



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

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES
LIGANTES A ANTICORPOS MONOCLONAIS REATIVOS A PROTEÍNAS DE
*Anaplasma marginale***

Vanessa Rodrigues Borges da Cunha

Orientador: Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

Co-Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA – MG

2008



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

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES
LIGANTES A ANTICORPOS MONOCLONAIS REATIVOS A PROTEÍNAS DE
*Anaplasma marginale***

Aluna: Vanessa Rodrigues Borges da Cunha

Orientador: Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

Co-Orientador: Dr. 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

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C972s Cunha, Vanessa Rodrigues Borges da, 1979-
 Seleção e caracterização de peptídeos recombinantes ligantes a
 anticorpos monoclonais reativos a proteínas de *Anaplasma marginale*
 / Vanessa Rodrigues Borges da Cunha. - 2008.
 60 f. : il.

 Orientador: Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.

 I. Genética molecular - Teses. I. Brandeburgo, Malcon Antônio
 Manfredi. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
 Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.21



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

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES
LIGANTES A ANTICORPOS MONOCLONAIS REATIVOS A PROTEÍNAS DE
*Anaplasma marginale***

Aluna: Vanessa Rodrigues Borges da Cunha

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo (Orientador)

Examinadores: _____

Data da defesa: ____/____/____

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

Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

Dedico este trabalho aos meus pais, Iraci e Mário, fonte de inspiração e exemplo de esforço e dedicação, e ao meu marido Walter, companheiro de todos os momentos, sua sabedoria e paciência têm me inspirado a tentar ser o melhor que eu posso.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por nos guiar pelos caminhos mais difíceis e por sempre estar presente ao nosso lado.

Aos meus pais Iraci e Mário e meus irmãos Fernanda e Marcos, que sempre me acompanharam, incentivaram e com muito amor torceram pelo meu sucesso.

Ao meu marido, Walter, pelo amor, incentivo, paciência e dedicação, o que sem dúvida possibilitou meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo pela oportunidade.

Ao Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua orientação, pelo estímulo, otimismo, compreensão.

Aos amigos Rafael, Carlos Prudêncio, Fausto, Rone, Carlos Ueira, que me auxiliaram na realização deste trabalho.

À amiga Fabiana que trabalhou firmemente na realização deste trabalho demonstrando uma disposição ímpar.

Ao Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza e ao Dr. Carlos Henrique Marchiori por aceitarem participar desta banca examinadora.

Aos amigos dos laboratórios de Genética que sempre contribuíram para o esclarecimento de dúvidas que surgiram neste período.

À Direção, Professores e Funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica e à Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio.

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

Sumário

Lista de abreviatura.....	viii
Lista de aminoácidos.....	x
Lista de tabelas	xi
Lista de figuras	xii
Apresentação	1
Fundamentação teórica.....	3
Anaplasmosse bovina.....	4
<i>Anaplasma marginale</i>	4
Distribuição do <i>Anaplasma marginale</i>	5
Transmissão do <i>Anaplasma marginale</i>	6
Ciclo evolutivo do <i>Anaplasma marginale</i>	7
Controle da anaplasmosse	8
Proteínas de membrana de <i>Anaplasma marginale</i>	9
MSP1	10
MSP2	11
Resposta imune contra <i>Anaplasma marginale</i>	11
<i>Phage Display</i>	13
Referências bibliográficas.....	17
Capítulo único	
Resumo	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos	
Anticorpos monoclonais	34
Seleção de peptídeos	
<i>Bipanning</i> em solução	34
Titulações	36
Extração de DNA de Fagos.....	36
Seqüenciamento de DNA	37
Análise dos dados por Bioinformática	38
<i>Phage ELISA</i>	38

Resultados

Seleção de Peptídeos – <i>Biopanning</i> e titulações	40
Extração de DNA e seqüenciamento dos clones dos fagos	41
Análise de dados por bioinformática	42
<i>Phage</i> ELISA	51
Discussão	53
Conclusão	57
Referências bibliográficas	58

Lista de Abreviaturas

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrometro
BSA	Soro albumina bovina
DNA	Ácido Desorribonucleico
DO	Densidade optica
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
g	Grama
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil α-D-tiogalactosise
kDa	Quilodaltom
kg	quilograma
l	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
M	Molar
M13KE	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos
M13mp19	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
MSP	major surface proteins
MSP1a	major surface proteins 1a
MSP1b	major surface proteins 1b
MSP2	major surface proteins 2
MSP3	major surface proteins 3
MSP4	major surface proteins 4
MSP5	major surface proteins 5
ng	Nanogramas
p/v	Peso por volume

pb	Par de base
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBST	Tampão fosfato de sódio com tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PEG	Polietileno glicol
pfu	Unidades formadoras de colônias
pH	Potencial Hidrogenionico
Ph.D	Bibliotecas de Phage display New England Biolabs
Ph.D- 12mer	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
	Proteína III capsídica menor de bacteriófagos
pIII	filamentosos
	Proteína IX capsídica menor de bacteriófagos
pIX	filamentosos
	Proteína VI capsídica maior de bacteriófagos
pVI	filamentosos
	Proteína VII capsídica menor de bacteriófagos
pVII	filamentosos
	Proteína VIII capsídica menor de bacteriófagos
pVIII	filamentosos
RELIC	Receptor ligants Contents
rpm	Rotações por minuto
TBS	Tampão Tris-NaCl
TBST	Tampão Trifosfato de sódio com Tween 20
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α -D-galactosideo

Lista de aminoácidos

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cis	C
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Fen	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos monoclonais anti-MSP1 e anti-MSP2 para <i>Anaplasma</i> . Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade.	41
Tabela 2 – Frequência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos anti-MSP1 e anti-MSP2; e a frequência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizada pelo AADIV ...	43
Tabela 3 – Sequências de aminoácidos dos clones selecionados, frequência observada, frequência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.....	46
Tabela 4: Alinhamento linear das sequências de aminoácidos dos peptídeos selecionados por afinidade realizado pelo MOTIF 2.	47

Lista de Figuras

Figura 1 – <i>Anaplasma marginale</i> em eritrócitos circulantes. Fonte: Kessler <i>et al</i> , 2002.	5
Figura 2 – Modelo de resposta imune celular e humoral contra <i>Anaplasma marginale</i> . (BROWN <i>et al</i> . 1998a).....	12
Figura 3 – Vetor M13KE (Tang <i>et al.</i> , 2002).....	14
Figura 4 – Esquema representativo de um bacteriófago filamentosso ilustrando as proteínas do capsídeo viral: pIX, pVII, pVIII, pVI e pIII (ARAP, 2005).	15
Figura 5 – A – Arquitetura do Fago M13KE; B – Esquema do Ciclo de Seleção por Afinidade (Adaptado de Smothers, J. F., 2002).	16
Figura 6 – Exemplo de placa de titulação. As colônias azuis representam as bactérias infectadas com os fagos M13 carreadores do gene da β -galactosidase.	40
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de 12 amostras de DNA extraído de fagos (1-12) aleatoriamente escolhidos e de 200ng de DNA controle (C) com 7249pb.	41
Figura 8 – Frequências observadas e esperadas de cada um dos 20 aminoácidos para os peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos anti-MSP1 e anti-MSP2, conforme o programa AADIV, Relic.....	42
Figura 9 – Gráfico construído pelo programa DIVAA que ilustra a diversidade de sucessão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos.	44
Figura 10 – Proteína MSP1a de <i>Anaplasma marginale</i> , com destaque para o domínio STSSxL dentro da região repetitiva de 28-29 aminoácidos (rico em serina) que ocorre em cinco blocos repetidos.	49
Figura 11 – Alinhamento dos 49 peptídeos recombinantes selecionados por Phage Display ao domínio protéico STSSxL em seqüência parcial de dois motivos repetidos da proteína MSP1a (com 28 ou 29 aminoácidos) de <i>Anaplasma marginale</i> . No motivo consenso final, as letras em vermelho indicam todos os aminoácidos que foram alinhados com a seqüência original (em azul)	50

Figura 12 – Placas de Elisa mostrando a reatividade dos clones contra o anticorpo anti-MSP1a.....	51
Figura 13 – Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio de ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-MSP1 e anti-MSP2 para <i>Anaplasma marginale</i>	52

APRESENTAÇÃO

A anaplasmosse bovina, causada pela rickettsia *Anaplasma marginale*, é uma doença de grande importância econômica que é transmitida principalmente por carrapatos. A rickettsia infecta eritrócitos bovinos, causando severa anemia associada à anorexia, febre, diminuição no ganho de peso e produção de leite, e morte nos casos severos em animais não tratados (ZAUGG *et al.*, 1985).

O controle da anaplasmosse é realizado por quimioterapia, controle de vetores e imunização, sendo esse último mais eficiente (PALMER, 1989).

A membrana externa de *A. marginale* é capaz de induzir reposta imune protetora contra desafio homólogo e parcialmente protetora contra desafio heterólogo (TEBELE *et al.*, 1991). Nela foram identificadas seis proteínas principais de superfície - MSPs (PALMER & MCGUIRE, 1984; TEBELE *et al.*, 1991), as quais têm sido alvo de estudos para o desenvolvimento de imunógenos contra a anaplasmosse. Destas proteínas, MSP1a e MSP2 têm demonstrado maior potencial como imunógenos, protegendo os animais contra desafio com isolados virulentos homólogos e heterólogos de *A. marginale*, apesar das múltiplas isoformas da primeira proteína e variabilidade do gene que codifica a segunda.

A tecnologia de *phage display* tem apresentado um grande impacto na Imunologia, Biologia Celular, descoberta de medicamentos e de fármacos em geral. Esta técnica permite a obtenção de diferentes peptídeos ou proteínas imunogênicas, e tem sido utilizada para revelar os diversos tipos de interações que existem entre antígeno–anticorpo, caracterizando epítomos reconhecidos por anticorpos.

O presente trabalho teve como objetivo identificar peptídeos ligantes à anticorpos monoclonais reativos a proteínas de *Anaplasma marginale* a partir de bibliotecas de peptídeos recombinantes por meio da tecnologia *Phage Display*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Anaplasmosse bovina

Anaplasmosse bovina é uma doença causada por uma rickettsia intra-eritrocitária obrigatória, do gênero *Anaplasma* (RISTIC, 1968), que infecta eritrócitos de bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos, além de uma variedade de ruminantes silvestres (WANDURAGALA & RISTIC, 1993). Duas espécies acometem o bovino: *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910), rickettsia responsável pela doença maligna, com ampla distribuição geográfica (KESSLER *et al.*, 1992) e *A. centrale* (THEILER, 1911), agente da anaplasmosse pouco patogênica para bovinos, com baixa distribuição (KESSLER *et al.*, 1992).

A enfermidade é caracterizada por febre elevada, palidez de mucosas, icterícia marcada, desidratação, perda de apetite, coprostase e fezes ressequidas; a anemia é decorrente da massiva hemocaterese; pode ocorrer ainda, aborto, esterilidade, queda de produção (TOKARNIA & DOBEREINER, 1962; KESSLER *et al.*, 1992) e eventualmente morte (DREHER *et al.*, 2005; KOCAN *et al.*, 2004).

A anaplasmosse é uma doença economicamente importante em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo, por determinar perdas econômicas devido à mortalidade, redução do peso e da produção de leite e custos com tratamentos (KOCAN *et al.*, 2003).

Anaplasma marginale

Anaplasma marginale é uma rickettsia intraeritrocitária obrigatória que causa anaplasmosse em bovinos e outros ruminantes (PALMER *et al.*, 1999). Esse patógeno é classificado dentro da ordem Rickettsiales e tem sido reorganizado na família Anaplasmataceae (KOCAN *et al.*, 2004).

A espécie mais patogênica e de maior importância para os bovinos é a *A. marginale* (VIDOTTO & MARANA, 2001). Essa rickettsia é visualizada em microscopia ótica como pequenos pontos escuros, de localização periférica, variando entre 0,1µm a 0,8µm de diâmetro (FARIAS, 1995) (Figura 1).

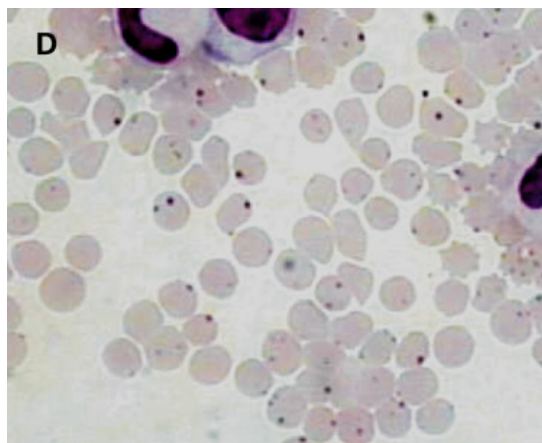


Figura 1 – *Anaplasma marginale* em eritrócitos circulantes. Fonte: Kessler *et al*, 2002.

Distribuição do *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale está amplamente distribuída nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo (PALMER, *et al.*, 1989). É considerada endêmica em vários países das Américas Central e do Sul, com exceção as áreas de deserto e de elevadas altitudes como os Andes (GUGLIELMONE, 1995). Nos Estados Unidos, *A. marginale* é enzoótica em vários estados do sudeste, ao longo da costa do Atlântico, e estados da região oeste (KOCAN *et al.*, 2003). A bactéria já foi relatada também em países europeus às margens do Mediterrâneo (KOCAN *et al.* 2000), Oriente Médio (RAPJUT *et al.*, 2005; MOLAD *et al.*, 2006) e Ásia (LIU *et al.*, 2005), além do continente africano (THEILER, 1910), onde foi inicialmente descrita. Bovinos infectados por *A. marginale* têm sido encontrados na Áustria (BAUMGARTNER *et al.*, 1992), Itália (CRINGOLI *et al.* 2002), Espanha (FUENTE *et al.*, 2004), Portugal (CAEIRO, 1999) e alguns países do leste europeu (KOCAN *et al.* 2003). Na América do Sul, o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é apontado como o único vetor biológico de *A. marginale* (AGUIRRE *et al.*, 1994), o que torna a distribuição da bactéria nestas áreas diretamente associada à distribuição do vetor.

No Brasil, a situação epidemiológica da anaplasmosse bovina, na maioria das regiões, é de estabilidade endêmica (ARAÚJO *et al.*, 1998). Mas, estudos soropidemiológicos da anaplasmosse têm revelado variações na prevalência, com áreas de instabilidade endêmica (PAYNE & OSÓRIO, 1990), onde os

fatores ecológicos e climáticos não favorecem o desenvolvimento de *R. microplus* e de dípteros hematófagos, transmissores de *A. marginale* (SOUZA *et al.*, 2000) e com situação de estabilidade em outras áreas (MADRUGA *et al.*, 1983; RIBEIRO *et al.*, 1984).

Cada vez mais casos de anaplasmose têm sido observados em regiões de clima temperado, como o norte da Europa (HOFMANN-LEHMANN *et al.*, 2004) e Canadá (DONKERSGOED *et al.*, 2004).

Transmissão do *Anaplasma marginale*

A transmissão do *Anaplasma marginale* pode ser biológica, mecânica ou transplacentária. A transmissão biológica é realizada pelos carrapatos. Mais de 20 espécies de ixodídeos com capacidade de transmitir a rickettsia para bovinos já foram descritos (EWING, 1981). *A. marginale* é transmitida pelo carrapato *Dermacentor* sp. em regiões temperadas como na América do Norte e por *Boophilus* sp. e outros gêneros nas outras regiões geográficas (KOCAN *et al.*, 1992, RIBEIRO & LIMA, 1996). Sabe-se que os carrapatos são capazes de transmitir patógenos de forma transovariana, transestadial e intraestadial, porém a transmissão transovariana de *A. marginale* não tem sido confirmada (STICH *et al.*, 1989, RIBEIRO & LIMA, 1996, KOCAN *et al.*, 2000, RUIZ *et al.*, 2005). No Brasil, o carrapato *Boophilus microplus* é o único vetor biológico conhecido de *A. marginale* (RIBEIRO & LIMA, 1996).

A transmissão mecânica de *A. marginale* freqüentemente ocorre via instrumentos contaminados com sangue infectado, tais como agulhas, instrumentos de castração, colocação de brincos, descorna e tatuagem (POTGIETER *et al.*, 1987; FOIL, 1989; KOCAN *et al.*, 2003). A transmissão mecânica por dípteros hematófagos, principalmente os dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys* é uma realidade (POTGIETER *et al.*, 1987; FOIL, 1989), embora ainda seja contestada por alguns pesquisadores (KESSLER, 2001). Essa forma de transmissão tem sua importância epidemiológica enfatizada quando, em áreas consideradas livres de carrapatos vetores, casos clínicos de anaplasmose bovina são registrados (GUGLIELMONE, 1995; HOFMANN-LEHMANN *et al.*, 2004).

A transmissão transplacentária tem sido notificada com certa frequência (RIBEIRO *et al.*, 1995). Na maioria dos casos, os fetos apresentaram infecção congênita quando as mães foram infectadas durante a gestação (KESSLER, 2001). Entretanto, também pode ocorrer em vacas portadoras crônicas (NORTON *et al.*, 1983).

Ciclo evolutivo do *Anaplasma marginale*

O desenvolvimento de *A. marginale* em carrapatos é complexo e coordenado pelo ciclo de alimentação do artrópode (KOCAN *et al.*, 2003). Os eritrócitos infectados ingeridos durante o repasto sangüíneo do carrapato são a fonte de infecção para suas células intestinais. Após o desenvolvimento de *A. marginale* no intestino, muitos outros tecidos do carrapato são infectados, incluindo as glândulas salivares, a partir das quais a rickettsia é transmitida para os vertebrados durante a alimentação do carrapato (KOCAN *et al.*, 1985; KOCAN *et al.*, 1992; GE *et al.*, 1996). De forma semelhante ao que acontece no hospedeiro vertebrado, *A. marginale* se desenvolve em vacúolos formados pela invaginação da membrana celular das células dos vetores, a primeira forma vista na colônia é a reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. Esta forma evolui para a forma denominada “corpos densos”, que é a forma infectante e é capaz de sobreviver por um curto período de tempo no meio extracelular (KOCAN *et al.*, 2003).

Em bovinos, os eritrócitos são as únicas células infectadas por *A. marginale*. Os corpúsculos iniciais, adquiridos biológica ou mecanicamente pelo hospedeiro susceptível, após atingirem a corrente sanguínea aderem-se aos eritrócitos, provavelmente por meio de moléculas adesivas de membrana como a MSP1a (FUENTE *et al.*, 2001a), e em seguida promovem a invaginação da membrana eritrocítica até seu total englobamento. No interior dos vacúolos formados pela membrana celular, os corpúsculos iniciais sofrem sucessivas fissões binárias até atingirem um número de quatro a oito novos corpúsculos. O vacúolo contendo os novos corpúsculos desloca-se em direção a periferia do eritrócito, até a fusão do mesmo com a membrana celular, quando os novos

corpúsculos iniciais de *A. marginale* são liberados para infectar novos eritrócitos (RISTIC & WATRACH, 1963).

Controle da anaplasmosse

As estratégias de controle da anaplasmosse variam com a localização geográfica e têm sido focadas não só no controle de infecções agudas, mas também na diminuição da população de bovinos cronicamente infectados, por meio da redução das populações de vetores, utilizando acaricidas e antibióticos ou por vacinação (ERIKS *et al*, 1993; KOCAN *et al*, 2000). O controle de artrópodes não é prático em muitas áreas e protege apenas parcialmente contra a transmissão de *A. marginale*, uma vez que esta rickettsia possui outras vias de transmissão (KOCAN *et al*, 2000).

O grande paradoxo no controle da anaplasmosse bovina são os animais persistentemente infectados. Estes, apesar de possuírem uma sólida imunidade contra o desenvolvimento da doença clínica, representam o principal reservatório de infecção para animais susceptíveis, por meio da transmissão mecânica e biológica, e contribuem para a difusão da anaplasmosse. Bovinos infectados com baixos níveis de rickettsemia são muitas vezes difíceis de serem detectados por meio de distensões sanguíneas coradas. Além disso, bovinos que são tratados com tetraciclina, que reduz a rickettsemia e subsequentemente os títulos de anticorpos, podem mostrar-se sorologicamente negativos para *A. marginale* (KOCAN *et al*. 2000). De acordo com COETZEE *et al*. (2006) foi testada a eficiência da enrofloxacin contra *A. marginale* em bezerros experimentalmente infectados. Cerca de 12 dias após a administração de 12,5 mg/Kg da droga, observou-se uma redução no percentual de eritrócitos parasitados de 39,13%. No entanto, esse regime de tratamento não foi capaz de promover a eliminação total da rickettsia.

O controle de vetores, principalmente carrapatos, por meio da utilização de acaricidas, requer altos investimentos e, segundo alguns pesquisadores, o seu uso prolongado torna a população bovina suscetível quando a utilização é interrompida ou quando ocorre resistência dos carrapatos aos acaricidas. Além disso, o impacto ambiental causado por parte dos acaricidas deve ser considerado (MOLLOY *et al*., 1999).

Com relação às vacinas vivas, existe o risco de causar manifestações clínicas de anaplasmosse em bovinos adultos, particularmente em vacas prenhes, enquanto que os antígenos mortos podem causar isoeritrólise neonatal, devido à sensibilização de vacas para grupos sangüíneos (ROGERS *et al.*, 1988). Ademais, ambos os sistemas de vacinação constituem fontes potenciais de contaminação do animal imunizado com microrganismos veiculados pelo sangue (KESSLER & SCHENK, 1998).

Segundo Kessler *et al* (2002), as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras contra *A. marginale* estão focalizadas nas proteínas de membrana dos corpúsculos iniciais. A inoculação de bovinos com membrana externa dessa rickettsia resultou em proteção de 70%.

Proteínas de membrana de *Anaplasma marginale*

Seis proteínas principais de superfície [major surface proteins – MSPs: MSP1a (105kDa), MSP1b (100kDa), MSP2 (36kDa), MSP3 (86kDa), MSP4 (31kDa) e MSP5 (19kDa)] foram inicialmente identificadas em *A. marginale* derivado de eritrócitos bovinos e de tecido de carrapatos (BARBET *et al.*, 1987; OBERLE *et al.*, 1988; BOWIE *et al.*, 2002).

MSP1a, MSP4 e MSP5 são codificadas por um único gene e não variam antigenicamente durante a multiplicação da rickettsia (VISSER *et al.*, 1992; BOWIE *et al.*, 2002; MOLAD *et al.*, 2004). A conservação destas proteínas é importante para definir os epítomos comuns e específicos que podem ser usados para o desenvolvimento de testes sorod diagnósticos e vacinas para anaplasmosse (BARBET *et al*, 1999; KANO *et al*, 2002). Já as proteínas MSP1b, MSP2 e MSP3 são codificadas por famílias multigênicas e podem variar antigenicamente durante os ciclos de rickettsemia persistentes (ALLEMAN & BARBET, 1996; FRENCH *et al*, 1999; BOWIE *et al*, 2002) inclusive em isolados brasileiros (KANO *et al*, 2002).

Proteínas principais de superfície de *A. marginale* (MSPs) desempenham importante papel no desenvolvimento da resposta imune de animais infectados (PALMER & MCGUIRE, 1984). Destas proteínas, MSP1a e MSP2 têm demonstrado maior potencial como imunógenos, protegendo os

animais contra desafio com isolados virulentos homólogos e heterólogos de *A. marginale*, apesar das múltiplas isoformas da primeira proteína e variabilidade do gene que codifica a segunda (ARAÚJO *et al.*, 2003).

Algumas proteínas de membrana, não associadas a nenhuma superfamília, também foram descritas em *A. marginale* (VIRB3, VIRB9 e OMA 87) (BRAYTON *et al.*, 2005; LOPEZ *et al.*, 2005; BRAYTON *et al.*, 2006).

MSP1

A MSP1 é um complexo de duas proteínas, com massas moleculares de 105 e 100 kDa, denominadas MSP1a e MSP1b, respectivamente (BARBET *et al.*, 1987, OBERLE *et al.*, 1988). Uma única proteína MSP1a está ligada covalentemente, por pontes dissulfeto, a proteínas MSP1b (VIDOTTO *et al.*, 1994).

A MSP1a é codificada por um único gene (MSP1a), porém possui marcante variação de tamanho entre os diferentes isolados de *A. marginale* (46 a 105 kDa), como verificado em isolados brasileiros desta rickettsia (KANO *et al.*, 2002, OLIVEIRA *et al.*, 2003). Isso resulta da presença de um número variável de blocos repetitivos de 28 a 29 aminoácidos, ricos em serina, na região amino (N) terminal (OBERLE *et al.*, 1988, ALLRED *et al.*, 1990). Essa região contém um epítipo sensível à neutralização conservado entre os isolados (ALLRED *et al.*, 1990), incluindo brasileiros (KANO *et al.*, 2002, OLIVEIRA *et al.* 2003).

Sabe-se que MSP1a e MSP1b atuam como adesinas (MCGAREY *et al.* 1994), estando envolvidas no processo de invasão dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* à membrana dos eritrócitos do hospedeiro. Verificou-se também que a MSP1a é uma adesina para células de carrapato (FUENTE *et al.* 2001a), influenciando na transmissão de *A. marginale* por esse artrópode. Carrapatos *Dermacentor variabilis* foram capazes de transmitir o isolado de Oklahoma dessa rickettsia, porém não transmitiram o isolado da Flórida (FUENTE *et al.*, 2001b). Nesse estudo, constatou-se ainda que a MSP1 do isolado da Flórida de *A. marginale* não foi capaz de mediar aderência às células intestinais dos carrapatos, inibindo, portanto, a posterior infecção da glândula salivar e transmissão para os bovinos.

Anticorpos contra MSP1, MSP1a ou MSP1b inibem a ligação de *A. marginale* aos eritrócitos, o que sugere que os mesmos desenvolvem uma atividade neutralizante da invasão da rickettsia às células do hospedeiro (MCGAREY & ALLRED 1994, MCGAREY *et al.*, 1994).

A classe de anticorpo predominantemente direcionada contra a MSP1 é a IgG (BROWN *et al.* 2001b). Na MSP1a, são reconhecidos epítomos na região carboxi (C) terminal e na região N terminal (BROWN *et al.* 2001b). Essa última região contém o epítopo B EASTS(S/Q)ASTSS sensível à neutralização (PALMER *et al.*, 1987; ALLRED *et al.* 1990). Acredita-se que esses motivos sejam sítios para uma forma distinta de glicosilação (MCBRIDE *et al.* 2000) ligada a resíduos O, o que explicaria o fato de que, para um determinado isolado, a massa molecular da MSP1, separada em géis de poliacrilamida, é maior do que o esperado, por meio da análise de sua seqüência (ALLRED *et al.* 1990).

MSP2

A MSP2 é uma proteína imunodominante de superfície, codificada por uma família de genes polimórficos (PALMER *et al.*, 1994a). Ocorre com monômeros ou multímeros, ligados por pontes dissulfeto (VIDOTTO *et al.*, 1994). A análise dos diversos transcritos que codificam a MSP2 mostraram uma região central hipervariável única flanqueada por regiões N e C terminais altamente conservadas (FRENCH *et al.*, 1999).

Durante cada ciclo de rickettsemia, ocorre emergência de *A. marginale* expressando variantes distintas de MSP2, as quais contêm epítomos imunogênicos que induzem anticorpos específicos durante a infecção persistente da rickettsia (FRENCH *et al.*, 1999).

Resposta imune contra *Anaplasma marginale*

Possivelmente, anticorpos contra MSPs funcionam como opsoninas, facilitando a fagocitose e a eliminação de *A. marginale* por macrófagos (CANTOR *et al.* 1993). Outra possível função dos anticorpos seria o bloqueio da invasão de eritrócitos pela rickettsia. Anticorpos contra MSP1 bloqueiam a

aglutinação de eritrócitos de bovinos por corpúsculos iniciais de *A. marginale* (MCGAREY & ALLRED, 1994).

Apesar da importância dos anticorpos na imunidade contra *A. marginale*, é pouco provável que, isoladamente, os mesmos sejam capazes de proteger os bovinos contra a anaplasmosose (BROWN *et al.*, 2001b), uma vez que a inoculação de soro de animais imunes em bovinos susceptíveis não protege contra desafio com *A. marginale* (GALE *et al.*, 1992). Dessa forma, evidencia-se a importância das repostas celulares, as quais envolvem a participação de linfócitos T auxiliares ($CD4^+$), produtores de interferon-gama ($IFN-\gamma$) (BROWN *et al.* 1998). Essa citocina ativa macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO), substância que têm ação tóxica sobre rickettsias; estimulando a expressão de receptores de Fc e a fusão de fagossomos e lisossomos (BROWN *et al.* 1998) (Figura 2). Além disso, demonstrou-se que, em bovinos, o $IFN-\gamma$ atua sobre linfócitos B, estimulando a produção de IgG_2 (ESTES *et al.* 1994). Esse isotipo apresenta maior capacidade de promover fagocitose por meio de opsonização do que a IgG_1 (MCGUIRE *et al.* 1979), estando provavelmente envolvido no processo de neutralização da infectividade de corpúsculos iniciais de *A. marginale* mediada por anticorpos (TUO *et al.* 2000).

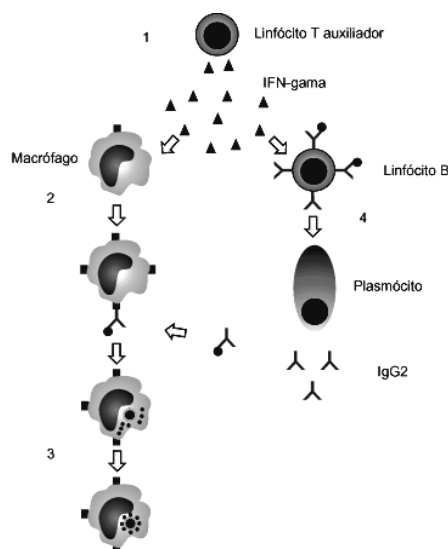


Figura 2 – Modelo de resposta imune celular e humoral contra *Anaplasma marginale*. a. Linfócitos T auxiliares ($CD4^+$), estimulados por antígenos de *A. marginale*, produzem interferon-gama ($IFN-\gamma$), o qual atua sobre macrófagos e linfócitos B. b. Sobre macrófagos, o $IFN-\gamma$ estimula a expressão de receptores de Fc, facilitando a fagocitose de *A. marginale*. c. Atua também aumentando a fusão fagossomo-lisossomo e a produção de óxido nítrico, resultando na destruição intracelular de *A. marginale*. d. O $IFN-\gamma$ estimula a produção de IgG_2 por linfócitos B. Esse isotipo tem importante função na opsonização de *A. marginale* para a fagocitose. (BROWN *et al.* 1998a).

Phage Display

Bibliotecas de peptídeos têm sido selecionadas com o intuito de produzir motivos protéicos capazes de mimetizar epítomos de anticorpos produzidos em doenças. Os anticorpos reconhecem motivos de peptídeos baseados somente em três ou quatro resíduos conservados. Por esse motivo, é possível a determinação da região de uma proteína que está sendo reconhecida por um anticorpo utilizando-se Phage Display (SCOTT *et al* 1990). Biblioteca de peptídeos sintéticos apresentados em fagos é uma ferramenta importante para identificar os sítios ligantes de moléculas biológicas de interesse. É um método de seleção no qual uma biblioteca de peptídeos ou proteínas é expressa no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada peptídeo encontra-se no genoma viral (AZZAZY & HIGHSMITH, 2002).

A tecnologia *Phage Display* foi desenvolvida por Smith, em 1985, e permite a seleção de peptídeos ou proteínas com propriedades específicas de ligação a alvos de interesse. A tecnologia é baseada no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de bacteriófagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressado fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína endógena.

Smith (1985) foi o pioneiro em conseguir a expressão da enzima de restrição *EcoRI* como uma fusão da proteína três (pIII) do capsídeo do fago. Tipicamente, utiliza-se o bacteriófago M13, um vírus bacteriófago filamentoso que parasita bactérias gram-negativas que por sua vez apresentam pilus F. O vírus utiliza maquinária de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir. Este bacteriófago não provoca lise na célula hospedeira, mas induz um estado no qual a célula infectada origina e libera partículas virais, causando uma queda na taxa de reprodução bacteriana (AZZAZY & HIGHSMITH, 2002).

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

brancas) (MESSING *et al.*, 1977; MESSING, 1983). O vetor M13KE (Figura 3) permite a construção e propagação de bibliotecas de *phage display* pelo uso de técnicas padronizadas para fagos M13. Para pequenos insertos, a biblioteca pode ser amplificada repetidamente com pouca perda de seqüências e diversidade (BARBAS *et al.*, 2001).

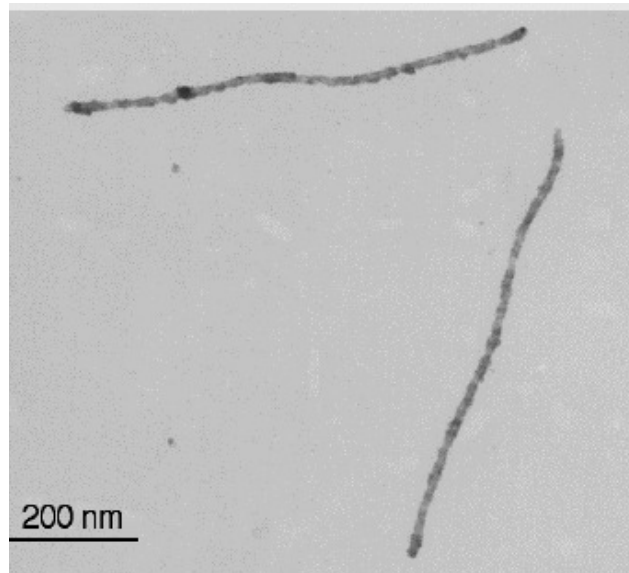


Figura 3 – Vetor M13KE (Tang *et al.*, 2002).

Anticorpos monoclonais utilizados na tecnologia *Phage Display* têm sido direcionados contra uma série de proteínas, muitas vezes consistindo em glicoproteínas imunodominantes de superfície de patógenos, como vírus, bactérias e protozoários, envolvidos nas mais diferentes patologias humanas e animais, como alergias, doenças auto-imunes, doenças infecto-contagiosas e outras. A seleção de peptídeos por meio de anticorpos monoclonais serve a muitos propósitos, sendo o mais comum deles a identificação e mapeamento de epítomos. A localização inequívoca de epítomos envolve a identificação de homologia entre o peptídeo selecionado e o antígeno natural. O mapeamento de epítomos pode produzir, também, informações que ajudem no esclarecimento da organização estrutural do antígeno e suas relações estruturais e funcionais (DEROO & MULLER, 2001).

A partícula de fago (Figura 4) é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX). Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou

proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago (PHIZICKY & FIELDS, 1995; BRÍGIDO & MARANHÃO, 2002).

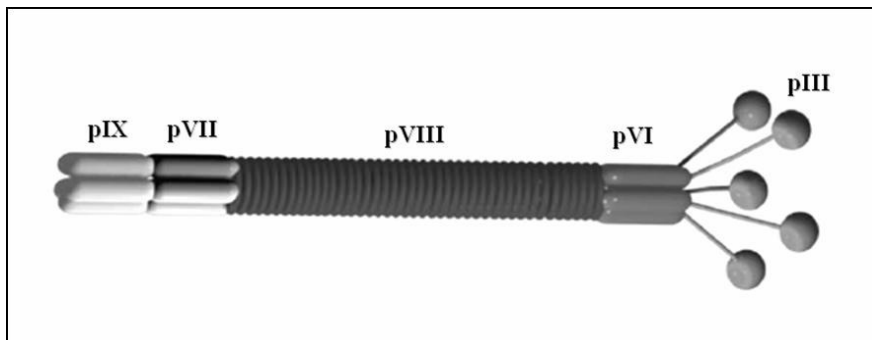


Figura 4 - Esquema representativo de um bacteriófago filamentosso ilustrando as proteínas do capsídeo viral: pIX, pVII, pVIII, pVI e pIII (ARAP, 2005).

A apresentação do peptídeo pelo fago é possível, pois, nesse sistema, seqüências aleatórias de DNA são introduzidas no gene que codifica a proteína do capsídeo do fago (camada externa e protetora). Desta forma, seqüências aleatórias de peptídeos fundidas à proteína do capsídeo (pIII ou pVIII, dependendo do sistema a ser empregado) são geradas durante a produção da partícula viral (SMITH, 1985). No fim do processo, bilhões de bacteriófagos são gerados, cada um deles apresentando um peptídeo diferente. Esta coleção de partículas virais recebe o nome de biblioteca apresentadora de peptídeos. Estas bibliotecas são, então, incubadas com as moléculas alvo do estudo (receptores purificados, células expressando seus receptores de superfície, anticorpos, entre outros). Este processo denominado *biopanning* (Figura 5), ou simplesmente *panning*, permite selecionar os fagos ligantes, expressando os peptídeos que mimetizam ligantes naturais destas moléculas (BARBAS *et al.*, 2001).

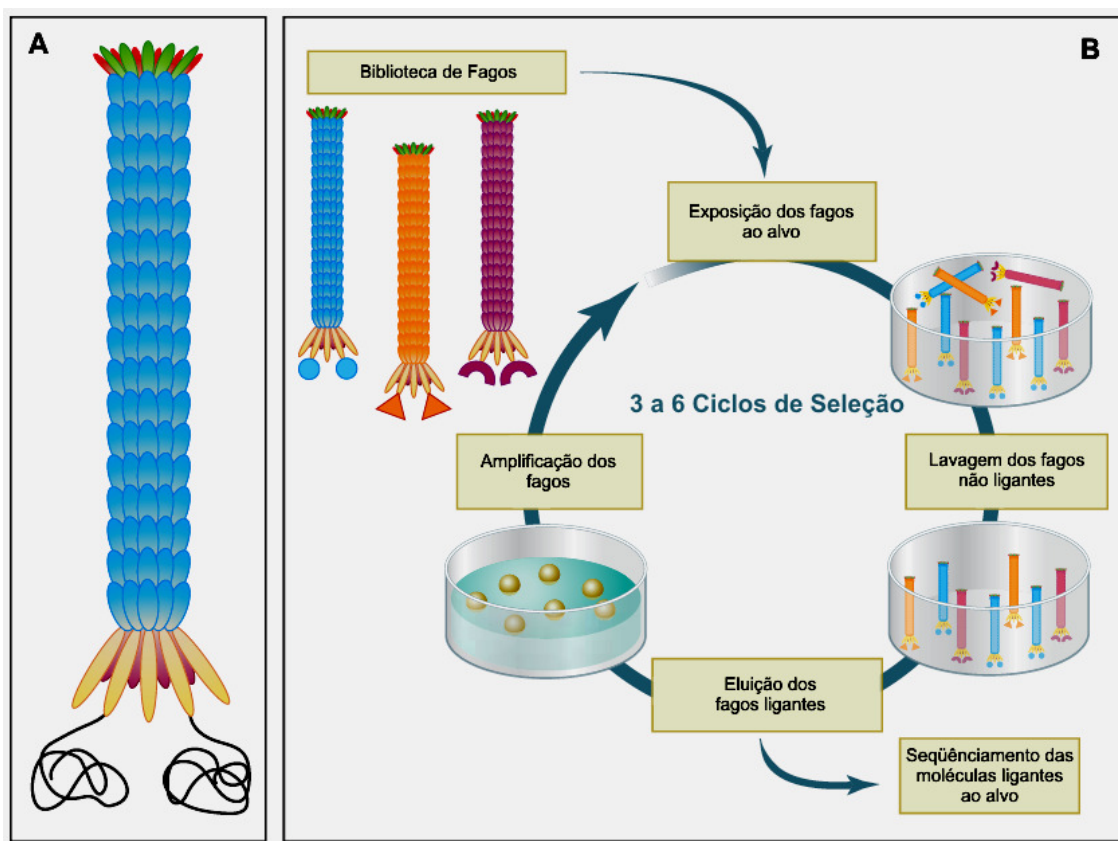


Figura 5 – A – Arquitetura do Fago M13KE; B – Esquema do Ciclo de Seleção por Afinidade (Adaptado de SMOTHERS, J. F., 2002).

Várias aplicações das bibliotecas de peptídeos randômicos expostos em fagos têm sido realizadas com sucesso, tais como mapeamento de epítomos (JEFFERIES, 1998), desenvolvimento de vacinas (IRVING *et al.*, 2001), identificação de substratos de proteínas quinases/ligantes de SH2 (KAY *et al.*, 2001), e identificação de peptídeos miméticos de ligantes não peptídeos (OLDENBURG, 1992). As vantagens da utilização da técnica são: a habilidade de selecionar ligantes de alta afinidade, a possibilidade de produzir proteínas solúveis, o baixo custo, o fácil manuseio e a rapidez (SMITH & PETRENKO, 1997). Uma particular aplicação é a identificação de novos peptídeos bioativos pela seleção contra receptores de superfícies celulares imobilizados ou em células intactas (SILVA, *et al.*, 2002). *Phage display* pode ser utilizado também *in vivo* para identificar peptídeos que se ligam em órgãos específicos. Neste caso, a biblioteca de fagos é injetada por via intravenosa, geralmente em roedores, e após o período de incubação os órgãos de interesse são removidos, homogeneizados e mantidos em suspensão com *E. coli* (RAJOTTE *et al.*, 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE D.H., GAIDO A.B., VIÑABAL A.E., DE ECHAIDE S.T., GUGLIELMONE A.A., 1994. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different level rickettsaemia. Parasite 1: 405-407.

ALLEMAN A.R. & BARBET A.F., 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. J. Clin. Microbiol. 34:270-276.

ALLRED D.R., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., LEIB S.R., HARKINS T.M., MCELWAIN T.F. & BARBET A.F., 1990. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 87:3220-3224.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; BASTOS, P. A. S.; MARQUES, A. P. C., Freqüência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 50, n. 3, p. 243-246, jun. 1998.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C.O., KESSLER, R.H., 2003. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. Pes. Vet. Bras. 23 (4): 139-148.

AZZAZY, H.M.E & HIGHSMITH, W.E. Jr., 2002. Phage Display Technology: Clinical Applications and Recent Advances. Clinical Biochemistry 35:425-445.

BARBAS, C.F.III; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J., 2001. Phage Display: A Laboratory Manual. Plain view, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

BARBET A.F., BLENTLINGER R., YI J., LUNDGREN A.M., BLOUIN E.F. & KOCAN K.M., 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale*

grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. Infect. Immun. 67:102-107.

BARBET A.F., PALMER G.H., MYLER P.J. & MCGUIRE T.C., 1987. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. Infect. Immun. 55:2428-2435.

BAUMGARTNER W., SCHLERKA G., FUMICZ M., STÖGER T., AWAD-MASAMEH M., SCHULLER W., WEBER P., 1992. Seroprevalence survey for *Anaplasma marginale* infection of Austrian cattle. Zent Vet 39: 97-104.

BOWIE M.V., FUENTE J. DE LA, KOCAN K.M., BLOUIN E.F. & BARBET A.F., 2002. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. Gene 282:95-102.

BRAYTON K.A., PALMER G.H., BROWN W.C., 2006. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. Exp Rev Vaccines 1: 95-101.

BRAYTON K.A., KAPPMAYER L.S., HERDON D.R., DARK M.J., TIBBALS D.L., PALMER G.H., MCGUIRE T.C., KNOWLES D.P., 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. Proceed Nat Acad Sci 102: 844-849.

BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q., 2002. Bibliotecas Apresentadas em FAGOS Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. n.26.

BROWN W.C., PALMER G.H., LEWIN H.A. & MCGUIRE T.C., 2001b. CD4+ T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. Infect. Immun. 69:6853-6862.

BROWN W.C., SHKAP V., ZHU D., MCGUIRE T.C., TUO W., MCELWAIN T.F. & PALMER G.H., 1998. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. Infect. Immun. 66:5406-5413.

CAEIRO V., 1999. General review of tick species present in Portugal. Parasit 41: 11-15.

CANTOR G.H., PONTZER C.H. & PALMER G.H., 1993. Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. Vet. Immunol. Immunopathol. 37:343-350.

COETZEE, J.F., APLEY, M.D., KOCAN, K.M. AND JONES, D.E., 2006. Flow cytometric evaluation of selected antimicrobial efficacy for clearance of *Anaplasma marginale* in short-term erythrocyte cultures. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics; 29; 173-183.

CRINGOLI G., OTRANTO D., TESTINI G., BUONO V., GIULIO G.D., TRAVERSA D., LIA R., RINALDI L., VENECIANO V., PUCCINI. V., 2002. Epidemiology of bovine tick-borne diseases in southern Italy. Vet Res 33: 421-426.

DEROO, S., MULLER, C. P., 2001. Antigenic and Immunogenic Phage Displayed Mimetopes as Substitute Antigens: Applications and Limitations. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 4, 75-110.

DONKERSGOED J.V., GERTONSON A., BRIDJES M., RATHS D., DARGATZ D., WAGNER B., BOUGHTON A., KNOOP D., WALTON T.E., 2004. Prevalence of antibodies to bluetongue virus and *Anaplasma marginale* in Montana yearling cattle entering Alberta feedlots: Fall 2001. Can Vet J 45: 486-492.

DREHER, U. M.; LEHMANN, R. H.; MELI, M. L.; REGULA, G.; CAGIENARD, A. Y.; SRARK, K. D. C.; DOHERR, M. G.; FILLI, F.; HASSIG, M.; BRAUN, U.; KOCAN, K. M.; LUTZ, H., 2005. Seroprevalence of anaplasmoses among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 107, n. ½, p. 71-79, Apr.

ERIKS I.S., STILLER D., PALMER G.H., 1993. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J Clin Microbiol* 31: 2091-2096. Coetzee JF, Apley MD 2006. Efficacy of enrofloxacin against severe experimental *A. marginale* infections in splenectomized calves. *Vet Ther* 7: 319-328.

ESTES D.M., CLOSSER N.M. & ALLEN G.K., 1994. IFN- γ stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-m and mitogen. *Cell. Immunol.* 154:287-295.

EWING, S.A., 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. P.395-423. In: R.J. Hidalgo and E.W. Jones (ed.). *Proceedings of the 7^o National Anaplasmosis Conference*. Mississippi State University State.

FARIAS, N. A., 1995. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. Guaíba, Porto Alegre: Agropecuária, 80 p.

FOIL L.D., 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol. Today*. 5: 88-96.

FRENCH D.M., BROWN W.C. & PALMER G.H., 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect. Immun.* 67:5834-5840.

FUENTE J, PASSOS L.M., VAN DEN BUSSCHE R.A., RIBEIRO M.F.B., FACURY-FILHO E.J., KOCAN K.M., 2004. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 121: 307-316.

FUENTE J. DE LA, GARCIA-GARCIA J.C., BLOUIN E.F. & KOCAN K.M., 2001a. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int. J. Parasitol.* 31:145-153.

FUENTE J. DE LA, GARCIA-GARCIA J.C., BLOUIN E.F., MCEWEN B.R., CLAWSON D. & KOCAN K.M., 2001b. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *Int. J. Parasitol.* 31:1705-1714.

GALE K.R., LEATCH G., GARTSIDE M. & DIMMOCK C.M., 1992. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. *Parasitol. Res.* 78:410-415.

GE N.L., KOCAN K.M., BLOUIN E.F., MURPHY G.L., 1996. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adult using nonradioactive *in situ* hybridization. *J Med Entomol* 33: 911-920.

GUGLIELMONE, A. A., 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 57, n. 1/3, p. 109-119, Mar.

HOFMANN-LEHMANN R., MELI M.L., DREHER U.M., GONCZI E., DEPLAZES P., BRAUN U., ENGELS M., SCHUPBACH J., JORGER K., THOMA R., GRIOT C., STARK K.D.C., WILLI B., SCHMIDT J., KOCAN K.M., LUTZ H., 2004. Current infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J Clin Microbiol* 42: 3775-3780.

IRVING, M. B.; PAN O.; SCOTT, J.K., 2001. 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.

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.

KANO F.S., VIDOTTO O., PACHECO R.C. & VIDOTTO M.C., 2002. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Vet. Microbiol.* 87:131-138.

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

KESSLER R.H. & SCHENK M.A.M., 1998. Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. 115p.

KESSLER R.H., 2001. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq Vet Bras* 21: 177-179.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; MADRUGA, C. R.; SACCO, A. M. S.; MIGUITA, M., 1992. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB). In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. Doenças parasitárias dos bovinos de leite. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL. p. 1-30.

KESSLER, R.H., SOARES, C.O., MADRUGA C.R., ARAÚJO, F.R., 2002. Tristeza parasitária dos bovinos: quando vacinar é preciso. Embrapa Gado de Corte. Campo Grande, MS.

KOCAN K.M., BARRON S.J., EWING S.A., HAIR J.A., 1985. Transmission the *Anaplasma marginale* by adult *Dermacentor andersoni* during feeding calves. *Am J Vet Res* 46: 1565-1567.

KOCAN K.M., BLOUIN E.F., BARBET A.F., 2000. Anaplasmosis control past, present, and future. *Ann NY Acad Sci* 916: 501-509.

KOCAN K.M., FUENTE J., GUGLIELMONE A.A., MELÉNDEZ R.D., 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. Clin Microbiol Rev 16: 698-712.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C., 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. Parasitology, New York, v. 129, p. 285-300. Supplement.

KOCAN, K.M., STILLER D.,GOFF W.L., CLAYPOOL P.I., EDWALDS W., EWING S.A., MCGUIRE T.C., HAIR J.A. & BARRON S.J., 1992. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. Am. J. Vet. Res. 53: 499-507.

LIU Z., LUO J., BAI Q., MA M., GUAN G., YIN H. 2005. Amplification of 16S rRNA genes of anaplasma species in china for phylogenetics analysis. Vet Microbiol 107: 145-148.

LOPEZ J.E., SIEMS W.F., PALMER G.H., BRAYTON K.A., MCGUIRE T.C., NORIMINE J., BROWN W.C., 2005. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. Infect Immun 73: 8109-8118.

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; PUTT, N., 1983. Epidemiologia da anaplasmosse e babesiose em bovinos da região de cerrado do estado de Mato Grosso do Sul: I. Prevalência. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 35, n. 5, p. 631-640, out.

MCBRIDE J.W., YU X.J. & WALKER D.H., 2000. Glycosylation of homologous immunodominant proteins of Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia canis. Infect. Immun. 68:13-18.

MCGAREY D.J. & ALLRED D.R., 1994. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect. Immun.* 62:4587-4593.

MCGAREY D.J., BARBET A.F., PALMER G.H., MCGUIRE T.C. & ALLRED D.R. 1994. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect. Immun.* 62:4594-4601.

MCGUIRE T.C., MUSOKE A.J. & KURTTI T., 1979. Functional properties of bovine IgG₁ and IgG₂: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology* 38:249-256.

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

MESSING, J.; GRONENBORN, B.; MULLER, H.B.; HANS, H.P., 1977. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a *Hind*III fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, p. 3642-3646.

MOLAD T., BRAYTON K.A., PALMER G.H., MICHAELI S. & SHKAP V., 2004. Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *Anaplasma marginale* and *A. centrale* vaccine strain. *Vet. Microbiol.* 100: 55-64.

MOLAD T., MAZUZ M.L., FLEIDEROVITZ L., FISH L., SAVITSKY I., KRIEL Y., LEIBOVITZ B., MOLLOY J., JONGEJAN F., SHKAP V., 2006. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. *Vet Microbiol* 113: 55-62.

MOLLOY, J.B., BOWLES P.M., KNOWLES D.P., MCELWAIN T., BOCK R., KINGSTON T., BLIGHT G. & DALGLIESH R., 1999. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet.* 77: 245-249.

NORTON, J. H.; PARKER, R. J.; FORBES-FAULKNER, J.C., 1983. Neonatal anaplasmosis in a calf. Australian Veterinary Journal, Melbourne, v. 60, n. 11, p. 348, Nov.

OBERLE S.M., PALMER G.H., BARBET A.F. & MCGUIRE T.C., 1988. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 56:1567-1573.

OLDENBURG, K.R., 1992. 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.

OLIVEIRA J.B., MADRUGA C.R., SCHENK M.A.M, KESSLER R.H., MIGUITA M. & ARAÚJO F.R., 2003. Antigenic characterization of four Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* Rickettsiaceae: Ehrlichiae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.

PALMER G.H. & MCGUIRE T.C., 1984. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. J. Immunol. 133:1010-1015.

PALMER G.H., BARBET A.F., CANTOR G.H., MCGUIRE T.C., 1989. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. Infect Immun 57: 3666-3669.

PALMER G.H., EID G., BARBET A.F., MCGUIRE T.C. & MCELWAIN T.F., 1994a. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. Infect. Immun. 62:3808-3816.

PALMER G.H., WAGHELA S.D., BARBET A.F., DAVIS W.C. & MCGUIRE T.C., 1987. Characterization of a neutralization-sensitive epitope on the Am 105 surface protein of *Anaplasma marginale*. Int. J. Parasitol. 17:1279-1285.

PALMER, G. H., RURANGIRWA F. R., KOCAN K. M., and BROWN W. C.. 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. Parasitol. Today 15:281–286.

PAYNE, R. C.; OSORIO, O., 1990. Tick-borne diseases of cattle in Paraguai. I. Seroepidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis. Tropical Animal Health and Production, Edinburgh, v. 22, n. 1, p.53-60.

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

POTGIETER F.T. & VAN RENSBURG L., 1987. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. Onderst. J. Vet. Res. 54: 557-560.

RAJOTTE, D.; ARAP, W.; HAGEDORN, M.; KOIVUNEN, E.; PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E., 1998. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display. J. Clin. Invest., v. 102, p. 430-437.

RAPJUT Z.I, SONG-HUA HU, ARIJO AG, HABIB M, KHALID M., 2005. Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. J Zhejiang Univ Sci 6: 1057-1062.

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M.; SCATAMBURLO. M. A.; MARTINS, N. E., 1995. Transmissão congênita da anaplasmoze bovina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 47, n. 3, p. 297-304, jun.

RIBEIRO, M. F. B.; PATARROYO, J. H. S.; SANTOS, J. L.; FARIA, J. E., 1984. Epidemiologia da anaplasmoze bovina no estado de Minas Gerais. I – Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, v.36, n. 4, p. 425-432, ago.

RIBEIRO, M.F.B. & LIMA, J.D., 1996. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. Vet. Parasitol. 61: 31-39.

RISTIC M., WATRACH A.M., 1963. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. Am J Vet Res 24: 267-277.

RISTIC, M., 1968. Anaplasmosis: In: WEINMAN, D.; RISTIC. Infectious blood diseases of man and animals. New York: Academic Press. p. 473-536.

ROGERS R.J., DIMMOCK C.K., VOS A.J. DE & RODWELL B.J., 1988. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis. Aust. Vet. J. 65: 285-287.

RUIZ, P.M.G. PASSOS, L.M.F. & RIBEIRO, M.F.B., 2005. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. Vet. Parasitol. 128: 325 -331.

SCOTT J.K., SMITH G.P., 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. Science. Jul 27; 249 (4967):386–390.

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., 2002. Avian anticoccidial activity of a novel membrane interactive peptide selected from phage display libraries. Molecular & Biochemical Parasitology, v. 120, p. 53–60.

SMITH, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 14 June. v. 228. no. 4705, pp. 1315 - 1317

SMITH, G.P.; PETRENKO V.A., 1997. Phage Display. Chem. Rev., v. 97, p. 391-410.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; SCOFIELD, A., FONSECA, A. H., 2000. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 97-101, jul./set.

STICH R.W., KOCAN K.M. PALMER G.H., EWING S.A., HAIR J.A. & BARRON S.J., 1989. Transtadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentro variabilis*. Am. J. Vet. Res. 50: 1377-1380.

THEILER A., (1908-9,1910). "*Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease." Report to the Government, Transvaal, South Africa. *Veterinary Bacteriology*, Department of Agriculture v. 7, n. 64.

THEILER, A., 1911. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle, p.7–46. First Report of the Director of Veterinary Research, Union of South Africa, Johannesburg, South Africa.

TOKARNIA, C.H., DOBEREINER, J., 1962. A importância da anaplasmoze em nossos bezerros e as medidas de seu controle. Veterinária, v.15, n.3 – 4, p.11 – 19.

TUO W., PALMER G.H., MCGUIRE T.C., ZHU D. & BROWN W.C., 2000. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 68:270-280.

VIDOTTO O., MARANA E. R. M., 2001. Diagnóstico em anaplasmoze bovina. Ciência Rural. Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 361-368.

VIDOTTO M.C., MCGUIRE T.C., MCELWAIN T.F., PALMER G.H. & KNOWLES D.P. JR., 1994. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 62: 2940-2946.

VISSER E.S., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., SHKAP V. PIPANO E. & KNOWLES D., 1992. The *Anaplasma marginale* MSP5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma species*. Infect and Immun. 60: 5139-5144.

WANDURAGALA, L.; RISTIC, M., 1993. Anaplasmosis. In: WOLDEHIWT, Z.; RISTIC, M. Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals. Pergmon Press, Oxford. p. 65-83.

CAPÍTULO ÚNICO

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES
LIGANTES A ANTICORPOS MONOCLONAIS REATIVOS A PROTEÍNAS DE
*Anaplasma marginale***

RESUMO

Anaplasmosse bovina é uma infecção causada por *Anaplasma marginale* e *A. centrale*. A espécie mais patogênica e de maior importância para bovinos é a *A. marginale* e está amplamente distribuída nas regiões tropicais, subtropicais e temperada do mundo. *A. marginale* é uma rickettsia intra-eritrocitária de ruminantes susceptíveis, transmitido biológica e mecanicamente por carrapatos e insetos hematófagos. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o principal transmissor de *A. marginale* no Brasil. A forma congênita de transmissão em bovinos pode ocorrer, ocasionando a anaplasmosse neonatal. A membrana externa do *A. marginale* inclui seis proteínas principais de superfície (MSPs) bem caracterizadas, designadas de MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 e desempenham papel importante no desenvolvimento da resposta imune de animais infectados. Para o desenvolvimento deste estudo, foi utilizada a técnica de *Phage Display* para identificar peptídeos ligantes a anticorpos monoclonais reativos a proteínas de *Anaplasma marginale* a partir de bibliotecas de peptídeos recombinantes por meio da tecnologia *Phage Display*. Para seleção dos peptídeos foi realizado uma seleção subtrativa utilizando uma biblioteca de peptídeos com 12 aminoácidos randômicos, Ph.D.-12, expressa na superfície do fago filamentoso M13 concomitantemente contra os anticorpos anti-MSP1a e anti-MSP2. Após quatro ciclos de seleção e validação por ELISA, o conjunto de peptídeos selecionados apresentou ser unicamente reconhecido pelo anticorpo anti-MSP1. Análises de bioinformática identificaram 45 peptídeos, que apresentaram o motivo proteico consenso STxS, representado em 78% dos fagos seqüenciados. Devido aos múltiplos sítios repetidos encontrados na proteína MSP1, o motivo proteico STSSxL pode ser um importante alvo biológico, com potencial utilização em ensaios diagnósticos e vacinais para o controle de *Anaplasma marginale*.

Palavras chave: *Anaplasma marginale*, MSP1, *Phage Display*

ABSTRACT

Bovine anaplasmosis is caused by *Anaplasma marginale* and *A. centrale*. The most pathogenic and important species for cattle production is *A. marginale*, and is widely distributed in tropical, subtropical and temperate regions of the world. *A. marginale* is an intra-erythrocyte rickettsia of susceptible ruminants, biological and mechanically transmitted by ticks and hematophagous insects. The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is the main vector of *A. marginale* in Brazil. The congenital form of transmission in cattle may occur, causing the neonatal anaplasmosis. The outer membrane of *A. marginale* includes six well characterized major surface proteins, MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 and MSP5, which play important role in the development of the immune response of infected animals. In this study, we have used the Phage Display technology to identify specific peptides that were immunoreactive to monoclonal antibodies anti-*A. marginale* proteins. Peptide selection was performed using a subtractive selection of a peptide library with 12 random amino acids, Ph.D.-12, expressed on the surface of the M13 filamentous phage concurrently against the anti-MSP1a and anti-MSP2. After four rounds of selection and validation by ELISA, the selected peptides have recognized only the anti-MSP1. Analysis of bioinformatics identified 45 peptides, which showed the protein consensus sequence STxS that was represented in 78% of selected phages. Due to the multiple motif repeats found in MSP1 protein, the STSSxL motif may become an important biological target, with potential use in diagnostic tests and vaccine for the control of *Anaplasma marginale*.

Key-words: *Anaplasma marginale*, MSP1, Phage Display.

INTRODUÇÃO

A anaplasmosse bovina, causada pela rickettsia *Anaplasma marginale*, é uma doença de grande importância econômica que é transmitida principalmente por carrapatos. A rickettsia infecta eritrócitos bovinos, causando severa anemia associada à anorexia, febre, diminuição no ganho de peso e produção de leite, e morte nos casos severos em animais não tratados (ZAUGG *et al.*, 1985).

O controle da anaplasmosse é realizado por quimioterapia, controle de vetores e imunização, sendo esse último mais eficiente (PALMER, 1989).

A membrana externa de *A. marginale* é capaz de induzir reposta imune protetora contra desafio homólogo e parcialmente protetora contra desafio heterólogo (TEBELE *et al.*, 1991). Nela foram identificadas seis proteínas principais de superfície - MSPs (PALMER & MCGUIRE, 1984; TEBELE *et al.*, 1991), as quais têm sido alvo de estudos para o desenvolvimento de imunógenos contra a anaplasmosse. Destas proteínas, MSP1a e MSP2 têm demonstrado maior potencial como imunógenos, protegendo os animais contra desafio com isolados virulentos homólogos e heterólogos de *A. marginale*, apesar das múltiplas isoformas da primeira proteína e variabilidade do gene que codifica a segunda.

A tecnologia de *phage display* tem apresentado um grande impacto na Imunologia, Biologia Celular, descoberta de medicamentos e de fármacos em geral. Esta técnica permite a obtenção de diferentes peptídeos ou proteínas imunogênicas, e tem sido utilizada para revelar os diversos tipos de interações que existem entre antígeno–anticorpo, caracterizando epítomos reconhecidos por anticorpos.

O presente trabalho teve como objetivo identificar peptídeos ligantes à anticorpos monoclonais reativos a proteínas de *Anaplasma marginale* a partir de bibliotecas de peptídeos recombinantes por meio da tecnologia *Phage Display*.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos monoclonais 15D2 (MSP1) do isotipo IgG3 e O50A2 (MSP2) do isotipo IgG1, ligantes às proteínas de superfície de *Anaplasma marginale*, foram adquiridos na empresa Veterinary Medical Research & Development, VMRD, Inc. (PO Box 502, Pullman, WA 99163 USA, www.vmr.com).

SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS

Biopanning em Solução

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

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

A seleção foi realizada em solução, sendo utilizado como substrato 50µL de proteína G agarose em 50% de solução aquosa (Recombinant Protein G Agarose – InvitrogenTM), lavados por ressuspensão em microtubo com 1 mL de TBS-T (TRIS – HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1%). Após centrifugação a 4000 rpm por 1 minuto em centrífuga refrigerada à 4°C, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e descartado. Em seguida, a resina foi bloqueada por uma hora em solução de bloqueio (NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,6; BSA 5 mg/mL; NaN₃ 0,02%) a 8°C, sendo misturada de 15 em 15 minutos. Após a incubação, a mesma foi lavada por quatro vezes, conforme descrito anteriormente, para então receber a mistura de 300ng dos anticorpos

monoclonais MSP1 e MSP2, seguido pela adição de $2,0 \times 10^{11}$ partículas virais em um volume final de 200 μ L de TBS-T 0,1%, previamente incubados à temperatura ambiente por 20 minutos.

A mistura resina/anticorpo/fago foi agitada vagarosamente por 3 vezes durante os 15 minutos de incubação a temperatura ambiente e em seguida lavada por 10 vezes com 1 mL de TBS-T 0,1%, preparando-a para a eluição dos fagos ligantes feita com 1 mL de tampão de eluição (Glicina – HCl 0,2M, pH 2,2; 1 mg/mL de BSA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Esta solução foi então centrifugada por 1 minuto a 4.000 rpm e o eluato transferido para um novo microtubo, onde foi imediatamente neutralizado com 150 μ L de TRIS-HCl 1 M, pH 9,1.

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

A precipitação dos fagos iniciou-se pela centrifugação da cultura por 10 minutos e 4.000 rpm, afim de extrair as células bacterianas. Após o descarte destas células, a cultura foi novamente centrifugada e extraídas as células residuais. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo, onde foi adicionado 20% do volume de PEG-NaCl (20% p/v de polietileno glicol – 8000 e NaCl 2,5M). A mistura permaneceu em repouso por 12 horas a 8°C e posteriormente foi centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi novamente centrifugada, agora por 2 minutos, a fim de ser possível a retirada do sobrenadante residual. O “pellet” foi diluído em 200 μ L de TBS 1X e os fagos foram posteriormente titulados.

Os fagos reamplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados no segundo ciclo em número de partículas de $2,0 \times 10^{11}$ e assim subsequente por mais 3 ciclos, sendo que cada ciclo envolveu os procedimentos de seleção, titulação do eluato, reamplificação e titulação dos fagos reamplificados. A partir do segundo ciclo, a estringência do tampão de

lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5%, utilizando-se, então, 0,5% de Tween-20 nas lavagens.

Titulações

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

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

Extração de DNA de Fagos

Para a extração do DNA dos fagos, colônias isoladas de uma placa oriunda do 3º ciclo do *biopanning* foram transferidas para poços de 2mL de placas de cultura tipo *deepwell*, contendo 1mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* ($OD_{600} \sim 0,3$); a cada poço foi adicionada apenas uma colônia de fago. A placa foi vedada com um adesivo próprio e incubada a 37°C, por 24 horas, sob vigorosa agitação (250rpm).

Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700rpm, a 20°C, durante 10 minutos. Apenas 800µL do sobrenadante da centrifugação foram transferidos para novas placas e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos com 350µL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 3700rpm, a 20°C durante 40 minutos para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi

descartado e 100µL de Tampão Iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foi adicionado ao precipitado de fagos.

As placas foram agitadas vigorosamente e, em seguida, 250µL de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 minutos, a temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas 3700rpm, 20°C, 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado de fagos foi lavado com 500µL de etanol 70% e recentrifugado. Finalmente, o precipitado remanescente foi diluído em 20µl de água ultrapura. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo e leitura espectrofotométrica (260nm e 280nm), respectivamente.

Seqüenciamento de DNA

Na reação de seqüenciamento foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do *primer* -96 gIII (5'- ^{OH}CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3' - *Biolabs*) e *Premix* (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences*).

A reação de 35 ciclos foi realizada em um termociclador de placas (*MasterCycler - Eppendorf*) nas seguintes condições: desnaturação (a 95°C por 20 segundos), anelamento do *primer* (a 58°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). O DNA seqüenciado foi precipitado com 1µL de acetato de amônio e etanol, homogeneizando a placa com leves batimentos. Então, foram acrescentados 27,5µL de etanol absoluto, em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000rpm e o sobrenadante descartado.

Adicionou-se 150µL de etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 10 minutos, a 4000rpm. A solução de etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800rpm, durante um segundo. A placa foi coberta por um papel alumínio durante cinco minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos no tampão de diluição (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences*).

A leitura do seqüenciamento foi realizada em um seqüenciador automático *MegaBace 1000* (*Amersham Biosciences*) no laboratório de Genética Molecular (UFU).

Análise dos Dados por Bioinformática

A tradução das seqüências de aminoácidos obtidas no seqüenciamento foi realizada pelo programa DNA2PRO12. Este programa é designado para a tradução de seqüências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs* (Ph.D.-12TM ou Ph.D.-C7CTM) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as seqüências inicial e final do vetor. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na seqüência, tais como códons inesperados ou erros na seqüência próxima (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>).

DIVAA (<http://relic.bio.anl.gov/divaa.aspx>) foi utilizado para o cálculo da diversidade e derivação padrão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos. O cálculo da freqüência, diversidade de aminoácidos dentro da população de peptídeos foi realizado pelo programa AADIV (<http://relic.bio.anl.gov/aafreqs3.aspx>).

As homologias de cada peptídeo, individualmente ou não, com proteínas de *Anaplasma marginale* foram testadas utilizando-se o programa MATCH (<http://relic.bio.anl.gov/match.aspx>). O programa MATCH foi usado para parear uma seqüência específica de proteína de *A. marginale* com todas as seqüências peptídicas selecionadas.

Phage ELISA

Para quantificação da reatividade dos clones aos anticorpos foi realizado o ensaio de ELISA onde placas de microtitulação foram sensibilizadas, com os anticorpos anti-MSP1 e anti-MSP2, para todas as amostras, com 1µg/poço de cada anticorpo diluído em tampão carbonato 100mM (8,3g NAHCO₃, dissolvido em 1L de água, autoclavado) pH 8,5 por 1 hora a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação as placas foram bloqueadas com 150µL de BSA a 1% overnight a 4°C.

As placas foram lavadas por três vezes com PBST (0,1% de Tween 20) e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com 100µL/poço de cultura dos fagos selecionados, do fago selvagem (fago que não expressa nenhuma proteína exógena) e de meio de cultura sem fago, para controle das reações.

Posteriormente as placas foram lavadas cinco vezes e incubadas com anti-M13 conjugado com peroxidase diluído 1:5000 em PBST 0,1%, durante 1 hora a temperatura ambiente, lavadas novamente por cinco vezes e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus*, Flow Laboratories, USA) pela leitura a 492nm.

O índice ELISA (IE) para os clones testados foi calculado realizando a divisão das leituras das densidades óticas (DO) das amostras pelo valor de *cutoff*. O valor *cutoff* foi calculado segundo a fórmula: *cutoff* = média das DOs do fago selvagem + 2X desvio padrão. Os IEs maiores que 1 foram considerados positivos e os IEs menores que 1 foram considerados negativos.

RESULTADOS

Seleção de Peptídeos - Biopanning e Titulações

Os procedimentos de titulação dos fagos foram eficientes em todos os 3 ciclos de seleção realizados, as colônias de bactérias apresentaram coloração azulada, demonstrando a quebra do substrato X-Gal e a expressão do gene da β -galactosidase pelas bactérias ER2738, como mostrado na Figura 6. Não foram observados, nas titulações, colônias transparentes resultado da ausência de bactérias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (não carreadores do gene *lac Z*).

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

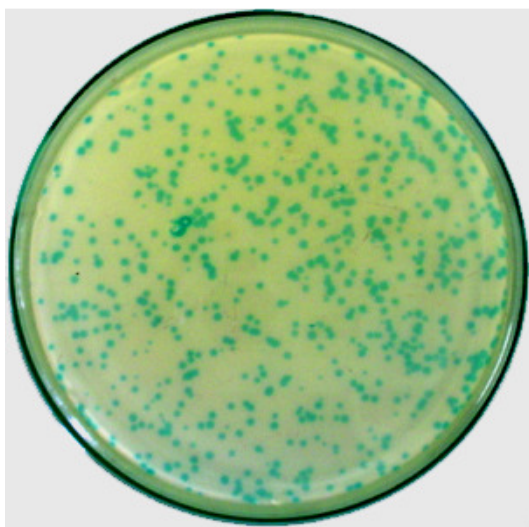


Figura 6 – Exemplo de placa de titulação. As colônias azuis representam as bactérias infectadas com os fagos M13 carreadores do gene da β -galactosidase.

Tabela 1 - Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos monoclonais anti-MSP1 e anti-MSP2 para *Anaplasma*. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade.

Ciclos	Número de partículas de fagos	
	Entrada	Saída
1º Ciclo de seleção	2×10^{10}	$1,7 \times 10^3$
2º Ciclo de seleção	2×10^{10}	$2,1 \times 10^4$
3º Ciclo de seleção	2×10^{10}	$3,8 \times 10^4$

A quantidade de fagos selecionados durante os três ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificado e não amplificado de cada ciclo (Tabela 1). Os títulos de entrada dos fagos no “*biopanning*” foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade a proteínas anti-MSP1 e anti-MSP2 ficam ligados a elas por interação peptídeo/anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade foi removido durante as lavagens. Nas amplificações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

Extração de DNA e Seqüenciamento dos Clones de Fagos

O DNA extraído dos fagos foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, para verificar sua qualidade e estimar sua quantidade, comparando a intensidade das bandas das amostras com a intensidade da banda do DNA padrão, o qual continha uma massa de 200ng (Figura 7). Em seguida o DNA foi seqüenciado e analisado.

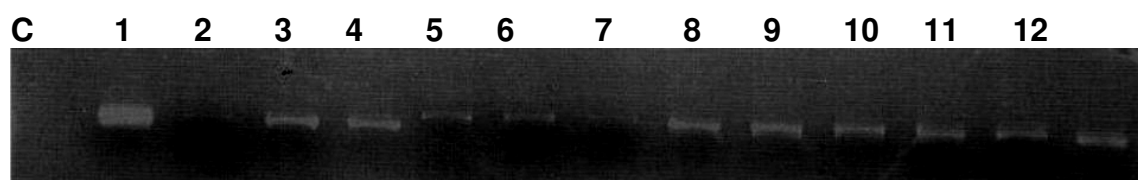


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de 12 amostras de DNA extraído de fagos (1-12) aleatoriamente escolhidos e de 200ng de DNA controle (C) com 7249pb.

Dos 96 clones seqüenciados, 52 apresentaram seqüências válidas (sem erros de sequenciamento), onde foram identificadas 49 seqüências diferentes e as demais ocorrendo repedidas vezes.

ANÁLISE DE DADOS POR BIOINFORMÁTICA

Após a tradução das seqüências de DNA pelo programa DNA2PRO12, o cálculo da freqüência de cada aminoácido nos peptídeos seqüenciados foi realizado pelo programa AADIV.

A Figura 8 e a Tabela 2 apresentam a comparação entre a freqüência dos vinte aminoácidos presentes nos peptídeos ligantes e a freqüência esperada dos aminoácidos na biblioteca original. Mais uma vez, observa-se que a seleção foi eficiente principalmente pelos aminoácidos Cisteína, Glicina, Lisina e Arginina que foram selecionados negativamente apresentando freqüência bem abaixo do esperado, e pela seleção positiva dos aminoácidos Asparagina, Serina e Treonina, os quais apresentaram uma freqüência bem elevada em relação à esperada sugerindo que esses aminoácidos estão envolvidos na maioria das interações peptídeo-anticorpo.

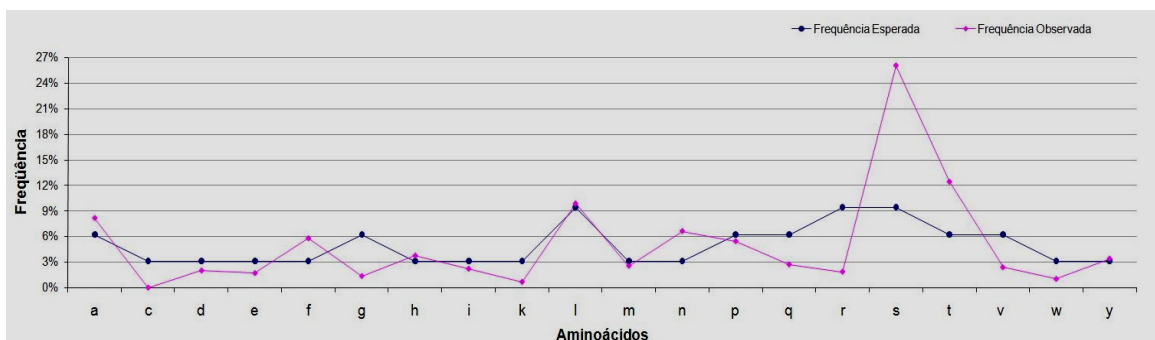


Figura 8 – Freqüências observadas e esperadas de cada um dos 20 aminoácidos para os peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos anti-MSP1 e anti-MSP2, conforme o programa AADIV, Relic.

Tabela 2 – Frequência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos anti-MSP1 e anti-MSP2; e a frequência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizada pelo AADIV.

Aminoácido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total	Frequência
A (Alanina)	3	4	5	3	8	5	2	3	7	3	1	4	48	0,0816
C (Cisteína)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0000
D (Aspartato)	1	3	0	1	1	0	0	0	0	1	3	2	12	0,0200
E (Glutamato)	2	2	0	2	2	0	0	0	1	0	1	0	10	0,0170
F (Fenilalanina)	6	0	0	2	2	2	3	1	4	5	6	3	34	0,0578
G (Glicina)	3	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	8	0,0136
H (Histidina)	4	2	2	5	4	1	1	0	0	0	1	2	22	0,0374
I (Isolucina)	1	2	1	3	0	1	0	1	1	1	1	1	13	0,0221
K (Lisina)	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,0068
L (Leucina)	4	3	4	3	0	2	1	3	2	5	9	22	58	0,0986
M (Metionina)	5	0	4	2	2	1	0	0	0	0	1	0	15	0,0255
N (Asparagina)	3	7	6	7	3	4	3	1	1	1	2	1	39	0,0663
P (Prolina)	0	7	4	1	5	2	3	0	0	2	6	2	32	0,0544
Q (Glutamina)	4	1	2	1	4	0	1	1	0	0	1	1	16	0,0272
R (Arginina)	0	2	3	1	0	2	0	0	1	0	2	0	11	0,0187
S (Serina)	3	5	8	5	13	18	26	16	21	26	10	3	153	0,2602
T (Treonina)	4	3	3	10	2	7	9	21	7	2	1	4	73	0,1241
V (Valina)	1	2	1	1	1	1	0	1	1	1	2	2	14	0,0238
W (Tryptofano)	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	6	0,0102
Y (Tirosina)	2	6	3	1	1	3	0	1	1	1	1	0	20	0,0340
Diversidade	6/50	7/52	8/52	10/53	13/54	18/55	26/56	21/57	21/58	28/59	10/60	22/61		
CONSENSO	F	N/P	S	T	S	S	S	T	S	S	S	L	588	

DIVAA é uma medida quantitativa de diversidade de sucessão dos aminoácidos, e gera hipóteses relativas à contribuição de resíduos individuais para as relações funcionais e evolutivas entre proteínas. A Figura 9 apresenta um gráfico gerado pelo programa DIVAA que calcula a diversidade de aminoácidos em cada uma das 12 posições nos peptídeos e a derivação padrão, mostrando as posições onde ocorreu a maior diversidade de aminoácidos, o gráfico mostra que nas posições 1, 2 e 3 houve a maior diversidade de aminoácidos enquanto que as diversidade nas posições 7, 8, 9 e 10 foram reduzidas, ficando abaixo de 0,2.

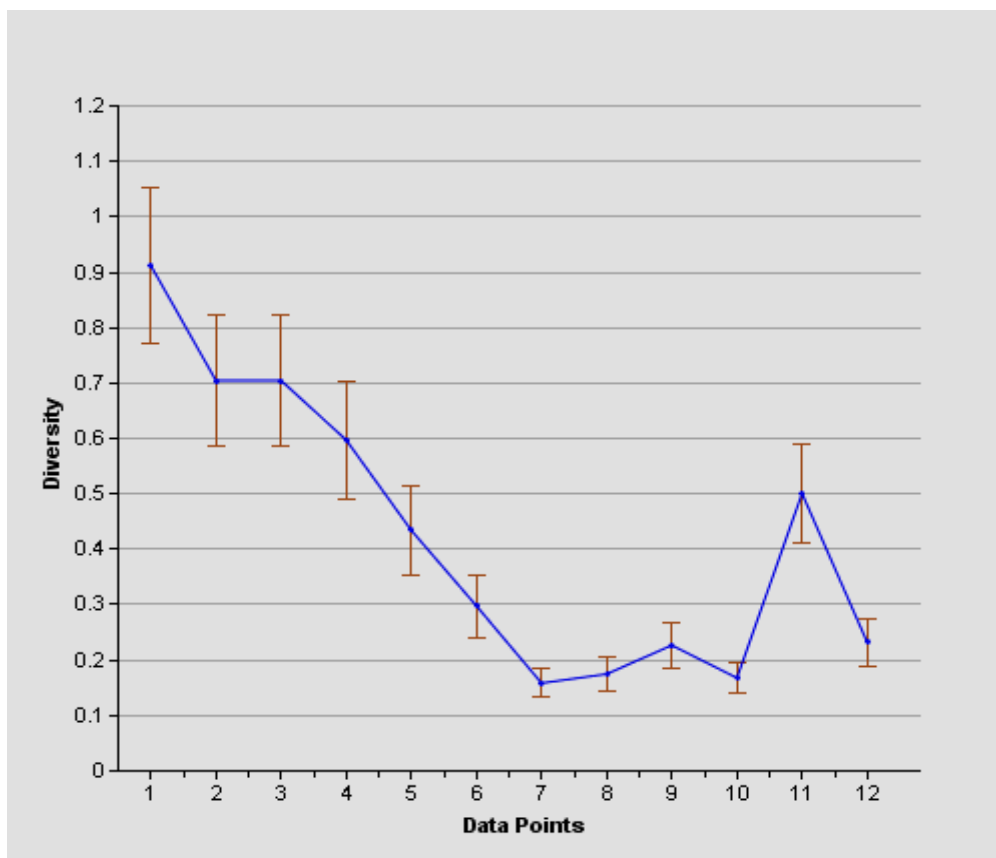


Figura 9 – Gráfico construído pelo programa DIVAA que ilustra a diversidade de sucessão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos.

Existem diversos parâmetros que indicam o sucesso de seleção de cada peptídeo. Na Tabela 3 são apresentados os seguintes parâmetros: seqüências de aminoácidos obtidas, freqüência dos peptídeos selecionados (FO), freqüência esperada desses peptídeos na biblioteca original (FE), amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à freqüência esperada dos peptídeos da biblioteca original (FO/FE), grau de informação de cada peptídeo ($I(m)$) e número provável de clones independentes dentro da biblioteca (λ). Estes parâmetros são obtidos mediante cálculos a partir das freqüências dos aminoácidos para cada posição no clone, a freqüência esperada é calculada pela multiplicação das freqüências de todos os aminoácidos observados, tabela que é apresentada pelo fabricante para cada tipo de biblioteca de fagos. Todos os outros parâmetros são fórmulas que se originam desta FE, conforme apresentadas na publicação de Rodi *et al.*, (2002). Ao analisar a tabela, deve-se relacionar todos os dados de cada peptídeo selecionado, assim um peptídeo que apresenta um baixo valor de FE

e λ , e alto valor para $I(m)$ e FO/FE possui uma baixa probabilidade de ser selecionado, a menos que a seleção seja de fato específica. Ao observar os clones 4, 5, 40 e 45, por exemplo, veremos que eles possuem os maiores valores para $I(m)$ e FO/FE, e os menores para FE e λ , mas mesmo assim foram selecionados durante o biopanning, o que comprova mais uma vez a eficiência da seleção.

Para identificar um motivo consenso entre os 49 clones selecionados, analisou-se a frequência dos aminoácidos observados em cada posição da sequência peptídica formada, de 1 a 12 aminoácidos (Tabela 2). Para efeito de estabelecer o motivo consenso observou-se a maior frequência em cada posição, e aquelas frequências que eram inferiores à menor frequência observada na posição 7 (9/56) não foram consideradas para compor o motivo central, considerando então somente aquelas posições com ≥ 10 observações do mesmo aminoácido, que originou o motivo TSSSTSSSL. Se ainda for considerado apenas aquelas posições com frequência acima de 35%, o motivo consenso seria STSSxL.

Motivos protéicos comuns também foram identificados por meio do alinhamento dos clones, após a terceira seleção no experimento (Tabela 4). Dois grupos de aminoácidos foram gerados, sendo o primeiro grupo constituído pelo motivo STxS e o segundo grupo pelo motivo TSS. Nestes dois casos, o motivo consenso foi considerado quando ocorreu quatro ou mais vezes nos clones distintos. Contudo, pode-se considerar ainda dois outros motivos semelhantes e muito frequentes, STSS e STAS, sendo que o primeiro se repete duas vezes dentro da sequência consenso geral entre todos os clones (Tabela 2).

Tabela 3 – Sequências de aminoácidos dos clones selecionados, frequência observada, frequência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.

Clone	Peptídeo	Frequência Observada (FO)	Frequência Randômica* (FE)	Amplificação** (FO/FE)	I(m)***	λ****	Clone	Peptídeo	Frequência Observada (FO)	Frequência Randômica* (FE)	Amplificação** (FO/FE)	I(m)***	λ****
1	YNSTASFSTPHL	2/52	$1,86 \times 10^{-13}$	$1,05 \times 10^{11}$	29,3	$3,73 \times 10^{-4}$	26	ANLHHPSTSSQL	1/52	$9,93 \times 10^{-14}$	$1,97 \times 10^{11}$	29,9	$1,98 \times 10^{-4}$
2	HTMTSASTSSLL	1/52	$6,77 \times 10^{-13}$	$2,89 \times 10^{10}$	28	$1,35 \times 10^{-3}$	27	DQRMASSTASFSS	1/52	$1,89 \times 10^{-15}$	$1,03 \times 10^{13}$	33,9	$3,78 \times 10^{-6}$
3	QYAPSTNSYLLL	1/52	$1,18 \times 10^{-12}$	$1,65 \times 10^{10}$	27,5	$2,37 \times 10^{-3}$	28	QYSTSSSLGISI	1/52	$9,64 \times 10^{-14}$	$2,03 \times 10^{11}$	30	$1,92 \times 10^{-4}$
4	INPIHNSTASF	1/52	$4,59 \times 10^{-21}$	$4,26 \times 10^{18}$	46,8	$9,18 \times 10^{-12}$	29	NRYTTSHILSPV	1/52	$7,58 \times 10^{-14}$	$2,58 \times 10^{11}$	30,2	$1,51 \times 10^{-4}$
5	FVPFASTSSNLA	1/52	$4,17 \times 10^{-19}$	$4,69 \times 10^{16}$	42,3	$8,35 \times 10^{-10}$	30	GDKHSTSSFLIT	1/52	$1,53 \times 10^{-11}$	$1,27 \times 10^9$	24,9	$3,06 \times 10^{-2}$
6	VYANQASTASRL	1/52	$2,37 \times 10^{-13}$	$8,26 \times 10^{10}$	29,1	$4,74 \times 10^{-4}$	31	TSNSTASFSSPA	1/52	$4,02 \times 10^{-13}$	$4,86 \times 10^{10}$	28,5	$8,05 \times 10^{-4}$
7	HSTEAASSTSSFA	1/52	$1,16 \times 10^{-14}$	$1,67 \times 10^{12}$	32,1	$2,33 \times 10^{-5}$	32	MDMAQLSTSSNL	1/52	$3,24 \times 10^{-11}$	$6,03 \times 10^8$	24,2	$6,49 \times 10^{-2}$
8	FASDMRPSTSSF	1/52	$1,88 \times 10^{-14}$	$1,03 \times 10^{12}$	31,6	$3,77 \times 10^{-5}$	33	NYHHQIAYALLD	1/52	$2,42 \times 10^{-14}$	$8,08 \times 10^{11}$	31,4	$4,85 \times 10^{-5}$
9	FNSTSSLLTSSP	1/52	$6,91 \times 10^{-17}$	$2,83 \times 10^{14}$	37,2	$1,38 \times 10^{-7}$	34	TPYSMSSTASRL	1/52	$3,98 \times 10^{-16}$	$4,92 \times 10^{13}$	35,5	$7,96 \times 10^{-7}$
10	LESRYFPVITPT	1/52	$1,25 \times 10^{-14}$	$1,56 \times 10^{12}$	32	$2,50 \times 10^{-5}$	35	GYSFENSTSSPL	1/52	$4,78 \times 10^{-14}$	$4,09 \times 10^{11}$	30,7	$9,57 \times 10^{-5}$
11	FNNTNSTSSFVS	1/52	$8,85 \times 10^{-16}$	$2,21 \times 10^{13}$	34,7	$1,77 \times 10^{-6}$	36	KPLLASSTSSL	1/52	$1,15 \times 10^{-13}$	$1,69 \times 10^{11}$	29,8	$2,30 \times 10^{-4}$
12	QWNTSSFAVYDP	1/52	$6,49 \times 10^{-16}$	$3,01 \times 10^{13}$	35	$1,29 \times 10^{-6}$	37	WALAPSTASFLS	1/52	$5,73 \times 10^{-14}$	$3,42 \times 10^{11}$	30,5	$1,14 \times 10^{-4}$
13	LEYHQVTLRDVL	1/52	$3,23 \times 10^{-13}$	$6,06 \times 10^{10}$	28,8	$6,46 \times 10^{-4}$	38	TLTYAPSTSSPL	1/52	$1,78 \times 10^{-15}$	$1,09 \times 10^{13}$	34	$3,56 \times 10^{-6}$
14	ESAAPYSTNSFA	1/52	$5,26 \times 10^{-12}$	$3,72 \times 10^9$	26	$1,05 \times 10^{-2}$	39	MYHNNTSSWLG	1/52	$2,59 \times 10^{-13}$	$7,55 \times 10^{10}$	29	$5,19 \times 10^{-4}$
15	HLASSTSSSLG	2/52	$1,29 \times 10^{-15}$	$1,51 \times 10^{13}$	34,3	$2,59 \times 10^{-6}$	40	SPPEFSNSTASF	1/52	$3,73 \times 10^{-18}$	$5,25 \times 10^{15}$	40,1	$7,46 \times 10^{-9}$
16	FNRLPYSTSSSL	1/52	$1,87 \times 10^{-14}$	$1,04 \times 10^{12}$	31,6	$3,74 \times 10^{-5}$	41	MHISDMSTSSML	1/52	$1,47 \times 10^{-11}$	$1,32 \times 10^9$	24,9	$2,94 \times 10^{-2}$
17	NDRNSLNTTSFL	152	$2,42 \times 10^{-14}$	$8,08 \times 10^{11}$	31,4	$4,85 \times 10^{-5}$	42	YTQNSTASFGPW	1/52	$6,36 \times 10^{-12}$	$3,07 \times 10^9$	25,8	$1,27 \times 10^{-2}$
18	ASQMVSTSSFND	2/52	$2,83 \times 10^{-13}$	$6,90 \times 10^{10}$	28,9	$5,67 \times 10^{-4}$	43	SPNTSSFTADL	1/52	$3,92 \times 10^{-14}$	$5,00 \times 10^{11}$	30,9	$7,84 \times 10^{-5}$
19	HVMSPHPQSTLL	1/52	$2,14 \times 10^{-17}$	$9,13 \times 10^{14}$	38,4	$4,29 \times 10^{-8}$	44	FINHASSTSSSL	1/52	$6,19 \times 10^{-13}$	$3,16 \times 10^{10}$	28,1	$1,23 \times 10^{-3}$
20	TPVNEAQNTASF	1/52	$3,22 \times 10^{-16}$	$6,07 \times 10^{13}$	35,7	$6,45 \times 10^{-7}$	45	LAPIGNSTTSFL	1/52	$5,46 \times 10^{-19}$	$3,58 \times 10^{16}$	42,1	$1,09 \times 10^{-9}$
21	GTWNNTSSLLLN	1/52	$8,53 \times 10^{-13}$	$2,29 \times 10^{10}$	27,8	$1,70 \times 10^{-3}$	46	EISKAFSTSSFH	1/52	$7,56 \times 10^{-13}$	$2,59 \times 10^{10}$	27,9	$1,51 \times 10^{-3}$
22	MHMTSSSTASYL	1/52	$9,93 \times 10^{-14}$	$1,97 \times 10^{11}$	29,9	$1,98 \times 10^{-4}$	47	APNQFRSTASEL	1/52	$1,76 \times 10^{-14}$	$1,11 \times 10^{12}$	31,7	$3,52 \times 10^{-5}$
23	SALNSTSSSFSSH	1/52	$7,95 \times 10^{-13}$	$2,46 \times 10^{10}$	27,9	$1,59 \times 10^{-3}$	48	QNWTSSTSSFSQ	1/52	$1,63 \times 10^{-17}$	$1,19 \times 10^{15}$	38,7	$3,27 \times 10^{-8}$
24	MRVSTSSFPAL	1/52	$3,68 \times 10^{-13}$	$5,32 \times 10^{10}$	28,6	$7,36 \times 10^{-4}$	49	LPTIPYSTASDL	1/52	$4,38 \times 10^{-15}$	$4,46 \times 10^{12}$	33,1	$8,77 \times 10^{-6}$
25	KLSLHNTSSVLT	1/52	$1,26 \times 10^{-17}$	$1,55 \times 10^{15}$	38,9	$2,52 \times 10^{-8}$							

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

Tabela 4: Alinhamento linear das seqüências de aminoácidos dos peptídeos selecionados por afinidade realizado pelo MOTIF 2.

Motivo	Alinhamento
	YNSTASFSTPHL
STxS*	HTMTSASTSLL
	QYAPSTNSYLLL
37 peptídeos com este motivo.	INPIHNSTASFT
	FVPFASTSSNLA
	VYANQASTASRL
	HSTEAASTSSFA
	FASDMRPSTSSF
	FNSTSSLLTSSP
	FNNTNSTSSFVS
	ESAAPYSTNSFA
	HLASSSTSSSLG
	FNRLPYSTSSSL
	ASQMVSTSSFND
	MHMTHTSTASYL
	SALNSTSSFSSH
	MRAVSTSSFPAL
	ANLHHPSTSSQL
	DQRMASSTAFSS
	QYSTSSSLGISI
	GDKHSTSSFLIT
	TSNSTASFSSPA
	MDMAQLSTSSNL
	TPYSMSSTASRL
	GYSFENSTSSPL
	KPLLASSTSSL
	WALAPSTASFSL
	TLTYAPSTSSPL
	SPPEFSNSTASF
	MHISDMSTSSML
	YTQNSTASFSPW
	FINHASSTSSSL
	LAPIGNSTTSL
	EISKAFSTSSFH
	APNQFRSTASEL
	QNWTSSSTSSFSQ
	LPTIPYSTASDL
TSS	HTMTSASTSSLL
29 peptídeos com este motivo.	FVPFASTSSNLA
	HSTEAASTSSFA
	FASDMRPSTSSF
	FNSTSSLLTSSP
	NSTSSLLTSSP
	FNNTNSTSSFVS
	QWNTSSFAVYDP
	HLASSSTSSSLG
	FNRLPYSTSSSL

ASQMVSTSSFND
 GTWNNTSSLLLN
 SALNSTSSFSSH
 MRAVSTSSFPAL
 KLSLHNTSSVLT
 ANLHHPSTSSQL
 QYSTSSSLGISI
 GDKHSTSSFLIT
 MDMAQLSTSSNL
 GYSFENSTSSPL
 KPLLASSTSSL
 TLTYAPSTSSPL
 MYHNNTSSWLGV
 MHISDMSTSSML
 SPNTSSFTEADL
 FINHASSTSSSL
 EISKAFSTSSFH
 QNWTSSSTSSFSQ
 QNWTSSSTSSFSQ

*Letras em negrito denotam resíduos conservados.

A sequência original da proteína MSP1a de *A. marginale* apresenta cinco repetições de 28 a 29 aminoácidos na extremidade NH₂-terminal da molécula. Um domínio consenso STSSxL encontrado ao final de cada repetição, que funciona como epítipo ativo reconhecido pelo anticorpo monoclonal anti-MSP1a, foi identificado pela maior frequência de aminoácidos nos clones selecionados (Figura 10).

(0-69)	MSAEYVSTQSD DSSSASGQQQESSVSSQSEASTSSQLGA DSSSAGGQQQESSVSSQSDQ ASTSSQLGA
(70-681)	DSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLGA DSSSAGGQQQESSVSSQSDQ ASTSSQLGA DSSSAGGQQQESSVSSQSDQ ASTSSQLGT DWRQEMRSKVASVEYMLAARALISVGVYAAQGEIARSRGCAPLRVAEVEEIV KDGLVRSHFHD SGLSLGSIRLVLMQVGD KLG LQGLKIGEGYATYLAQAFADSVVVAADVQSSGACASLDS AIANVETSWSLHGGLVSKGFDRTKVERGDLEAFVDFMFGGVSyndGNASAAARSVLETLAGHVDALGISYN QLDKLDADTLYSVVSFSAGSAIDRGAVSDAADKFRVMMFGGAPAGQEKTAEPHEEAATPSASSVPSTVHGK VVDAVDRAKEAAKQAYAGVRKRYVAKPSDTTTLVVAITALLITAFaICACLEPRLIGASGPLIWGCLALV ALLPLLGMVHTAVSASSQKKAAGGAQRVAAQERSRELSRARQEDQQLHVPAILTGLSVLVFIAAVVACI AVDARRGTWQGSICFLAAFVLFaISA AVVMATRDQSLAECD SKCATARTAQAVPGGQQQPRATEGVVSSG GQEGGAGVPGTSVPSAESGAVPPATIMVSVDPQLVATLGAGVAQAAA

Figura 10 – Proteína MSP1a de *Anaplasma marginale*, com destaque para o domínio STSSxL dentro da região repetitiva de 28-29 aminoácidos (rico em serina) que ocorre em cinco blocos repetidos.

Neste estudo, epítomos potenciais (miméticos ou com homologia perfeita) são apresentados a partir de similaridades significativas entre os peptídeos e a sequência protéica da MSP1a. Foram identificadas similaridades entre 46 dos 49 clones selecionados com a proteína de membrana MSP1a (Figura 11). Dentre os 28 ou 29 aminoácidos da sequência repetitiva da proteína MSP1a, 14 aminoácidos foram identificados por alinhamento com a sequência original, que provavelmente formam os resíduos críticos do epítomo na molécula, caracterizados em negrito como a seguir: **DSSSASGQQQESSVSSQSEASTSSQLGA**. Dentre os resíduos críticos, o domínio mais freqüente entre todos os 46 clones foi o STSSxL, conforme identificado pela análise de bioinformática.

	DSSSASGQQQESSVSSQSEASTSSQLGA (28 AA)
	DSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLGA (29 AA)
Clone 1	YN STAS FSTPHL
Clone 2	HTMT STSS LL
Clone 3	QYAP STNSYLLL
Clone 4	INPIHN STAS FT
Clone 5	FVPF ASTSS NLA
Clone 6	VYAN QASTAS RL
Clone 7	HSTEA ASTSS F
Clone 8	FASDMRP STSS F
Clone 9	FN STSS LLTSSP
Clone 11	FNNTN STSS FVS
Clone 12	QWNTSS FAVYDP
Clone 14	ESAAPY STNS F
Clone 15	HLASS STSS SLG
Clone 16	FNRLPY STSS SL
Clone 17	NDRNSLN TTSS FL
Clone 18	ASQMV STSS FND
Clone 19	HVMSPHP QST LL
Clone 20	TPVNEA QNTAS F
Clone 21	GTWNN STSS LLLN
Clone 22	MHMT STAS YL
Clone 23	SALN STSS FSSH
Clone 24	MRAV STSS FPAL
Clone 25	KLSLHN TTSS VL
Clone 26	ANLHHP STSS QL
Clone 27	D QRMAS TAFSS
Clone 28	QY STSS SLGISI
Clone 29	NRYT TTSH ILSPV
Clone 30	GDKH STSS FLIT
Clone 31	TSNSTAS FSSPA
Clone 32	MDMAQL STSS NL
Clone 34	TPYSMS STAS RL
Clone 35	GYSF ENSTSS PL
Clone 36	KPLLAS STSS TL
Clone 37	WALAP STAS FLS
Clone 38	TLTYAP STSS PL
Clone 39	MYHNN TTSS WLGV
Clone 40	SPPEFSN STAS F
Clone 41	MHISDM STSS ML
Clone 42	YT QNSTAS FGPW
Clone 43	SPNT SSFT EADL
Clone 44	FINHAS STSS SL
Clone 45	LAPIGN TTSS FL
Clone 46	EISKAF STSS FH
Clone 47	APNQFR STAS EL
Clone 48	QNWTSSTSS FSQ
Clone 48	QNWTS STSS FSQ
Clone 49	LPTIPY STAS DL
	DSSSASGQQQESSVSSQSEASTSSQLGA
	(Homologia entre 14 resíduos entre os 28/29 aminoácidos da repetição peptídica)
	Clones Sem Alinhamento:
Clone 10	LESRYFDVITPT
Clone 13	LEYHQVTLRDVL
Clone 33	NYHHQIAYALLD

Figura 11 – Alinhamento dos 49 peptídeos recombinantes selecionados por Phage Display ao domínio protéico STSSxL em sequência parcial de dois motivos repetidos da proteína MSP1a (com 28 ou 29 aminoácidos) de *Anaplasma marginale*. No motivo consenso final, as letras em vermelho indicam todos os aminoácidos que foram alinhados com a sequência original (em azul).

Phage ELISA

Para confirmar a eficiência de seleção, os fagos foram submetidos a ensaios de ELISA para quantificação da reatividade ao alvo. Para a normalização da quantidade de partículas virais entre os clones a serem testados, placas de microtitulação foram sensibilizadas com os anticorpos anti-MSP1a e MSP2 na concentração de 1 µg por poço. Utilizou-se o fago selvagem como controle negativo de reação (Figura 12).

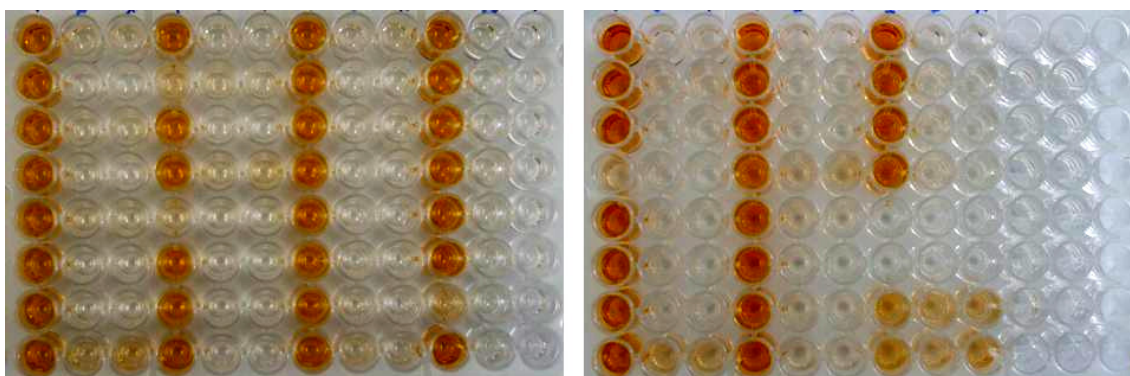


Figura 12 – Placas de Elisa mostrando a reatividade dos clones contra o anticorpo anti-MSP1a.

A Figura 13 apresenta um gráfico representativo da reatividade dos clones selecionados aos anticorpos anti-MSP1 e anti-MSP2, o *cutoff* foi calculado somando-se a média das leituras das réplicas do fago selvagem (controle negativo) mais duas vezes o desvio padrão. Observa-se que apenas os clones 6, 16, 26 e 40 não apresentaram razões dos índices ELISA maiores que 1, ou seja, não foram significativos; enquanto que os outros 45 peptídeos apresentaram IE maior que 1,0, inclusive para os três clones que não foram alinhados na sequência da proteína MSP1a.

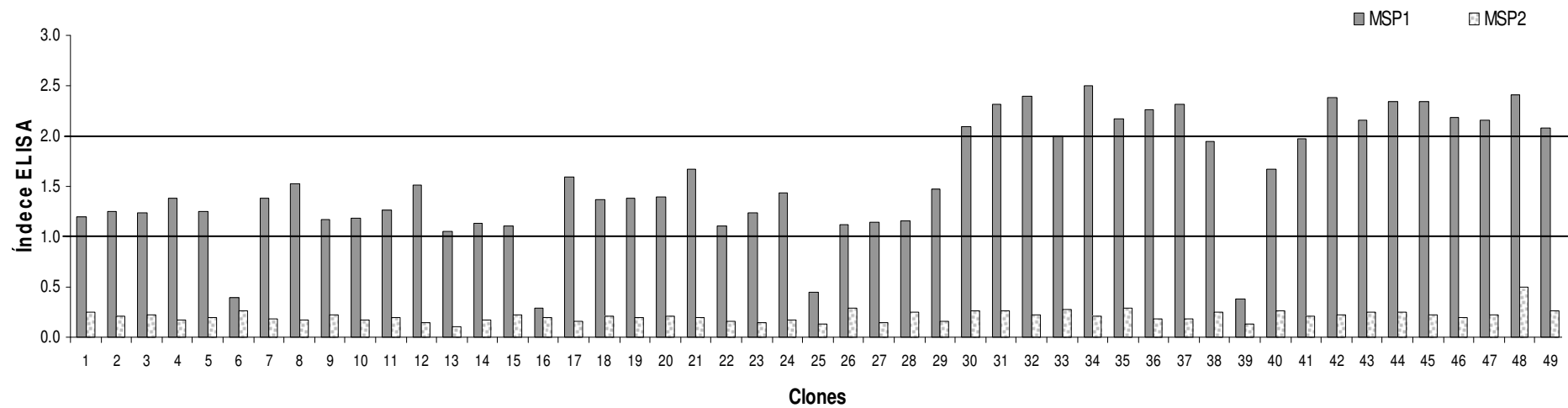


Figura 13 – Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio de ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-MSP1 e anti-MSP2 para *Anaplasma marginale*.

DISCUSSÃO

Este trabalho se propôs identificar peptídeos ligantes a anticorpos monoclonais reativos a proteínas de *Anaplasma marginale* a partir de bibliotecas de peptídeos recombinantes por meio da tecnologia *Phage Display*. Foram identificados peptídeos, os quais apresentaram homologias significativas com seqüências da proteína MSP1a. A seleção dos fagos ligantes aos anticorpos anti-MSP1 e anti-MSP2 foi realizada com uma biblioteca de peptídeos expressos em fagos M13 com 12 resíduos randômicos.

Durante os ciclos de seleção houve um enriquecimento do número de fagos, já esperado pelo fato de que, a cada ciclo, clones/fagos com determinadas seqüências foram retidos para subsequente eluição e amplificação no ciclo seguinte (Tabela 1). Os títulos dos fagos na entrada do biopanning foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados na placa ficam ligados a estes pela interação com o parátopo, e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade aos anticorpos são lavados (removidos). Fagos com baixa afinidade pelos anticorpos podem ficar aderidos diretamente à placa, não interagindo com os anticorpos, ou ainda permanecerem suspensos na solução (não ligados), assim após as sucessivas lavagens muitos destes fagos não específicos são excluídos (FRESCI, 2006). Isto leva a redução nos títulos após as etapas do *biopanning*. Os títulos do 1º, 2º e 3º ciclos de seleção ($1,7 \times 10^3$, $2,1 \times 10^4$, $3,8 \times 10^4$) evidenciam a ocorrência de uma seleção específica dos fagos.

Após a avaliação preliminar dos clones e sequenciamento, foi constatada a ausência de cisteína, e o aminoácido arginina apresentou-se com uma freqüência abaixo da freqüência esperada na biblioteca original (Tabela 2) Sabe-se que os aminoácidos arginina e cisteína nas seqüências de peptídeos randômicos atuam na secreção da Proteína III e podem interferir na infectividade dos fagos. Conseqüentemente, clones com peptídeos contendo estes aminoácidos podem ser menos freqüentes durante a seleção. (NOREN, 2001).

A proteína MSP1a é codificada por um único gene (MSP1a), porém possui marcante variação de tamanho entre os diferentes isolados de *A. marginale* (46 a

105 kDa), como verificado em isolados brasileiros desta rickettsia (KANO *et al.*, 2002, OLIVEIRA *et al.*, 2003). Isso resulta da presença de um número variável de blocos repetitivos de 28 a 29 aminoácidos, ricos em serina, na região amino (N) terminal (OBERLE *et al.* 1988, ALLRED *et al.*, 1990). Essa região contém um epítipo sensível à neutralização conservado entre os isolados (ALLRED *et al.* 1990), incluindo brasileiros (KANO *et al.* 2002, OLIVEIRA *et al.* 2003).

O fato das bibliotecas serem de peptídeos randômicos permite que vários clones possam compartilhar os mesmos motivos, mas com resíduos em posições diferentes do peptídeo, fazendo com que certos aminoácidos sejam mais freqüentes após a seleção e sequenciamento. Assim, a alta freqüência desses aminoácidos nas referidas posições do peptídeo recombinante, pode indicar um provável motivo não apresentado nos clones selecionados, mas descoberto pela combinação de várias seqüências (SANTOS, 2006).

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 parátipo (CORTESE *et al.*, 1995). Os motivos STxS e TSS são constituídos por peptídeos representados mais de uma vez e também representados em 78% e 59% dos fagos seqüenciados. Os aminoácidos presentes no motivo (S e T) foram acima da freqüência esperada quando comparados na tabela 2 e figura 8, especialmente para a serina, apresentando freqüência superior frente a treonina, e estando presente nos 2 grupos de seqüências consenso. Além disso, os aminoácidos serina e treonina, por serem altamente hidrofílicos indicam estar constituídos em epítipos ou mimetipos selecionados (MANOUTCHARIAN *et al.*, 1999).

Quando se considera apenas as posições dos aminoácidos mais freqüentes (>35%), o motivo consenso é o STSSxL, exatamente a seqüência encontrada na molécula original da MSP1a, com cinco repetições (Figura 11).

Quando se considera o motivo consenso STSSxL e sua variação, STASxL, os clones 30, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 44, 48 e 49 foram os que apresentaram os maiores índices ELISAs, exceto para o clone 16, que apresentou índice abaixo de 1 (não significativo), provavelmente devido ao efeito dos aminoácidos adjacentes ao motivo protéico na extremidade anterior (N-terminal), uma vez que a maioria dos clones apresentou o domínio na porção COOH-terminal.

A sequência repetitiva **DSSSASGQQQESSVSSQSEASTSSQLGA** apresentou 14 aminoácidos (em negrito) críticos que formam o epítopo da molécula MSP1a. Dentre os resíduos críticos alinhados nos 49 clones selecionados, o domínio mais freqüente, STSSxL, foi observado em 23 clones, semelhante ao descrito para o epítopo B, EASTS(S/Q)ASTSS, sensível à neutralização (PALMER *et al*, 1987; ALLRED *et al*. 1990). Nesta investigação os resíduos EASTSS foram identificados corretamente pelo alinhamento dos clones com a sequência repetitiva, mas nenhum clone apresentou a identidade perfeita, sendo que apenas quatro clones apresentaram o motivo ASTSS ou QASTxS. É importante enfatizar que, diferentemente do apresentado na literatura, o domínio mais freqüente e mais reativo, conforme os resultados sorológicos, foi o STSSxL. Diante do reconhecimento de novos domínios dentro da sequência repetitiva, e da alta freqüência do domínio STSSxL, sugere-se que o epítopo desta proteína seja mais complexo e maior do aquele publicado, e que maior avidéz e afinidade de peptídeos deve-se levar em conta o novo domínio aqui definido.

No ensaio de ELISA foram testadas a reatividade dos 49 clones selecionados contra os anticorpos anti-MSP1 e anti-MSP2 separados. Não houve reatividade contra o anticorpo anti-MSP2, provavelmente devido à competição com o anticorpo imunodominante anti-MSP1a que também possui alta avidéz pelo domínio repetitivo da molécula. Contudo, é possível ter ocorrido problemas na viabilidade do anticorpo anti-MSP2, uma vez que este não fora testado contra soros positivos. Já o teste com os clones contra o anticorpo anti-MSP1, somente os clones 6, 16, 26 e 40 apresentaram razões dos índices ELISA menores que 1, ou seja, não foram significativos; enquanto que os outros 45 peptídeos apresentaram IE maior que 1,0, o que pode evidenciar a imunorreatividade específica a proteína MSP1a do *Anaplasma marginale*. Tais resultados podem ser justificados pelo fato das proteínas MSP1a, MSP4 e MSP5 serem codificadas por um único gene não variando antigenicamente durante a multiplicação da rickettsia (VISSER *et al*, 1992; BOWIE *et al*, 2002; MOLAD *et al*, 2004). A conservação destas proteínas é importante para definir os epítomos comuns e específicos que podem ser usados para o desenvolvimento de testes sorodiagnósticos e vacinas para anaplasmoses (BARBET *et al*, 1999; KANO *et al*, 2002). Já as proteínas MSP1b, MSP2 e MSP3 são codificadas por famílias multigênicas e podem variar

antigenicamente durante os ciclos de rickettsemia persistentes (ALLEMAN & BARBET, 1996; FRENCH *et al*, 1999; BOWIE *et al.*, 2002) inclusive em isolados brasileiros (KANO *et al*, 2002).

A originalidade deste trabalho foi realizar uma seleção específica de peptídeos recombinantes por *phage display* contra o anticorpo monoclonal anti-MSP1a de *Anaplasma marginale*, identificando prováveis peptídeos recombinantes miméticos com potencial uso em diagnósticos e em vacinas.

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 *Anaplasma marginale* para a obtenção de peptídeos candidatos a vacinas.

CONCLUSÃO

A análise de peptídeos ligantes à anticorpos monoclonais reativos a proteínas de *Anaplasma marginale* selecionados a partir de bibliotecas de peptídeos recombinantes por *Phage Display* revelaram que:

- Não foi possível obter e, portanto selecionar clones contra o anticorpo anti-MSP2, provavelmente por problemas de viabilidade do anticorpo ou por competição com o anti-MSP1a, que provavelmente apresentou maior averse e afinidade durante a seleção.
- Os peptídeos obtidos contra o anticorpo monoclonal anti-MSP1a apresentaram alinhamentos significativos com a proteína de *Anaplasma marginale* e foram altamente reativos contra o anticorpo, sendo caracterizado como domínio principal a sequência STSSxL.
- Definiu-se, por meio de alinhamentos e reatividade nos ensaios ELISA, novos resíduos críticos dentro da sequência repetitiva da proteína MSP-1a, que provavelmente compõem o epítipo reativo, com a sequência caracterizada parcialmente em negrito como: DSSSASG**QQQESSVSSQSEASTSSQLGA**.
- Embora estudos adicionais sejam necessários para determinar a efetividade dos peptídeos obtidos, os resultados poderiam colaborar na definição de seqüências antigênicas que mimetizam epítipos naturais do *Anaplasma marginale*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEMAN A.R. & BARBET A.F., 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. J. Clin. Microbiol. 34:270-276.

ALLRED D.R., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., LEIB S.R., HARKINS T.M., MCELWAIN T.F. & BARBET A.F., 1990. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 87:3220-3224.

BARBET A.F., BLENTLINGER R., YI J., LUNDGREN A.M., BLOUIN E.F. & KOCAN K.M., 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. Infect. Immun. 67:102-107.

BOWIE M.V., FUENTE J. DE LA, KOCAN K.M., BLOUIN E.F. & BARBET A.F., 2002. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. Gene 282:95-102.

CORTESE R., MONACI P., NICOSIA A., LUZZAGO A., FELICI F., CALFRE G., PESSI A., TRAMONTANO A. AND SOLLAZZO M., 1995. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. Current Opinion in Biotechnology. v.6, p.73-80.

FRENCH D.M., BROWN W.C. & PALMER G.H., 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. Infect. Immun. 67:5834-5840.

FRESCHI, A. P. P., 2006. Desenvolvimento de Aplicações Tecnológicas da Metodologia de *phage display* no Diagnóstico do Câncer de Próstata. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

KANO F.S., VIDOTTO O., PACHECO R.C. & VIDOTTO M.C., 2002. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. Vet. Microbiol. 87:131-138.

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

MOLAD T., BRAYTON K.A., PALMER G.H., MICHAELI S. & SHKAP V., 2004. Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *Anaplasma marginale* and *A. central* vaccine strain. Vet. Microbiol. 100: 55-64.

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

OBERLE S.M., PALMER G.H., BARBET A.F. & MCGUIRE T.C., 1988. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 56:1567-1573.

OLIVEIRA J.B., MADRUGA C.R., SCHENK M.A.M, KESSLER R.H., MIGUITA M. & ARAÚJO F.R., 2003. Antigenic characterization of four Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* Rickettsiaceae: Ehrlichiae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.

PALMER G.H. & MCGUIRE T.C., 1984. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. J. Immunol. 133:1010-1015.

RELIC – RECEPTOR LIGANTS CONTENTS. Disponível em: <<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>>. Acesso em 03 maio 2007.

RELIC – RECEPTOR LIGANTS CONTENTS. Disponível em: <<http://relic.bio.anl.gov/aafreqs3.aspx>>. Acesso em 03 maio 2007.

RELIC – RECEPTOR LIGANTS CONTENTS. Disponível em: <<http://relic.bio.anl.gov/match.aspx>>. Acesso em 03 maio 2007.

RODI J. D., SOARES A. S., MAKOWSKI L., 2002. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide *phage display* libraries. *Journal of Molecular Biology*. v. 322, p.1039–1052.

SANTOS, P.S., 2006. Seleção e caracterização de peptídeos recombinants miméticos de antígenos do vírus da dengue por Phage Display. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

TANG JX, JANMEY PA, LYUBARTSEV A, NORDENSKIÖLD L., 2002. Metal ion-induced lateral aggregation of filamentous viruses fd and M13. *Biophys J*. Jul; 83(1):566-81.

TEBELE N., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun* 59: 3199-3204.

VISSER E.S., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., SHKAP V. PIPANO E. & KNOWLES D., 1992. The *Anaplasma marginale* MSP5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma species*. *Infect and Immun*. 60: 5139-5144.

ZAUGG, J.L., 1985. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *American Journal of Veterinary Research*. v.46, n.3, p.570-572.