

Análises de Imunogenecidade das proteínas recombinantes

Análises de *Western Blot* mostraram que as proteínas recombinantes expressadas apresentaram forte imunoreatividade aos anticorpos policlonais de galinhas reconhecedores de proteínas de carrapato (Figura 34). As proteínas foram imunoreativas a partir de 1 hora até 5 horas, após a indução por IPTG. As bandas apresentaram um perfil intenso de reatividade, especialmente para a PRB. Estes resultados confirmam que as proteínas recombinantes PRA e PRB são imunologicamente similares aos peptídeos recombinantes selecionados por bibliotecas de *Phage Display* e também por conter pelo menos um único epítipo mimético aos antígenos nativos totais do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

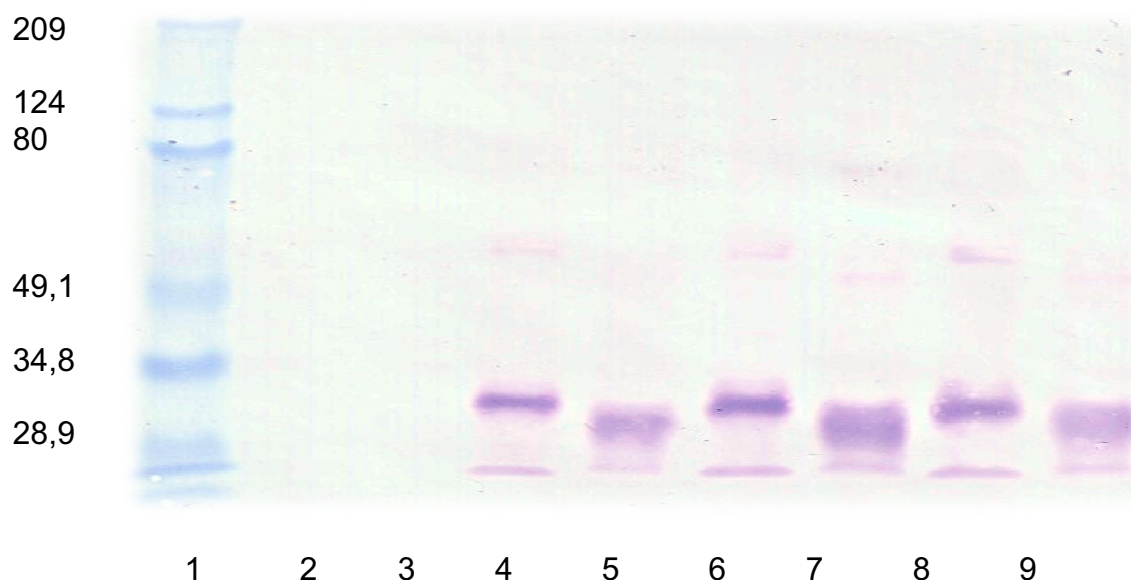


Figura 34 – *Western Blot* da indução da expressão das proteínas PRA e PRB em *E.coli*. Amostras da cultura foram coletadas em diversos tempos, 0 (poço 2 e 3), 1 hora (poço 4 e 5), 2 horas (poço 6 e 7), 3 horas (poço 8 e 9), e separadas em gel SDS-PAGE 16% antes do processo de transferência para as membranas de nitrocelulose. O poço 1 representa o marcador de massa molecular (Bio-Rad Protein Ladder).

Preparação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes expressadas em *E. coli* foram encontradas no *pellet* das células bacterianas rompidas, indicando que as proteínas recombinantes formaram corpos de inclusão. Ensaio de solubilidade foram

realizados para as proteínas oriundas da expressão de recombinantes pET32a contendo as proteínas PRA e PRB. Foram determinadas as frações solúveis para os testes com uréia 5M; 2,5M; 1,2M e 0,6M e comparadas com as frações insolúveis. Foi verificado que a concentração de uréia a 5M apresentou melhor solubilização do *pellet* dos corpos de inclusão (Figura 35). Em um posterior teste de solubilização com uréia 8M seguida de uma solubilização parcial de 5M, em uma etapa de solubilização dos corpos de inclusão, foi constatado uma melhora relativa quanto à qualidade da fração solúvel (Figura 36 e

Figura 37). Por fim, foi possível a obtenção das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade (Figura 38). A produção das proteínas PRA e PRB foram satisfatórias em cultura bacteriana e a pureza foi considerada de boa qualidade ao longo das etapas de purificação.

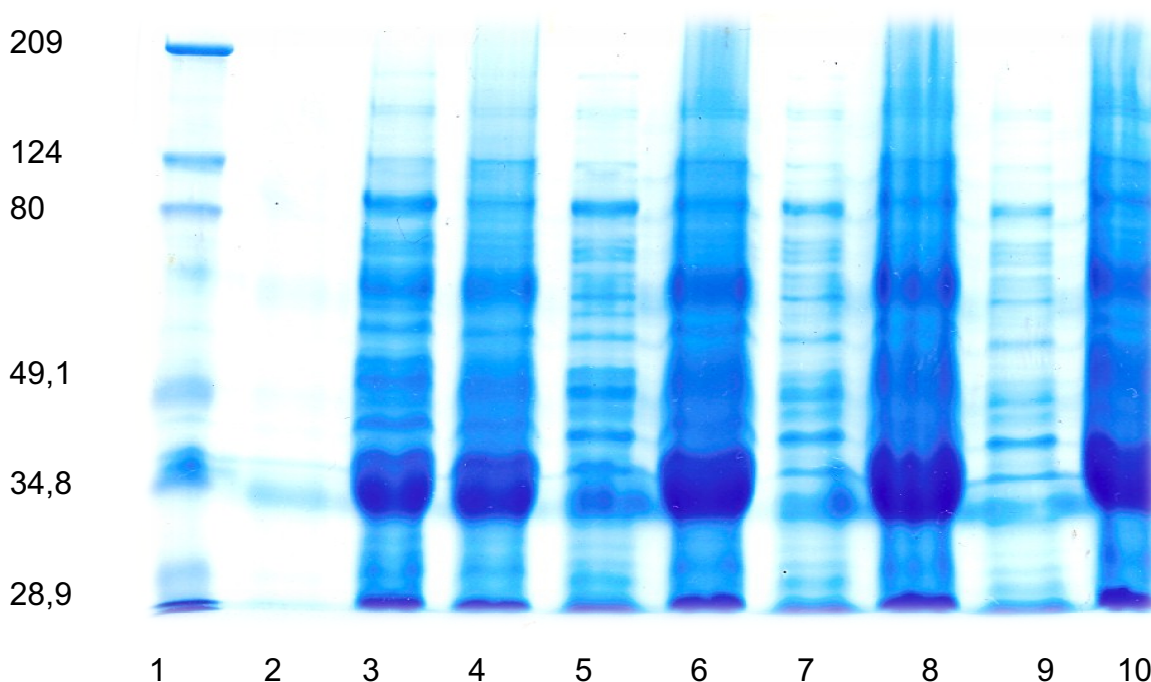


Figura 35 – Ensaio de solubilidade para a expressão de recombinantes pET32a contendo a proteína PRA em SDS-PAGE 16%. (1) marcador de peso molecular, (2) controle positivo. Poços 3, 5, 7 e 9 frações solúveis para os testes com uréia 5M; 2,5 M; 1,2M e 0,6M, respectivamente. Poços 4, 6, 8 e 10 representam as frações insolúveis nas concentrações de uréia a 5M; 2,5M; 1,2M e 0,6M, respectivamente.

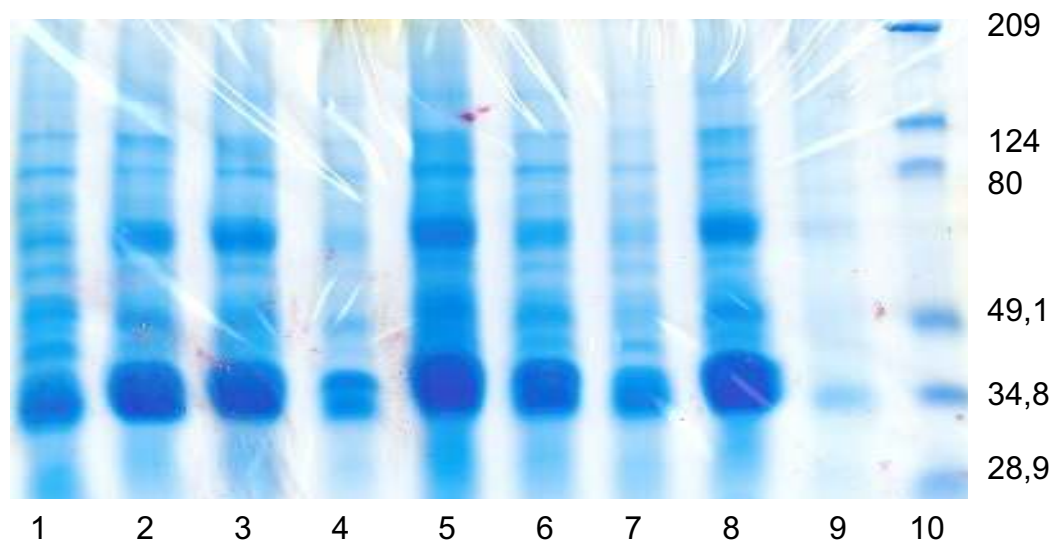


Figura 36 Ensaio de solubilidade para a expressão de recombinantes pET32a contendo a proteína PRA em SDS-PAGE 16%. (10) marcador de peso molecular, (9) controle positivo. Poços 1, 3, 5 e 7 frações solúveis para os testes com uréia 5 M; 8 M; 5 M e 8 M, respectivamente. Poços 2, 4, 6 e 8 representam as frações insolúveis nas concentrações de uréia a 5M; 8M; 5M e 8M, respectivamente.

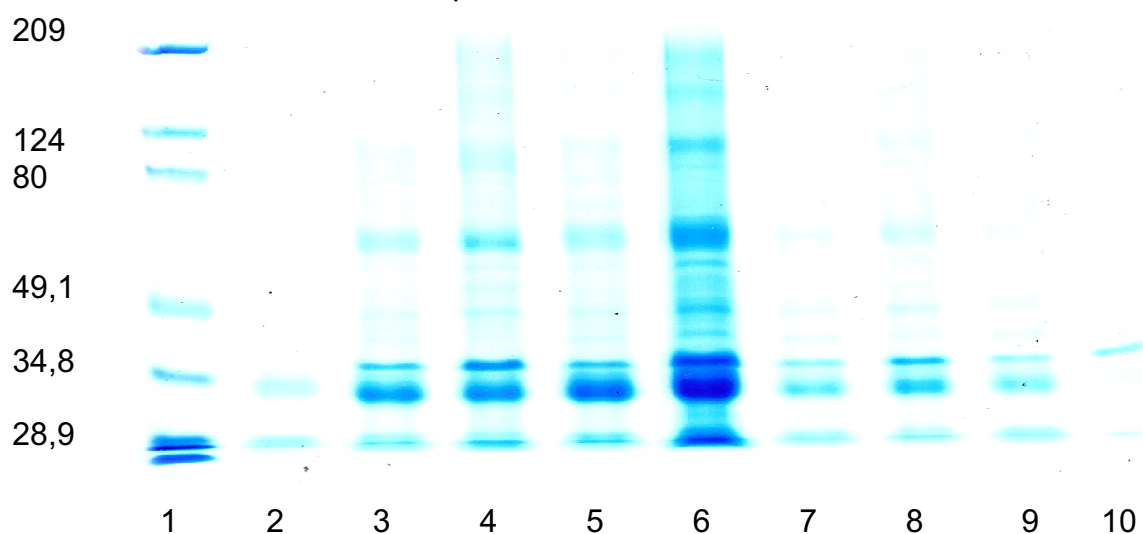


Figura 37 – Processo de purificação da proteína recombinante e solubilização dos corpos de inclusão. O poço 1 representa o marcador de peso molecular, a coluna 2 representa um controle positivo para presença da proteína purificada. As colunas 3, 4, 5 e 6 representam a parte insolúvel e as colunas 7, 8, 9, e 10 representa a parte solúvel dos corpos de inclusão.

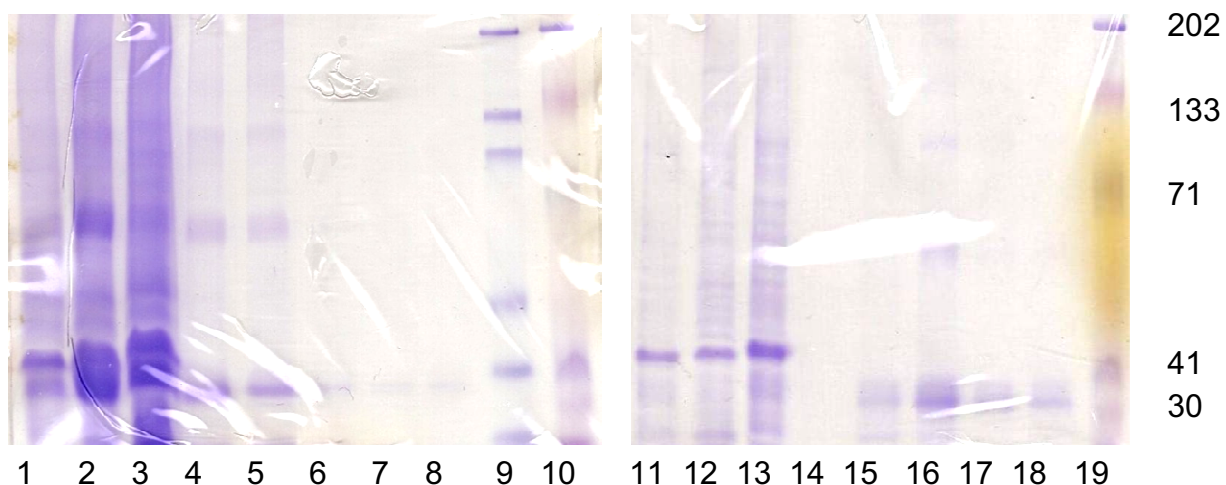


Figura 38 - Purificação das proteínas PRA e PRB por cromatografia de afinidade Ni-NTA, analisada em gel SDS-PAGE 16%. Os poços 9, 10 e 19 representam o marcador de massa molecular (*BIORAD Protein Ladder*). Os poços 4-8 e 14 - 18 representam as frações obtidas a partir da eluição com imidazol para a proteína PRA e PRB. Os poços 1-3 e 11-13, as frações brutas.

DISCUSSÃO

Técnicas de *Phage Display* têm sido usadas para a resolução de diversos problemas de origem biológica (Smith e Petrenko, 1997). No campo do desenvolvimento de vacinas os mimetopos têm sido recentemente usados como componentes vacinais, os quais não necessariamente representam equivalência estrutural, mas sim uma imagem funcional que poderia substituir o antígeno original para o desenvolvimento de vacinas moleculares (Agadjanyan et al., 1997; Bastien et al., 1997; De Berardinis et al., 2000; Frenkel et al., 2000). Esta metodologia possibilita a obtenção de um perfil de epítomos de um determinado alvo biológico de forma eficiente e evita, pela forma tradicional, o processo de obtenção de anticorpos monoclonais para a caracterização. Nesta metodologia novos antígenos podem ser identificados sem informação prévia a respeito da especificidade dos anticorpos (Parmley e Smith, 1988; Parmley e Smith, 1989).

Neste estudo foram identificados mimetopos de proteínas totais do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os peptídeos foram obtidos pela imunoseleção de bibliotecas randômicas de peptídeos apresentados em fagos contra Imunoglobulinas Y reconhecedoras de antígenos dos estádios de larvas e adultos do ectoparasito. Para a obtenção das IgYs, galinhas foram imunizadas com proteínas totais de carrapato. O isolamento dos peptídeos homólogos às proteínas do carrapato é explicado pelos repetidos ciclos de seleção dos peptídeos por imunoafinidade ao alvo biológico (Parmley & Smith, 1988; Parmley e Smith, 1989). Assim, os ciclos de seleção e amplificação tenderiam a prevalência dos peptídeos reconhecidos pelos anticorpos com maiores títulos gerando sub-populações específicas de clones de fagos ligantes aos anticorpos IgY. Após as seleções biológicas os clones de fagos foram caracterizados e validados através da adoção de critérios específicos.

Inicialmente foi constatado o enriquecimento do eluato durante a evolução do processo seletivo através da titulação dos fagos na entrada e na saída dos processos seletivos (Tabela 1). Foi possível identificar 107 seqüências distintas entre as 286 seqüências completas obtidas no seqüenciamento de DNA das regiões correspondentes aos insertos (Tabela 2). As seqüências de aminoácidos deduzidas foram analisadas por diferentes metodologias de análises *in silico* gerando motivos importantes. Pelos testes de imunoreatividade foi possível a

caracterização do reconhecimento específico dos mimetopos pelos anticorpos seletores. Os dados indicam que proteínas PIII e PVIII contendo os peptídeos recombinantes podem ser reconhecidas de forma específica quando comparados ao fago selvagem (M13) na região correspondente ao inserto. A imunização com os mimetopos em camundongos confirmou a reatividade cruzada contra as proteínas do carrapato. Pelo teste de imunotriagem foi possível a confirmação da reatividade cruzada e a identificação de perfis diferenciados de reatividade entre as raças no reconhecimento dos clones de fagos pelas IgGs do soro de animais infestados naturalmente. Em testes de hipersensibilidade cutânea foram identificados graus diferenciados de reatividade entre os clones, via de aplicação e raças testadas. Ainda, após o desafio em bovinos, em um experimento piloto, foi verificado por observações diretas, alterações sugestivas de lesão tecidual no intestino de carrapatos submetidos a testes de oviposição, mas não ocorreu diminuição no número de carrapatos entre o grupo tratamento e o controle.

Finalmente, foram sintetizados dois genes artificiais para a constituição das proteínas recombinantes multi-antigênicas, sendo estas imunorreativas aos anticorpos reconhecedores de proteínas de carrapato. A produção das proteínas recombinantes provou ser eficiente em larga escala. Estes resultados representam um avanço em direção à obtenção de novos imunógenos para a confecção de uma vacina contra este ectoparasito.

Pelo nosso conhecimento, este estudo é a primeira descrição de peptídeos mimetopos do carrapato bovino, desenvolvidos por *Phage Display*, com aplicações vacinais. Os resultados apresentam os clones como importantes epítomos de antígenos vacinais candidatos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A presença de uma ferramenta molecular que direcione o desenvolvimento de uma vacina poli-imunogênica apoia-se na utilização de um grande número de dados baseados em seqüências peptídicas. Neste trabalho, foram geradas 107 seqüências distintas representando diferentes epítomos de diversos órgãos e estádios de desenvolvimento do carrapato bovino. Estas seqüências representam um banco de epítomos selecionados pela interação imune com anticorpos reconhecedores de proteínas totais dos estádios de larvas e teleóginas do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* prontos para serem testados em diferentes formulações.

A escolha do extrato total do parasito para a geração de anticorpos policlonais ocorreu em função dos anticorpos bovinos funcionais serem encontrados em vários tecidos do carrapato. Isto expandiu a variedade de moléculas-alvo além daquelas presentes no intestino, de forma que moléculas presentes em praticamente qualquer tecido do carrapato passaram a ser alvo potencial (Da Silva Vaz Junior et al., 1996).

A capacidade de desenvolvimento da resposta humoral em galinhas para antígenos de carrapato necessita de mais estudos. Os resultados apresentados na Figura 5 colaboram com o enunciado por Lemamy et al.,(1999), que discorre da capacidade das aves produzirem anticorpos com alto título e grande persistência da resposta imune para proteínas de bactérias e mamíferos. Isto provavelmente se deve ao fato do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* não ser um ectoparasito natural de galinhas. Outro importante fator é que os anticorpos produzidos em galinhas possuem vantagens bioquímicas como resistência ao pH extremo (Lee et al.,2002), resistência à temperatura elevada (Jensenius et al.,1981), grande afinidade (Ikemori et al.,1993) e avidicidade (Stuart et al.,1988), motivo pelo qual têm sido usadas eficientemente em análises imunológicas (Schade e Hlinak,1996). Estas características são essenciais na escolha de galinhas para o desenvolvimento da resposta imune em ensaios clínicos diversos.

Neste trabalho, estes mesmos animais foram utilizadas para a construção de bibliotecas combinatórias de fragmentos de anticorpos scFv expressados em bacteriófagos filamentosos, tendo como objetivo o isolamento de anticorpos monoclonais específicos para o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (dados a serem publicados). A maior facilidade da utilização de aves como fonte produtora de genes de anticorpos ocorre em função do mecanismo de produção de anticorpos se fazer por conversão gênica, diferentemente dos mamíferos, sendo por mutação somática, embora com a mesma taxa de variabilidade de anticorpos. Neste processo, ocorre a necessidade de um baixo número de iniciadores necessários para a construção de anticorpos scFv quando comparado aos mamíferos (Barbas et al., 2001).

Nas etapas de seleção foi verificado o enriquecimento dos peptídeos (ver Tabela 1). Neste passo foi possível a seleção de sub-populações de clones de fagos contendo peptídeos recombinantes ligantes ao alvo biológico. Os casos de

empobrecimento nos ciclos iniciais podem ser explicados pelo aumento da estringência, a qual foi alterada pela diminuição do número de partículas na entrada do segundo ciclo e aumento do detergente *tween* 20 nas lavagens. Como exemplo, na seleção S1 ocorreu empobrecimento (0,6 vezes) demonstrando pouca efetividade na seleção. Foi demonstrada de forma predominante a ocorrência de seleção positiva dos clones, os quais representam em cada seleção, uma sub-população específica de peptídeos específicos para o alvo. Exemplificamos isto através da seleção S6 a qual enriqueceu 1091 vezes a partir do conjunto de clones da biblioteca inicial representando a maior taxa entre estas seleções. Os mimetopos que apresentaram maior frequência entre as seqüências selecionadas foram considerados importantes candidatos (Tabela 2). A análise da frequência de aminoácidos ao longo das seqüências peptídicas e também como percentual geral (Tabela 3) evidenciou a presença de aminoácidos críticos na seqüência peptídica e outros desnecessários ao processo de seleção, fornecendo indícios de especificidade no processo de reconhecimento dos ligantes.

A presença dos motivos protéicos pode ser relacionada com a seleção a favor do ligante, pela indicação de que estes aminoácidos poderiam ser cruciais para o reconhecimento dos peptídeos pelo paratopo (Cortese et al.,1995). Pelas análises de alinhamentos protéicos foi possível demonstrar que os peptídeos isolados possuem resíduos críticos que apresentam identidade e conservação, que poderiam mimetizar a estrutura e função dos epítomos originais existentes nas proteínas do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo semelhante ao trabalho desenvolvido por Yang et al. (2005). Apenas a seqüência consenso PxxKxH não apresentou similaridade, possivelmente devido ao fato de que os peptídeos foram selecionados a partir de bibliotecas Ph.D.-C7C e, desta forma, pelo fato de serem bibliotecas constritas, poderiam representar uma estrutura conformacional de proteínas de carrapato, não sendo possível determinar por alinhamentos lineares.

Como mostrado nas Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8 e Tabela 9 as seqüências de peptídeos epítomos específicos freqüentemente correlacionam com muitas proteínas antigênicas de carrapato, assim como proteínas preditas de ESTs. Neste caso, a seleção de peptídeos pode-se tornar uma ferramenta importante para a identificação de seqüências gênica em bancos de genomas, sem função imunológica definida. Além disso, o perfil não só revela os

importantes papéis de cada antígeno, mas também apresenta a estrutura do epítipo dentro de uma proteína antigênica possivelmente relacionada com a indução de uma resposta imune (Yang et al., 2005).

Em todas as estratégias de seleção utilizadas ocorreram similaridades significativas (Tabela 7). Entre as proteínas identificadas com motivos similares aos peptídeos selecionados temos alguns antígenos, ou mesmo proteínas com importantes funções fisiológicas. Entre eles podemos citar a BmTI-A, cistatina intracelular, receptor de serotonina, canal de sódio, protease inibidora de carrapatina, BM86, precursor de GP80.

Foram evidenciados alinhamentos específicos entre os peptídeos e algumas proteínas importantes, como metaloproteases de glândulas salivares, proteína *Notch-like*, GP80 e proteínas não identificadas ou mesmo preditas sem funções definidas, as quais podem indicar importantes imunógenos (Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8). As metaloproteases estão diretamente relacionadas com a alimentação do carrapato *Ixodes ricinus* no hospedeiro pois afetam a habilidade da saliva de interferir na fibrinólise. Esta família de proteínas participa na inibição da cicatrização após a picada do carrapato, facilitando a absorção de sangue (Decrem et al., 2008). Embora a vacinação com esta metaloprotease não alterasse a taxa de sobrevivência ou o tempo de alimentação de carrapatos, o seu ganho de peso e a taxa de oviposição foram reduzidas (Decrem et al., 2007). A proteína *Notch-like* não possui função conhecida e também não foi utilizada como imunógeno. Ovinos vacinados com GP80, purificada de extratos de larva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* definida como sendo um produto transformado a partir de vitelogenina, reduziu significativamente o número de teleóginas com diminuição do peso e oviposição.

Nos trabalhos realizados por Souza (2007), o repertório de anticorpos monoclonais do tipo scFv desenvolvidos a partir do repertório imune dos mesmos animais utilizados neste trabalho, foi comprovado o reconhecimento pelos anticorpos de uma proteína natural similar a uma GP80 ou vitelina a partir do seqüenciamento N- terminal da proteína nativa por espectrometria de massa e também por determinação de peptídeos epítopos específicos selecionados por *Phage Display* a partir do mesmo repertório de scFvs.

Os fagos recombinantes foram escolhidos para a checagem da resposta imune em camundongos, embora o sistema imune de camundongos e bovinos sejam diferentes, ainda é informativo a determinação do grau de imunogenicidade. Os resultados mostraram que os soros da maioria dos fagotopos, comprovados por ELISA, apresentaram capacidade de reconhecimento das proteínas totais, comprovando o potencial imunogênico dos peptídeos recombinantes, fato comprovado principalmente para o clone Seq. ID Nº 32, que atingiu um IE próximo de 3 (Figura 19) e também o clone Seq. ID Nº 18 (Figura 21) com índice IE 3. Ambos os clones foram obtidos na seleção S2. Estes clones comprovaram ser imunoreativos aos anticorpos de galinhas anti-carrapato por *Dot-Blot* (Figura 12) e ELISA (Figura 11B) e também o reconhecimento destes clones foram inibidos na presença do antígeno nativo de carrapato (Figura 13A,13B e 13C). Assim, fica provado a importância destes clones como miméticos antigênicos e imunogênicos de proteínas de carrapatos.

Estes peptídeos alinham-se com várias proteínas de carrapato, indicando que estes mimetopos provavelmente compartilham os epítomos com as proteínas nativas. Foi visto que o Seq. ID Nº 32 apresentou similaridade com uma proteína e o Seq. ID Nº 18 alinhou com 5 proteínas. É importante ressaltar que estes 2 peptídeos compartilham as mesmas seqüências consenso (Tabela 4), de forma que foram classificados na sub-população de clones contendo o consenso predominante (65%), e desta forma, provavelmente apresentam o mesmo resíduo crítico no respectivo epítomo que mimetizam.

Foi demonstrado que a resposta imunitária induzida pelo fago foi especificamente dirigida contra os peptídeos expressos na proteína PIII dos fagos (Yang e Shiuan, 2003). Os testes proporcionaram o reconhecimento do soro do grupo de camundongos imunizados com o clones Seq. ID Nº18, tanto para as proteínas nativas de carrapatos (Figura 19 e Figura 21), quanto o equivalente sintético e também do equivalente recombinante fusionado no fago (Figura 20). Desta forma, foi demonstrado que os peptídeos sintetizados quimicamente apresentaram um enorme potencial para o desenvolvimento de novas seqüências e oferecem possibilidades atrativas para o desenvolvimento de imunógenos por síntese química e recombinante, visando a obtenção de antígenos vacinais a partir dos mimetopos fusionados em fagos. Por outro lado, será necessária a

adequação destes peptídeos sintéticos no teste de ELISA, pois o reconhecimento do soro de camundongos imunizados com fagos tanto com ou sem adjuvantes foi superior, embora não se tenha feito uma comparação direta em função da não equivalência na concentração de peptídeos recombinantes expressos em fagos com os peptídeos sintéticos para se chegar a uma equivalência numérica.

A imunogenicidade dos peptídeos recombinantes em fagos foi avaliada por meio da capacidade de induzir reações cutâneas e a determinação dos níveis de resposta mediada por anticorpos do tipo (IgG) do soro. Desta forma, foi proposta uma hipótese para verificar o potencial dos clones de fagos expressando os peptídeos recombinantes, serem reconhecidos por soros de animais infestados naturalmente. Isto foi proposto, em função de que a exposição natural do parasito no momento do parasitismo, leva a indução da resposta imune natural, contra as proteínas do aparelho bucal, da saliva, entre outros órgãos e proteínas que entram na relação parasito com o hospedeiro (Willadsen e Jongejan, 1999; Willadsen, 2004). Os resultados do teste de imunotriagem corroboram a hipótese apresentada de que os clones apresentaram reatividade cruzada e poderiam estar mimetizando estruturas protéicas constituintes de órgãos específicos do parasito (exemplo clone 32) e que poderiam entrar em contato com o hospedeiro em infestações naturais por desencadearem resposta imune humoral, constituindo assim os chamados antígenos expostos. Por outro lado os clones que não apresentaram reatividade poderiam constituir antígenos ocultos em função do não reconhecimento destes clones por soros de animais naturalmente infestados por carrapatos, em função de não receberem o estímulo inicial.

Foi verificada a ocorrência de reatividade entre as raças de bovinos e também entre os animais, determinados pela contagem de carrapatos. Os resultados fornecidos pelo *Dot-Blot* do soro de bovinos (Figura 24) evidenciaram a capacidade de determinação da reatividade cruzada nos animais sensibilizados com os antígenos nativos. Desta maneira, foi confirmado o perfil de reconhecimento humoral dos fagos pelo soro de animais naturalmente infestados com carrapatos oriundos de cepas de campo. Foi detectado que o clone Seq. ID N°2 apresentou uma reatividade intermediária distinta para o soro do animal nelore com baixa contagem de carrapatos. Este clone sugere algum processo polimórfico relacionado a uma possível barreira biológica ao parasitismo por

carrapatos nos bovinos. Futuros trabalhos serão conduzidos para investigar o real valor deste clone. Aparentemente a maioria dos clones da seleção S1 e S2 apresentaram baixa reatividade, com exceção dos clones Seq. ID Nº 12, Seq. ID Nº 15, e Seq. ID Nº 32 sugerindo que estes clones poderiam estar mimetizando antígenos ocultos.

Em função do reconhecimento dos clones de fagos pelos anticorpos do soro de animais naturalmente expostos ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, foi verificado o perfil de resposta imune celular frente a estes clones de fagos. Assim, o teste de hipersensibilidade cutânea com antígenos totais de larvas em bovinos infestados naturalmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pode fornecer um padrão de resposta dependente da raça do animal utilizada, dependente da região do teste cutâneo, da concentração das partículas de fagos inoculadas e das seqüências dos peptídeos recombinantes expressos nos fagos, além da verificação de uma reatividade natural do tecido cutâneo ao fago selvagem (Figura 25, Figura 26, Figura 27 e Figura 28). O aumento da espessura ocorreu com maior intensidade nos animais inoculados na região cervical do que na região do pavilhão auricular, tanto para os animais inoculados com proteínas totais de larvas, quanto para as partículas virais de fagos. Pelas leituras métricas no pavilhão auricular, foi constatado um perfil diferenciado de resposta cutânea tanto diminuição da espessura, quanto em relação a cinética da resposta. Foi visto que o animal holandês com alta contagem de carrapatos (susceptível) apresentou os maiores valores de aumento de espessura nos testes da região cervical e na região do pavilhão auricular do que os demais animais testados. Pelo nosso conhecimento, ainda não temos informações a respeito da existência de testes de hipersensibilidade cutânea em bovinos utilizando partículas de fagos como inóculos. Os dados gerados pelo teste cutâneo sugerem que os animais resistentes conseguem modular a resposta de hipersensibilidade gerada pelos mimetótipos expressos em fagos quando comparado aos animais susceptíveis.

A associação destes resultados foi essencial no direcionamento da escolha de clones específicos para serem testados como antígenos vacinais. Desta forma, escolhemos um sistema de síntese e expressão de múltiplos antígenos recombinantes expressados em *tandem* prontos para serem testados, abrangendo diversas combinações para os peptídeos selecionados neste

trabalho. Este sistema de expressão foi utilizado com sucesso na produção de polipeptídeos recombinantes para a produção de antígenos heterólogos em métodos de diagnóstico e vacinas relacionados com a doença de gumboro (Wang et al., 2007). Os peptídeos utilizados foram selecionados previamente a partir de bibliotecas de *Phage Display* tendo como alvo biológico os anticorpos monoclonais monoespecíficos para o vírus causador da doença.

Subunidades de vacinas recombinantes produzidas através da biotecnologia apresentam grandes promessas para o futuro das vacinas veterinárias. A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* oferece os benefícios da produção de grandes quantidades do antígeno alvo dentro de poucas horas após a indução e sendo uma tarefa menos difícil e mais barata quando comparado com culturas de células (Sambrook et al., 1989). Entretanto, a produção de proteínas a partir de genes clonados requer freqüentes modificações pós-traducionais, tais como formação de pontes dissulfeto, glicosilação, fosforilação, e oligomerização, os quais não são realizados eficientemente em células bacterianas, tornando esse aspecto um grande desafio a ser resolvido (Sambrook et al., 1989). Epítomos conformacionais necessitam da produção de anticorpos neutralizantes que também podem ser destruídos durante o procedimento de recuperação, tais como sonicação ou pelo pH ácido durante a eluição de uma coluna de afinidade. Adicionalmente, a proteína expressada pode não se conformar adequadamente, de acordo com a demanda para o desenvolvimento de vacinas recombinantes e testes de diagnósticos (Tellan et al., 2002). Os peptídeos recombinantes por serem uma estrutura simples poderiam simplificar o processo de produção em escala e evitar os problemas de conformação.

As vantagens do uso de proteínas recombinantes para o desenvolvimento de vacinas objetivando o controle do carrapato bovino são: Uma vacina com potencial para o controle do carrapato, baseada na expressão em vetores ou na síntese química, alto nível de pureza biológica por causa da inexistência de processos complicados de purificação, completa caracterização do antígeno, segurança pela ausência de contaminantes, reprodutibilidade em média escala, alta estabilidade em função do sistema de expressão ou síntese química, tornando mais adequado a armazenagem, baixo custo de produção em escala

industrial em função do fago apresentar reprodução ilimitada e purificação simplificada (Wang et al., 2007).

A expressão de múltiplos mimetopos em uma única proteína em *E. coli* apresenta vantagens em relação a expressão de antígenos protéicos nativos ou mesmo em bacteriófagos. Em primeiro lugar, os mimetopos selecionados por *Phage Display* possuem forma linear e mimetizam epítomos que podem ser tanto lineares quanto conformacionais, uma vez que não ocorre necessidade de modificações pós traducionais e são mais prováveis conformar-se corretamente em *E. coli* com um mínimo de perda de afinidade de ligação. Segundo, a imunização com uma proteína artificial consistindo de múltiplos mimetopos minimiza qualquer efeito tóxico associado com a atividade biológica de um antígeno e minimizam também a interferência da resposta imune do hospedeiro (tais como anticorpos maternos) contra os antígenos. Terceiro, uma proteína artificial consistindo de múltiplos mimetopos e espaçadores são usualmente pequenos em tamanhos e desta forma indicados para a produção em *E. coli* (Wang et al., 2007).

O desenho racional é um fator importante na eficácia de imunógenos multi-mimetopos. Pequenas alterações em apenas um único aminoácido apresentam efeitos de modulação da eficiência de processamento antigênico (Livengston et al., 2001). A adição de espaçadores entre os epítomos foi reportada como sendo crucial para a proteção contra tumores induzidos por antígenos específicos (Velders et al., 2001). Nesta linha de pensamento, trabalhos futuros serão encaminhados na direção de identificar e caracterizar mimetopos específicos e posteriormente aperfeiçoar o arranjo e a apresentação de múltiplos mimetopos do sistema imune para se alcançar os melhores efeitos de vacinação.

O presente estudo demonstra a capacidade de identificação de importantes mimetopos para o desenvolvimento de vacinas através da seleção de bibliotecas de peptídeos (Folgori et al., 1994). Os resultados também indicam o potencial da utilização destes mimetopos como subunidades vacinais a partir da síntese de genes artificiais para a constituição de vacinas com múltiplos epítomos do carrapato bovino.

CONCLUSÃO

- A produção de anticorpos policlonais IgY foi eficiente a partir da imunização de galinhas com proteínas totais do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por gerar alto título de anticorpos e conferir a especificidade necessária para os experimentos de seleção biológica.
- A seleção das bibliotecas de *Phage Display* contra o alvo biológico proporcionou a identificação de 107 clones de fagos distintos altamente específicos, evidenciado pelo enriquecimento na seleção em seis das sete seleções utilizadas.
- As análises de alinhamento evidencia a presença de 8 motivos, provavelmente representantes de estruturas críticas de epítomos naturais como sendo: NxxxKxxL (SC1), TPDKS (SC2), PxxKxH (SC3), LHS (SC4), LHxxL (SC5), HTS (SC6), PxFF (SC7), e LYGS (SC8) sendo estas seqüências consenso detectadas por alinhamento múltiplo com diversas proteínas antigênicas do parasito.
- As seqüências dos peptídeos apresentaram motivos com alta similaridade às proteínas descritas em bancos de dados protéicos, sendo as metaloprotease de glândula salivar, GP80 e proteínas tipo *notch* as mais representativas e que representam atualmente importantes alvos em estudos vacinais.
- Os fagos recombinantes apresentaram-se altamente reativos nos testes de Elisa, *Dot-Blot* e *Western blot*, comprovando seus potenciais antigênicos no reconhecimento pelos anticorpos específicos para proteínas de carrapato e desta forma estes epítomos certamente apresentam-se estruturalmente semelhantes aos epítomos nativos.
- Os fagos Seq. ID N^o 18, Seq. ID N^o 22, Seq. ID N^o 32, Seq. ID N^o 47, Seq. ID N^o 48, Seq. ID N^o 50, Seq. ID N^o 51, Seq. ID N^o 69 e Seq. ID N^o 70 apresentam-se altamente específicos por serem inibidos em ensaios de competição e comprovando assim que estes peptídeos dividem os mesmos epítomos com as proteínas de carrapato no reconhecimento pelas IgYs policlonais anti-carrapato.
- A maioria dos peptídeos apresentaram capacidade de indução de imunidade cruzada contra as proteínas totais do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em

camundongos, sendo os peptídeos Seq. ID N^o 18 e Seq. ID N^o 32 os mais imunogênicos e provavelmente alvos de estudos vacinais futuros.

- O estudo dos fagos em animais infestados naturalmente permitiram a detecção de um padrão atípico de resposta imune humoral e celular no reconhecimento dos fagos.
- A reatividade dos clones em testes cutâneos de hipersensibilidade como sendo dependente da dose, via de aplicação e o fago por si só apresentam resposta de hipersensibilidade imediata.
- A expressão e a purificação das proteínas recombinantes multi-epitopos específicas, expressadas em *E. coli*, foram eficientemente realizadas, o que demonstrou que a estratégia utilizada foi eficaz para a obtenção de antígenos na forma de proteína recombinante.
- As proteínas recombinantes multi-epitopos apresentaram reatividade aos anticorpos anti-proteínas de carrapato, sendo a primeira evidência de sua utilização como imunógenos.
- As proteínas recombinantes foram expressas sob a forma de corpos de inclusão, o que indica uma característica de insolubilidade, embora após os processos de solubilização, possibilita a sua utilização diretamente em ensaios vacinais.
- As seqüências miméticas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* obtidas neste trabalho apresentaram alto potencial como antígenos e estão prontas para serem testadas, sob diferentes formulações, em futuros ensaios vacinais para o controle imunológico do carrapato bovino.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Torna-se extremamente necessário a abrangência e a realização de novos testes complementares *in vivo* com as proteínas recombinantes desenvolvidas e produzidas neste estudo, a fim de serem testadas em situações artificiais e também naturais de parasitismo frente ao hospedeiro.
- Testar diferentes combinações e concentrações dos fagos selecionados para produção de vacinas poligênicas através do sistema de expressão de proteínas recombinantes multi-epítomos de forma semelhante as utilizadas neste trabalho, tendo como referência os 107 clones distintos identificados. Nesta etapa os índices de proteção serão avaliados por testes de desafio parasitário.
- Identificar e caracterizar mimetopos específicos e posteriormente aperfeiçoar o arranjo e a apresentação de múltiplos mimetopos do sistema imune para alcançar os melhores efeitos de vacinação.
- Pela importância fisiológica das prováveis proteínas identificadas neste trabalho e pelos seus epítomos selecionados da biblioteca de peptídeos recombinantes, juntamente com as bibliotecas de scFv, torna-se necessário a purificação, caracterização e testes vacinais das proteínas nativas referentes aos epítomos selecionados.
- Seleção de novos epítomos pela utilização da biblioteca de peptídeos, de forma individualizada, em diferentes tecidos de carrapato como: aparelho bucal, intestino e ovário por serem os principais órgãos alvo. Assim como, a seleção de novos peptídeos recombinantes a partir de anticorpos monoclonais produzidos a partir de hibridomas ou anticorpos monoclonais do tipo scFv, específicos e já caracterizados no reconhecimento de epítomos nativos.
- Os peptídeos recombinantes selecionados por nosso grupo encontram-se em fase de patenteamento para a continuidade dos testes e estarão aptos para a transferência de tecnologia, caso haja necessidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agadjanyan, M.; Luo, P.; Westerink, M.A.; Carey, L.A.; Hutchins, W.; Steplewski, Z.; Weiner, D.B.; Kieber-Emmons, T. Peptide mimicry of carbohydrate epitopes on human immunodeficiency virus. *Nat Biotechnol.* v.15(6), p.547-51, 1997.
- Almazan, C.; Kocan, K.M.; Blouin, E.F.; de la Fuente, J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*, v.23, p.5294–5298, 2005.
- Andreotti, R.; Gomes, A.; Malavazi-Piza, K.C.; Sasaki, S.D.; Sampaio, C.A.M.; Tanaka, A.S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International. Immuno. Pharmacology*, v. 2, p.557– 563, 2002.
- Barbas, C.F.III; Burton, D.R.; Scott, J.K.; Silverman, G.J. *Phage Display: a laboratory manual*. plain view, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Bastien, N.; Trudel, M.; Simard, C. Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacterio*Phage Displaying* an epitope of the human respiratory syncytial virus. *Virology*. 21, v.234(1), p.118-22, 1997.
- Benhar, I. Biotechnological applications of *Phage* and cell display. *Biotechnol. Adv.* v.19(1), p.1-33, 2001.
- Cortese, R.; Monaci, P.; Nicosia, A.; Luzzago, A.; Felici, F.; Galfré, G.; Pessi, A.; Tramontano, A.; Sollazzo, M. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on *Phage* . *Curr. Opin. Biotechnol.* v.6(1), p.73-80, 1995.
- Da Silva Vaz Junior, I.; Martinez, R.H.; Oliveira, A.; Heck, A.; Logullo, C.; Gonzales, J.C.; Dewes, H.; Masuda, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet. Parasitol.* p.62, v.155-160, 1996.

- De Berardinis, P.; Sartorius, R.; Fanutti, C.; Perham, R.N.; Del Pozzo, G.; Guardiola, J. *Phage Display* of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses, *Nat. Biotech.*, v.18, p.873-876, 2000.
- De la Fuente, J.; Kocan, K.M. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Expert. Rev. Vaccines*, v.2, p.583–593, 2003.
- Decrem, Y.; Beaufays, J.; Blasioli, V.; Lahaye, K.; Brossard, M.; Vanhamme, L.; Godfroid, E. A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J.*, v.275(7), p.1485-99, 2008.
- Decrem, Y.; Mariller, M.; Lahaye, K.; Blasioli, V.; Beaufays, J.; Zouaoui Boudjeltia, K.; Vanhaeverbeek, M.; Cérutti, M.; Brossard, M.; Vanhamme, L.; Godfroid, E. The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.*, v.38(5), p. 549-60, 2007.
- Folgori, A.; Tafi, R.; Meola, A.; Felici, F.; Galfre, G.; Cortese, R.; Monaci, P.; Nicosia, A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera, *EMBO J.* v.13, p.2236-2243, 1994.
- Frenkel, D.; Katz, O.; Solomon, B. Immunization against Alzheimer's beta -amyloid plaques via EFRH *Phage* administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.10;97(21), p.11455-9, 2000.
- García-García, J.C.; Gonzalez, I.L.; González, D.M.; Valdés, M.; Méndez, L.; Lamberti, J.; D'Agostino, B.; Citroni, D.; Fragosó, H.; Ortiz, M.; Rodríguez, M.; de la Fuente J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp. Appl. Acarol.* v.23(11), p.883-95, 1999.
- Gough, J.M.; Kemp, D.H. Localization of low abundance protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. *J. Parasitol.*, v. 79, p.900-907, 1993.

- Horn, S.C.; Arteché, C.C.P. Carrapato, berne e bicheira, inquérito nacional, 1983, divulgado pelo Ministério da Agricultura, Brasília, maio de 1984.
- Ikemori, Y.; Peralta, R.C.; Kuroki, M.; Yokoyama, H.; Kodama, Y. Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. *Poult Sci.* v.72(12), p.2361-5, 1993.
- Irving, M.B.; Pan, O.; Scott, J.K.; Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *J. Immunol.*, v.166, p.5366–73, 2001.
- Jensenius, J.C.; Andersen, I.; Hau, J.; Crone, M.; Koch, C.; Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods*, v.46, p.63–68, 1981.
- Lee K.A. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *J. Biochem. Mol. Biol.*, v.35, p.488-493, 2002.
- Lemamy, G.J. High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies. *Int. J. Cancer*, v.80, p.896-902, 1999.
- Livengston, B.D.; Newnan M.; Crimi, C.; McKinney, D.; Chesnut, R.; Sette, A.; Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines. *Vaccine*, v.19, p.4652–60, 2001.
- Manoutcharian, K.; Díaz-Orea, A.; Gevorkian, G.; Fragoso, G.; Acero, G.; González, E.; Aluja, A. de; Villalobos, N.; Gómez-Conde, E.; Sciutto, E. Recombinant bacteriophage -based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.99, p.11–24, (2004).
- Massard, C. L.; Fonseca, A. H.; Bittencourt, V.R.E.P.; Silva, K.M.M. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 “GAVAC” contra o carrapato *B. microplus* no Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.17, n.4, p.167-173, 1995.

- Nascimento-Silva, M.C.L.; Leal, A.T.; Daffre, S.; Juliano, L.; da Silva Vaz Jr., I.; Paiva-Silva, G.O.; Oliveira, P.L.; Sorgine, M.H.F. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v.149, (4), p.599-607, 2008.
- Noren, K. A.; Noren C.J. construction of high-complexity combinatorial *phage display* peptide libraries. *Methods*, v.23, p.169–178, 2001.
- Nuttall, P.A.; Trimmell, A.R.; Kazimirova, M.; Labuda, M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, v.28, p.155–163, 2006.
- OBA, Revista da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, v.13, p.409-420, 1976.
- Parmley, S.F.; Smith, G.P. Antibody-selectable filamentous fd *Phage* vectors: affinity purification of target genes. *Gene*. v.73(2), p.305-18, 1988.
- Parmley, S.F.; Smith, G.P. Filamentous fusion *Phage* cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* v.251, p.215-8, 1989.
- Patarroyo, J.H.; Portela, R.W.; de castro, R.O.; Couto-Pimentel, J.; Guzman F.; Patarroyo, M.E.; Vargas, M.I.; Prates A.A.; Dias Mendes, M.A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.88, p.163–172, 2002.
- Redondo, M.; Fragoso, H.; Ortiz, M.; Montero, C.; Lona, J.; Medellin, J. A.; Fria, R.; Hernandez, V.; Franco, R.; Machado, H.; Rodriguez, M.; De La Fuente, J. Integrated control of acaricide resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac™ and amidine treatment. *Experimental Applied Acarology*, v. 23, n. 10, p. 841-849, 1999.
- Rodríguez, M.; Massard, C.L.; da Fonseca, A.H.; Ramos, N.F.; Machado, H.; Labarta, V.; de la Fuente, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86

- antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine*. v.13(18), p.1804-8, 1995.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Schade, R. & Hlinak, A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX*, v.13, p.5-9, 1996.
- Smith, G.P.; Petrenko V.A. *Phage Display*. *Chem. Rev.*, v. 97, p. 391-410, 1997.
- Stuart, C.A. High-affinity antibody from hens' eggs directed against the human insulin receptor and the human IGF-1 receptor. *Anal. Biochem.*, v.173, p.142–150, 1988.
- Souza, G.R.L. de, Construção de uma biblioteca de anticorpos (scFv) apresentada em fagos para seleção, análise e caracterização de antígenos do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). Tese, Instituto de genética e Bioquímica, Uberlândia, M.G., Universidade Federal de Uberlândia, 2007.
- Tellan, R.L.; Kemp, D.; Riding, A.G.; Briscoe, A.S.; Smith, B.D.; Sharp, B.P.; Irving, B.D.; Willadsen, P. A. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*, v.103, p.141–156, 2002.
- Velders, M.P. Weijzen, S.; Eiben, G.L.; Elmishad, A.G.; Kloetzel, P.M.; Higgins, T. Ciccarelli, R.B.; Evans, M.; Man, S.; Smith, L.; Kast, W.M. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J. Immunol.* v.166(9), p.5366-73, 2001.
- Wang, Y.S.; Fan, H.J.; Li, Y.; Shi, Z.L.; Pan, Y.; Lu, C.P. Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus. *Vaccine*, v.25, p.4447–4455, 2007.
- Willadsen P. Anti-tick vaccines, *Parasitology*, v.129:S1–S2, 2004.

- Willadsen, P. e Jongejan, F. Immunology of the tick–host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitology Today*, v.15(7), 1999.
- Willadsen, P. Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, v. 71, p. 209-22, 1997.
- Willadsen, P.; Riding, G.A.; McKenna, R.V.; Kemp, D.H.; Tellam, R.L.; Nielsen, J.N. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J. Immunology*. v.143, p.1346–51, 1989.
- Yang, W.J.; Lai, J.F.; Peng, K.C.; Chiang, H.J.; Weng, C.N.; Shiuan, D. Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using *Phage Displayed* peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. *Journal of Immunological Methods*. v.304(1-2), p.15-29, 2005.
- Yang, W.J.; Shiuan, D. Plaque reduction test: an alternative method to assess specific antibody response to pIII-displayed peptide of filamentous *Phage* M13. *Journal of Immunological Methods*, v. 276, p. 175-183, 2003.