S.C. Inhibition and recovery of tick functions in cattle repeatedly infested with *Boophilus microplus*. **J Parasitol.** V.79(5), p.710-15, 1993.

BARRIGA, O.O. Evidence and mechanisms of immuno suppression in tick infestations. Genetic Analysis: **Biomolecular Engineering**. V.15, p.139-142, 1999.

BEERLI R.R., DREIER B. & BARBAS III C.F. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 97, p.1495-1500, 2000.

BENNET T.G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina:Ixodidae). II. Influences of temperature, humidity and light. *Acarologia*. V.16, p.250-7, 1974.

BIRCH-MACHIN I., RYDER S., TAYLOR L., INIGUEZ P., MARAULT M., CEGLIEC L., ZIENTARA S., CRUCIERE C., CANCELLOTTI F., KOPTOPOULOS G., MUMFORD J., BINNS M., DAVIS-POYNTER N. Utilisation of bacteriophage display libraries to identify peptide sequences recognised by Equine herpes virus type 1 specific equine sera. *Journal of Virological Methods*. V. 88, p.89-104, 2000.

BRUM J.G.W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (Grimont et al., 1981): etiopatogenia e sazonalidade**. Tese, Rio de Janeiro: Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1988

BULLMAN G.M., MUÑOS CABENAS M.E., AMBRÚSTOLO R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. *Veterinária Argentina*. V.8(127), p.3-15, 1996.

CHEADLE C., IVANCHENKO Y., SOUTH V., SEARFOSS G. H., FRENCH S., HOWK R., RICCA G. A. & JAYE M. Identification of a Src SH3 domain binding motif by screening a random phage display library. *J. Biol. Chem* v. 269, p. 24034-24039, 1994.

CHRISTOPHER G., LEANN A., ROBIN T., ANDERS F., & FOLEY M. Isolation of Peptides That Mimic Epitopes on a Malarial Antigen from Random Peptide Libraries Displayed on Phage **infection and immunity**. V., p. 4679-4688, 1999.

CORDOVÉS C.O. Carrapato: controle ou erradicação. 2 ed. Rio Grande do Sul: **Agropecuária**. p.176, 1997.

CORTESE R., FELICI F., GALFRE G., LUZZAGO A., MONACI P., NICOSIA A. Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage. *Trends Biotechnol*. V.12, p. 262-7, 1994.

DA SILVA VAZ J.R.I. **Caracterização de proteínas de *Boophilus microplus* como imunógeno em vacina contra o carrapato.** tese. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

DALTON J.P. MULCAHY G. Parasite vaccines — a reality? **Veterinary Parasitology**. V.98, p. 149–167, 2001.

DAVIS G.P. Genetic parameters for tropical beef cattle in northern Australia a review. **Aust. J. Agric. Res.** V.44, P.179, 1993.

DE CASTRO J.J. Sustainable tick and tick borne disease control in livestock improvement in developing countries. **Vet. Parasitol.** V. 71, p.77–97, 1997.

DE LA FUENTE, J., RODRIGUEZ, M., MONTERO, C., REDONDO, M., GARCIA-GARCIA, J.C., MENDEZ, L., SERRANO, E., VALDES, M., ENRIQUEZ, A., CANALES, M., RAMOS, E., BOUE, O., MACHADO, H., LLEONART, R., Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac^(TM). **Genet. Anal. Biomol. Eng.** V.15, p.143–148, . 1999.

DE ROSE R., MCKENNA R., COBON G., TENNENT J., ZAKRZEWSKI H., GALE K., WOOD P.R., SCHEERLINCK J.Y., & WILLADSEN, P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. **Vet. Immunol. Immunopathol.** V. 71, p.151-160, 1999.

DELPINO F.A.B., BRANDELLI A., GONZALES J.C., HENRIQUES J.A.P., DEWES H. Effect of antibodies against -N-acetylhexosaminidase on reproductive efficiency of the bovine tick *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.** v.79, p. 247–255, 1998.

DEMANGEL C., LAFAYE P., MAZIE J.C. Reproducing the immune response against the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 with mimotopes selected from a phage-displayed peptide library. **Mol Immunol.** V. 33, p. 909-16, 1996.

ELDER J.K., KEARNAN J.F., WATERS K.S., DUNWELL G.H., EMMERSON F.R., KNOTT S.G. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistance cattle and pasture spelling. **Aust. Vet. J.** v.56, p. 219-31, 1980.

FARIAS N.A. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. Guaíba/RS: **Agropecuária**, 1995.

FERNANDEZ-GACIO A., UGUEN M. & FASTREZ J. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. **TRENDS in Biotechnology**. V. 21 No.9, 2003.

FOLGORI A., TAFI R., MEOLA A., FELICI F., GALFRE G., CORTESE R., MONACI P., NICOSIA A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. **EMBO J.**; v.13, p.223-243, 1994.

FRANCIS J., LITTLE D.A. Resistance of drought master cattle to tick infestation and babesiosis. **Aust. Vet. J.** v. 40, p.247-53, 1964.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Esc. Veterinária UFMG**, n.8, p.49-61, 1993.

GARCIA-GARCIA J.C., MONTERO C., REDONDO M., VARGAS M., CANALES M., BOUE O., RODRIGUEZ M., JOGLAR M., MACHADO H., GONZALEZ I.L., VALDES M., MENDEZ L., DE LA FUENTE. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus* **J. Vaccine**. V.28, 18 (21), p.2275-87, 2000.

GOMES A. **Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (canestrini, 1987) (Acari: ixodidae) em bovinos nelore (*bos indicus*) e cruzamentos em infestações experimentais**, tese. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.

GOMES A., HONER M.R., SCHENK M.A., CURVO J.B.E. Populations of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Iabajé and Nellore x

European crossbreds in the Brazilian Savanna. **Trop. Anim. Health. Prod.** V. 21, p. 20-24, 1989.

GONZALES J.C. O controle do carrapato do boi. 2a ed. Porto Alegre: **Edição do Autor**, 1995.

GONZALES J.C., SERRA-FREIRE N.M. O couro dos bovinos no Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. **A Hora Veterinária**. v.12(69), p.14-6, 1992.

GOTHE R., KUNZE K., HOOGSTRAAL H. The mechanisms of pathogenicity in the tick paralysis. **J. Méd. Entomol.** V.16, p.357-369, 1979.

GRIHALDE, N. D., CHEN, Y. C. J., GOLDEN, A., GUBBINS, E., AND MANDECKI, W., Epitope mapping of anti-HIV and anti-HCV monoclonal antibodies and characterization of epitope mimics using a filamentous phage peptide library. **Gene** v.166, p.187-195, 1995.

HASSAN M. E., AZZAZY W., EDWARD HIGHSMITH J.R.A. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Review, **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 425-445, 2002.

HITCHCOCK L.F. Studies on the parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **Aust J. Zool.** V.3, p.145-55, 1955.

HOOGENBOOM H. R. & WINTER G. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. **J. Mol. Biol.** V. 227, p. 381-388, 1992.

HOOGENBOOM H.R. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. **Trends Biotechnol.** v.15, p. 62-70, 1997.

HORN S.C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. **Bol. Def. San. Ani.** Brasília: Ministério da Agricultura, 1983.

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.

KAUFMAN W.R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitol. Today**. V.5, p.47-56, 1989.

KAY B.K., KASANOV J. AND YAMABHAI M. Screening Phage-Displayed Combinatorial Peptide Libraries. **Methods**. v. 24, p.240-246, 2001.

KOLONIN M., PASQUALINI R. AND ARAP W. Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy. **Current Opinion in Chemical Biology**. V. 5, p.308-313, 2001.

LOGULLO C. DA SILVA VAZ J.R., SORGINE M.H.F., PAIVA I., SILVA G.O., FARIA F.S., ZINGALI R., ROSA DE LIMA M., ABREU L., OLIVEIRA E.F., ALVES E.W., MASUDA H., GONZALES J.C., MASUDA A. and OLIVEIRA P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitol**. V.116, p.525-532, 1998.

LONDT J.G.H, ARTHUR D.R. The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). **J. Ent. Soc. Sth. Afr.** V. 38, 321-340, 1975.

MANOUTCHARIAN K., DIAZ-OREA A., GEVORKIAN G., FRAGOSO G., ACERO G., GONZALEZ E., ALUJA A., VILLALOBOS N., CONDE E.G., SCIUTTO E. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 2004.

MANOUTCHARIAN, K., SOTELO, J., GARCIA, E., CANO, A., AND GEVORKIAN, G., Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. **Clin. Immunol.** 91, 117-121, 1999.

- MCKENNA R.V., RIDING G.A., JARMEY J.A., PEARSON R.D., WILLADSEN P. Vaccination of cattle against *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. **Parasite Immunology**. V.20, p. 325-36, 1998.
- MEDYNSKI D. Phage Display: all dressed up and ready to role. **Trends Biochem. Sci.** v.12, p. 1134-1136, 1994.
- MEOLA A., DELMASTRO P., MONACI P., LUZZAGO A., NICOSIA A., FELICI F., CORTESE R., GALFRE G. Derivation of vaccines from mimotopes. **J. Immunol.** V.154, p.3162-3172, 1995.
- MULENGA A, SUGIMOTO C., ONUMA M., Issues in tick vaccine development identification and characterization of potential candidate vaccine antigens **Microbes and Infection**. V. 2, p.1353-1361, 2000.
- NEURATH, A.R., KENT, S.B.H. Requirements for successfully synthetic peptide vaccines. **Ann. Inst. Pasteur/Virol.** V.137, p.513-514, 1986.
- NOREN K. A. & NOREN C.J. Construction of High-Complexity Combinatorial Phage Display Peptide Libraries. **Methods**. V. 23, p.169-178, 2001.
- NUÑES J.L., PUGLIESE M.E., HAYES R.P. *Boophilus microplus* Estudio sobre los estadios parasitarios del ciclo biológico. **Ver. Méd. Vet.** V.53, p.19-34, 1972.
- 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.
- OLEKSIEWICZ M. B., BOTNER A., TOFT P., NORMANN P., & STORGAARD T. Epitope Mapping Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Phage Display: the nsp2 Fragment of the Replicase Polyprotein Contains a Cluster of B-Cell Epitopes. **Journal of Virology**. v.4, p. 3277-3290, 2001.
- OLIVEIRA G.P., ALENCAR M.M. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. I. Infestação artificial. **Pesq. Agropec. Bras.** V.22, 433-8, 1987.

- PARMLEY S., & SMITH G. Antibody-selectable filamentous fd phagevectors: affinity purification of target genes. **Gene**. V.73, p.305-318. 1988.
- PASQUALINI R., ARAP W., RAJOTTE D., RUOSLAHTI E. In vivo selection of phage-display libraries. In *Phage Display: A Laboratory Manual*. Barbas C., Burton D., Silverman Scott J. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press** v.22. p. 1-22. c.24, 2000.
- PASQUALINI R., RUOSLAHTI E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. **Nature**. V. 380, p.364-366, 1996.
- PATARROYO J.H., PORTELA R.W., DE CASTRO R.O, COUTO PIMENTEL J., GUZMAN F., PATARROYO M.E., VARGAS M.I. PRATES A.A., DIAS MENDES M.A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V.88 p.163-172, 2002.
- RADER C. & BARBAS III C.F. Phage display of combinatorial antibody libraries. **Current Opinion in Biotechnology**. V. 8, p.503-508, 1997.
- RAND K.N., MOORE T., SRISKANTHA A., SPRING K., TELLAM R., WILLADSEN P. and COBON G.S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** v.86, p.9657-9661, 1989.
- RIBEIRO J.M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents. Dis.** V.4(3), p.143-52,1995a.
- RIDING G.A., JARMEY J., MCKENNA R.V., PEARSON R., COBON G.S., WILLADSEN P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*: purification, localization and possible function. **J. Immunol.** V.153, p. 5158-66, 1994.
- ROBERTS J.A. Acquisition by the host of resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Journal Parasitol.** V.54(4), p.657-62, 1968.

ROBERTSON M. W. Phage and *Escherichia coli* expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alpha-subunit ectodomain. **J. Biol. Chem.** v.268, p.12736-12743, 1993.

RODI D.J., MAKOWSKI L. Phage-display technology – finding a needle in a vast molecular haystack. **Curr Opin Biotechnol.** V.10, p.87-93, 1999.

RODRIGUEZ M., PENICHER M.L., MOURIS A.E., LABARTA V., LORENZO LUACES L., RUBIERA R. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Vet. Parasitol.** V.57, p.339-49, 1995.

RODRIGUEZ M., RUBIERA R., MANUEL P., MONTESINOS R., CREMATA J., FALCON V., SANCHEZ G., BRINGAS R., CORDOV S., VALDES M., LLEONART R., HERRERA L. and DE LA FUENTE J. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **J. Biotech.** V.33, p.135-146, 1994.

SAHIBI H., RHALEM A., BARRIGA O.O. **Vet. Parasitol.** V.68, p.359–66, 1997.

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.

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

SMOTHERS J. F. HENIKOFF S., CARTER P. Affinity Selection from Biological Libraries. **Science** v.298, P.18, 2002.

SOUMILLION P., JESPERS L., BOUCHET M., MARCHAND-BRYNAERT J., WINTER G. & FASTREZ, J. Selection of β -lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. **J. Mol. Biol.**, v.237, p. 415-422, 1994.

STEAR M.J., NEWMAN M.J., NICHOLAS F.W., BROWN S.C., HOLROYD R.G. Tick resistance and the major histocompatibility system. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.** V.62, P.47-52, 1984.

SUTHERST R.W., JONES R.J., SCHNITZERLING H.J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature.** V.295, P.320-1, 1982.

SUTHERST R.W., KERR J.D., MAYWALD G.F., STEGEMAN D.A. The effect of Season and Nutrition on the Resistance of Cattle to the tick *Boophilus microplus*. **J. Agric. Res.** V.34, P.329-39, 1983.

SUTHERST R.W., WHARTON R.H., COOK I.M., SUTHERLAND I.D., BOURNE A.S. Long-term population studies on the cattle tick (*Boophilus microplus*) on untreated cattle selected for different levels of tick resistance. **Aust. J. Agric. Res.** V.30, P.353-68, 1979.

TELLAM R.L., KEMPA D., RIDING A. G., BRISCOE A. S., SMITH B.D., SHARP B.P., IRVING B.D., WILLADSEN P. A Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. **Veterinary Parasitology.** V.103, p.141-156, 2002.

UTECH K.W.B., WHARTON R.H., KERR J.D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Aust. J. Agric. Res.** V.29, p.885-95, 1978.

WAGLAND B.M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos Indicus*) cattle. I Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20,000 larvae. **Aust. J. Agric. Res.** V.26, p.1073-80, 1975.

WIDHOPF J.A., RADER C., STEINBERGER P., FULLER R., BARBAS III C. F. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display.

- WIKEL S.K. Host immunity to ticks. **Ann. Rev. Entomol.** V.41, p.1-22, 1996.
- WIKEL S.K., BERGMAN D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today.** V.13, p.383-389, 1997.
- WIKEL S.K., RAMACHANDRA R.N., BERGMAN K.D. Tick induced modulation of the host immune response. **Parasitology Today** V.24(1), p.59-66, 1994.
- WILLADSEN P. & KEMP, D.H. Vaccination with concealed antigens for tick control. **Parasitology Today.** V.4, p.196-198, 1988.
- WILLADSEN P. & JONGEJAN F. Immunology of the Tick-Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. **Parasitol. Today.** V.15(7), p.258-62, 1999.
- WILLADSEN P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology.** V.71, p.209-22, 1997.
- WILLADSEN P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. **Veterinary Parasitology.** v.101, p. 353-367, 2001.
- WILLADSEN P., BIRD P., COBON G.S., HUNGERFORD J., TOMLEY F.M., TAYLOR D.W. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology.** V.110, p.43-50, 1995.
- WILLADSEN P., COBON G., MCKENNA R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunology.** V.18, p.241-6, 1996.
- WILLADSEN P., RIDING G.A., MCKENNA R.V., KEMP D.H., TELLAM R.L., NIELSEN J.N. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **J. Immunology.** V.143, p.1346-51, 1989.
- WILLADSEN P., SMITH D., COBON G., MCKENNA R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunol.** v.18, p.241-246, 1996.

WILLIS A.E. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. **Gene**. v. 128, p 79–83, 1993.

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

Capítulo I
PRODUÇÃO DE SOROS POLICLONAIS EM GALINHAS PARA
A DETECÇÃO DE ANTÍGENOS DO CARRAPATO BOVINO
(*Boophilus microplus*).

PRODUÇÃO DE SOROS POLICLONAIS EM GALINHAS PARA A DETECÇÃO DE ANTÍGENOS DO CARRAPATO BOVINO (*Boophilus microplus*).

RESUMO

Galinhas foram imunizadas com proteínas totais, extraídas de larvas do carrapato bovino *Boophilus microplus*, para a produção de soro policlonal. A triagem foi monitorada por ELISA durante o período das injeções de extrato protéico. Após obtenção de título satisfatório, as imunoglobulinas de galinha (IgY) foram precipitadas por sulfato de amônio e cromatografadas em colunas de troca iônica. As imunoglobulinas foram caracterizadas parcialmente quanto à pureza e funcionabilidade pelas técnicas SDS-PAGE e *Western Blotting*, respectivamente. O Processo de purificação de imunoglobulinas a partir do soro de galinhas apresentou ser eficiente e os anticorpos policlonais foram funcionalmente ativos quanto ao reconhecimento dos antígenos totais de *Boophilus microplus*.

PALAVRAS-CHAVE: Purificação de Imunoglobulina, Soro de Galinha, Carrapato bovino.

ABSTRACT

POLYCLONAL SERA PRODUCTION IN CHICKENS FOR ANTIGEN DETECTION OF BOVINE TICKS (*Boophilus microplus*). To produce polyclonal sera, chickens were immunized with total proteins extracted from cattle tick *Boophilus microplus* larvae. Titering was carried out by ELISA during protein extracts injections. After obtaining a satisfactory titer, chicken's immunoglobulins (IgY) were precipitated with ammonium sulfate and loaded onto an anion exchange chromatography. Immunoglobulins were partially examined for purity and activity through SDS-PAGE and *Western Blotting* analyses, respectively. The Immunoglobulin purification assay on chicken sera was efficient and polyclonal antibodies raised were functionally active and able to recognize *Boophilus microplus* total antigens.

KEY WORDS: Immunoglobulin Purification, Chicken sera, Cattle tick

INTRODUÇÃO

Métodos de investigações imunoquímicas utilizando anticorpos podem ser usados na identificação, quantificação e enriquecimento de proteínas específicas. Coelhos, camundongos, ou grandes mamíferos são comumente empregados para a produção de soro hiperimune policlonal ou monoclonal. Estas imunoglobulinas (IgGs) têm sido usadas com sucesso em vários estudos imunológicos e clínicos com a finalidade de diagnóstico e tratamento (SCHADE *et al.*, 1997).

Recentemente tem sido sugerida a utilização de imunoglobulina de galinha (IgY) para pesquisas proteômicas, metodologia denominada *IgY technology* (ZHANG, 2003). Existem algumas vantagens na utilização desta tecnologia, sendo as IgYs capazes de apresentar alta afinidade e títulos persistentes (LEMAMY *et al.*, 1999), produção de resposta imune a antígenos conservados em mamíferos e produção maior e em escala, tendo como fontes dos anticorpos o soro e os ovos (GASSMANN *et al.*, 1990). Diferenças bioquímicas e imunológicas são marcantes como a não ligação de receptores Fc de bactérias e mamíferos (proteínas A ou G) (BARKAS *et al.*, 1979), ausência de reação com IgGs de mamíferos (HADGE *et al.*, 1984) e fatores do complemento (CARLANDER *et al.*, 2000), as IgY possuem grande afinidade (IKEMORI *et al.*, 1993) e avidicidade (STUART *et al.*, 1988), resistência a pH extremo (LEE *et al.*, 2002) e temperatura (JENSENIUS *et al.*, 1988), motivo pelo qual têm sido usadas eficientemente em análises imunológicas (SCHADE *et al.*, 1996).

A fusão de proteínas em fagos filamentosos *Phage display*, tem permitido a construção de bibliotecas imunes derivadas dos genes de anticorpos (BARBAS *et al.*, 2001, MARANHÃO & BRÍGIDO, 2000). Nosso grupo, tem utilizado galinhas na produção de RNAm para amplificação de genes de anticorpos via Transcrição Reversa e posterior Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) com o objetivo de construir bibliotecas combinatoriais de anticorpos (SOUZA *et al.*, 2003), ou também utilizando bibliotecas de peptídeos sintéticas contra soros policlonais para a seleção de peptídeos específicos (CARDOSO *et al.*, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo analisar a resposta imune de galinhas imunizadas com extrato protéico total de larvas do carrapato bovino *Boophilus microplus*, purificar as imunoglobulinas específicas do soro e verificar o reconhecimento dos anticorpos de galinhas.

MATERIAL E MÉTODOS

Proteínas totais foram extraídas de larvas de *B. microplus* por maceração em nitrogênio líquido e acrescentado éter etílico para o desengorduramento das proteínas durante 18 horas. Foi adicionado tampão de extração no macerado (40mM Hepes pH 7,4, 10mM EDTA, 2mM EGTA, 1mM DTT, 1mM Benzamidina, 0,5mM PMSF) e centrifugado por 40 minutos a 40000xg. O sobrenadante foi colhido e dialisado extensivamente em salina, quantificado e verificado o perfil protéico por SDS-PAGE (10%).

Foram utilizadas para a imunização, galinhas de três semanas de idade, da raça *White-Leghom*. O esquema de imunização foi o descrito por BARBAS *et al.* (2001), com algumas modificações, sendo a primeira dose de 200 µg e as três doses subseqüentes de 100 µg de proteínas totais de *B. microplus* por via intramuscular em intervalos de 14 dias para cada dose. A primeira dose continha adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co, USA) e as doses subseqüentes adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os animais imunizados foram sangrados a partir da terceira dose e avaliados quanto à produção de anticorpos pelo método ELISA.

Para o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), placas de microtitulação de alta afinidade (NUNC) foram sensibilizadas com 10 µg/ml de proteínas totais de carrapato, diluída em tampão carbonato/ bicarbonato, durante toda a noite a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com PBSTM 5% (leite desnatado diluído em tampão fosfato de sódio) para adição das amostras de soro das galinhas antes e após as imunizações e incubadas por 60 minutos a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas e adicionado anticorpo secundário (IgG de coelho anti IgY de galinhas) diluído em PBSTM 5%, durante 60 minutos. O conjugado imunoenzimático [IgG de cabra anti-IgG de coelho ligado à peroxidase (Sigma)] foi diluído em PBSTM 5% e incubado a 37°C por 60 minutos. A ligação específica foi revelada pela adição de substrato

enzimático contendo o-fenilenodiamino (OPD). Após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico e efetuada a leitura a 492 nm em leitor de microplaca (Flow Titertek Multiskan Plus - USA).

Após a observação de título satisfatório, o sangue foi coletado para obtenção de soro policlonal. As IgYs foram obtidas pela precipitação com sulfato de amônio em salina. As IgYs foram obtidas pela precipitação com (tampão 0,02M Tris-HCl, pH 4,5) e as frações contendo IgY foram liofilizadas e armazenadas a 4°C.

Para averiguar a qualidade das amostras de IgYs purificadas foi utilizado SDS-PAGE (16%). O tampão da amostra continha 1% SDS, 1% Tris pH 6,8, *bromophenol blue* a 0,02% e 20% glycerol, contendo ou não agentes redutores. A corrida de eletroforese foi realizada em temperatura ambiente com tampão superior 0,1M tris pH 6,8, 0,1M Tricina e SDS 1% e com tampão inferior 0,2 M tris-HCL, pH 8,9, até a saída dos indicadores azul bromofenol, com voltagem de 100V. Após a corrida, o gel de poli-acrilamida foi colocado em uma solução de *Coomassie-blue* R-250 como corante de proteínas.

Para a análise de *Western Blotting*, realizou-se a eletroforese das proteínas totais de carrapato (SDS-PAGE, 16%) e a eletrotransferência das proteínas do gel em membrana de nitrocelulose (NC, Sigma) de acordo com as técnicas descritas por SAMBROOK, *et al.* (1989), com algumas modificações. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada por PBSTM 5% e incubada com os anticorpos purificados (IgY) diluídos em bloto 5% durante toda a noite a 4°C. Anticorpos de coelhos anti IgY diluídos em PBSTM 5% foram incubados em temperatura ambiente durante duas horas. Por fim, anticorpos de cabra anti IgGs de coelhos marcados com a fosfatase alcalina foram incubados durante 2 horas em temperatura ambiente e a reatividade específica foi determinada pela adição de substrato enzimático NBT/BCIP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram extraídas proteínas totais de larvas de *B. microplus* como imunógenos para a produção de anticorpos policlonais de galinhas (IgY). As proteínas totais extraídas e observadas em gel de acrilamida em SDS-PAGE

mantiveram-se preservadas (dados não apresentados), o que permitiu a imunização das galinhas.

Todos os animais imunizados desenvolveram anticorpos reativos a muitas frações antigênicas do extrato protéico de *B. microplus*, em contraste com os animais controles e reações negativas antes das imunizações (Fig.1). Estes resultados estão de acordo com LEMAMY *et al.*, (1999) cujo trabalho demonstrou a capacidade das aves produzirem anticorpos com alta afinidade, alto título e grande persistência da resposta imune para proteínas de bactérias e mamíferos. Isto provavelmente se deve ao fato do *B. microplus* não ser um ectoparasita natural de galinhas.

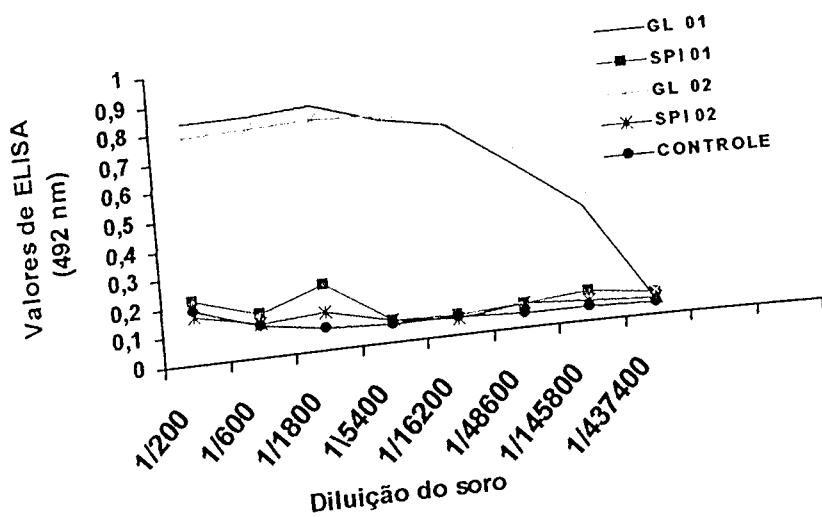


Figura 1 Resultados do ELISA expressos como títulos (Título = Diluição do soro baseado no valor do "cut off"). Os títulos foram acima de 1: 48600. Galinhas (GL1 e GL2), soros pré imunes (SP1 e SP2) e o controle (PBS).

A análise dos anticorpos foi verificada em SDS-PAGE para determinação da pureza. A figura 2 mostra um padrão de eletroforese das preparações comparadas com soro total e também com um padrão de purificação rotineiro para IgGs de coelhos em nosso laboratório. Foram utilizadas condições redutoras (DTT) e não redutoras nas amostras para a determinação das cadeias leves e pesadas. Foi verificada a presença de uma banda forte de aproximadamente 180 kDa no purificado correspondente ao peso molecular da IgY. Sob condições redutoras com DTT, ocorreu a presença

de uma banda com peso molecular de aproximadamente 66 kDa, sendo a cadeia pesada do anticorpo e duas bandas menores correspondentes a aproximadamente 28 kDa, sendo a cadeia leve. Foi possível demonstrar a boa seletividade na purificação dos anticorpos por Sulfato de amônio associada a uma posterior cromatografia de troca iônica. Possivelmente, isto se deve a característica hidrofóbica das IgYs (ZHANG, 2003) e ponto isoelétrico distinto das principais proteínas do soro (HADGE, D. & AMBROSIUS, 1984).

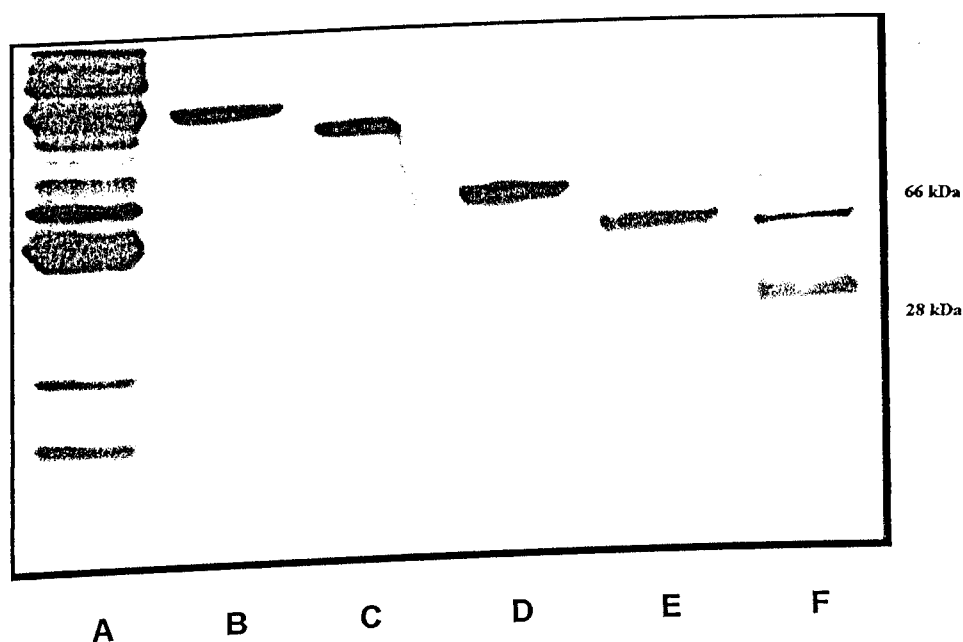


Figura 2 SDS-PAGE (Gel 16%) Preparações de IgY obtidas por precipitação com sulfato de amônio e cromatografadas em resina de troca iônica. Linha A - amostra de soro total de galinhas, linha B - Fração de IgY obtida no void, linha C - IgG de coelho purificada, linhas D e E - amostras B e C reduzidas por DTT, demonstrando a presença das cadeias pesadas e leves de ambos os anticorpos, linha F - Marcador de massa molecular (Sigma).

Para verificar a sensibilidade e a funcionabilidade dos anticorpos policlonais purificados, foi realizado um experimento de *Western blotting* (Fig.3). Os resultados mostraram afinidade das IgYs contra as principais proteínas do estágio larval do *B. microplus*. Foram identificadas bandas fracas para as proteínas de menor massa molecular, bem como bandas fortes com massas moleculares maiores. Assim, através dos anticorpos purificados

possibilitará a seleção por *Phage display* de peptídeos epítomos específicos para se demonstrar com clareza quais epítomos estão se ligando aos anticorpos obtidos e, desse modo, poderem ser utilizados na pesquisa de peptídeos vacinais.

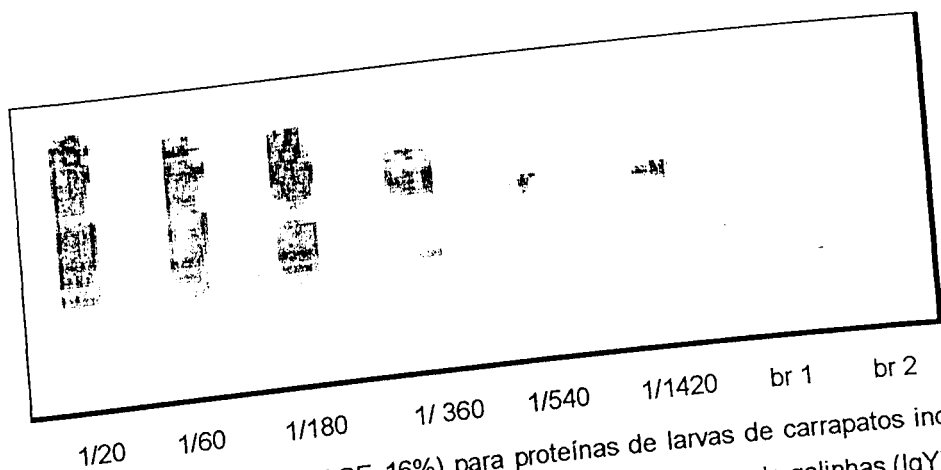


Figura 3 Western blot (SDS-PAGE 16%) para proteínas de larvas de carrapatos incubadas com diferentes diluições dos anticorpos policlonais purificados de soro de galinhas (IgY).

CONCLUSÃO

Pela análise da resposta imune em galinhas imunizadas com o extrato protéico bruto de *B. microplus*, foi possível demonstrar neste trabalho, a capacidade de se utilizar galinhas como fonte produtora de anticorpos policlonais, tendo os animais apresentados altos títulos, a purificação eficiente e os anticorpos funcionalmente ativos. Isto permite a continuidade dos trabalhos para o desenvolvimento e utilização de bibliotecas de *Phage display*.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Valleé SA, pelo fornecimento da cepa mozo de *B. microplus*, das galinhas e instalações para as imunizações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBAS, C.F; BURTON, D.R; SCOTT, J.K; SILVERMAN, G.J. Phage Display. *A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p.8.4-8.7.
- BARKAS, T. & WATSON, C.M. Induction of an Fc conformational change by binding of antigen: the generation of protein A-reactive sites in chicken immunoglobulin. *Immunology*, v.36, p.557-561, 1979.
- CARDOSO, R., et al. Seleção de Peptídeos a Partir De uma Biblioteca de Peptídeos Sintéticos (Phage Display) por Anticorpos Policlonais Para a Neuwiedase, uma Toxina da Peçonha de *Bothrops Neuwiedi Pauloensis*. In: XVIII Reunião anual da Federação de Sociedade de Biologia experimental, Curitiba, 2003.
- CARLANDER, D. et al. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol. Res.*, v.21, p.1-6, 2000.
- GASSMANN, M. et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.*, v. 4, p.2528-2532, 1990.
- HADGE, D. & AMBROSIUS, H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins - IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. *Mol. Immunol.*, v.21, p.699-707, 1984.
- IKEMORI, Y. et al. Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. *Poult. Sci.*, v.72, p.2361-2365, 1993.
- JENSENIUS, J.C. et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods*, v.46, p.63-68, 1981.
- LEE, K.A. et al. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *J. Biochem. Mol. Biol.*, v.35, p.488-493, 2002.

LEMAMY, G.J. *et al.* High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-IIreceptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies. *Int. J. Cancer*, v.80, p.896-902, 1999.

MARANHÃO A.Q. & BRÍGIDO M.M. Expression of anti-Z-DNA single chain antibody variable fragment on the filamentous phage surface. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.33, p. 569-579, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. p.18.60-18.75.

SCHADE, R., & HLINAK, A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX*, v.13, p.5-9, 1996.

SCHADE, R.; HENKLEIN, P.; HLINAK, A. Egg yolk antibody: state of the art and advantageous use in the life sciences. In: *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Amsterdam: Elsevier., p.973-981, 1997.

SOUZA, G. R. L *et al.* Geração de Biblioteca Combinatorial de scFV a partir do Repertório de Galinha Imunizada com Proteínas Totais de Carrapato Bovino (*Boophilus microplus*). In: *Arquivos do instituto biológicos*. 2003. v.70, nº 152, São Paulo. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/>

STUART, C.A. *et al.* High-affinity antibody from hens' eggs directed against the human insulin receptor and the human IGF-1 receptor. *Anal. Biochem.*, v.173, p.142-150, 1988.

ZHANG, W.W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discovery Today*, v.8, n.8, p.364-371, 2003.

Capítulo II

**UTILIZAÇÃO DO “PHAGE DISPLAY” PARA A IDENTIFICAÇÃO
DE PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR IMUNOGLOBULINAS Y
POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO
*Boophilus microplus.***

Capítulo 2

UTILIZAÇÃO DO "PHAGE DISPLAY" PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR IMUNOGLOBULINAS Y POLICLONAIS ANTI PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO *BOOPHILUS MICROPLUS*

RESUMO

Peptídeos foram selecionados por IgY policlonais específicas para proteínas totais de larvas de *B. microplus* através da utilização de uma biblioteca de peptídeos sintéticos apresentada em fagos. As imunoglobulinas Y policlonais foram purificadas por afinidade ao imunógeno e testadas para a reatividade no processo de seleção. Após a seleção, o conjunto de peptídeos apresentou ser reconhecido pelos anticorpos antiproteínas totais de larvas de *Boophilus microplus* e a antigenicidade dos peptídeos foi deduzida por análises de bioinformática, sendo identificado 13 peptídeos com os maiores índices. As seqüências consenso NxxxKxxL e TPDKS foram identificadas, sendo a primeira representada na população em 65% e a segunda em 12% dos fagos seqüenciados. Foram realizadas buscas por homologias das seqüências obtidas com as proteínas do *Boophilus microplus* depositadas no banco de dados. Foram identificadas 3 proteínas com seqüências similares a seqüência consenso NxxxKxxL e 10 para a seqüência TPDKS. O processo de seleção pode ser utilizado para a identificação de prováveis epítomos para o carrapato bovino. Para averiguação da produção de resposta imune pelos peptídeos, imunizações em animais estão sendo realizadas para a caracterização como futuros alvos candidatos a vacinas.

PALAVRAS-CHAVE: Imunoglobulina Y, proteínas totais, peptídeos, Carrapato bovino, phage display.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o carrapato bovino *Boophilus microplus* representa um grande problema para a bovinocultura em diferentes regiões por ser um agente debilitante e também como vetor transmissor de organismos causadores de doenças. O uso de acaricidas vem sendo a medida de controle profilático e terapêutico mais comum contra esses ectoparasitos. Os principais problemas relacionados com essa prática dizem respeito ao desenvolvimento de linhagens resistentes de carrapatos, ao aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal, sendo principalmente leite e carne, e à poluição ambiental proveniente do uso dos acaricidas no controle (BULLMAN et al., 1996). Em decorrência disso, o perfil estimado dos prejuízos causados pelos carrapatos no mundo não é otimista e, no Brasil, a estimativa aproxima-se a um bilhão de dólares (HORN, 1983). No mundo, esses valores alcançam, anualmente, a cifra de 7 bilhões de dólares (DE CASTRO, 1997).

As Vacinas são potencialmente promissoras para o controle do carrapato bovino (WILLADSEN, 1997). Entretanto, ainda não foi possível identificar antígenos totalmente protetores como substituição ao uso de acaricidas. Diversos antígenos são apresentados na tabela 1 e são descritos nas revisões de MCKENNA et al., (1998) e WILLADSEN (2001), como potenciais candidatos para vacinas, independentes do tipo da relação parasito-hospedeiro. Com a utilização de antígenos convencionais ou mesmo recombinantes, protótipos contendo mais de um antígeno apresentam ser mais eficazes do que aquelas com apenas um antígeno (WILLADSEN, 1996). Diversos protocolos têm sido usados na identificação e caracterização de novos alvos terapêuticos ou mesmo, complementar as propriedades antigênicas existentes dos antígenos já conhecidos (PATARROYO et al., 2002, ANDREOTTI et al., 2002). Entre as metodologias ainda não utilizadas, o "Phage display" apresenta uma nova possibilidade na identificação e isolamento de um grande número de peptídeos epítomos específicos, mesmo sem possuir informações prévias dos antígenos ou dos anticorpos (CORTESE et al., 1995). Vacinas efetivas podem ser desenvolvidas em função da identificação, caracterização, produção em escala e utilizados diretamente em sensibilizações (BENHAR, 2001; IRVING et al., 2001).

A metodologia do "Phage Display" tem apresentado uma utilização cada vez mais crescente no desenvolvimento de novos medicamentos, desde a implantação em 1985 por SMITH. Bibliotecas de peptídeos fusionadas em fagos têm despertado o interesse como fonte de grande número de epítomos e têm sido vastamente utilizadas em estudo de interações de ligação entre antígeno-anticorpo (CORTESE, 1995). Foi demonstrado que era possível a obtenção de epítomos específicos pela seleção de bibliotecas com anticorpos monoclonais e policlonais, epítomos lineares tanto quanto mimetopos, os que imitam peptídeos lineares, descontínuos e até mesmo epítomos não peptídicos de antígenos.

O "Phage Display" descreve uma técnica de seleção na qual uma biblioteca de peptídeos ou proteínas com as seqüências randomizadas são expressas na superfície da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada resíduo encontra-se no genoma viral (PARMLEY & SMITH, 1988). Com isto, é possível a ligação entre cada seqüência da proteína variante e a respectiva seqüência de DNA, com a qual permite rápida discriminação baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo. Foram expressos na superfície viral anticorpos (BARBAS III et al., 1992; HOOGENBOOM, 1997), peptídeos (NOREN E NOREN, 2001; SMITH, 1985), enzimas (SOUMILLION, 1994; FERNANDEZ-GACIO, 2003), receptores de superfície celular (ROBERTSON, 1993), entre outras estruturas. As biomoléculas específicas contidas nestas bibliotecas são "peneiradas" por um processo de seleção *in vitro* denominado "Biopanning" (PARMLEY & SMITH, 1988).

O presente trabalho descreve a identificação de peptídeos derivados da seleção de uma biblioteca randômica de peptídeos sintéticos selecionados por anticorpos específicos para proteínas totais dos estágios de larvas do *Boophilus microplus*. O processo foi desenvolvido no sentido de isolar e caracterizar os peptídeos potencialmente antigênicos com potencialidade para futuramente serem antígenos candidatos em uma vacina poliimunogênica e assim, obter-se uma efetividade tal que o controle do carrapato possa ser feito sem o uso de pesticidas químicos.

MATERIAIS e MÉTODOS

Purificação e caracterização das imunoglobulinas Y de galinha.

Os anticorpos policlonais de galinhas reconhecedores de proteínas de *Boophilus microplus* foram desenvolvidos como descrito por PRUDENCIO et al., (2003), e foram submetidos a uma purificação por afinidade de acordo com as técnicas descritas por SAMBROOK et al., (1989), com algumas modificações. O extrato protéico de carrapato foi adsorvido em uma membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia) durante toda a noite à 4°C e posteriormente bloqueada por leite em pó 5%, durante 1 hora à temperatura ambiente. A membrana contendo as proteínas foi incubada com a fração parcialmente purificada de IgY durante toda noite à 4°C e posteriormente lavadas com PBST uma vez, e mais três vezes com PBS, monitoradas por leitura no espectrofotômetro no final da lavagem para averiguação do desprendimento de proteínas da membrana. Os anticorpos foram eluídos por 100mM de glicina pH 2.8, por 30 minutos e imediatamente após a eluição, foram neutralizados por 100mM de tris pH 8.0 e a concentração do eluído foi estimado por espectrofotometria (OD₂₈₀).

Análises de "Western Blot" para detecção de atividade dos anticorpos purificados

Para a análise de "Western Blot", realizou-se a eletroforese das proteínas totais de carrapato (SDS-PAGE, 16%) e a eletrotransferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (NC, Sigma) de acordo com as técnicas descritas por BARBAS III et al., (2001), com algumas modificações. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada por PBSTM 5% e incubada com os anticorpos (IgY) purificados por afinidade ao ligante e diluídos em PBSTM 5% durante toda à noite a 4°C. Anticorpos de coelhos anti IgY diluídos em PBSTM 5% foram incubados em temperatura ambiente por duas horas. Anticorpos de cabra anti IgGs de coelhos marcados com a fosfatase alcalina foram incubados durante 2 horas em temperatura ambiente e a reatividade específica foi determinada pela adição do substrato NBT/BCIP.

Seleção da biblioteca de peptídeos fusionados em bacteriófagos filamentosos

Foi utilizada uma biblioteca de 12 peptídeos randômicos fusionados em

fagos ("Ph.D -12 mer- New England Biolabs"). 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 aminotermiais (NOREN & NOREN, 2001). A biblioteca de fagos foi incubada com a fração eluída de imunoglobulinas IgY anti-proteínas totais do carrapato bovino purificadas por imunoafinidade, como descrito abaixo.

Foram adsorvidos no orifício de uma placa de microtitulação de 96 poços (Maxisorp - Nunc) 150 UI de IgY purificada por afinidade ao imunógeno (100 ug/ml em 0.1 M NaHCO₃, pH 8.6) e incubadas durante a noite a 4°C em um recipiente contendo papel toalha umidificado. A placa foi bloqueada com 250 UI de um tampão de bloqueio (0.1 M NaHCO₃, pH 8.6, 5 mg/ml BSA) por 2 h a temperatura de 4°C. A placa foi lavada seis vezes com TBST (TBS contendo 0.1% Tween-20 v/v), foram acrescentados nos orifícios da placa 4×10^{10} fagos diluídos em 100 UI TBST e mantido sob agitação por 1h a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos pela lavagem dos orifícios da placa por dez vezes com TBST (0.1% Tween-20) na primeira passagem e nas subseqüentes com TBST (0.5% Tween-20). Os fagos ligantes foram eluídos com 100 UI do tampão de eluição (0.2 M glicina-HCl, pH 2.2, contendo 1 mg/ml BSA) por 10 min a temperatura ambiente e imediatamente neutralizados com 15 UI do tampão de neutralização (1 M Tris-HCl, pH 8.0). Alíquotas dos fagos eluídos foram utilizadas para a determinação da titulação. O eluato remanescente contendo fagos foi utilizado para a reamplificação, para a próxima passagem, pela infecção em *E. coli* ER2738. Foram realizadas três passagens para o enriquecimento dos fagos contendo os peptídeos ligantes.

Caracterização dos clones selecionados.

Identificação dos Clones reativos

O vetor de fago utilizado contém o gene *lacZ* α , o qual utiliza o sistema de α -complementação, permitindo clones reativos serem selecionados pela

coloração das colônias (azuis positivas ou brancas negativas). Para as titulações, foi feita uma mistura de fago e bactérias em agarose na superfície, sendo plaqueada em meio LB contendo X-gal (40 µg/ml) e IPTG (0.5 mM).

“Western Blot”

Para assegurar que os clones selecionados tenham afinidade pelo anticorpo gerado pela imunização das galinhas com proteínas de carrapato, as amostras referentes ao conjunto de clones das três passagens de seleção de larvas, foram tratadas com DTT e imediatamente aquecidas em Banho-Maria por 2 min a 95°C e aplicados em gel de eletroforese. As amostras foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia), complexadas com anticorpo primário (IgY de galinha anti proteínas totais de *B. microplus*), ligados ao anticorpo secundário anti-IgG de galinha e posteriormente o anticorpo terciário conjugado com a fosfatase alcalina e revelado com o substrato NBT/BCIP.

Seqüenciamento de DNA.

Para a obtenção de DNA de bacteriófagos filamentosos de fita simples, colônias obtidas após a terceira passagem de seleção por imunoafinidade foram repicadas separadamente em microtubos e crescidas em meio LB líquido por 6 horas. Os fagos foram isolados pela precipitação com 20% PEG/NaCl, seguido da adição de iodeto de sódio para liberação do ácido nucléico e posterior precipitação com etanol. A qualidade e quantidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose (dados não mostrados). O seqüenciamento foi realizado utilizando o Kit “Big Dye Terminator” (Pharmacia) utilizando um seqüenciador automático “MegaBace” (Amersham Biosciences) do laboratório de Genética Molecular (UFU). Para a reação do seqüenciamento, foi utilizado o “primer” – 96 M13 – (5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG -3' - Pharmacia) o qual flanqueia a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionado nos fagos M13 recombinantes pela hibridização na região -96 pb “downstream”.

Análise de dados pela Bioinformática.

1º- A seqüência de aminoácidos foi traduzida usando DNA2PRO12 (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>) para as seqüências de DNA obtidas

através do seqüenciamento. Este programa é específico para os insertos das bibliotecas da "New England Biolabs Ph.D.-12™".

2º - Parâmetros de antigenicidade dos peptídeos foram determinados individualmente pelo programa "Protean" (DNASTAR - Lasergene).

3º - A população dos peptídeos foi caracterizada quanto à frequência de aminoácidos pelo programa AAFREGS (<http://relic.bio.anl.gov/aafregs.aspx>).

4º - Os Motivos protéicos dos peptídeos foram gerados pelo MOTIF2 (<http://relic.bio.anl.gov/motif2.aspx>). O programa não permite substituições de aminoácidos conservativos, mas junções idênticas. É considerado um motivo conservado para os peptídeos alinhados quando são longos o suficiente para gerar uma estrutura secundária parcial.

5º - O programa FASTAcom (<http://relic.bio.anl.gov/fastaconsen.aspx>) procura por identidade entre as seqüências consenso, podendo ser contínuas ou descontínuas, com múltiplas proteínas conhecidas do *Boophilus microplus* obtidas no "GENEBANK".

6º - Procuras foram feitas para homologias dos peptídeos isolados com as proteínas depositadas no "GENEBANK" pelo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTADOS

A fração de IgY parcialmente purificada foi submetida à seleção por imunoafinidade contra proteínas totais de larvas do carrapato bovino para a obtenção de anticorpos policlonais reconhecedores das proteínas deste estágio parasitário. A Figura 1 apresenta nas linhas A e B Frações parcialmente purificadas e linhas C e D fração do eluato das IgYs purificadas por imunoafinidade. A concentração foi estimada através da leitura por densidade Ótica (OD_{280nm}).

Para verificar a sensibilidade dos anticorpos policlonais, foi realizado um experimento de "Western blot". Foi verificada reatividade nas principais proteínas do carrapato para os anticorpos purificados por imunoafinidade (Fig. 2). Nos experimentos, ocorreu a identificação de bandas fracas para as proteínas de menor massa molecular, bem como bandas fortes com massas moleculares maiores ao longo das diluições testadas do anticorpo primário.

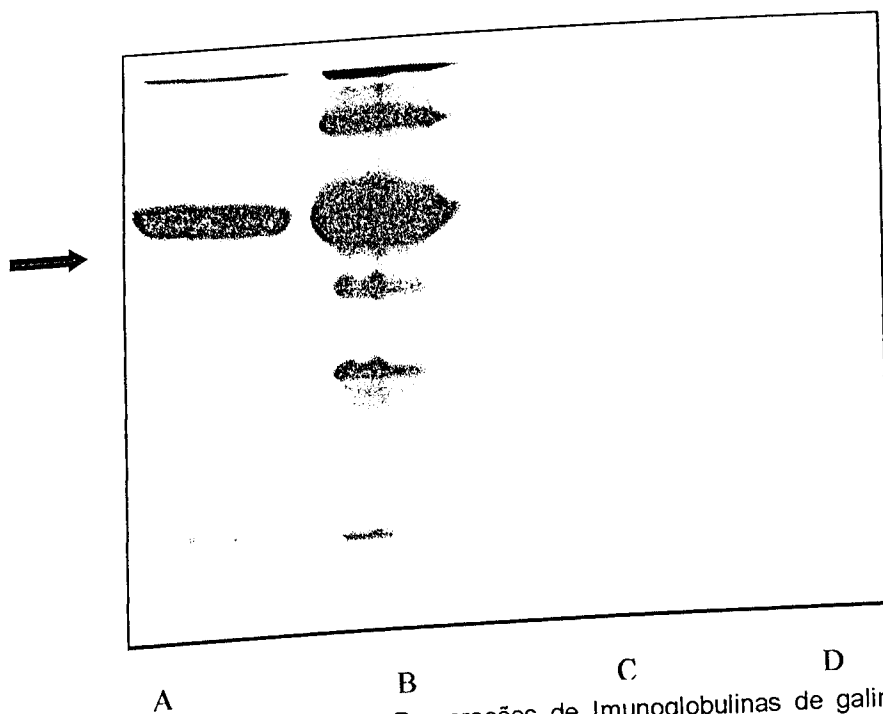
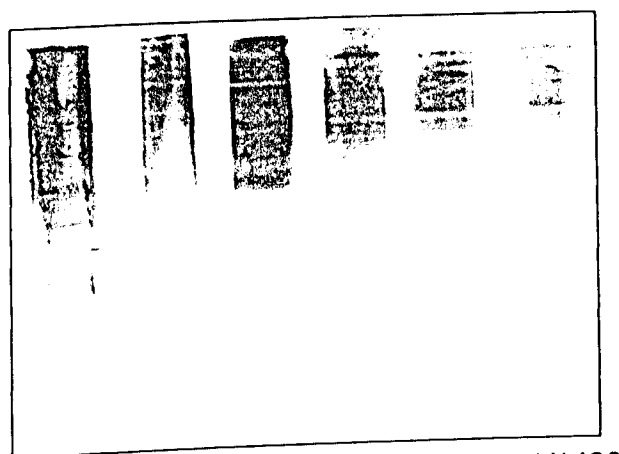


Figura 1 SDS-PAGE (Gel 16%) de Preparações de Imunoglobulinas de galinhas obtidas através da purificação por imunoafinidade dos anticorpos com proteínas totais do *B. microplus*. A seta indica a posição das Imunoglobulinas de galinha. Linhas A e B pool das frações de IgY obtidas pela precipitação por Sulfato de amonio e cromatografadas para IgY anti-larvas. Linhas C e D representam a fração do eluído de IgY após eluição ácida e neutralização.



1/20 1/60 1/180 1/360 1/540 1/1420

Figura 2 Caracterização das Imunoglobulinas de galinhas purificadas por afinidade. Pelo experimento de Western blot (SDS-PAGE) foi possível verificar o reconhecimento das proteínas de larvas de *B. microplus* em diferentes diluições dos anticorpos policlonais (IgY) purificados por afinidade.

As proteínas totais para o estágio larval do carrapato bovino foram reconhecidas por anticorpos policlonais de galinhas purificados por afinidade. Através das metodologias empregadas foi demonstrado o reconhecimento específico das IgYs durante as etapas de purificação. Desta forma, estes anticorpos poderiam ser utilizados na seleção por imunoafinidade dos peptídeos contidos em uma biblioteca de peptídeos randômicos fusionados na superfície de fagos.

Seleção por Imunoafinidade

Para a identificação dos múltiplos alvos ligantes aos anticorpos policlonais antiproteínas totais do carrapato bovino, foi realizado uma seleção de uma biblioteca de peptídeos expressos em fagos M13. Para aumentar a especificidade da seleção dos peptídeos, as IgY utilizadas nas três passagens da seleção foram purificadas por afinidade contra as proteínas totais do parasita pela eluição da fração ligante. Por este método, apenas IgY específicas para o carrapato são submetidas à seleção contra a biblioteca.

Caracterização dos clones ligantes selecionados

Os clones reativos foram selecionados pela coloração das colônias (azuis positivas ou brancas negativas) e titulados posteriormente (Figura 3). Os valores das titulações durante os processos de seleção são apresentados na

tabela 1. A coluna cônica representa os fagos utilizados para a entrada e a coluna retangular os fagos retidos por imunoreatividade com posterior eluição ácida. O eluato não amplificado da terceira seleção foi plaqueado para determinação de título e as colônias azuis foram repicadas e seqüenciadas aleatoriamente.

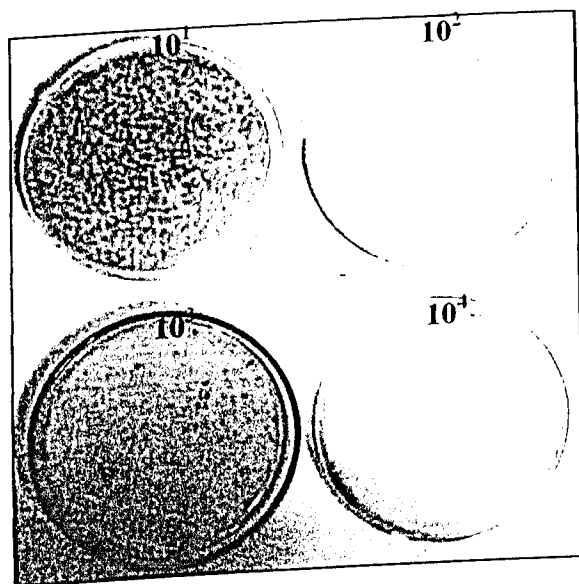


Figura 3 Titulação do eluído após a terceira seleção. Colônias azuis representam a infecção de *E. coli* F' com fagos M13 carregando o gene da β -galactosidase.

1º Ciclo de Seleção	Entrada	4×10^{10}	2×10^5
	Saída	2×10^5	
2º Ciclo de Seleção	Entrada	5×10^9	5×10^7
	Saída	1×10^2	
3º Ciclo de Seleção	Entrada	2×10^{10}	4×10^6
	Saída	5×10^5	

Tabela 1 Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais para as proteínas de larvas de *B. microplus*. Título obtido (ufc) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade (título por 10UI).

Para a determinação da imunoreatividade do conjunto dos fagos selecionados durante o experimento, foi realizado um experimento de "Western Blot" (Figura 4). A Figura 4A representa uma corrida de proteínas de fagos em Gel de acrilamida (SDS PAGE 16%) para demonstração da posição da proteína capsídica III, a qual contém o peptídeo fusionado, sob condições redutoras A1-A2 e não redutoras A3-A4, sendo uma banda com massa molecular de aproximadamente 65 kDa. A Figura 4B apresenta uma banda correspondente a Proteína III com marcação colorimétrica, revelada pela adição do substrato NBT/BCIP. O sinal foi crescente no decorrer da primeira a terceira passagem para o experimento (B1-B3). Assim, foi possível averiguar o enriquecimento dos peptídeos específicos presentes no conjunto para os anticorpos IgY anti-proteínas do carrapato bovino durante o processo da seleção.

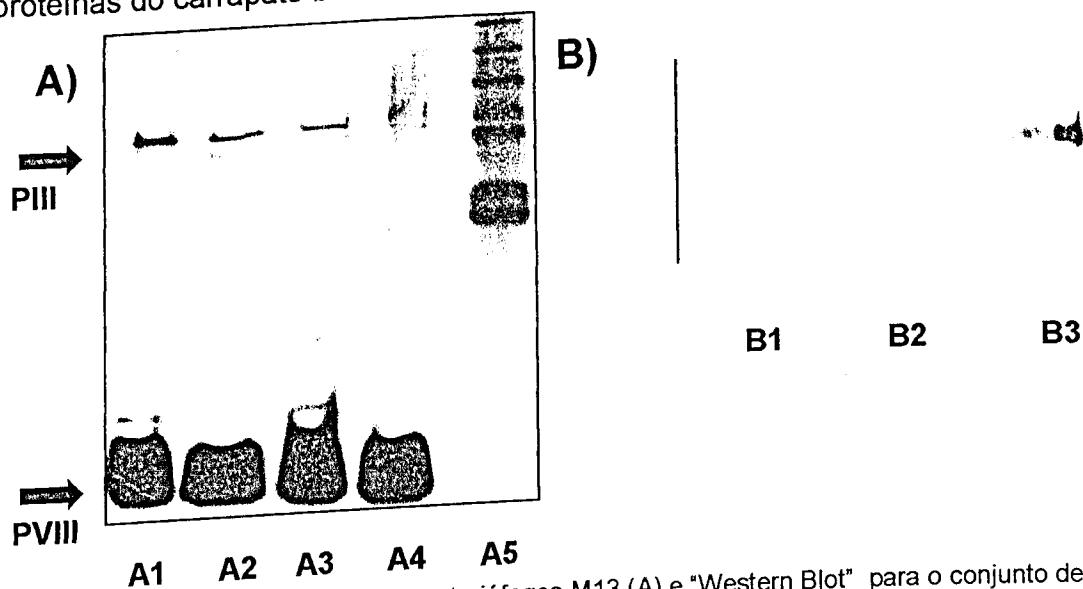


Figura 4 SDS-PAGE (Gel 16%) de Bacteriófagos M13 (A) e "Western Blot" para o conjunto de fagos após a terceira seleção do experimento (B). Em A as setas indicam as posições da proteína VIII e a proteína III (contém o peptídeo fusionado). As proteínas foram submetidas a condições redutoras e não redutoras. B representa bandas com intensidades crescentes de sinal (B1-B3) representando o aumento do reconhecimento dos peptídeos selecionados pelos anticorpos anti-proteínas de carrapato.

Seqüenciamento de DNA

Para o seqüenciamento, foram escolhidas aleatoriamente colônias azuis isoladas de tamanho uniforme, do titulado do eluato não amplificado da terceira seleção. No seqüenciamento do DNA de fita simples dos fagos, foi possível a obtenção dos 36 pb dos nucleotídeos correspondentes aos 12 AA de cada peptídeo fusionados ao gene da Proteína III (gIII). A tradução dos

nucleotídeos em aminoácidos obedeceu aos critérios determinados pelo programa DNA12PRO (RELIC softwares), específico para a biblioteca utilizada.

A tabela 2, mostra a seqüência completa dos peptídeos selecionados na terceira seleção. Foram obtidas 74 seqüências no experimento, sendo apenas 29 seqüências distintas. Peptídeos independentes foram isolados mais de uma vez, sendo 45 as seqüências repetidas, A seqüência (DAWKMRLSQMYD) apareceu 22 vezes, outras 9 seqüências foram (VNYNGKEHLLIP), 7 seqüências para (IDPLMFKYWSNM) e duas seqüências (AGLPNHNAMLLT, NAWLQEPNHRNL, TLFTPDKSPAKT SNNADYKQSLLL, GALHQEPSSNLF, GLFTPDKSPAKT) os quais foram mais freqüentes.

Tabela 2 Seqüência de aminoácidos dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos policlonais de galinhas imunizadas com proteínas totais de larvas de *B. microplus*.

Larvas			
Clone	F	Clone	F
DAWKMRLSQMYD	22/74	GPYDTPMFSLNM	1/74
VNYNGKEHLLIP	9/74	HAWQSKTPDKTR	1/74
IDPLMFKYWSNM	7/74	HTQHS PMVSVEF	1/74
SPLNNFYKTQLR	3/74	HVRI PPTMPEAW	1/74
VNWNSWHKTNLS	3/74	IDSNHVYKDFLT	1/74
AGLPNHNAMLLT	2/74	IPYTHAHADHTL	1/74
NAWLQEPNHRNL	2/74	KPVVGMPIVEVW	1/74
TLFTPDKSPAKT	2/74	SHDGASSKIRPA	1/74
SNNADYKQSLLL	2/74	SIPTYTPDKVTY	1/74
GALHQEPSSNLF	2/74	SQKYFNDLLDHQ	1/74
GLFTPDKSPAKT	2/74	SSKLT FIDFHRN	1/74
APYDTPWPSPSL	1/74	SVPLAKRHLISL	1/74
CLHCKYTLQQQA	1/74	SWSSAERLYTMN	1/74
GALIYTPEKYTI	1/74	SYGSSVTQHLAT	1/74
IDPLMFKYWYNM	1/74		
Total de seqüências			74
Total de seqüências repetidas			45
Total de clones Distintos			29

Análise das seqüências

Índices de antigenicidade foram preditos para os peptídeos selecionados por afinidade (tabela 3). Peptídeos localizados à esquerda da

tabela contém as seqüências de AA e à direita, o gráfico de cada peptídeo corresponde ao seu índice antigênico. O gráfico representa na vertical esquerda o índice antigênico variável de 1,7 até -1,7 e na extensão horizontal inferior variação entre os aminoácidos para cada peptídeo. Foram representadas apenas as seqüências contendo pelo menos três aminoácidos e índice de antigenicidade próximo ou superior ao valor 2. Portanto, 13 peptídeos apresentaram índices antigênicos destacados.

Tabela 3 Índices de antigenicidade preditas para os peptídeos selecionados por afinidade realizado pelo Protean (Lasergene softwares).

Seqüências	Antigenicidade
VNYNGKEHLLIP (9/74)	-0.25 0.00 0.45 1.25 1.70 0.60 0.45 0.30 0.30 -0.60 -0.60 -0.60
SNNADYKQSLLL (2/74)	0.85 0.85 1.05 1.15 1.30 1.30 0.60 0.60 -0.45 -0.30 -0.60 -0.60
VNWNWSWHKTNLS (3/74)	-0.20 0.00 0.20 0.15 0.35 0.35 0.74 0.88 1.02 1.61 1.40 0.66
SPLNNFYKTKQLR (3/74)	1.31 0.84 0.8 0.87 1.30 0.77 0.39 -0.04 0.13 0.45 0.75 0.45
SIPTYTPDKVTY (1/74)	-0.30 -0.60 -0.45 0.23 0.76 1.84 2.12 2.80 2.12 1.29 1.01 -0.02
HAWQSKTPDKTR (1/74)	-0.40 -0.40 0.25 0.25 1.14 1.88 2.52 2.86 3.40 2.91 1.97 1.63
TLFTPAKSPAKT (2/74)	-0.40 -0.40 -0.10 0.85 1.20 1.40 1.50 1.50 1.50 1.15 0.85 0.65
GPYDTPMFSLNM (1/74)	2.05 2.50 2.25 1.00 0.40 0.00 -0.10 -0.40 -0.40 -0.40 -0.40 -0.1
NAWLQEPNHRNL (2/74)	-0.40 -0.40 -0.10 0.24 0.73 1.62 3.06 3.40 3.06 2.07 1.73 1.19
GALHQEPSSNPF (2/74)	-0.60 -0.30 0.30 0.79 1.28 2.22 2.76 3.40 2.56 1.27 0.93 0.79
HVRNPPTMPEAW (1/74)	0.89 1.13 1.77 2.01 2.40 2.16 1.92 1.28 0.09 -0.30 -0.15 -0.30
SHDGASSKIRPA (1/74)	0.65 0.70 1.10 1.10 1.70 1.15 1.30 1.10 1.10 0.95 0.80 0.65
GLFTPAKSPAKT (2/74)	-0.40 -0.40 -0.10 0.85 1.20 1.70 2.12 2.43 2.74 3.10 2.9 1.58

Tabela 4 Frequência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelas IgYs e a frequência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AAFREQ.

Aminoácidos	Frequência (%)		
		Fesp*	Fobs
a (alanina)	Ala 6.2%	21	5,65%
c (Cisteína)	Cis 3.1%	2	0,54%
d (Aspartato)	Asp 3.1%	21	5,65%
e (Glutamato)	Glu 3.1%	8	2,15%
f (Fenilalanina)	Fen 3.1%	12	3,23%
g (Glicina)	Gly 6.2%	9	2,42%
h (Histidina)	His 3.1%	20	5,38%
i (Isoleucina)	Ile 3.1%	13	3,49%
k (Lisina)	Lys 3.1%	24	6,45%
l (Leucina)	Leu 9.4%	37	9,95%
m (Metionina)	Met 3.1%	15	4,03%
n (Asparagina)	Asn 3.1%	21	5,65%
p (Prolina)	Pro 6.2%	30	8,06%
q (Glutamina)	Gln 6.2%	15	4,03%
r (Arginina)	Arg 9.4%	10	2,69%
s (Serina)	Ser 9.4%	36	9,68%
t (Treonina)	Thr 6.2%	27	7,26%
v (Valina)	Val 6.2%	15	4,03%
w (Triptofano)	Trp 3.1%	12	3,23%
y (Tirosina)	Tyr 3.1%	20	5,38%

*Frequência esperada = Codons para os 32 aminoácidos x 100%. Foi utilizado o código genético NNK (32 codons) para a construção da biblioteca (Noren e Noren, 2001).

Tabela 5 Alinhamento linear das seqüências de aminoácidos dos peptídeos selecionados por afinidade realizado pelo MOTIF 2.

Motivo	Alinhamento	Frequência
NxxxKxxL*	VNYNGKEHLLIP	9/74
	SNNADYKQSLLL	2/74
	VNWN ^W SHKTNLS	3/74
	SPLN ^N FYKTQLR	3/74
	IDS ^N HVYKDFLT	1/74
	MNSWYKFMLPDI**	7/74
	DAWK ^M RLSQMYD	22/74
		65%
TPDKS	GLFT ^P DKSPAKT	2/74
	SIPTY ^T PDKVTY	1/74
	HAWQSK ^T PDKTR	1/74
	TLFT ^P DKSPAKT	2/74
	GALIY ^T PEKYTI	1/74
	GPYD ^T PMFSLNM	1/74
	APYD ^T PWPSPSL	1/74
		12%

*Letras em negrito denotam resíduos conservados.

**seqüência inversa ao peptídeo IDPLMFKYWSNM

Na tabela 4, a comparação entre a frequência dos vinte aminoácidos presentes nos peptídeos ligantes e a frequência esperada dos aminoácidos na biblioteca original: ocorre a indicação da seleção positiva para Lisina, Aspartato, Histidina, Metionina, Asparagina, Prolina, Treonina e Tirosina. Por outro lado, ocorre seleção negativa para Cisteína, Glicina, e Arginina. Os AA Arginina e uma única Cisteína nas seqüências de peptídeos randômicos atuam na secreção de Proteína III e podem interferir na infectividade dos fagos. Conseqüentemente, clones com peptídeos contendo estes aminoácidos podem ser menos freqüentes durante a seleção (NOREN & NOREN, 2001).

Motivos protéicos foram identificados após a terceira seleção no experimento (tabela 5). Dois grupos de aminoácidos foram formados, sendo o primeiro grupo constituído pelo motivo NxxxKxxL representado por 6 peptídeos e o segundo grupo pelo motivo TPDKS, sendo as seqüências sobrepostas, TPKD em 4 peptídeos, TPxK em 5 peptídeos, e TPxxS estando presente em 4 peptídeos. Nestas seqüências, foram mantidos constantes os aminoácidos TP ao longo de 7 clones distintos. O motivo consenso foi considerado quando ocorreu quatro ou mais vezes nos clones distintos.

Tabela 6 Alinhamentos das seqüências consenso entre os motivos protéicos com proteínas referentes ao *Boophilus microplus* depositadas nos bancos de dados. Foi utilizado para as análises o programa FASTAcom.

Seqüências consenso: Nxxxkxxl

1 419	>emb CAA09335.1	Receptor de associação à proteína G (NYAQKRTL)*
2 411	>gb AAN03709.1	Precursor de Calreticulina (NYKGNHL)
3 223	>gb AAD15991.1	Glutathione S transferase (NEKTKLGL)

Seqüências consenso: TPDKS

1 1289	>pir T31344	Precursor de GP80 (TSDCS)
2 978	>gb AAN15115.1	Antígeno B de proteína de membrana (TLDPs)
3 873	>gb AAO20875.1	Paramiosina (TKAKSK)
4 650	>sp P20736	Precursor do antígeno glicoproteico Bm86 (PGKSS)
5 569	>gb AAD38381.2	Proteína Bm95 (TPNIS)
6 531	>gb AAF91384.1	P450 CYP319A1 (TQSKS)
7 411	>gb AAN03709.1	Precursor de Calreticulina (TPDPK)
8 397	>gb AAF72891.1	Receptor peptídico do tipo leucoquinina (TLDPs)
9 354	>gb AAG00993.1	Proteinase aspartática ligante do Heme (TFTKS)
10332	>gb AAF61565.1	Precursor de proteinase tipo Catepsina 1 (TPVKDQ)

* Seqüência da proteína similar indicada entre parênteses

Foram investigadas similaridades das seqüências consenso presentes nos peptídeos com proteínas referentes ao *Boophilus microplus* depositadas no

"GENEBANK" (Tabela 6). Múltiplas seqüências protéicas descritas foram confrontadas com cada motivo. O alinhamento revelou similaridades dos motivos com várias proteínas antigênicas e ainda, proteínas com funções celulares importantes, tendo a seqüência similar com o motivo consenso demonstrada entre parênteses. Para o motivo TPKDS, no alinhamento foram consideradas a presença de no mínimo 3 identidades exatas, pois o motivo completo não gerou alinhamento.

Foi investigado diretamente a presença de similaridade entre os peptídeos selecionados por imunoafinidade e as proteínas depositadas no GENE BANK (<http://www.ncbi.nlm.gov/>) restritas ao carrapato bovino *Boophilus microplus*. O alinhamento revelou a presença similaridade das seqüências testadas (Tabela 7).

Tabela 7 Proteínas do *B. microplus* similares com os peptídeos alinhados pelo BLAST.

Peptídeos	Larvas Proteína	Similarid ade
VNYNGKEHLLIP (9/74)	gb AAN03709.1 Precursor de calreticulina (148-155)	NY-GK-HL
SNNADYKQSLLL (2/74)	gb AAB04998.1 Enzima semelhante a ECA (79-88)	SN-DY-Q++
	gb AAN03709.1 Precursor de calreticulina (266-271)	NN-+YK
VNWNSWHKTNLS (3/74)	gb AAF00496.1 Esterase (189-194)	SW-KTN
SPLNNFYKTQLR (3/74)	gb AAP75707.1 Inibidor de serino proteases (123-133)	P+++YK-QLR
	gb AAD28395.1 NADH desidrogenase sub.2 (40-46)	PL-NN-YK
IDSNHVYKDFLT (1/74)	gb AAN15115.1 Antígeno B de membrana (186-192)	NH-VY-DF
NAWLQEPNHRNL (2/74)	gb AAP75707.1 Inibidor de serino proteases (157-162)	NAW++E
SIPTYTPDKVTY (1/74)	gb AAN03709.1 Precursor de calreticulina (296-301)	P-YTPD
GPYDTPMFSLNM (1/74)	gb AAF00496.1 Esterase (485-490)	FSLN-M
GALHQEPSSNPF (2/74)	emb CAA09335.1 Receptor ligado proteína G (274-283)	AL-QE--PSS
	gb AAP75707.1 Inibidor de serino proteases (45-50)	PSSN-F
HTQHS PMVSVEF (1/74)	gb AAA92143.1 Precursor de GP80 (878-887)	TQ-SP-V-SV
SLLTFIDFHHR (1/74)	gb AAF91384.1 450 CYP319A1 (303-307)	LTFID

+ Representam aminoácidos com propriedade bioquímicas semelhantes

-Representa aminoácidos com ausência de similaridade

Similaridades entre as seqüências foram encontradas em 11 peptídeos, no qual os principais motivos protéicos foram: os clones VNYNGKEHLLIP, SNNADYKQSLLL e SIPTYTPDKVTY apresentaram

homologia com a proteína precursora de calreticulina pelas seqüências (NY-GK HL), (NN-+YK) e (P-YTPD), respectivamente. Os clones SPLNNFYKTQLR, NAWLQEPNHRNL e GALHQEPSSNPF apresentaram homologia com as proteínas inibidoras de serino proteases (serpinas) pelos motivos (P+++ -YK QLR), (NAW++E) e (PSSN-F), respectivamente. Os clones VNWNSWHKTNLS e GPYDTPMFSLNM foram similares a esterase pelas seqüências (SW-KTN) e (FSLN-M), respectivamente. Os peptídeos com seus respectivos motivos SNNADYKQSLLL, (SN--DY Q++), SPLNNFYKTQLR (PL-NN-YK), IDSNHVYKDFLT (NH-VY-DF), GALHQEPSSNPF (AL-QE-PSS), HTQHSPMVSVEF (TQ-SP-V-SV) e SLLTFIDFHHR (LTFID) foram similares as proteínas semelhantes às enzimas conversoras de angiotensinas, NADH desidrogenase, proteína B de membrana, receptor associado à proteína G, precursor de GP80 e uma proteína do complexo do citocromo 450, respectivamente.

DISCUSSÃO

O sistema de exposição de proteínas em fagos têm sido extensivamente aplicado em diversos campos. Aplicações recentes no desenvolvimento de medicamentos, vacinas e agentes para diagnósticos estão sendo cada vez mais promissores (BENHAR, 2001). Neste trabalho, identificou-se peptídeos que apresentaram homologias significativas com seqüências protéicas depositadas em bancos de dados ou podem representar produtos gênicos não descritos para o carrapato bovino (*B. microplus*). Os peptídeos foram obtidos pela imunoseleção de uma biblioteca randômica de peptídeos apresentados em fagos contra Imunoglobulinas Y reconhecedoras de antígenos dos estádios de larvas do *B. microplus*. Para a obtenção IgYs específicas, soro policlonal foi desenvolvido em galinhas através de imunizações com proteínas totais do parasita e selecionadas por afinidade contra o imunógeno, com posterior eluição da fração ligante. O isolamento dos peptídeos homólogos às proteínas do carrapato é explicado pelos repetidos ciclos de seleção dos peptídeos por imunoafinidade contra IgY específicas para as proteínas do parasita (PARMLEY & SMITH, 1988). Assim, os ciclos de seleção e amplificação tenderiam a prevalência dos peptídeos reconhecidos pelos anticorpos com maiores títulos, suportado pela ligação as imunoglobulinas policlonais induzidas pelo imunógeno.

Ainda não existem estudos sobre o reconhecimento imune de galinhas para os antígenos do carrapato. Os resultados apresentados colaboram com o enunciado por LEMAMY et al.,(1999) da capacidade das aves produzirem anticorpos com alto título e grande persistência da resposta imune para proteínas de bactérias e mamíferos. Isto provavelmente se deve ao fato do *B. microplus* não ser um ectoparasita natural de galinhas. Outro importante fator, os anticorpos produzidos em galinhas possuem vantagens bioquímicas como resistência a pH extremo (LEE et al.,2002), resistência à temperatura elevada (JENSENIUS et al.,1988), grande afinidade (IKEMORI et al.,1993) e avidéz (STUART et al.,1988), motivo pela qual, têm sido usadas eficientemente em análises imunológicas (SCHADE et al.,1996). Estas, características essenciais na escolha de galinhas para o desenvolvimento da resposta imune contra o carrapato.

Nas etapas de seleção, embora não seja verificado o enriquecimento da subpopulação de fagos, ocorreu a maturação da afinidade dos peptídeos. A presença do sinal crescente na banda correspondente à proteína PIII, local do inserto dos peptídeos, demonstrou a maturação de afinidade durante as 3 passagens. Com isto, tornou-se evidente a ocorrência da seleção dos peptídeos específicos para o alvo selecionado em função do reconhecimento dos peptídeos pelas Imunoglobulinas Y anticarrapato.

A antigenicidade dos peptídeos foi predita para verificação da ocorrência de reconhecimento pelas imunoglobulinas. Ainda, epítomos ausentes de homologias, assim como epítomos conformacionais, poderiam ser relacionados como um provável alvo em função da observação dos valores antigênicos. A metodologia para a predição de regiões antigênicas de determinadas proteínas condiz com a utilizada por Patarroyo et al., (2002) o qual determinou 3 determinantes imunogênicos miméticos de epítomos da proteína Bm 86 e os peptídeos apresentaram antigenicidade e imunogenicidade para o desenvolvimento de uma vacina sintética. Neste caso, diversas propriedades da proteína Bm86 foram exploradas para a produção dos peptídeos sintéticos, tal como a capacidade antigênica (HOOP & WOODS, 1981), folha beta pregueada (CHOW & FASSMAN, 1978), propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas (KYTE & DOOLITTLE, 1982). Inicialmente, uma seqüência consenso (PxKS) foi determinada e alinhada com a proteína Bm86, sendo um provável epítomo desta proteína.

A presença dos motivos protéicos pode ser relacionada com a seleção a favor do ligante, pela indicação de que estes aminoácidos poderiam ser cruciais para o reconhecimento dos peptídeos pelo paratopo (CORTESE et al., 1995). O motivo (NxxxKxxL) é constituído por peptídeos independentes representados mais de uma vez e também representado em 65% dos fagos seqüenciados. Os aminoácidos presentes nestes 2 motivos (N,K,L,T,P,D,K,S) foram acima da freqüência esperada quando comparados na tabela 4, especialmente para a lisina, apresentando freqüência superior frente aos demais, e estando presente nos 2 grupos de seqüências consenso. Além disso, os aminoácidos serina e treonina, por serem altamente hidrofílicos indicam estarem constituídos em epítomos ou mimetopos selecionados

(MANOUTCHARIAN et al., 1999). As análises para predição de antigenicidade apontam as seqüências TPD ou próximas, como sendo regiões antigênicas nos peptídeos observados, como foi analisado na tabela 3.

As seqüências consenso obtidas alinharam com algumas proteínas do carrapato. Em virtude da representação conservada em determinadas regiões ao longo dos peptídeos, os motivos poderiam representar importantes epítomos contínuos ou descontínuos dos antígenos (CORTESE et al., 1995, YANG & SHIUIAN, 2003). Possíveis antígenos relacionados para o motivo (NxxxKxxL), a Calreticulina apresentou homologia pela seqüência (NYKGKNHL). Esta é uma proteína envolvida em múltiplas funções celulares e possivelmente, com atuação na modulação do sistema imune do parasita com o hospedeiro (FERREIRA et al., 2002a). O mesmo motivo, apresentou similaridade com a glutathione S transferase na seqüência NEKTKLGL e com o receptor de associação a proteína G pela NYAQKRTL, sendo proteínas funcionalmente importantes e sugerindo estudos de sensibilização com estas proteínas.

Proteínas identificadas podem conter determinantes antigênicos homólogos ao motivo TPKDS. Entre as proteínas descritas, a glicoproteína Bm86 (GARCIA-GARCIA et al., 2000), a proteína Bm 95 (GARCIA-GARCIA et al., 2000), Precursor da proteína GP80 (TELLAM, 2002), precursor de calreticulina (FERREIRA et al., 2002), antígeno B de membrana (WILLADSEN, 1997), Paramiosina (FERREIRA et al., 2002b), precursor de proteinase do tipo catepsina (RENARD et al., 2000) todas provavelmente compartilhando similaridades antigênicas, entre os motivos e talvez entre as proteínas. As proteínas P450 CYP319A1 (HE et al., 2002), o peptídeo receptor do tipo leucoquinina (HOLMES et al., 2000), e a proteinase aspartática ligante do heme (SORGINE et al., 2000), são proteínas pouco conhecidas no ponto de vista imunológico em *B. microplus* e sugerindo mais estudos com estas proteínas. Assim, cada seqüência homóloga do peptídeo selecionado com a proteína identificada poderia representar um epítomo linear ou parte de um grande determinante antigênico. Desta forma, os peptídeos obtidos por imunoafinidade contendo os motivos identificados oferecem subsídios para serem testados diretamente nos animais para verificação da capacidade de

desenvolvimento da imunogenicidade.

Segundo SMOTHRES et al., (2002), epítomos lineares cognatos de anticorpos podem ser localizados pelo alinhamento das seqüências selecionadas por biblioteca de "phage display" com a seqüência de aminoácidos deduzidas do antígeno original. Parece plausível que em função da presença de motivos protéicos, prevalência de alguns peptídeos detentores de propriedades antigênicas, e alinhamento com proteínas conhecidas de carrapatos, os peptídeos serem reconhecidos pelos anticorpos antiproteínas do carrapato. Sendo as IgYs purificados por afinidade contra as proteínas do carrapato, a busca direta dos peptídeos selecionados no banco de dados torna-se plausível, mesmo com reconhecimento multiespecífico e pressupõe-se que seqüências peptídicas contendo homologia com as proteínas do *B. microplus* correspondam total ou parcialmente aos epítomos lineares das proteínas descritas e a inexistência de homologia poderia sugerir novos produtos gênicos.

Outra questão, é a ocorrência de ambigüidade nos alinhamentos descritos, podendo ser em função da natureza policlonal dos anticorpos utilizados para a seleção e múltiplos alvos protéicos serem utilizados como imunógeno ocasionando à existência de reatividade cruzada. É provável que um mesmo peptídeo contenha diferentes sítios ligantes aos anticorpos anticarrapato produzidos em galinhas. Da mesma forma, uma proteína antigênica poderia possuir diferentes epítomos equivalentes a distintos peptídeos selecionados. Isto é suportado pelo pouco número de AA constituinte dos epítomos, revelados por estudos cristalográficos do complexo antígeno-anticorpo mostrando que anticorpos formam contato direto com 14-22 AA e constituindo a região de ligação do antígeno, seqüências lineares variando de 2-5 AA (SZECSI, 1999). Segundo o estudo, cada anticorpo foi capaz de reagir com vários peptídeos de diferentes seqüências em função de diversos fatores relevantes como a conformação adotada em função do equilíbrio termodinâmico. A ocorrência de ambigüidade, ou mesmo reatividade cruzada, poderia ser benéfico para o desenvolvimento de vacinas com múltiplos epítomos (MANOUTCHARIAN et al., 2004).

A comparação simplesmente pelo BLAST pode não apresentar todos os ligantes aos anticorpos quando são utilizadas apenas as seqüências lineares dos peptídeos (alinhamento pelas estruturas primárias das proteínas). As redundâncias e altos sinais imunoquímicos poderiam ocorrer em casos de sobreposição dos anticorpos ligantes nos epítomos (DYBWAD et al., 1993; FOLGORI et al., 1994). Somente um limitado número de trabalhos tem sido publicados para a determinação dos diferentes grupos de epítomos que são identificados pela seleção de preparações de anticorpos policlonais purificados (KAY 1993; ROBERTS et al., 1993; RO, 1994).

Do ponto de vista para o desenvolvimento de vacina, usando anticorpos policlonais para selecionar epítomos lineares, poderiam ser discriminados epítomos ou antígenos cruciais responsáveis pela produção de resposta imune no hospedeiro, ou ainda a identificação de epítomos conservados em um organismo específico. Além disso, pela utilização de bibliotecas de peptídeos é possível a identificação de epítomos descontínuos ou seja, compostos de resíduos distantes na seqüência que são aproximados pelo enovelamento da cadeia polipeptídica (LUZZAGO, 1993). Foi sugerido que uma maioria de anticorpos reconhece e liga-se a epítomos descontínuos (DAVIES, 1990). Alternativamente, desde que é possível encontrar seqüências contendo pouca semelhança com a seqüência inicial (mimetopos) nos experimentos (MCCONNELL et al., 1994), podemos pressupor que alguns dos peptídeos obtidos poderiam ser mimetopos de antígenos naturais, em vista da ausência de homologia aparente com proteínas do parasita, havendo a necessidade de testes imunológicos para confirmação. Dessa forma, tendo evidências significativas que determinadas proteínas poderiam ser antígenos usuais, possibilitaria acrescentar informações no que diz respeito às proteínas recombinantes ou mesmo o isolamento de proteínas nativas relacionados com o carrapato bovino. Finalmente, peptídeos descritos neste estudo poderiam estar presentes em outras proteínas ainda não conhecidas relacionadas com o carrapato bovino e que poderiam assumir um papel imunológico importante.

Estudos adicionais sobre a especificidade e a sensibilidade dos peptídeos obtidos neste estudo estão sendo realizados. Desta forma, testes preliminares de imunizações com os peptídeos fusionados nos fagos são

imprescindíveis para a determinação da produção de resposta imune cruzada dos peptídeos contra as proteínas do carrapato bovino para a obtenção de peptídeos candidatos a vacinas.

CONCLUSÃO

- O processo de seleção de peptídeos por "Phage display" apresentou ser eficiente pela obtenção de seqüências consenso a partir de anticorpos policlonais.
- Os peptídeos obtidos apresentaram alinhamentos similares com diversas proteínas antigênicas deste parasita.
- Foi possível a obtenção de um conjunto de peptídeos para a formação de um banco de peptídeos epítomos específicos prontos para serem testados como antígenos candidatos em uma vacina poliimunogênica
- Embora estudos adicionais são necessários para determinar a efetividade dos peptídeos obtidos, os resultados poderiam colaborar na definição de seqüências antigênicas que mimetizam epítomos naturais do carrapato bovino *Boophilus microplus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTTI R., GOMES A., MALAVAZI-PIZA K.C., SASAKI S.D., SAMPAIO C.A.M., TANAKA A.S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**. v. 2, p.557–563, 2002.
- BARBAS C.F., BURTON D.R., SCOTT J.K., SILVERMAN G.J., Phage Display. A laboratory manual. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p.8.4-8.7, 2001.
- BARBAS III C.F., BAIN J.D., HOEKSTRA D.M., LERNER R.A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 89, p. 4457, 1992.
- BENHAR I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**. V.19, p.1±33, 2001.
- BULLMAN G.M., MUÑOS CABENAS M.E., AMBRÚSTOLO R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. **Veterinaria Argentina**. V.8(127), p.3-15, 1996.
- CHOW P.Y., FASSMAN G.D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Adv. Enzimol.** V.54, p.45–148, 1978.
- CORTESE R., MONACI P., NICOSIA A., LUZZAGO A., FELICI F., CALFRE G., PESSI A., TRAMONTANO A. AND SOLLAZZO M. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. **Current Opinion in Biotechnology**. V.6, p.73-80, 1995.
- DAVIES R. D., PADLAN E. A., AND SHERIFF S. Antibody–antigen complexes. **Annu. Rev. Biochem.** V.59, p. 439–473, 1990.
- DE CASTRO J.J. Sustainable tick and tick borne disease control in livestock improvement in developing countries. **Vet. Parasitol.** V. 71, p.77–97, 1997.
- DELPINO F.A.B., BRANDELLI A., GONZALES J.C., HENRIQUES J.A.P., DEWES H. Effect of antibodies against -N-acetylhexosaminidase on

reproductive efficiency of the bovine tick *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.** v.79, p. 247–255, 1998.

DYBWAD A., FORRE O., KJELDSSEN-KRAGH J., NATVIG J.B., SIOUD M. Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. **Eur. J. Immunol.** V.12, p.3189–93, 1993.

FERNANDEZ-GACIO A., UGUEN M. & FASTREZ J. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. **Trends in Biotechnology.** V. 21 No.9, 2003.

FERREIRA C.A., BARBOSA M.C., SILVEIRA T.C., VALENZUELA J.G., VAZ IDA S..JR, MASUDA A. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. **Parasitology.** Sep. V.125, p.265-74, 2002.

FERREIRA C.A., DA SILVA VAZ I., DA SILVA S.S., HAAG K.L., VALENZUELA J.G., MASUDA A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. **Exp Parasitol.** V.101(1), p.25-34, 2002a.

FOLGORI A., TAFI R., MEOLA A., FELICI F., GALFRE G., CORTESE R., MONACI P., NICOSIA A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. **EMBO J.** v.13, p.223-243, 1994.

GARCIA-GARCIA J.C., MONTERO C., REDONDO M., VARGAS M., CANALES M., BOUE O., RODRIGUEZ M., JOGLAR M., MACHADO H., GONZALEZ I.L., VALDES M., MENDEZ L., DE LA FUENTE. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus* **J. Vaccine.** V.28, 18 (21), p.2275-87, 2000.

GEVORKIAN G., MANOUTCHARIAN K., ALMAGRO J. C., GOVEZENSKY T., AND DOMINGUEZ V. Identification of Autoimmune Thrombocytopenic Purpura-Related Epitopes Using Phage-Display Peptide Library. **Clinical Immunology And Immunopathology.** V. 86, No. 3, p. 305–309, 1998.

- HE H., CHEN A.C., DAVEY R.B., IVIE G.W. Molecular cloning and nucleotide sequence of a new P450 gene, CYP319A1, from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.** Mar. V.1, P. 32(3), P.303-9, 2002.
- HOLMES S.P., HE H., CHEN A.C., LVIE G.W., PIETRANTONIO P.V. Cloning and transcriptional expression of a leucokinin-like peptide receptor from the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Insect. Mol. Biol.** Oct. V.9, p.457-65, 2000.
- HOOGENBOOM H.R. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. **Trends Biotechnol.** v.15, p. 62-70, 1997.
- HOOP T.P., WOODS K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V.78, p.3824-3828, 1981.
- HORN S.C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. **Bol. Def. San. Ani.** Brasília: Ministério da Agricultura, 1983.
- IKEMORI Y. Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. **Poult. Sci.**, v.72, p.2361-2365, 1993.
- 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.
- JENSENIUS, J.C. et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. **J. Immunol. Methods**, v.46, p.63-68, 1981.
- KAY B.H. & KEMP, D.H. Vaccines against arthropods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 50: 87-96, 1994.
- KAY BK, ADEY NB, HE YS, MANFREDI JP, MATARAGNON AH, FOWLKES DM. An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. **Gene.** V.128(1), P.59-65, 1993.
- KYTE J., DOOLITTLE R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **J. Mol. Biol.** V.157, p.105-132, 1982.

- LEE, R.P. & OPDEBEECK, J.P. Isolation of protective antigens from the gut of *Boophilus microplus* using monoclonal antibodies. **Immunol.** V.72, p. 121-126, 1991.
- LEE, K.A. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.35, p.488-493, 2002.
- LEMAMY, G.J. High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies. **Int. J. Cancer**, v.80, p.896-902, 1999.
- LOGULLO C. DA SILVA VAZ J.R., SORGINE M.H.F., PAIVA I., SILVA G.O., FARIA F.S., ZINGALI R., ROSA DE LIMA M., ABREU L., OLIVEIRA E.F., ALVES E.W., MASUDA H., GONZALES J.C., MASUDA A. & OLIVEIRA P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitol.** V.116, p.525-532, 1998.
- LUZZAGO A., FELICI F., TRAMONTANO A., PESSI A., AND CORTESE R., Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. **Gene** v.128, p. 51-57, 1993.
- MANOUTCHARIAN K., DIAZ-OREA A., GEVORKIAN G., FRAGOSO G., ACERO G., GONZALEZ E., ALUJA A., VILLALOBOS N., CONDE E.G., SCIUTTO E. Recombinant bacteriophage-based multi-epitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 2004.
- MANOUTCHARIAN, K., SOTELO, J., GARCIA, E., CANO, A., AND GEVORKIAN, G., Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. **Clin. Immunol.** 91, 117-121, 1999.
- MCCONNELL S. J., KENDALL M. L., REILLY T. M., AND HOESS R. H., Constrained peptide libraries as a tool for binding mimotopes. **Gene** v.151, p.115-118, 1994.

- MCKENNA R.V., RIDING G.A., JARMEY J.A., PEARSON R.D., WILLADSEN P. Vaccination of cattle against *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. **Parasite Immunology**. V.20, p. 325-36, 1998.
- MEOLA A, DELMASTRO P, MONACI P, LUZZAGO A, NICOSIA A, FELICI F, CORTESE R, GALFRE G. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. **J Immunol**. V.154, p.3162-72, 1995.
- MEOLA A., DELMASTRO P., MONACI P., LUZZAGO A., NICOSIA A., FELICI F., CORTESE R., GALFRE G. Derivation of vaccines from mimotopes. **J Immunol**. V.154, p.3162-3172, 1995.
- MOTTI C., NUZZO M., MEOLA A. Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. **Gene**. V.146, p.191-8, 1994.
- NOREN K. A. & NOREN C.J. Construction of High-Complexity Combinatorial Phage Display Peptide Libraries. **Methods**. V. 23, p.169-178, 2001.
- PARMLEY S., & SMITH G. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**. V.73, p.305-318. 1988.
- PATARROYO J.H., PORTELA R.W., DE CASTRO R.O, COUTO PIMENTEL J., GUZMAN F., PATARROYO M.E., VARGAS M.I. PRATES A.A., DIAS MENDES M.A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V.88 p.163-172, 2002.
- PRUDENCIO, C. R. Produção de soros policlonais em galinhas para a detecção de antígenos do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). **Arquivos do instituto Biológico**. São Paulo, v.70, nº 153, 2003. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/>
- RENARD G., GARCIA J.F., CARDOSO F.C., RICHTER M.F., SAKANARI J.A., OZAKI L.S., TERMIGNONI C., MASUDA A. Cloning and functional expression

of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. **Insect Biochem Mol Biol.** Nov. v.30(11), p.1017-26, 2000.

RIDING G.A., JARMEY J., MCKENNA R.V., PEARSON R., COBON G.S., WILLADSEN P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*: purification, localization and possible function. **J. Immunol.** V.153, p.:5158-66, 1994.

RO L.H., CHEN R.J., SHIUAN D. Rapid purification of antiserum against *Mycoplasma hyopneumoniae* by an efficient absorption method. **J. Biochem. Biophys. Methods.** v. 28, p.155, 1994.

ROBERTS D., GUEGLER, K., WINTER, J. Antibody as a surrogate receptor in The screening of a phage display library. **Gene** V.128, P.67-69, 1993.

ROBERTSON, M. W. Phage and *Escherichia coli* expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alfa-subunit ectodomain. **J. Biol. Chem.** v.268, p.12736-12743, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, p.18.60-18.75, 1989.

SCHADE R., & HLINAK, A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. **ALTEX**, v.13, p.5-9, 1996.

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

SMOTHERS J. F. HENIKOFF S., CARTER P. Affinity Selection from Biological Libraries. **Science** v.298, p.18, 2002.

SORGINE M.H., LOGULLO C., ZINGALI R.B., PAIVA-SILVA G.O., JULIANO L., OLIVEIRA P.L. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. **J. Biol. Chem.** Sep..15, V 275(37), p.28659-65, 2000.

- SOUMILLION P., JESPER S L., BOUCHET M., MARCHAND-BRYNAERT J., WINTER G. & FASTREZ, J. Selection of β - lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. **J. Mol. Biol.**, v.237, p. 415-422, 1994.
- STUART, C.A. High-affinity antibody from hens' eggs directed against the human insulin receptor and the human IGF1 receptor. **Anal. Biochem.**, v.173, p.142-150, 1988.
- SZECSI P.B., RIISE E., ROSLUND L.B. Identification of patient specific peptides for detection of M-proteins and myeloma cells. **Br. J. Haematol.** V.107, p.357-64, 1999.
- TELLAM R.L., KEMP D., RIDING G., BRISCOE S., SMITH D, SHARP P., IRVING D, WILLADSEN P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. **Veterinary Parasitology** V.103, P.141-156, 2002.
- TELLAM R.L., KEMPA D., RIDING A. G., BRISCOE A. S., SMITH B.D., SHARP B.P., IRVING B.D., WILLADSEN P. A Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. **Veterinary Parasitology.** V.103, p.141-156, 2002.
- TORO-ORTIZ, R.D., DA SILVAVAZ JR., I., GONZALES, J.C. and MASUDA, A. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. **Vet. Parasitol.**, V.69: P.297-306, 1997.
- VAZ I.D., LOGULLO C., SORGINE M., VELLOSO F.F., DELIMA M.F.R., GONZALES J.C., MASUDA H., OLIVEIRA P.L., MASUDA A., Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** V.66, p.331-341, 1998.
- VAZ JR., I., GONZALES J.C. and MASUDA A. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. **Vet. Parasitol.** V.69, P.297-306, 1997.
- WILLADSEN P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology.** V.71, p.209-22, 1997.

WILLADSEN P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. **Veterinary Parasitology**. v.101, p. 353–367, 2001.

WILLADSEN P., COBON G., MCKENNA R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunology**. V.18, p.241–6, 1996.

WILLADSEN P., RIDING G.A., MCKENNA R.V., KEMP D.H., TELLAM R.L., NIELSEN J.N. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **J. Immunology**. V.143, p.1346–51, 1989.

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

ZHANG, W.W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**. n.8, p.364-371, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

- Galinhas desenvolveram resposta imunológica contra as proteínas totais do estágio larval do *B. microplus*.
- As imunoglobulinas de galinhas foram parcialmente isoladas e funcionais para estudos com o "Phage display".
- A técnica de "Phage display" foi eficiente no isolamento e caracterização de peptídeos ligantes de Imunoglobulinas anti-proteínas totais do estágio larval de *B. microplus*.
- Foi possível a obtenção de um conjunto de peptídeos formando um banco de peptídeos epítopos específicos do *B. microplus* para testes futuros como antígenos candidatos em uma vacina poliimunogênica

ANEXO 1

O trabalho foi publicado nos arquivos do Instituto Biológico (<http://www.biologico.sp.gov.br/> v.70, suplemento 3, nº 153, 2003). Também foi apresentado durante a 16ª Reunião Anual do Instituto Biológico em formato de resumo expandido.

PRODUÇÃO DE SOROS POLICLONAIS EM GALINHAS PARA A DETECÇÃO DE ANTÍGENOS DO CARRAPATO BOVINO (*Boophilus microplus*).

C.R. Prudencio, R. Cardoso, G.R.Lino, L.R.Goulart

Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Amazonas s/n, CEP 38400902, Campus Umuarama, sala 24, MG, Brasil. E-mail: crprudencio@alunos.ufu.br

RESUMO

Galinhas foram imunizadas com proteínas totais, extraídas de larvas do carrapato bovino *Boophilus microplus*, para a produção de soro policlonal. A triagem foi monitorada por ELISA durante o período das injeções de extrato protéico. Após obtenção de título satisfatório, as imunoglobulinas de galinha (IgY) foram precipitadas por sulfato de amônio e cromatografadas em colunas de troca iônica. As imunoglobulinas foram caracterizadas parcialmente quanto à pureza e funcionabilidade pelas técnicas SDS-PAGE e *Western Blotting*, respectivamente. O processo de purificação de imunoglobulinas a partir do soro de galinhas apresentou ser eficiente e os anticorpos policlonais foram funcionalmente ativos quanto ao reconhecimento dos antígenos totais de *Boophilus microplus*.

PALAVRAS-CHAVE: Purificação de Imunoglobulina, Soro de Galinha, Carrapato bovino.

ABSTRACT

POLYCLONAL SERA PRODUCTION IN CHICKENS FOR ANTIGEN DETECTION OF BOVINE TICKS (*Boophilus microplus*). To produce polyclonal sera, chickens were immunized with total proteins extracted from cattle tick *Boophilus microplus* larvae. Titering was carried out by ELISA during protein extracts injections. After obtaining a satisfactory titer, chicken's immunoglobulins (IgY) were precipitated with ammonium sulfate and loaded onto an anion exchange chromatography. Immunoglobulins were partially examined for purity and activity through SDS-PAGE and *Western Blotting* analyses, respectively. The immunoglobulin purification assay on chicken sera was efficient and polyclonal antibodies raised were functionally active and able to recognize *Boophilus microplus* total antigens.

KEY WORDS: Immunoglobulin Purification, Chicken sera, Cattle tick

INTRODUÇÃO

Métodos de investigações imunológicas utilizando anticorpos podem ser usados na identificação, quantificação e enriquecimento de proteínas específicas. Coelhos, camundongos, ou grandes mamíferos são comumente empregados para a produção de soro hiperimune policlonal ou monoclonal. Estas imunoglobulinas (IgGs)

têm sido usadas com sucesso em vários estudos imunológicos e clínicos com a finalidade de diagnóstico e tratamento (SCHADE *et al.*, 1997).

Recentemente tem sido sugerida a utilização de imunoglobulina de galinha (IgY) para pesquisas proteômicas, metodologia denominada *IgY technology* (ZHANG, 2003). Existem algumas vantagens

na utilização desta tecnologia, sendo as IgYs capazes de apresentar alta afinidade e títulos persistentes (LEMAMY *et al.*, 1999), produção de resposta imune a antígenos conservados em mamíferos e produção maior e em escala, tendo como fontes dos anticorpos o soro e os ovos (GASSMANN *et al.*, 1990). Diferenças bioquímicas e imunológicas são marcantes como a não ligação de receptores Fc de bactérias e mamíferos (proteínas A ou G) (BARKAS *et al.*, 1979), ausência de reação com IgGs de mamíferos (HADGE *et al.*, 1984) e fatores do complemento (CARLANDER *et al.*, 2000), possuir grande afinidade (IKEMORI *et al.*, 1993) e avidicidade (STUART *et al.*, 1988), resistência a pH extremo (LEE *et al.*, 2002) e temperatura (JENSENIUS *et al.*, 1988), motivo pela qual têm sido usadas eficientemente em análises imunológicas (SCHADE *et al.*, 1996).

A fusão de proteínas em fagos filamentosos *Phage display*, tem permitido a construção de bibliotecas imunes derivadas dos genes de anticorpos de aves (BARBAS *et al.*, 2001). Nosso grupo, tem utilizado galinhas na produção de RNAm para amplificação de genes de anticorpos via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o objetivo de construir bibliotecas combinatoriais, ou também como fonte de anticorpos policlonais para seleção de peptídeos específicos.

O presente trabalho teve como propósito analisar a resposta imune de galinhas imunizadas com extrato protéico total de larvas do carrapato bovino *Boophilus microplus*, purificar as imunoglobulinas específicas do soro e verificar o reconhecimento dos anticorpos de galinhas.

MATERIAL E METODOS

Proteínas totais foram extraídas de larvas de *B. microplus* por maceração em nitrogênio líquido e acrescentado éter etílico durante 18 horas. Foi adicionado tampão de extração no macerado e centrifugado. O sobrenadante foi colhido e dialisado extensivamente em salina, quantificado e verificado o perfil protéico por SDS-PAGE (10%).

Foram utilizadas para a imunização, galinhas de três semanas de idade, da raça *White-Leghorn*. O esquema de imunização foi o descrito por BARBAS *et al.*

(2001), com algumas modificações, sendo a primeira dose de 200 µg/mL e as três doses subsequentes de 100 µg/mL por via intramuscular em intervalos de 14 dias para cada dose. A primeira dose continha adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co, USA) e as doses subsequentes adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os animais imunizados foram sangrados a partir da terceira dose e avaliados quanto à produção de anticorpos pelo método ELISA.

Para o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), placas de microtitulação de alta afinidade (NUNC) foram sensibilizadas com 10 µg/ml de proteínas totais de carrapato, diluída em tampão carbonato/bicarbonato, durante toda a noite a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com bloto 5%, para adição das amostras de soro das galinhas antes e após as imunizações e incubadas por 60 minutos a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas e adicionado anticorpos secundários (IgG de coelho anti IgY de galinhas) diluído em bloto 5%, durante 60 minutos. O conjugado imunoenzimático [IgG de cabra anti-IgG de coelho ligado à peroxidase (Sigma)] foi diluído em bloto 5% e incubado a 37°C por 60 minutos. A ligação específica foi revelada pela adição de substrato enzimático contendo o-fenilenodiamino (OPD). Após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 6N e efetuada a leitura a 492 nm em leitor de microplaca (Flow Titertek Multiskan Plus - USA).

O sangue foi coletado para obtenção de soro policlonal. As IgYs foram obtidas pela precipitação com solução saturada de sulfato de amônio (100%) e posteriormente a 40% e dialisadas extensivamente em salina. Realizou-se a cromatografia em DEAE-Sephacel (tampão 0,02M Tris-HCl, pH 4,5) no qual as frações contendo IgY foram liofilizadas e armazenadas a 4°C.

Para averiguar a qualidade das amostras de IgYs purificadas foi utilizado SDS-PAGE (16%). O tampão da amostra continha 1% SDS, 1% Tris pH 6,8,

bromophenol blue a 0,02% e 20% glycerol, contendo ou não agentes redutores. A corrida de eletroforese foi realizada em temperatura ambiente com tampão superior 0,1M tris, 0,1M Tricina e SDS 1% e com tampão inferior 0,2 M tris-HCL, pH 8,9, até a saída dos indicadores, com voltagem de 100V. Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi colocado em uma solução de Coomassie-blue R-250 como corante de proteínas.

Para a análise de *Western Blotting*, realizou-se a eletroforese das proteínas totais de carrapato (SDS-PAGE, 16%) e a eletrotransferência das proteínas do gel em membrana de nitrocelulose (NC, Sigma) de acordo com as técnicas descritas por SAMBROOK, *et al.* (1989), com algumas modificações. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada por bloto 5% e incubada com os anticorpos purificados (IgY) diluídos em bloto 5% durante toda a noite a 4°C. Anticorpos de coelhos anti IgY diluídos em bloto 5% foram incubados em temperatura ambiente durante duas horas. Por fim, anticorpos de cabra anti IgGs de coelhos marcados com a fosfatase alcalina foram incubados durante 2 horas em temperatura ambiente e a reatividade específica foi determinada pela adição de substrato NBT/BCIP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram extraídas proteínas totais de larvas de *B. microplus* como imunógenos para a produção de anticorpos policlonais de galinhas (IgY). As proteínas totais extraídas e observadas em gel de acrilamida em SDS-PAGE mantiveram-se preservadas, o que permitiu a imunização das galinhas.

Todos os animais imunizados desenvolveram anticorpos reativos a muitas frações antigênicas do extrato protéico de *B. microplus*, em contraste com os animais controles e reações negativas antes das imunizações (Fig.1). Estes resultados condizem com a capacidade das aves produzirem anticorpos com alta afinidade, alto título e grande persistência da resposta imune para proteínas de bactérias e mamíferos (LEMAMY *et al.*, 1999). Isto provavelmente se deve ao fato do *B. microplus* não ser um ectoparasita natural de galinhas. A grande distância evolucionária existente entre aves e artrópodes é um fator contribuidor, assim como o fato de que em aves o mecanismo de produção de anticorpos se faz por conversão gênica, diferentemente dos mamíferos, sendo por mutação somática.

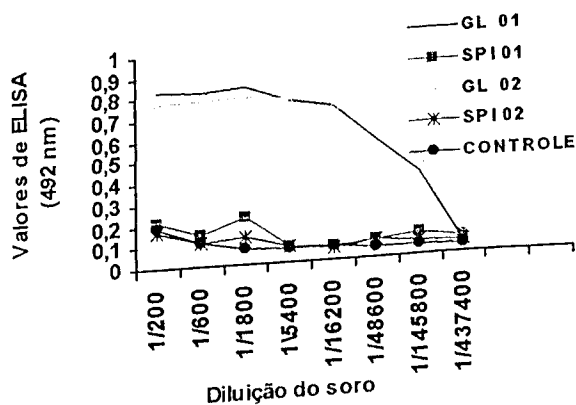


Fig. 1-Resultados do ELISA expressos como títulos (Título = Diluição do soro baseado no valor do cut off). Os títulos foram acima de 1: 48600. Galinhas (GL1 e GL2), soros pré imunes (SP1 e SP2) e o controle (PBS).

A análise dos anticorpos foi verificada em SDS-PAGE para determinação da pureza. A figura 2 mostra um padrão de eletroforese das preparações comparadas com soro total e também com um padrão de purificação rotineiro para IgGs de coelhos em nosso laboratório. Foram utilizadas condições redutoras (DTT) e não redutoras

nas amostras para a determinação das cadeias leves e pesadas. Foi verificada a presença de uma banda forte de aproximadamente 180 kDa no soro correspondente ao peso molecular da IgY. Sob condições redutoras com DTT, ocorreu a presença de uma banda com peso molecular de aproximadamente 66 kDa, sendo a cadeia pesada do anticorpo e

duas bandas menores correspondentes a aproximadamente 28 kDa, sendo a cadeia leve. Foi possível demonstrar a boa seletividade na purificação dos anticorpos por Sulfato de amônio associada com posterior cromatografia de troca iônica. Possivelmente, isto se deve a característica hidrofóbica das IgYs (ZHANG, 2003) e ponto isoeletrico distinto das principais proteínas do soro (HADGE, D. & AMBROSIUS, 1984).

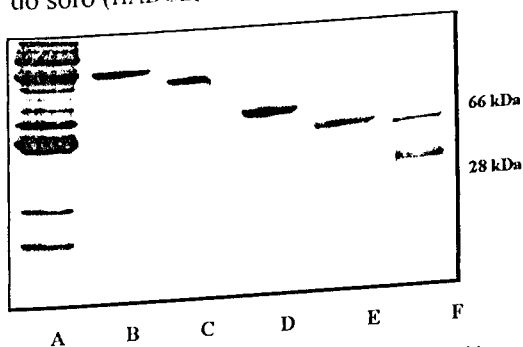


Fig. 2 - SDS-PAGE (Gel 16%) Preparações de IgY obtidas por precipitação com sulfato de amônio e cromatografadas em resina de troca iônica. Linha A - amostra de soro total de galinhas, linha B - Fração de IgY obtida do void, linha C - IgG de coelho purificada, linhas D e E - amostras B e C reduzidas por DTT, demonstrando a presença das cadeias pesadas e leves de ambas os anticorpos, linha F - Marcador de baixo peso molecular (Sigma).

Para verificar a sensibilidade dos anticorpos policlonais, foi realizado um experimento de *Western blotting* (Fig.3). Os resultados mostraram reações contra as principais proteínas. No extrato de larvas foram identificadas bandas fracas para as proteínas de menor peso molecular, bem como bandas fortes com massas moleculares maiores. No entanto, mais análises deverão ser realizadas para se demonstrar com clareza quais epítopos estão se ligando aos anticorpos obtidos e, desse modo, poderem ser utilizados na pesquisa de peptídeos vacinais.

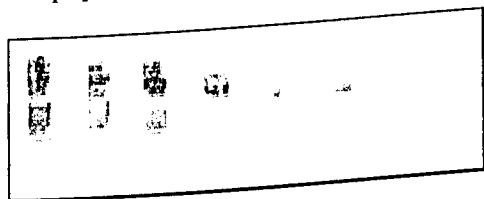


Fig. 3: Western blot (SDS-PAGE 16%) para proteínas de larvas de carrapatos incubadas com diferentes diluições dos anticorpos policlonais purificados de soro de galinhas (IgY).

CONCLUSÃO

Pela análise da resposta imune em galinhas imunizadas com o extrato protéico bruto de *B. microplus*, foi possível demonstrar neste trabalho, a capacidade de se utilizar galinhas como fonte produtora de anticorpos policlonais, tendo os animais apresentados altos títulos, a purificação eficiente e os anticorpos funcionalmente ativos. Isto permite a continuidade dos trabalhos para o desenvolvimento e utilização de bibliotecas de *Phage display*.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Valleé SA, pelo fornecimento da cepa *mozo* de *B. microplus*, das galinhas e instalações para as imunizações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBAS, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. *Phage Display. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p.8.4-8.7.
- BARKAS, T. & WATSON, C.M. Induction of an Fc conformational change by binding of antigen: the generation of protein A-reactive sites in chicken immunoglobulin. *Immunology*, v.36, p.557-561, 1979.
- CARLANDER, D. *et al.* Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol. Res.*, v.21, p.1-6, 2000.
- GASSMANN, M. *et al.* Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.*, v. 4, p.2528-2532, 1990.
- HADGE, D. & AMBROSIUS, H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins - IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. *Mol. Immunol.*, v.21, p.699-707, 1984.
- IKEMORI, Y. *et al.* Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. *Poult. Sci.*, v.72, p.2361-2365, 1993.
- JENSENIUS, J.C. *et al.* Eggs: conveniently packaged antibodies. *Methods for*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
BIBLIOTECA

- purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods*, v.46, p.63-68, 1981.
- LEE, K.A. *et al.* Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *J. Biochem. Mol. Biol.*, v.35, p.488-493, 2002.
- LEMAMY, G.J. *et al.* High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies. *Int. J. Cancer*, v.80, p.896-902, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. p.18.60-18.75.

- SCHADE, R.; HENKLEIN, P.; HLINAK, A. Egg yolk antibody: state of the art and advantageous use in the life sciences. In: *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Amsterdam: Elsevier, 1997. p.973-981.
- SCHADE, R., & HLINAK, A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX*, v.13, p.5-9, 1996.
- STUART, C.A. *et al.* High-affinity antibody from hens' eggs directed against the human insulin receptor and the human IGF1 receptor. *Anal. Biochem.*, v.173, p.142-150, 1988.
- ZHANG, W.W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discovery Today*, v.8, n.8, p.364-371, 2003.

FU0003283B-1