

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

CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS (scFv)
APRESENTADA EM FAGOS PARA SELEÇÃO, ANÁLISE E
CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DO CARRAPATO BOVINO (*Boophilus*
***microplus*)**

Guilherme Rocha Lino de Souza

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA - MG
2007

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

CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS (scFv)
APRESENTADA EM FAGOS PARA SELEÇÃO, ANÁLISE E
CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DO CARRAPATO BOVINO (*Boophilus*
***microplus*)**

ALUNO: Guilherme Rocha Lino de Souza

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

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

UBERLÂNDIA-MG
2007

Souza, Guilherme Rocha Lino, 1970 -

- Uberlândia:2007

Nº total de folhas:96, Nº total de figuras:16

Nome do Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Tese de Doutorado Universidade Federal de

Uberlândia. Coordenação de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui Bibliografia

1. *Boophilus microplus*. 2.Biblioteca de Anticorpos. 3.Biblioteca de peptideos. I. Universidade Federal de Uberlândia. Coordenação de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

CDU xxxxxx

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS (scFv)
APRESENTADA EM FAGOS PARA SELEÇÃO, ANÁLISE E
CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DO CARRAPATO BOVINO (*Boophilus
microplus*)**

ALUNO: Guilherme Rocha Lino de Souza

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)

Examinadores:

Prof. Dra. Andréa Queiroz Maranhão - UnB

Prof. Dr. José Miguel Ortega - UFMG

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó - UFU

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola - UFU

Data da Defesa:

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

(Orientador)

Uberlândia, ____/____/____

Dedicatória

Dedico esta Tese a todos os pesquisadores curiosos que queiram utilizá-la como fonte de pesquisa e conhecimento

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Ricardo Goulart pela amizade e orientação durante todos estes anos de pós-graduação.

À Cris, minha companheira de todas as horas, dias, meses, anos. . . .

A toda minha família pelo apoio às minhas escolhas.

Aos amigos Andréa Maranhão, Marcelo Brígido e Liziane Lima pela generosidade em compartilhar todo seu conhecimento, fundamental para a realização deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Molecular (UFU), igualmente importantes durante minha trajetória.

Ao Prof. Marcelo Bemquerer (UFMG) pela colaboração nos resultados deste trabalho.

À Deus pela oportunidade de caminhar pela vida experimentando emoções e descobertas.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUÇÃO	6
Origem.....	6
Hospedeiro	6
Distribuição geográfica	6
Ciclo de vida.....	6
Prejuízos econômicos	8
Sistema imune.....	8
Estrutura geral das imunoglobulinas	9
Variabilidade e rearranjo dos genes de anticorpos em galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	11
Biblioteca combinatorial de anticorpos (scFv) apresentados em fagos filamentosos (<i>Phage Display libraries</i>)	12
Seleção dos anticorpos contra proteínas totais de carrapato bovino (<i>biopanning</i>)	16
Objetivos	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
Linhagem bacteriana.....	18
Plasmideo.....	18
Bacteriófago auxiliar	18
Meios de cultura	18
Antibióticos	19
Oligonucleotídeos sintéticos específicos	20

Enzimas e kits utilizados	21
Soluções de uso geral	22
Anticorpos	23
Material biológico	23
Extração de proteínas totais.....	24
Imunizações das galinhas	24
Extração de RNA total	25
Síntese de cDNA.....	25
Amplificação dos fragmentos das cadeias leve (VL) e pesada (VH) de anticorpos de galinha	26
Amplificação dos fragmentos scFv de galinha (<i>Overlap</i>).....	26
Digestão dos fragmentos scFv e do vetor pComb3X com a enzima <i>Sfi</i> I.....	28
Ligação dos fragmentos de DNA scFv com o vetor pComb3X.....	28
Preparação de células XL1-Blue eletrocompetentes.....	29
Transformação de células <i>E. coli</i> (XL1-Blue) por eletroporação	29
Preparação do fago auxiliar VCSM13	30
Obtenção de partículas virais a partir de células transformadas com fagomídeos (biblioteca de anticorpos scFv)	31
Seleção de partículas virais (scFv fusionados) ligantes a proteínas totais de carrapato bovino imobilizadas em placas de microtitulação.....	32
Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	35
Expressão de proteínas heterólogas em placas do tipo <i>deep well</i>	35
<i>Dot blot</i> para análise da expressão heteróloga da região codificante completa dos scFvs	36
Sequenciamento das cadeias variáveis pesadas e leves dos clones selecionados	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
Extração de proteínas totais.....	38
Imunizações das galinhas com proteínas totais extraídas das fases larval e adulta do carrapato bovino	38
Amplificação dos fragmentos das cadeias leve (VL) e pesada (VH) de anticorpos de galinha e amplificação do fragmento scFv (<i>Overlap</i>)	40

Construção da biblioteca combinatorial de anticorpos (scFv) fusionados à proteína 3 de fagos filamentosos.	41
Seleção da biblioteca combinatorial de anticorpos contra antígenos totais de larvas e teleóginas imobilizados em placas de microtitulação (<i>biopanning</i>)...	42
Análise dos clones selecionados por <i>dot blot</i>	44
Sequenciamento e análise dos clones isolados	45
CONCLUSÕES	48
BIBLIOGRAFIA	49
CAPÍTULO II	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
INTRODUÇÃO	58
Biblioteca de peptídeos apresentados em fagos (<i>Peptide Phage Display Libraries</i>)	61
Seleção de ligantes (<i>Biopanning</i>).....	62
Objetivo	63
MATERIAIS E MÉTODOS	64
Biblioteca de anticorpos	64
Ensaio de <i>western blot</i> dos clones selecionados	64
Sequenciamento N-terminal	65
Seleção dos peptídeos recombinantes apresentados em fagos (<i>Peptide phage display libraries</i>) reativos aos clones scFv	66
Sequenciamento e análise em bancos de dados protéicos dos clones (peptídeos) reativos aos fragmentos scFv.....	68
Ensaio de <i>dot blot</i> para caracterização dos peptídeos selecionados quanto a capacidade de ligação aos fragmentos scFv utilizados na seleção.	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
Ensaio de <i>Western Blot</i> dos clones selecionados	70
Sequenciamento N-terminal	71
Seleção e sequenciamento dos peptídeos recombinantes apresentados em fagos (<i>Peptide phage display libraries</i>) reativos aos clones scFv	72

CONCLUSÕES	78
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	79
BIBLIOGRAFIA	80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Seleção por cinco ciclos, de fragmentos scFv de galinha contra proteínas totais de larva e teleógina adsorvidas em placa de microtitulação.
- Tabela 2. Alinhamento das cadeias variáveis pesadas e leves dos clones do 5º ciclo de seleção com antígenos totais de larva (L) e teleógina (T).
- Tabela 3. Representação das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dos fragmentos variáveis de cadeia leve e pesada de quatro clones (L11H, L8D, T5F, T5C) seqüenciados.
- Tabela 4. Seleção por três ciclos de fagos da biblioteca de peptídeos contra fragmentos de anticorpos scFv adsorvidos em placa de microtitulação, demonstrando títulos de entrada e saída e as condições de estringência das lavagens em cada ciclo.
- Tabela 5. Alinhamento dos clones seqüenciados da biblioteca de peptídeos recombinantes selecionados por afinidade aos fragmentos scFv, mostrando os resíduos comuns entre os peptídeos seqüenciados e proteínas de *Boophilus microplus* depositadas no banco de dados GenBank alinhadas utilizando BLASTp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura de uma imunoglobulina gama.

Figura 2. Organização dos *loci* de imunoglobulina de galinhas.

Figura 3. Representação esquemática de um fago filamentoso.

Figura 4. Representação esquemática da amplificação dos segmentos gênicos das imunoglobulinas de galinhas.

Figura 5. Seleção de fagos, expressando as diferentes formas scFvs.

Figura 6. Gel SDS PAGE 12% de proteínas totais de larvas e teleóginas.

Figura 7. Avaliação da eficiência do procedimento de imunização expressa em títulos.

Figura 8. Análise dos fragmentos obtidos por PCR.

Figura 9. Representação esquemática do vetor Pcomb3X.

Figura 10. (A) Análise em gel de agarose 1% das formas ligantes obtidas da ligação do fragmento scFv ao vetor pComb3X. (B) 1- Fragmento scFv antes da restrição com *Sfi* I; 2- Fragmento scFv depois da restrição com *Sfi* I; 3- Vetor pComb3X depois da restrição com *Sfi* I.

Figura 11. Imunoensaio dos clones dos ciclos 0, 2 e 5 contra proteínas totais de larvas e teleóginas.

Figura 12. Análise por dot blot dos clones expressando fragmentos scFv de teleóginas e larvas em membrana de nitrocelulose.

Figura 13. Representação esquemática de um processo de seleção (*biopanning*) de peptídeos contra um alvo (scFv) imobilizado em uma placa de microtitulação.

Figura 14. *Western Blot* em membrana de nitrocelulose.

Figura 15. Análise por dot blot dos peptídeos selecionados reconhecidos pelo fragmento scFv em membrana de nitrocelulose.

LISTA DE ABREVIATURAS

scFv	Fragmento variável de cadeia única
°C	Graus Celsius
pComb3X	Vetor de clonagem.
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrometro
BCIP	Bromochloroindolyl phosphato
Bm86	Glicoproteína de <i>Boophilus microplus</i>
Bm91	Glicoproteína de <i>Boophilus microplus</i>
Bm95	Glicoproteína de <i>Boophilus microplus</i>
BMA7	Glicoproteína de <i>Boophilus microplus</i>
BMTI	Inibidor de serino proteases
BSA	Soroalbumina bovina
BYC	Boophilus Yolk Catepsin
DNA	Ácido desoxirribonucleico
OD	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	Enzyme linked immunosorbent
g	Grama
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobolinas Y (Yolk)
IPTG	Isopropil α -D-tiogalactosise
kDa	Quilodalton
L	Litro
M	Molar
M13KE	Bacteriófagos filamentosos
mA	Miliamper
NBT	Nitroblue tetrazolium
ng	Nanogramas

p/v	Peso por volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb	Par de base
PBS	Fosfato de sódio
PBST	Fosfato de sódio com tween 20 0,5%
TBS	Trifosfato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Phage Display
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D	Bibliotecas de Phage Display New England Biolabs
Ph.D-C7C	Biblioteca contendo peptídeos randômicos com 7 resíduos flanqueados por 2 cisteínas
PIII	Proteína III do capsídio de bacteriófagos filamentosos
PVIII	Proteína VIII do capsídio de bacteriófagos filamentosos
RNA _m	RNA mensageiro
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBST	Trifosfato de sódio com Tween 20
UFC	Unidades formadoras de colônias
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α -D-galactosideo
GL	Galinha imunizada com proteínas de larva
GT	Galinha imunizada com proteínas de teleógina
BL	Branco da reação com proteínas de larva
BT	Branco da reação com proteínas de teleógina
SP	soros pré-imunes.
Ni	Níquel
ML	Mass Ladder

INTRODUÇÃO GERAL

O carrapato bovino *Boophilus microplus*, baseado nas informações fornecidas pelas Secretarias de Agricultura nos estados brasileiros e segundo estudos feitos por Horn e Arteché (1984), causam prejuízos que chegam a quase um bilhão de dólares, devido à mortalidade dos animais, à diminuição do ganho de peso (6 kg/animal/ano), danos sobre o couro, gastos com carrapaticidas e diminuição da produção de leite. Grisi *et al.* (2002) estimaram que, em função do crescimento do rebanho bovino de 76 milhões de cabeças em 1983 para 169 milhões em 2000, estas perdas poderiam ultrapassar dois bilhões de dólares.

A utilização de vacinas contra o carrapato bovino ainda é uma prática pouco utilizada na pecuária brasileira e mundial, pelo fato de não existirem no mercado, produtos com eficiência, que garantem o controle sem utilização de métodos químicos utilizados no combate ao parasita. Existe uma preocupação crescente entre os pesquisadores para mudar este quadro, pois a resistência dos parasitas aos produtos químicos sempre foi um problema, experimentado em algum momento, por todos os produtores em suas propriedades.

Os custos altos para desenvolvimento de novas moléculas químicas para o controle do carrapato chocam com a curta vida útil que elas apresentam e o uso apenas do controle químico não é uma prática muito atrativa para o produtor rural do ponto de vista econômico, já que a eficiência destas moléculas diminui a cada ciclo de vida do carrapato com a seleção de genótipos mutantes resistentes. Outro fator importante é a crescente demanda do mercado por alimentos com menores níveis de resíduos químicos e com menos impacto ambiental (Rodriguez *et al.*, 1995).

O controle imunológico pode suprir estes problemas e tem como vantagens, além da segurança, a ausência de período de carência após a aplicação, sendo considerada a prática com melhor relação custo-benefício no controle (Da Silva Vaz Jr. *et al.*, 2000).

Neste trabalho foi utilizado uma metodologia para a geração de fragmentos scFv (fragmento variável de cadeia única) de anticorpos gerados pela imunização de galinhas com proteínas totais de carrapato (larvas e teleóginas), para a construção de uma biblioteca de anticorpos utilizada na identificação de antígenos

(epitopos) de interesse vacinal. Para tanto optou-se por clonar o repertório de genes variáveis das cadeias leve e pesada de imunoglobulinas de galinhas imunizadas com proteínas totais de diferentes estágios de vida do carrapato. A clonagem foi feita sob a forma de scFv aleatoriamente combinados de forma a se obter a biblioteca combinatorial. Os fragmentos de PCR foram obtidos por meio da amplificação com iniciadores para os genes de scFv em fagomídeos e os anticorpos foram expressos na superfície de fagos filamentosos. Como os fragmentos Fv são difíceis de serem gerados por digestão enzimática e menos estáveis comparado ao Fc ou Fab (Brígido & Maranhão, 2002), foi necessário introduzir um peptídeo conector entre os domínios VH (cadeia pesada) e VL (cadeia leve) da região variável para produzir a molécula scFv assegurando a ela uma certa conformação e estabilidade, podendo ser utilizada no reconhecimento de antígenos específicos (Barbas III *et al.*, 2001). Com esse sistema de expressão, foi utilizada a técnica de *Phage Display Libraries* para isolar anticorpos com capacidade de reconhecer epitopos de proteínas de carrapato. A biblioteca de anticorpos foi utilizada para seleção e caracterização de peptídeos recombinantes miméticos à epítomos de proteínas de carrapato bovino, em uma biblioteca comercial de peptídeos expressos em fagos.

O objetivo desse trabalho é a obtenção de anticorpos monoclonais (fragmentos scFv) recombinantes anti-proteínas totais de carrapato e sua utilização para a seleção e caracterização de peptídeos miméticos à regiões antigênicas de proteínas alvo naturais do carrapato bovino *Boophilus microplus* com potencial para o desenvolvimento de novas vacinas para o controle deste parasita.

CAPÍTULO I

GERAÇÃO DE BIBLIOTECA COMBINATORIAL DE scFv A PARTIR DO
REPERTÓRIO DE GALINHA IMUNIZADA COM PROTEÍNAS TOTAIS DE
CARRAPATO BOVINO *Boophilus microplus*.

RESUMO

A amplificação de fragmentos scFv (fragmentos variáveis de cadeia única) de animais imunizados é um importante método na geração de anticorpos monoclonais. Neste trabalho galinhas foram imunizadas com proteínas totais das fases larval e adulta (teleóginas) do carrapato bovino *Boophilus microplus* para a geração de uma biblioteca combinatorial de anticorpos anticarrapato. RNA total de baço destes animais foram extraídos e reações de amplificação (PCR) foram feitas utilizando iniciadores específicos das regiões variáveis dos anticorpos com a finalidade de obter toda a variabilidade do repertório imune na construção da biblioteca. Cinco ciclos de seleção (*biopanning*) foram feitos para captura dos clones scFv reativos às proteínas totais de larvas e teleóginas. A afinidade dos clones às proteínas totais do carrapato bovino foi confirmada por imunoensaio (ELISA) demonstrando um aumento da afinidade dos clones ao ligante ao longo dos cinco ciclos de seleção. O sequenciamento dos clones do quinto ciclo demonstrou uma predominância de clones idênticos tanto para a biblioteca construída utilizando proteínas de larvas, quanto para proteínas de teleóginas. Os anticorpos recombinantes scFv foram utilizados para seleção e caracterização de epítomos miméticos à proteínas do carrapato bovino para utilização como imunógenos no controle deste parasita.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, anticorpo, fragmento scFv

ABSTRACT

The amplification of fragmentos scFv (single chain fragments variable) of immunized animals is an important method to generation of monoclonal antibodies. In this work chickens had been immunized with proteins of the larval and adult phases of the *Boophilus microplus* for the generation of an antibodies combinatorial library. Total RNA of spleen had been extracted and amplification reactions (PCR) had been made using specific primers of the antibodies variable regions with the purpose to get all the variability of the immune repertoire in the construction of the library. Five cycles of selection (biopanning) had been made for capture of clones scFv reactive to total proteins of larvae and adults ticks. The affinity of clones to proteins was confirmed by ELISA demonstrating an increase of the affinity of clones to the ligante throughout the five cycles of selection. The sequencing of clones demonstrated a predominance of identical clones for the library using both larvae and adults proteins. The recombinant antibodies had been used for selection and characterization of epitope to proteins of the cattle tick for use as vaccine in the control of this parasite.

Keywords: *Boophilus microplus*, antibodies, scFv fragments

INTRODUÇÃO

Origem

O carrapato bovino *Boophilus microplus* é um artrópode pertencente à família dos Ixodidae, originário provavelmente do sul da Ásia, retratado a cerca de 3500 anos atrás em uma tumba egípcia (Arthur, 1960), dispersando-se para vários países, difundindo-se juntamente com o gado zebu, até as regiões costeiras do Oceano Pacífico e as Américas (Evans, 1979). O carrapato *B. microplus* chegou à América do Sul trazido pelos colonizadores ibéricos entre os séculos XVI e XVIII (Nuñez *et al.*, 1982) e a sua introdução no Brasil foi devida à importação do gado zebu da Ásia (Walker, 1987).

Hospedeiro

O principal hospedeiro para *Boophilus microplus* é o bovino, mas outros animais como ovinos, búfalos, jumentos, burros, caprinos, cães, gato, porco podem ser parasitados, no entanto apenas quando parasitam bovinos conseguem chegar a estágios adultos. Em outros hospedeiros em função de fatores imunológicos, os parasitas apresentam grande mortalidade, ainda em estágios larvais (Riek, 1959).

Distribuição geográfica

O *Boophilus microplus* é encontrado distribuído entre os paralelos 32°N e 32°S, com alguns focos até 35°N e S (Wharton, 1974). No Brasil, o carrapato *B. microplus* é encontrado nos 26 estados, em 95,6% dos municípios (Teixeira Leite *et al.*, 1991) e em 66,04% destes, durante os doze meses do ano. As regiões que apresentam maior incidência deste parasita são as regiões sul, sudeste e centro-oeste em função das condições climáticas favoráveis (Horn & Arteche, 1984).

Ciclo de vida

O carrapato *B. microplus* é um parasita monoxeno, ou seja, realiza suas mudas ou metamorfoses em um único hospedeiro. Seu ciclo de vida pode ser subdividido em duas fases: fase parasitária e fase não parasitária (Cotton, 1908; Gonzáles, 1975).

A fase parasitária inicia-se com a fixação das larvas no hospedeiro e tem duração média de 22 dias (Furlong *et al.*, 2004). Após a fixação, as larvas, se alimentam de plasma e linfa iniciando o processo de metamorfose dando origem as metalarvas que quando ingurgitadas iniciam a metamorfose para ninfa. A ninfa se alimenta de plasma e sangue e inicia a metamorfose para outro ínstar, transformando-se em metaninfa. As metaninfas podem dar origem aos machos (neandros), que se queratinizam e adquirem mobilidade se transformando em gonandros. Os gonandros estão aptos para irem ao encontro das fêmeas e fecundá-las. O acasalamento ocorre a partir do 17º dia da infestação (Londt e Arthur, 1975). Os machos se alimentam de sangue e podem permanecem no corpo do bovino acasalando-se com várias fêmeas. As metaninfas fêmeas (neóginas) se fixam novamente e iniciam a sua alimentação. A fêmea fecundada semi-ingurgitada chama-se partenógina e a fêmea totalmente ingurgitada, teleógina, (Pereira, 1980).

A fase não parasitária é muito influenciada pelas condições climáticas e ambientais e divide-se em: período de pré-postura, postura, incubação e eclosão dos ovos. O período de pré-postura é o período entre a queda da teleógina e o início da postura e tem um tempo de duração de 2 a 4 dias. O período de postura tem duração média de 15 a 17 dias, à temperatura de 27°C e umidade relativa do ar superior a 80% (Gonzáles *et al.*, 1975). A quantidade de ovos postos por uma fêmea é proporcional ao peso alcançado por ela, o qual é uma consequência da quantidade de sangue ingerido (Diehl *et al.*, 1982). Rocha *et al.* (1985) verificaram uma relação de 8,5 ovos para cada miligrama de peso da teleógina. O número máximo de ovos postos por uma fêmea variou de 2.631 a 7.759. O período de incubação: compreende o período de desenvolvimento embrionário entre o primeiro dia de postura até a emergência da larva. Segundo Ivancovich (1975), a temperatura ótima para postura é entre 23 e 30°C e para incubação entre 21 e 36°C com umidade relativa superior a 80 %. A fase de incubação dos ovos varia de 15 dias no verão a 55 dias no inverno (Legg, 1930). As larvas ao eclodir, precisam de um período de quatro a seis dias para parasitar o animal (Cotton, 1915), estimulada pela luz, odor, calor, vibrações e concentração de CO₂ (Wilkinson, 1953).

Prejuízos econômicos

Baseado nas informações fornecidas pelas Secretarias de Agricultura nos estados brasileiros, Angus e Bowman (1996) estimaram os prejuízos causados pelos *B. microplus*, em alguns bilhões de dólares ao ano. Irritação pela picada, expoliação sanguínea, predisposição a outras infecções, paralisia, toxicoses, alterações metabólicas, anorexia, infertilidade e diminuição da resposta imune são alguns dos problemas causados pelo parasita (Teixeira Leite, 1991). O carrapato *B. microplus* também causa prejuízos por ser um importante transmissor de hemoparasitoses: *Anaplasma sp* (rickettsia) e *Babesia spp* (protozoário). Estes dois hemoparasitas são responsáveis pela tristeza parasitária bovina, uma doença de grande importância principalmente em bezerros podendo levar a morte (Furlong, 1993).

Sistema imune

O termo Imunidade de maneira geral, significa proteção contra doenças e mais especificamente, contra doenças infecciosas. Sabemos também que muitos dos mecanismos de resistência a infecções estão envolvidos na resposta do indivíduo a substâncias estranhas não infecciosas. Portanto, uma definição mais moderna e abrangente é a de uma reação a substâncias estranhas, inclusive microorganismos, bem como macromoléculas como as proteínas e polissacarídeos. As moléculas e células responsáveis pela imunidade constituem o sistema imune ou sistema imunológico. As respostas imunes específicas são mediadas pelos linfócitos, as células capazes de reconhecer determinantes antigênicos diferentes.

Os linfócitos B, envolvidos na resposta imune humoral, são as células capazes de produzir anticorpos e são gerados na medula óssea e antes da estimulação antigênica, migram para os tecidos linfóides periféricos apresentando em sua superfície imunoglobulinas IgM e IgD. Ocorre então, a migração destes linfócitos para os órgãos linfáticos secundários (baço e linfonodos). Neste local antígenos quando reconhecidos pelos receptores de células B (IgM e IgD), induzem duas alterações nos clones de células B: expansão clonal ou proliferação e diferenciação, resultando em uma progênie de célula B expressando

Imunoglobulinas de membrana receptivas a antígenos e secretando anticorpos de diferentes isotipos.

Estrutura geral das imunoglobulinas

As imunoglobulinas ou anticorpos são moléculas pertencentes a uma família de glicoproteínas estruturalmente relacionadas, responsáveis pelo reconhecimento de determinantes antigênicos. Os anticorpos são produzidos pelos linfócitos B ligados a membrana ou secretados ligando-se aos antígenos, desencadeando diversas funções efectoras do sistema imune. Dentre as classes usadas pelo sistema imune para reconhecimento de antígeno, os anticorpos são as moléculas com a maior capacidade de reconhecer uma faixa mais ampla de estruturas antigênicas, maior capacidade de discriminar diferentes antígenos e maior força de ligação a estes. O esquema geral de uma molécula de anticorpo está representado na figura 1.

Todos os anticorpos têm uma estrutura central comum de duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada e as duas cadeias pesadas são unidas mutuamente. Tanto as cadeias leves quanto as pesadas contêm uma série repetitiva de unidades homólogas, que se enovelam independentemente em um motivo globular comum denominado domínio de imunoglobulina. Entretanto quando comparadas entre diferentes imunoglobulinas, as seqüências destas cadeias variam amplamente. Tanto nas cadeias pesadas quanto nas leves, essa variabilidade é mais pronunciada no domínio N-terminal, enquanto as seqüências dos outros domínios permanecem relativamente constantes. Por este motivo o domínio N-terminal numa cadeia polipeptídica pesada ou leve é denominado região variável (Fv), abreviada para VH e VL, respectivamente. O Fv apresenta uma estrutura constituída de folhas β pregueadas intercaladas por uma volta (*loop*). Seis destas voltas participam com quase a totalidade dos pontos de contato com o antígeno. Os outros domínios são denominados de região constante (CH e CL), sendo as regiões CH da cadeia pesada constituídos de 3 ou mais domínios denominados CH1, CH2, etc. (Ferreira & Teixeira, 2005).

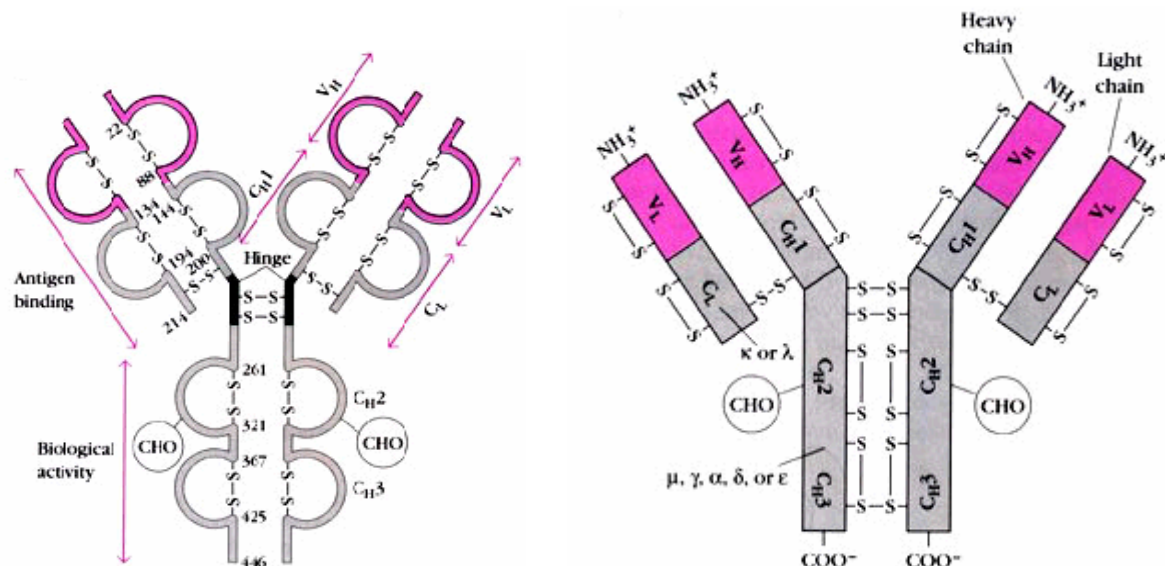


Figura 1. Representação esquemática da estrutura de uma imunoglobulina gama. (Immunology bookcase, 2006).

Dentro de uma imunoglobulina, as cadeias pesadas e leves são paralelas e este par de domínios forma um sítio de ligação de antígenos. A especificidade antigênica de determinada proteína é condicionada pelas seqüências combinadas de seus domínios VH e VL e por este motivo varia amplamente entre as imunoglobulinas. A molécula de anticorpo pode ser subdividida em porções Fc e Fab, onde Fc é constituída dos domínios constantes e Fab constituída dos domínios VH-CH1 e VL-CL, responsáveis pela ligação com os antígenos e, portanto denominado sítio combinatorial para o antígeno. As três áreas altamente divergentes dentro das regiões V são chamadas também de regiões hipervariáveis e são mantidas no local por regiões estruturais, mais conservadas. Em uma imunoglobulina, as três regiões hipervariáveis de uma cadeia leve e as três regiões hipervariáveis de uma cadeia pesada ocupam conjuntamente um espaço tridimensional para formar uma superfície de ligação para o antígeno. Como estas seqüências formam uma superfície complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado, as regiões hipervariáveis são também chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) (Ferreira & Teixeira, 2005).

Variabilidade e rearranjo dos genes de anticorpos em galinha (*Gallus gallus domesticus*)

Ao contrário dos mamíferos, as aves apresentam órgãos linfóides diferentes. O órgão primário de geração de anticorpos em embrião de galinha e apenas em pássaros é chamado Bursa de Fabricius. Células embrionárias migram para a Bursa e diferenciam-se, e no vigésimo dia 90% das células B são linfócitos B diferenciados. A Bursa, então involui após quatro semanas da eclosão do ovo e não é mais capaz de gerar células B (Well & Reynaud, 1987, citado por Maranhão, 2001).

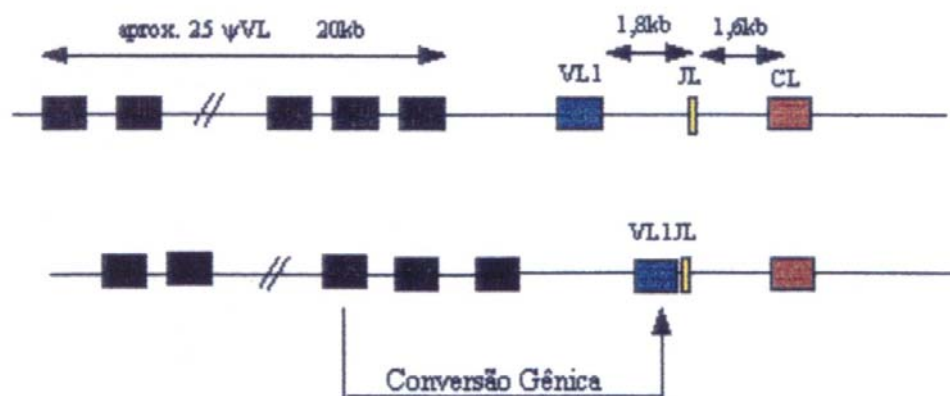
A galinha tem uma maneira própria de gerar diversidade nas cadeias leve e pesada de imunoglobulina, onde o locus da cadeia leve tem somente uma região variável funcional (VL1) que é expressa. Durante o desenvolvimento da célula B, o gene VL1 é diversificado por conversão gênica. Usando vários pseudogenes como doadores de segmentos de DNA. Uma estratégia similar é usada para o repertório da cadeia pesada (Mansikka *et al.*, 1990). Em todos os casos, o rearranjo gênico resulta em justaposição de segmentos de DNA, codificando os genes para as imunoglobulinas (Ratcliff & Jacobsen, 1994). No *locus* da cadeia leve são encontrados cerca de 25 pseudogenes distribuídos em 20 Kb. Cerca de 1,8 Kb após o segmento VL1 encontra-se um único segmento JL e 1,6 Kb após encontra-se o domínio constante lambda C. Para a cadeia pesada encontra-se cerca de 80 pseudogenes distribuídos em aproximadamente 80 Kb antes do segmento funcional VH1. Encontra-se na região 3' após o segmento funcional, cerca de 16 segmentos D, distribuídos em aproximadamente 15 Kb e posteriormente a estes segmentos, o único segmento JH do locus da cadeia pesada. O segmento constante (CH) localiza-se aproximadamente 22Kb após o segmento JH (Reynaud *et al.*, 1989) (Figura 2). A denominação pseudogene é devido a não funcionalidade, pois não codificam nenhuma proteína. São seqüências homólogas aos segmentos V, truncadas na porção 5' e/ou 3' ou apresentam alterações na fase de leitura (Reynaud *et al.*, 1987). O mecanismo da conversão gênica não está completamente elucidado. O processo inclui duplicação de seqüências de um pseudogene doador e recolocação da seqüência homóloga no gene funcional receptor mantendo a seqüência original do

pseudogene doador (Ratcliffe *et al.*, 1994). Vale ressaltar que a conversão gênica ocorre também no baço e linfonodo (Arakawa, *et al.*, 1996). Em galinhas como nos mamíferos, genes rearranjados e posteriormente convertidos sofrem também o processo de hipermutação somática. É comum a observação de mutações ao longo dos CDRs e *frameworks* inclusive nas regiões constantes (Arakawa, *et al.*, 1996).

Biblioteca combinatorial de anticorpos (scFv) apresentados em fagos filamentosos (*Phage Display libraries*)

A escolha de galinhas para a geração de anticorpos para construção de uma biblioteca combinatorial de anticorpos apresentada em fagos, se deu devido à maneira pela qual a diversidade de anticorpos é gerada. Durante os rearranjos gênicos e o processo de conversão gênica, as cadeias leves e pesadas são geradas diversificadas e com as extremidades terminais apresentando seqüências de aminoácidos idênticas. Neste caso, o repertório de genes variáveis (VH e VL) pode ser amplificado utilizando apenas um par de iniciadores distintos para cada fragmento gênico (Wyngaardt *et al.*, 2004). Para amplificação dos segmentos gênicos de mamíferos, por exemplo, necessitaríamos de um maior número de oligonucleotídeos e de reações de amplificações (Dantas-Barbosa *et al.*, 2004).

(A) *locus* da cadeia leve de galinha



(B) *locus* da cadeia pesada de galinha

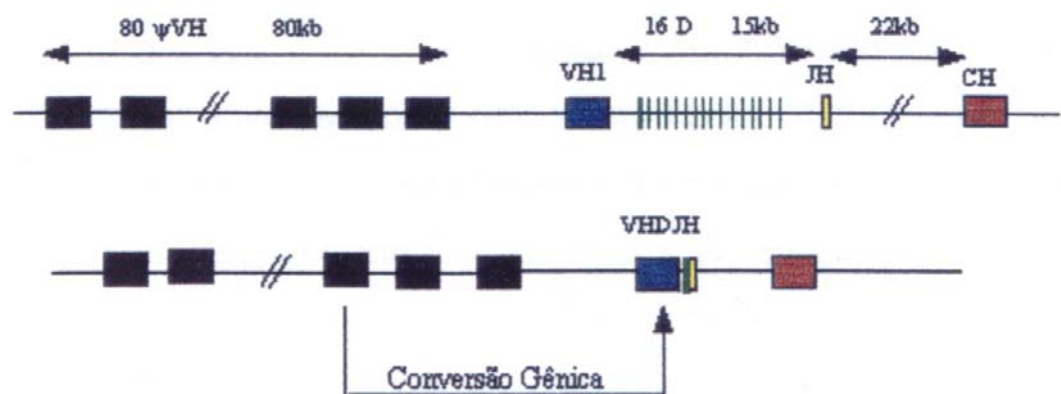


Figura 2. Organização dos *loci* de imunoglobulina de galinhas. (A) *locus* da cadeia leve mostrando cerca de 25 pseudogenes (quadrados pretos); VL(azul) - único segmento funcional; JL(amarelo)-um segmento de junção; CL(vermelho)-segmento da cadeia constante. (B) *locus* da cadeia pesada mostrando cerca de 80 pseudogenes (quadrados pretos); VH (azul) - único segmento funcional; D-exclusivos da cadeia pesada; JH(amarelo); CH(vermelho)-segmento da cadeia constante. (Maranhão, 2001)

- **Fagos filamentosos**

Os fagos filamentosos possuem como material genético DNA fita simples. A infecção viral ocorre via pilus sexual de células bacterianas Gram negativas que apresentam o gene para a fímbria codificada pelo Plasmídeo F'. As partículas virais são liberadas por extrusão do DNA reunido às proteínas estruturais formadoras da partícula viral através da membrana, sem lisar a célula ou impedir sua divisão (Smith & Scott, 1993), possibilitando a separação de partícula virais do conteúdo intracelular, eliminando reações cruzadas com proteínas celulares. A

figura 3 mostra a organização estrutural de uma partícula viral do bacteriófago M13. O capsídeo do fago é composto por cinco tipos diferentes de proteínas (PIII, PVI, PVII, PVIII, PIX). A PVIII é a principal componente da partícula viral com aproximadamente 3700 cópias por fago, formando o corpo cilíndrico do vírus. A proteína P3 está presente em 5 cópias e tem papel fundamental na reprodução viral, pois é ela a responsável pela ligação do fago ao pilus sexual da célula bacteriana. Tanto a proteína PIII quanto a PVIII são utilizadas para a apresentação de proteínas recombinantes fusionadas. Smith (1985) demonstrou a possibilidade de inserção de genes entre os domínios da P3 sem interferir na sua função, ou seja, na infectividade do vírus. A partir desta observação, foi proposta a manipulação dos genes *III* e *VIII* para a construção de bibliotecas de peptídeos ou proteínas (Smith, 1993). Parte do domínio D1 foi retirado no vetor utilizado neste trabalho.

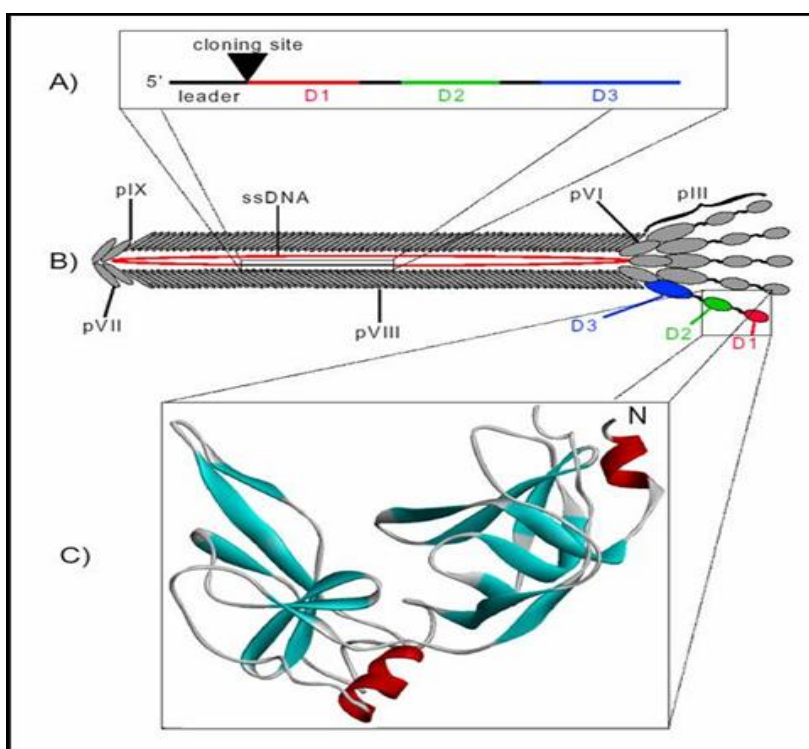


Figura 3. Representação esquemática de um fago filamentosso. A) Composição do gene III, mostrando o sitio de clonagem para introdução do gene de interesse; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e PIX; C) Cristalografia dos domínio D1 e D2 da proteína III (Holliger & Williams, 1999), as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas β em verde.

- **Biblioteca combinatorial de anticorpos**

As imunoglobulinas são amplamente utilizadas como proteínas de fusão a fagos filamentosos, mas a utilização da molécula inteira é praticamente impossível pelo tamanho de seu arcabouço. Moléculas menores como scFv (fragmentos variáveis de cadeia única) ou Fab são perfeitamente aceitas como proteínas de fusão a fagos filamentosos. Nós optamos neste trabalho por expressar scFv pois este formato de fragmento de anticorpo tem algumas vantagens quando comparado ao Fab. Primeiro, a construção da biblioteca é facilitada pelo menor número de oligonucleotídeos e passos envolvidos na amplificação dos fragmentos variáveis dos genes das imunoglobulinas. Segundo, a habilidade do scFv em formar estruturas multiméricas pode aumentar a avidéz e afinidade e facilitar a seleção contra certos antígenos. Terceiro o rendimento de moléculas scFv tende a ser maior do que Fab, ou seja, níveis de expressão são maiores para scFv. A vantagem de se trabalhar com Fab é a maior estabilidade da molécula durante os processos de seleção (*biopanning*) (Barbas, III *et al.*, 2001).

Os anticorpos obtidos *in vivo* por processos de imunização, podem agora pela técnica do *phage display*, utilizando bibliotecas de anticorpos, serem selecionados *in vitro* pela afinidade ao ligante. Esta comparação entre os dois processos comentados por Hoogenboom & Winter (1992) levou a uma linha de pensamento, admitindo-se que os anticorpos recombinantes apresentados em fagos seriam representativos da resposta imune. No entanto, este conceito fica falho quando não levamos em conta a influência de outros parâmetros no processo de seleção, diferentes daqueles encontrados no organismo (Brígido & Maranhão, 2002).

- **Vetores para expressão de scFv**

A construção de vetores (fagomídeos) foi uma alternativa prática ao uso e manipulação do DNA viral para expressão de anticorpos recombinantes. Fagomídeos basicamente são Plasmídeos que possuem além da origem de replicação de bactérias (*E. coli*), a origem de replicação viral, o gene de fusão (*pIII* ou *pVIII*), sítio de inserção do fragmento codificante do anticorpo ou qualquer

outra proteína de interesse e genes de resistência a antibióticos para seleção em meio apropriado. Como os Fagomídeos não possuem todas as proteínas necessárias para a encapsidamento da partícula viral, fagos auxiliares (*helper*) contendo todos os genes dos bacteriófagos filamentosos são utilizados nas culturas de células transformadas com o Fagomídeo, permitindo o resgate da partícula viral (Brígido & Maranhão, 2002). Durante a infecção viral o DNA proveniente dos fagomídeos é preferencialmente revestido pelas proteínas estruturais, pois os fagos *helper* possuem mutações na origem de replicação, dificultando sua reprodução e empacotamento de seu próprio material genético (Barbas III *et al.*, 2001).

Seleção dos anticorpos contra proteínas totais de carrapato bovino (*biopanning*)

A necessidade de caracterizar antígenos que possam ser utilizados como imunógenos na fabricação de uma vacina mais eficiente para o controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*) foi a motivação para a construção de uma biblioteca de anticorpos (scFv) apresentada em fagos. A biblioteca construída a partir do repertório de imunoglobulinas de galinhas imunizadas com proteínas totais é uma grande ferramenta para identificação de novos antígenos, pois durante o processo, um grande número de clones são selecionados com alta afinidade ao ligante (proteínas totais). Os fragmentos scFv selecionados serão utilizados posteriormente para identificação de peptídeos recombinantes expressos em fagos filamentosos (*peptide library*), descrito no capítulo II deste trabalho.

Objetivos

- Construção de uma biblioteca combinatorial de fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) apresentados na superfície de fagos filamentosos a partir do repertório imune de galinhas imunizadas com proteínas totais de carrapato bovino (*B. microplus*)
- Expressão dos anticorpos em sistemas heterólogos (bactéria) e sua caracterização quanto à capacidade de ligação aos antígenos presentes no carrapato

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem bacteriana

A linhagem de *Escherichia coli* utilizada durante a realização deste trabalho para produção de partículas virais, transformação e amplificação de Fagomídeos foi: XL1-Blue *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *relA1 lac*, [*F' ProAB lacI^q lacIqZΔM15*, Tn10(*tet^r*)].

Plasmídeo

pComb3X – 4,5 kb, promotores *plac*, *ori ColE1*, *ori f1*, *Amp^R*. Possui a sequência codificadora para parte da proteína III de bacteriófagos filamentosos. Apresenta ainda um códon de parada âmbar, não reconhecido eficientemente por linhagens supressoras como a XL1-Blue ou ER2537, mas reconhecido por cepas de bactérias não supressoras como a TOP 10F' permitindo assim tanto a expressão de proteínas fusionadas à proteína PIII do fago, quanto proteínas de fusão livre da proteína III. Possui uma região com seis histidinas, logo após o sítio de clonagem do gene, para purificação em coluna de níquel e uma região codificadora de resíduos que constituem o epítipo de uma hemaglutinina (HA) que possibilita sua detecção utilizando um anticorpo anti-HA (Scott & Barbas III, 2000).

Bacteriófago auxiliar

VCSM13 – Derivado do bacteriófago M13 com o gene II mutado: origem de duplicação plasmidial derivada do p15 e gene de resistência à kanamicina.

Meios de cultura

- **Meio LB, pH 7,0:**

Peptona de caseína 1,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 1,0% (p/v)

- **Meio LB ágar:**

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 1,4% (p/v).

- **Meio LB top ágar:**

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 0,7% (p/v).

- **Meio SB, pH 7,0:**

Peptona de caseína 3,0% (p/v)

Extrato de levedura 2,0% (p/v)

MOPS 1,0% (p/v)

- **Meio SOB, pH 7,0**

Peptona de caseína 2,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 0,05% (p/v)

KCl 0,00186% (p/v)

- **Meio SOC:**

Meio SOB 97 mL

Glicose 2M (filtrada) 1 mL

MgCl₂ 1M (autoclavado) 1 mL

Mg SO₄ (autoclavado) 1 mL

Os meios foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos e conservados a temperatura ambiente até a utilização.

Antibióticos

Soluções estoques: Ampicilina 100 mg/mL

Carbenicilina 100 mg/mL

Canamicina 50 mg/mL

Essas soluções foram preparadas em água mili Q, esterilizadas por filtração em filtro Millipore 0,2 µm e estocadas a -20°C.

Solução estoque: Tetraciclina 20mg/ml

Essa solução foi preparada em etanol, esterilizada por filtração em filtro Millipore 0,2 µm e estocadas a -20°C.

Oligonucleotídeos sintéticos específicos

Oligo	Seqüência	Utilização
CSCVHo-F	5'GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG 3'	Para amplificação dos genes de cadeia pesada de galinha a partir da extremidade 5'. Cria um peptídeo conector curto e é complementar ao CKJo
CSCG-B	5' CGT GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CC 3'	Para amplificação dos genes de cadeia pesada de galinha a partir da extremidade 3'.
CSCVK	5' GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC 3'	Para amplificação dos genes de cadeia leve de galinha a partir da extremidade 5'
CKJo-B	5' GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G 3'	Para amplificação dos genes de cadeia leve de galinha a partir da extremidade 3'. É complementar ao CSCVHo.
CSC-F	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG 3'	Para amplificação dos scFv a partir do 5' da cadeia variável leve originada na primeira PCR com os iniciadores CSCVK e CKJo-B. Cria um sítio para <i>Sfi</i> I.
CSC-B	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GG 3'	Para amplificação dos scFv a partir do 3' da cadeia variável pesada originada na primeira PCR com os iniciadores CSCVHo-F e CSCG-B. Cria um sítio para <i>Sfi</i> I, diferente daquele criado por CSC-F
MMB4	5' GCTTCCGGC TCG TAT GTTGTG T3'	Para seqüenciamento dos scFv clonados no vetor pComb3X a partir da extremidade 5' (cadeia leve).
MMB5	5' CGTTTG CCA TCT TTT CATAAT C 3'	Para seqüenciamento dos scFv clonados no vetor pComb3X a partir da extremidade 3' (cadeia pesada).

Enzimas e kits utilizados

Acess Quick RT-PCR system – PROMEGA, utilizado para amplificar o cDNA.

Taq DNA Polimerase - Cenbiot (5 U/ μ L) fornecida com o seu tampão de reação 10X, utilizada nas reações de PCR.

Enzima de restrição *Sfi* I - Roche Molecular Biochemicals (40 unidades/ μ L), suprida com o seu tampão de reação 10X (Tampão M), utilizada para digerir o vetor pComb3XSS.

T4 DNA Ligase - Gibco-BRL (1 unidade/ μ L), fornecida com o seu tampão 5X, utilizada nas reações de ligação.

dNTPs - Eppendorf (100 mM/cada) utilizados nas reações de PCR.

Wizard SV gel and PCR Clean-up System – PROMEGA, utilizado para eluir DNA a partir de gel de ágarose.

Cubetas de 0,2 cm - usadas para eletroporação no equipamento Gene Pulser com Pulser Controller da Bio-Rad.

Marcador de Massa Molecular 100bp – Amersham Pharmacia Biotech.

Marcador de Massa Molecular 1 kb DNA ladder – Gibco-BRL.

Low Mass Ladder (marcador de baixo peso molecular) - Gibco-BRL.

Glicogênio - Roche Molecular Biochemicals (20 mg/mL).

Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Celulose - Invitrogen (0,5 μ g/ μ L).

Enzima *Sfi* I – New England Biolabs (20 U/ μ L), acompanhada do tampão de reação NEB 2 10X.

IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) 1M

0,238 g de IPTG/mL de água mili Q.

A solução foi esterilizada por filtração em filtro Millipore 0,2 μ m e estocada a -20°C.

Soluções de uso geral

Glicose 20%

Glicose anidra 20% (p/v)

- **Glicerol 10%**

Glicerol 10% (v/v)

Esta solução foi esterilizada por autoclavagem.

- **PBS pH 7,2**

Na ₂ HPO ₄ 1 M	68,4 mL
--------------------------------------	---------

NaH ₂ PO ₄ 1 M	31,6 mL
--------------------------------------	---------

NaCl 2,5 M	58 mL
------------	-------

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

- **PBST**

PBS adicionado de tween 20 a 0,05% (v/v).

- **PBS-BSA 3%**

PBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 3% (p/v)

- **Tampão de amostra para gel de ágarose (TEB) 10X**

Glicerol	50% (v/v)
----------	-----------

Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
--------------------	------------

Xileno cianol	0,1% (p/v)
---------------	------------

- **Tampão TE**

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

- **Tampão da fosfatase alcalina (APB)**

Tris-HCl, pH 9,5	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl ₂	50 mM

- **Tampão de transferência**

Tris	48 mM
Glicina	39 mM
Metanol	20%
SDS	0,037%

- **NBT** (nitro blue tetrazole)/**BCIP** (5-bromo-4-cloro-indolil fosfato) – Amersham Pharmacia Biotech.

Anticorpos

Anti-HA – produzido em coelho, Santa Cruz Biothecnology.

Anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina - Amersham Pharmacia Biotech.

Anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase - Amersham Pharmacia Biotech.

Material biológico

Foram utilizadas para este experimento, larvas e teleóginas (fêmeas adultas ingurgitadas) de carrapato bovino (Cepa Mozzo), cedidos pela Vallée S/A.

As teleóginas foram sacrificadas e rapidamente lavadas internamente com solução salina gelada para retirada total do sangue bovino presente em seu intestino. O material biológico foi acondicionado em freezer à uma temperatura de – 80 °C até sua utilização.

Extração de proteínas totais

Proteínas totais foram extraídas de larvas e adulto de *B. microplus* por maceração em nitrogênio líquido. Aproximadamente 100mg de larvas foram maceradas diretamente em nitrogênio líquido. Para as teleóginas, o sangue bovino presente no intestino do parasita foi lavado com PBS 1X e os órgãos internos utilizados para extração de proteínas totais. Foi adicionado tampão de extração ao macerado (40mM Hepes pH 7,4, 10mM EDTA, 2mM EGTA, 1mM DTT, 1mM Benzamidina, 0,5mM PMSF), vortexado por alguns segundos e centrifugado por 40 minutos a 4000g. O sobrenadante foi coletado e as proteínas totais quantificadas pelo método de Bradford. O perfil protéico foi avaliado por SDS-PAGE (10%).

Imunizações das galinhas

Foram utilizadas para a imunização, 6 galinhas de três semanas de idade, da raça *White Leghorn* mantidas dentro de gaiolas em biotério apropriado. Duas galinhas para cada fase de vida do carrapato foram imunizadas com proteínas totais e a terceira utilizada como controle negativo (imunizadas apenas com adjuvante). As galinhas foram sangradas previamente ao início da imunização para determinação do título pré-imune como controle das imunizações. O esquema de imunização foi o descrito por Barbas *et al.* (2001), com algumas modificações, sendo a primeira dose de 200 µg e as três doses subseqüentes de 100 µg de proteínas totais de *B. microplus* por via intramuscular em intervalos de 14 dias para cada dose. A primeira dose continha adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co, USA) e as doses subseqüentes, adjuvante incompleto de Freund (Sigma) na proporção de 1:1. Os animais imunizados foram sangrados a partir da terceira dose e avaliados quanto à produção de anticorpos por ELISA.

Para o ensaio imunoenzimático (ELISA), placas de microtitulação de alta afinidade (NUNC) foram sensibilizadas com 10 µg de proteínas totais das fases (larvas e teleógina) do carrapato, diluída em tampão carbonato/ bicarbonato, durante toda a noite a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBST 0,1%, leite desnatado 5%), para posterior adição das amostras de soro das galinhas antes e após as imunizações e incubadas por 1 hora a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas 5 vezes com PBST 0,5% e

adicionado anticorpos secundários (IgG de coelho anti IgY de galinhas) diluído em tampão de bloqueio, durante 1 hora a 37°C. A placa foi novamente lavada com PBST e um conjugado imunoenzimático [IgG de cabra anti-IgG de coelho ligado à peroxidase (Sigma)] diluído em tampão de bloqueio foi adicionado e incubado a 37°C por 1 hora. A reação foi revelada pela adição de substrato enzimático contendo o-fenilenodiamino (OPD). Após a constatação da reação medida visualmente entre as reações positivas e controles negativos (cerca de 20 min após a colocação do substrato OPD) a reação foi interrompida com ácido sulfúrico e efetuada a leitura a 492 nm em leitor de microplaca (*Flow Titertek Multiskan Plus - USA*).

Com a comprovação do título satisfatório, as galinhas foram sacrificadas e seus baços retirados e imediatamente acondicionados em recipientes com nitrogênio líquido e posteriormente em freezer a uma temperatura de – 80°C até sua utilização.

Extração de RNA total

Os baços das galinhas imunizadas foram macerados em cadinho com nitrogênio líquido e imediatamente transferidos para tubos Falcon contendo Trizol. A extração de RNA foi realizada conforme protocolo descrito pelo fabricante (Invitrogen). Após a extração, o RNA foi analisado em gel de agarose 1%, aliquotado e armazenado a – 80 °C.

Síntese de cDNA

Aproximadamente 20µg de uma mistura de RNAs dos baços das galinhas imunizadas, foram utilizados para a síntese de cDNA, utilizando o kit Acess Quick RT-PCR system (Promega) e oligo(dT)₁₂₋₁₈ (invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. As condições para a reação no termociclador foram: 70°C por 10 min, 4°C por 1 min. A reação foi parada para adição da enzima transcriptase reversa (AMV) e continuação do ciclo por 1h a 48°C. O produto foi mantido a -20°C até sua utilização.

Amplificação dos fragmentos das cadeias leve (VL) e pesada (VH) de anticorpos de galinha

Para amplificação dos fragmentos de DNA das cadeias leves e pesadas dos anticorpos, foram realizadas cinco reações utilizando 10 µL de cDNA como molde. Cada reação continha um volume final de 100µL, utilizando 60 pmoles de oligonucleotídeos CSCVHo-F (senso) e CSCGB (reverso) para amplificação dos genes VH; CSCVK (senso) e CKJo-B (reverso) para amplificação dos genes VL, 10 µl de tampão de PCR 10X (Cenbiot), 8 µl de dNTPs 2,5 mM (Eppendorf) e 0,5 µl de *Taq* DNA polimerase 5U/µl (Cenbiot). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador com as seguintes condições:

94°C durante 5 minutos

30 ciclos de:

94°C durante 45 segundos

56°C durante 1 minuto

72°C durante 2 minutos

Extensão final: 72°C durante 10 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio e visualizados utilizando o equipamento *ImageMaster VDS* (Pharmacia Biotech).

As cinco reações de PCR (para amplificação da cadeia pesada e cadeia leve) foram reunidas, precipitadas com 2,5 volumes de etanol e 0,1 volumes de acetato de sódio 3M, pH 5.2, e ressuspensos em água. Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose 1% para purificação dos fragmentos de DNA correspondentes aos genes VH e VL, utilizando o kit *Wizard SV Gel up-System* (Promega). As amostras de DNA eluídas e purificadas do gel foram quantificadas em gel de agarose 1% utilizando um marcador padrão (*Low DNA Mass ladder* - Invitrogen).

Amplificação dos fragmentos scFv de galinha (*Overlap*)

O *overlap* definido como a sobreposição dos fragmentos VH e VL e posterior amplificação do fragmento unido (scFv) só é possível pelo fato de os iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos variáveis possuírem uma

“cauda” complementar entre os fragmentos formando um peptídeo conector (linker), permitindo a ligação entre os fragmentos. Um novo par de oligonucleotídeos externos foi utilizado para a amplificação do scFv (Figura 4). Foram realizados 10 reações de PCR utilizando 500ng de VH e VL purificados, 60 pmoles de oligonucleotídeos CSC-F (senso) e CSC-B (reverso), 10 µL de tampão de PCR 10X (Cenbiot-RS/Brasil), 8 µL de dNTPs 2,5 mM (Eppendorf) e 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase 5 U/µl (Cenbiot-RS/ Brasil).

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador com as seguintes condições:

Gradiente de desnaturação:

94°C durante 5 minutos

80°C durante 1 minuto

70°C durante 1 minuto

Pausa - adição da enzima.

30 ciclos de:

56°C durante 15 segundos

72°C durante 15 segundos

94°C durante 15 segundos.

Anelamento final: 56°C durante 15 segundos

Extensão final: 72°C durante 10 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio e utilizando o equipamento *ImageMaster VDS* (Pharmacia Biotech). As 10 reações foram precipitadas com 2,5 volumes de etanol e 0,1 volumes de acetato de sódio 3M, pH 5.2 e em seguida, os fragmentos scFv foram purificados utilizando o kit *Wizard SV Gel up-System* (Promega) e quantificados em gel de agarose utilizando um marcador padrão (*Low DNA Mass ladder* - Invitrogen).

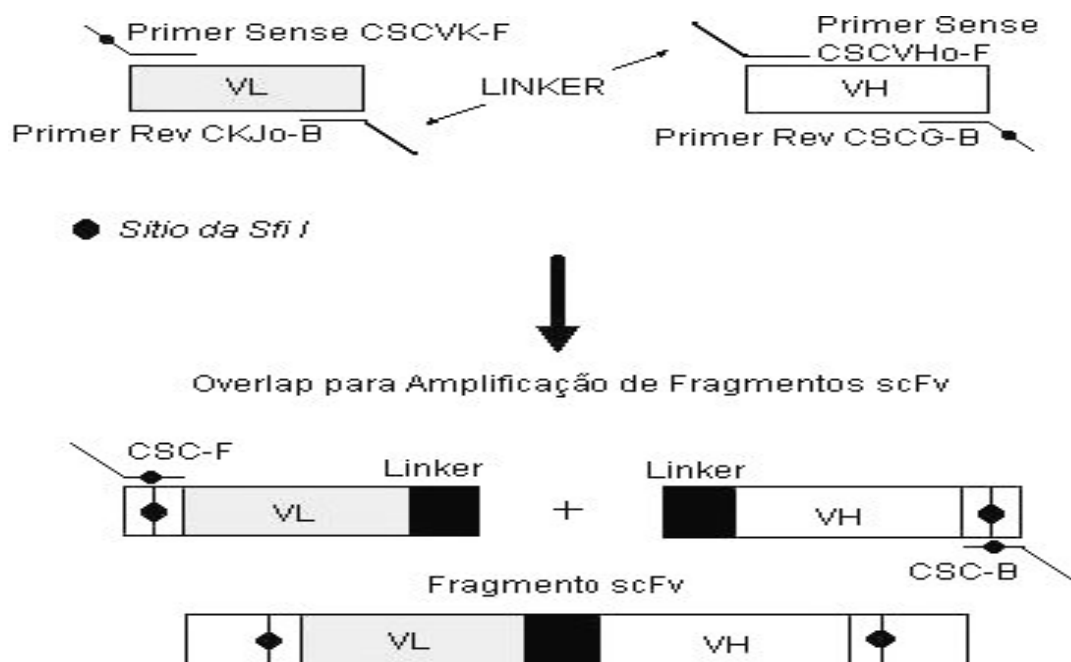


Figura 4. Representação esquemática da amplificação dos segmentos gênicos das imunoglobulinas de galinhas. **1ª PCR** – amplificação das seqüências gênicas das cadeias leves e pesadas, usando um par de oligonucleotídeos para cada gene. Os oligonucleotídeos senso CSCVHo-F e reverso CSJo-B inserem o peptídeo de ligação. Os oligonucleotídeos senso CSCVK (cadeia leve) e reverso CSCG-B (cadeia pesada) inserem um sítio de restrição para a enzima *Sfi* I para a inserção do scFv no vetor pComb3X. **2ª PCR** – amplificação da seqüência gênica dos scFvs de imunoglobulinas de galinhas, a partir da sobreposição do peptídeo de ligação das cadeias leves e pesadas.

Digestão dos fragmentos scFv e do vetor pComb3X com a enzima *Sfi* I

Para a digestão do scFv e do vetor foram montadas duas reações utilizando 12 unidades de enzima *Sfi* I (20 U/ μ L - Biolabs) para cada 1 μ g de DNA e tampão NEBuffer 2, em concentração final de 1X. As reações foram incubadas a 50°C durante 5 horas, e em seguida analisadas em gel de agarose. Os fragmentos digeridos foram purificados do gel utilizando o kit *Wizard SV Gel up-System* (Promega), seguido de quantificação em gel de agarose utilizando um marcador padrão (*Low DNA Mass ladder* - Invitrogen).

Ligação dos fragmentos de DNA scFv com o vetor pComb3X

Foram misturados 1400 ng de pComb3X digerido com *Sfi* I, 700 ng de scFv digeridos com *Sfi* I, 40 μ L de tampão da enzima 5X (Gibco-BRL), 10 μ L de T4 DNA Ligase (Gibco – BRL) e H₂O q.s.p. 150 μ L.

Três sistemas de ligação idênticos foram realizados para aumentar a variabilidade da biblioteca. As reações foram incubadas a 16°C durante 20h e em seguida, precipitadas com etanol/acetato de sódio, para posterior transformação das células competentes.

Preparação de células XL1-Blue eletrocompetentes (adaptado de Rader *et al.*, 2000).

Uma colônia de células XL1-Blue foi isolada e inoculada em 10 mL de meio SB contendo tetraciclina (30 µg/mL), este pré-inóculo foi incubado a 37°C durante a noite, sob agitação de 250 rpm. Foi inoculado 7,5 mL do pré-inóculo em 250 mL de meio SB contendo glicose 2% e MgCl₂ 0,1 M e incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm até D.O._{600nm} de 0,7. Após ter atingido a D.O._{600nm} desejada, os frascos foram resfriados no gelo durante 15 minutos e a cultura foi centrifugada a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos ressuspensos em 100 mL de glicerol 10% gelado. A suspensão de células foi centrifugada a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Os sedimentos foram submetidos a mais duas lavagens com 50 e 25 mL de glicerol 10% gelado. Após a terceira lavagem, as células foram ressuspensas no volume residual de glicerol e aliqüotadas em volume de 75 µL e transferidas para microtubos novos e estéreis. As aliqüotas foram congeladas em banho de álcool e gelo seco e estocadas a -80°C até serem utilizadas para eletroporação e para os experimentos de seleção.

Transformação de células *E. coli* (XL1-Blue) por eletroporação (adaptado de Rader *et al.*, 2000).

Para a transformação das células, 6 µL do sistema de ligação foi misturado a 100 µL de células competentes (no total de cinco transformações para teleóginas e oito para larvas). Em seguida, a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2cm previamente resfriada em gelo e submetida ao choque no eletroporador com os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω. O τ esperado nessas condições é entre 4,0 e 5,0 milissegundos. Após a eletroporação,

as células foram recuperadas, imediatamente, em 3 mL de meio SOC, transferidas para um tubo Falcon de 50 mL estéril e incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm durante 1 hora. Diluições desta cultura foram semeadas em placa de petri com meio LB ágar contendo carbenicilina 100 µg/mL para a determinação da eficiência de transformação.

Preparação do fago auxiliar VCSM13 (adaptado de Rader *et al.*, 2000).

- **Obtenção de placas de lise**

Para a obtenção das placas de lise foram inoculados 2 µL de células XL1-Blue competente em 2 mL de meio SB contendo tetraciclina 10 µg/mL, incubado a 37°C sob agitação até atingir D.O._{600nm} de 0,6–1,0. Em seguida, foram feitas alíquotas de 50 µL de células em microtubos, adicionado 1 µL de fagos auxiliares diluídos (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}), para garantir a formação de placas de lises isoladas, e incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente. Os 50 µL da cultura foram adicionados em 3 mL de meio LB top ágar liquefeito (45-50°C) e vertido em uma placa de petri contendo LB ágar. As placas foram Incubadas a 37°C durante a noite e no dia seguinte à incubação observou-se a formação de placas de lise.

- **Amplificação de placas de lise**

Para a amplificação das placas de lise, foram inoculados 10 µL de células XL1-Blue competente em 10 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, contendo tetraciclina 10 µg/mL, em um tubo Falcon de 50 mL e incubado a 37°C durante uma hora sob agitação. Uma placa de lise foi selecionada com o auxílio de um palito estéril e transferida para o tubo contendo a cultura de bactérias, para que ocorresse a infecção, incubado a 37°C sob agitação durante 2 horas. A cultura infectada foi então transferida para um erlenmeyer de 1litro com 250 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C contendo tetraciclina 10 µg/mL e incubada a 37°C sob agitação durante 1 hora, adicionado kanamicina 70 µg/mL e incubado a 37°C sob agitação durante a noite. No dia seguinte, a cultura foi transferida para tubos,

centrifugado a 2500 x g durante 15 minutos e o sobrenadante coletado em tubos novos. O sobrenadante foi submetido à incubação a 70°C durante 20 minutos para eliminar as células residuais e centrifugado a 2500 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi estocado em tubos estéreis a 4°C.

- **Determinação do título da preparação de fagos auxiliares**

Para determinar o título da preparação dos fagos auxiliares foram inoculados 2 mL de meio SB, contendo tetraciclina 10 µg/mL, com 2 µL de células XL1-blue competentes e incubado a 37°C em agitação até atingir a D.O._{600nm} de 0,6 a 1,0. As células foram aliquotadas em 50 µL para microtubos e adicionado 1µL de fagos auxiliares diluídos (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) e incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos. Foram adicionados os 50 µL de células infectadas a 3 mL de meio LB top ágar, misturado e espalhado em placas contendo meio LB ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite e no dia seguinte a incubação as placas de lise foram contadas e o título de fagos foi determinado em unidades formadoras de placas pfu/mL de fagos.

Obtenção de partículas virais a partir de células transformadas com fagomídeos (biblioteca de anticorpos scFv)

As células transformadas com o sistema de ligação contendo o vetor pComb3X e os scFv amplificados por PCR foram submetidas, ao protocolo descrito abaixo para a produção de partículas virais.

À cultura de células transformadas (50mL para cada sistema de transformação) e crescidas foram adicionados 10 µL de carbenicilina (100 mg/mL) e 25 µL de tetraciclina (10 mg/mL) e incubado a 250 rpm durante 1 hora a 37°C. Em seguida, foram adicionados 15 µL de carbenicilina incubando as células por mais uma hora, nas mesmas condições anteriores. A cultura foi então transferida para um erlenmeyer de 1 L e foram adicionados 10 mL de fago auxiliar VCSM13 ($3,2 \times 10^{11}$ pfu/mL) e 150 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, contendo 75 µL de carbenicilina (100 mg/mL) e 75 µL de tetraciclina (20 mg/mL) e incubado em agitador durante 1,5 a 2 horas, a 300 rpm, a 37°C. Foram adicionados 280 µL de kanamicina (50 mg/mL) e mantido nas condições descritas anteriormente durante

a noite. No dia seguinte a cultura foi submetida à centrifugação a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C. O sedimento foi estocado a -20°C para futuras preparações plasmidiais. Ao sobrenadante foram adicionados 8g de PEG 8000 (polietilenoglicol) e 6g de cloreto de sódio e agitado a 250 rpm, durante 10 minutos, a 37°C para dissolver a fase sólida. Em seguida, o sobrenadante foi incubado em banho de gelo durante 30 minutos. Os fagos foram coletados por centrifugação a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a garrafa mantida invertida sobre papel toalha, por pelo menos 10 minutos. Para garantir a secagem do sedimento, as bordas da garrafa foram enxugadas com papel toalha. O sedimento foi ressuscitado em 2 mL de TBS/BSA 1% (p/v), a suspensão foi transferida para dois microtubos e centrifugada a 12000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante, contendo as partículas virais, foi transferido para um tubo novo e estocado a 4°C.

Seleção de partículas virais (scFv fusionados) ligantes a proteínas totais de carrapato bovino imobilizadas em placas de microtitulação

Devido a instabilidade de scFv na superfície de fagos, os procedimentos de seleção foram feitos logo após a expressão dos anticorpos no fago. Recomenda-se uma nova amplificação da biblioteca quando esta for estocada para utilizações futuras.

O procedimento de seleção seguiu como descrito por Barbas *et al.* (2001) (figura 5).

Em dois poços de uma placa de microtitulação foram adsorvidos 100 µL de tampão PBS contendo 250 µg de antígenos totais de larva e teleógina. A placa foi incubada a 4°C durante a noite. Após a incubação, foram recolhidos os 100 µL da solução contendo os antígenos e foram adicionados 150 µL de BSA 3% para bloquear, seguido de incubação a 37°C durante 1 hora. Em seguida, a solução bloqueadora foi descartada e foram adicionados 100 µL da biblioteca de anticorpos em fagos. A placa foi coberta e incubada durante 2 horas a 37°C, em estufa. A solução de fagos foi descartada da placa de ELISA, foram adicionados 150 µL de PBST 0,5% em cada poço e pipetado vigorosamente 5 vezes. A placa

permaneceu em repouso durante 5 minutos e a solução de lavagem foi descartada. Os ciclos de seleção 1 e 2, foram realizados com 5 lavagens. A partir do terceiro ciclo, a seleção foi realizada com 10, 10 e 15 lavagens para os ciclos 3, 4 e 5, respectivamente. Após a última lavagem, foram adicionados 100 µL de tampão de eluição ácido (glicina 100 mM, pH 2,2), incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente e pipetado 10 vezes vigorosamente. A solução eluída foi transferida para um microtubo contendo 6 µL de solução neutralizante (tampão Tris-base 2M). Em seguida, foram adicionados 50 µL dos fagos eluídos a 2 mL de uma cultura de células XL1-Blue (os 50 µL restantes foi estocado a 4°C) e incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos. A cultura foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e foram adicionados 6 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, 1,6 µL de carbenicilina (100 mg/mL) e 6 µL de tetraciclina (10 mg/mL) (neste ponto foram reservados 20 µL da cultura para calcular o título de saída). Os 8 mL de cultura foram incubados a 37°C durante 1 hora, sob agitação de 250 rpm. Foi adicionado 1 mL de fago auxiliar VCSM13 (10^{11} pfu/mL) e transferido para um erlenmeyer de 500 mL. Foram adicionados 91 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, contendo 46 µL de carbenicilina (100 mg/mL) e 92 µL de tetraciclina (10 mg/mL) e incubado durante 1,5 a 2 horas sob agitação de 300 rpm a 37°C. Foram adicionados 140 µL de kanamicina (50 mg/mL) e incubado durante a noite nas condições descritas anteriormente. A cultura crescida durante a noite foi submetida à centrifugação a 3.000 x g durante 15 minutos a 4°C. O sedimento foi estocado para futuras preparações plasmidiais a -20°C. Para precipitação dos fagos foram adicionados ao sobrenadante 4 g de PEG 8000 (polietilenoglicol) e 3 g de cloreto de sódio e agitado a 250 rpm, durante 10 minutos, a 37°C para dissolver a fase sólida. Em seguida, o sobrenadante foi incubado em banho de gelo durante 30 minutos. A solução contendo os fagos foi submetida à centrifugação a 10000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a garrafa mantida invertida sobre papel toalha, durante pelo menos 10 minutos, para garantir a secagem do sedimento. Após esse tempo as proximidades da boca da garrafa foram enxugadas com papel toalha e o sedimento ressuspendido em 2 mL de TBS/BSA 1% (p/v). A suspensão foi transferida para dois microtubos e centrifugada a 12000 rpm durante 5 minutos a

4°C. Em seguida, o sobrenadante contendo as partículas virais foi transferido para um novo tubo e estocado a 4°C.

A cada ciclo de seleção neste processo de biopanning descrito acima, o título de entrada e saída foi determinado. Este procedimento tem a finalidade de monitorar o enriquecimento da biblioteca e consequentemente o aumento da afinidade dos anticorpos ao ligante.

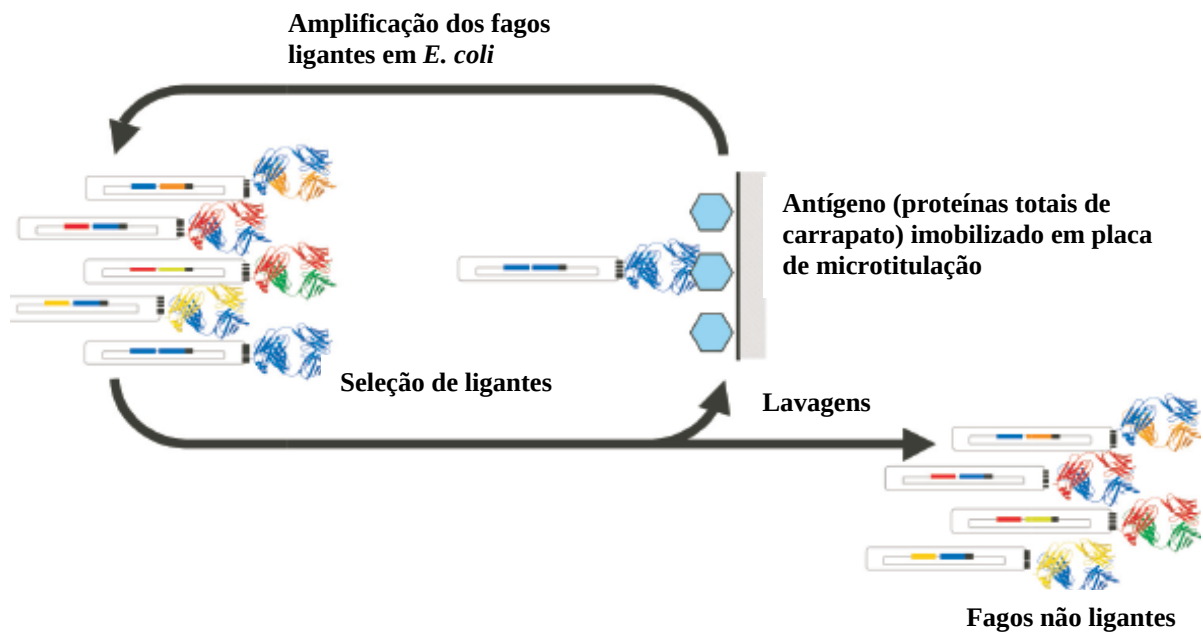


Figura 5. Seleção de fagos, expressando as diferentes formas scFvs. A triagem dos fagos foi realizada em cinco ciclos de seleção, utilizando placa de ELISA com os antígenos adsorvidos. A cada ciclo os ligantes específicos foram selecionados e re-amplificados (Sidhu & Fellouse, 2006)

A titulação dos fagos foi feita inoculando diluições seriadas dos fagos (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) para título de entrada e diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) para títulos de saída. As diluições são misturadas, com as células (XL1-Blue) e incubadas à temperatura ambiente. Em seguida, uma alíquota de cada cultura é espalhada em placas de petri contendo meio LB ágar com antibiótico adequado e incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte, as colônias crescidas na placa foram contadas e os títulos de entrada e saída foram determinados contando-se o número de colônias multiplicado pelo fator de diluição da placa. O resultado é definido como unidades formadoras de colônias ufc/mL.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Este ensaio teve como objetivo a análise dos clones (fagos) dos ciclos de seleção 0, 2 e 5 quanto a sua capacidade de ligação às proteínas totais das fases do carrapato bovino. Para analisar a reatividade destes fagos, três poços de uma placa de microtitulação foram sensibilizados, em duplicata para cada ciclo de seleção, com 100 µL de uma solução contendo proteínas totais de larva e teleógina separadamente em uma concentração de 15 µg/mL. Em um dos poços foi omitido o scFv para controle como “branco” (BR) da reação. A placa foi incubada durante a noite a 4°C. A solução de proteínas foi descartada e bloqueada com 150 µL da solução bloqueadora (leite desnatado 5% em PBS 1X) e incubada durante 1 hora a 37°C. A solução bloqueadora então foi descartada e os poços lavados 3 vezes com PBST 0,1%. Uma diluição de fagos (10^{10}) de cada ciclo de seleção foi preparada e 50 µL da diluição de fagos foram adicionados em cada poço e incubados durante 2 horas a 37°C. Uma mesma diluição de fago selvagem M13 (sem scFv) foi preparada e adicionada em um terceiro poço, em duplicata, contendo proteínas totais de larva e teleógina com o objetivo de avaliar a ligação inespecífica entre as proteínas totais de carrapato e proteínas do fago. A solução de fagos foi descartada e os poços lavados 3 vezes com PBST. Foram adicionados 50 µL do anticorpo anti-M13 marcado com peroxidase diluído 1:5000 em solução de bloqueio e incubado durante 1 hora a 37°C. Após a incubação, a solução de anticorpo foi descartada e a placa lavada 3 vezes com PBST. Foram adicionados 100 µL da solução do substrato OPD em cada poço e incubado a temperatura ambiente até a visualização da reação (aproximadamente 15 minutos). A placa foi lida a 492 nm em leitor de microplaca (*Flow Titertek Multiskan Plus* - USA).

Expressão de proteínas heterólogas em placas do tipo *deep well*

Células do 5º ciclo de seleção foram utilizadas para extração de DNA plasmidial para transformação de XL1-Blue eletrocompetente e isolamento de clones para *dot blot* com o objetivo de identificar clones com correta expressão do anticorpo recombinante. A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando o *Qiaprep Spin Mini Kit*. Após a transformação as células foram semeadas em

placas de petri com meio LB ágar contendo carbenicilina 100 µg/mL e incubadas a 37°C durante a noite.

Em uma placa de 96 poços (*deep well*) foi adicionado a cada poço 1 mL de meio SB contendo carbenicilina (20 µg/mL) e glicose 1% e inoculado uma colônia isolada a partir das placas da transformação das células XL1-Blue. A placa foi coberta com filme plástico e incubada a 250 rpm a 37°C durante a noite. No dia seguinte, 100 µL de cada clone foi inoculado em 900 µL de meio SB contendo apenas carbenicilina (20 µg/mL), incubado a 250 rpm a 37°C durante 10 horas. Após esse tempo de incubação a expressão foi induzida pela adição de IPTG na concentração final de 2,5 mM incubado a 250 rpm, a 30°C durante a noite. Após a incubação, as placas foram submetidas à centrifugação a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C, o pellet foi estocado na placa a -20°C e o sobrenadante contendo as proteínas heterólogas solúveis foram transferidos para outra placa de 96 poços e armazenado a 4°C.

Dot blot para análise da expressão heteróloga da região codificante completa dos scFvs

Para analisar a expressão heteróloga de proteínas foi realizado um ensaio de *dot blot*. Para isso foram pipetados 5 µL da cultura de cada clone individual em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (*Hybridization transfer membranes* Amersham Biosciences) e deixado secar a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução de BSA 3% em PBS e incubada a 4°C sob agitação, durante a noite. A membrana foi lavada, rapidamente, 3 vezes com PBST 0,05%, imersa em uma solução contendo o anticorpo primário (anti-HA), diluído 1:2500 em PBS (rabbit polyclonal IgG anti HA) e incubada durante 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes, rapidamente, com PBST e incubada com o anticorpo secundário (anti-rabbit IgG), diluído 1:2500 (goat anti-rabbit IgG (Fc) alkaline phosphatase PIERCE). A membrana foi lavada 3 vezes com PBST e 1 vez com APB (tampão da fosfatase alcalina). O ensaio foi revelado com o substrato NBT/BCIP. Para parar a reação, a membrana foi lavada em água corrente.

Sequenciamento das cadeias variáveis pesadas e leves dos clones selecionados

O seqüenciamento foi realizado utilizando o DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amershan Biosciences) utilizando um seqüenciador automático capilar MegaBace. As amostras foram preparadas para seqüenciamento em placas de 96 wells contendo aproximadamente 400 ng de DNA plasmidial e 2,5 pmoles do oligonucleotídeo mmB4 (senso) ou 2,5 pmoles do oligonucleotídeo mmB5 (reverso) em um volume final de 10 µL. As condições da reação de sequenciamento foram:

25 ciclos de:

95 °C por 20 segundos

50 °C por 15 segundos

60 °C por 1 minuto

A reação foi precipitada conforme descrito no Kit de sequenciamento e as placas de sequenciamento foram injetadas imediatamente no seqüenciador automático MegaBace.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração de proteínas totais

O método e tampões utilizados para extração de proteínas totais de larvas e teleóginas foram eficientes com qualidade e quantidade de proteínas solúveis satisfatórias (aproximadamente 20µg/ µL de proteínas totais) como podemos observar no perfil protéico em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Figura 6). As proteínas extraídas foram utilizadas para imunização das galinhas para construção da biblioteca de anticorpos.

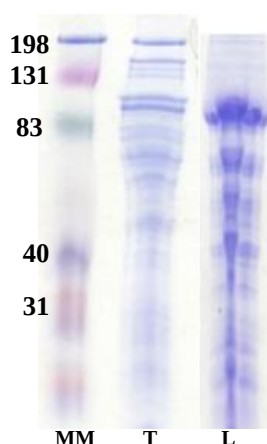


Figura 6. Gel SDS PAGE 10% de proteínas totais de larvas e teleóginas (T)-Proteínas totais de teleóginas, (L)-Proteínas totais de larvas. MM – marcador de massa molecular em KDa (BioRad).

Imunizações das galinhas com proteínas totais extraídas das fases larval e adulta do carrapato bovino

Todos os animais imunizados desenvolveram anticorpos reativos a frações antigênicas do extrato protéico de *B. microplus*, em contraste com os animais controles e reações negativas antes das imunizações (figura 7). Estes resultados estão de acordo com Lemamy *et al.*, (1999) cujo trabalho demonstrou a capacidade das aves produzirem anticorpos com alta afinidade, alto título e grande persistência da resposta imune para proteínas de bactérias e mamíferos. Isto provavelmente se deve ao fato do *B. microplus* não ser um ectoparasita natural de galinhas. Pelo gráfico da figura 7 podemos observar que para larvas, o título de anticorpos foi acima de 1/145800 nas duas galinhas imunizadas (GL1 e GL2) comparados ao título observado para os soros pré-ímmunes retirados das

galinhas antes da primeira imunização. A eficiência da imunização das galinhas com as proteínas totais de teleóginas (GT1 e GT2) foi menor comparado a imunização com proteínas de larvas, mas foi observado um alto título, acima de 1/16200, comparado com os soros pré-ímmes para teleóginas (SPIT1 e SPIT2). As galinhas separadas como controle negativo, imunizadas somente com adjuvantes (BL1 e BT1) não obtiveram títulos significativos. Vale ressaltar que em uma parasitose natural, a maioria destes antígenos não são apresentados para o hospedeiro. No caso de carrapatos apenas as proteínas da saliva são apresentados para o sistema imune do hospedeiro. Esses altos títulos foram esperados e são fundamentais para a produção de anticorpos contra outros antígenos (ocultos) objeto deste trabalho. Segundo Barbas *et al.*, (2001), um título acima de 1/1000 demonstra uma eficiência da imunização para construção de bibliotecas de anticorpos.

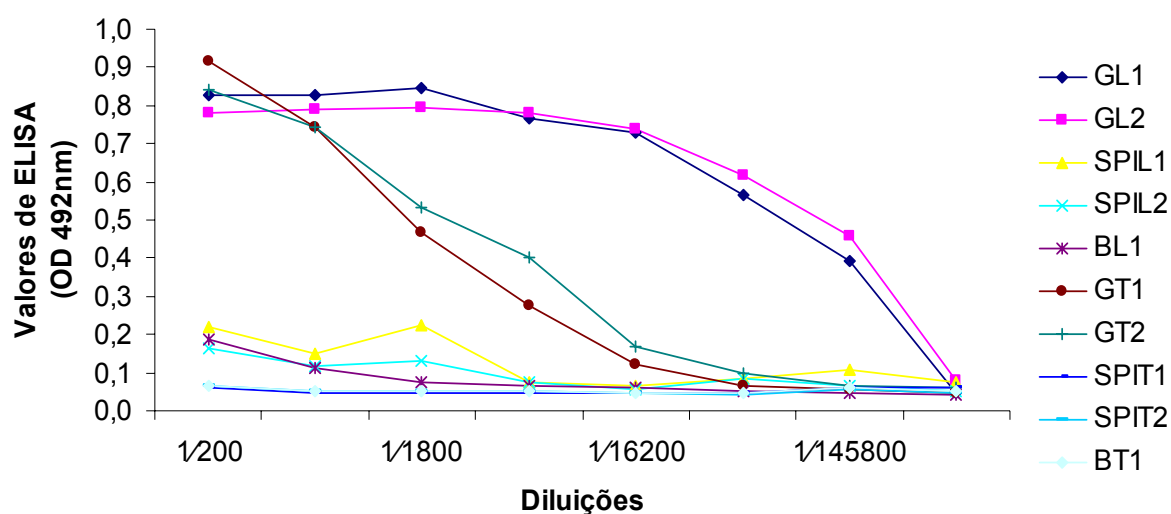


Figura 7. Avaliação da eficiência do procedimento de imunização expressa em títulos. (GL1 GL2) títulos de duas galinhas imunizadas com proteínas extraídas de larvas. (SPIL1 e SPIL2) soro pré-ímmes das galinhas imunizadas com proteínas de larvas. (BL1) galinha controle imunizada com adjuvante de Freund. (GT1 e GT2) de duas galinhas imunizadas com proteínas extraídas de teleóquina. (SPIT1 e SPIT2) soro pré-ímmes das galinhas imunizadas com proteínas de teleóquina. (BT1) galinha controle imunizada somente com adjuvante de Freund.

Amplificação dos fragmentos das cadeias leve (VL) e pesada (VH) de anticorpos de galinha e amplificação do fragmento scFv (*Overlap*)

O produto da amplificação dos genes variáveis da cadeia leve e pesada das imunoglobulinas foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo demonstrando os tamanhos esperados dos fragmentos gênicos das cadeias leve (cerca de 350 pb) utilizando oligonucleotídeos CSCVK (senso) e CKJo-B (reverso). Para cadeia pesada o fragmento amplificado possui cerca de 400 pb utilizando os oligos CSCVHo-F (senso) e CSCG-B (reverso) (figura 8.A). Os fragmentos VH e VL produzidos e purificados foram utilizados como molde para a reação de sobreposição promovida por uma sequência nucleotídica codificadora de um peptídeo ligante (*short linker*) presente nos oligonucleotídeos CkJo-B (VL) e CSCVHo-F (VH). Novos Oligos CSC-F (senso) e CSC-B (reverso) externos ao fragmento sobreposto foram utilizados para amplificação de um fragmento de aproximadamente 750pb (figura 8 B). O volume total de amplificação foi separado em gel de agarose e os produtos foram purificados do gel utilizando *kit* de purificação para produtos de PCR para eliminação dos componentes das reações de amplificação e sobreposição, prováveis contaminantes para a ligação do fragmento scFv no vetor de expressão.

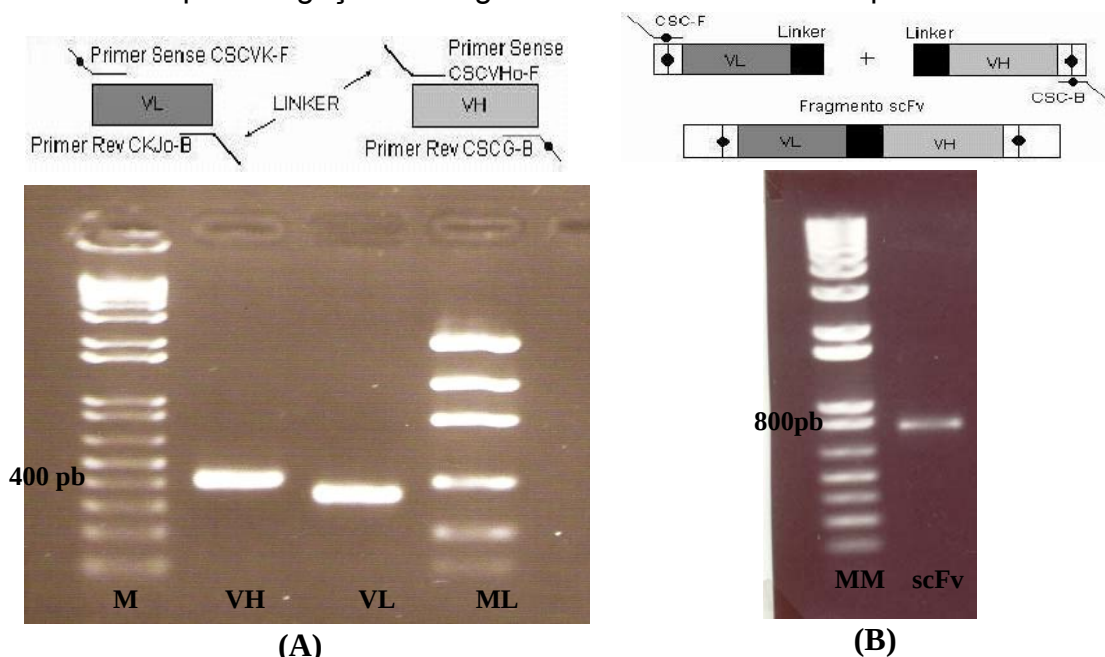


Figura 8. Análise dos fragmentos obtidos por PCR (A) Fragmentos gênicos das cadeias leve e pesada amplificadas e purificadas. M – marcador de massa molecular 100pb, ML (mass ladder). (B) Análise em gel de agarose 1% do fragmento scFv purificado. MM – Marcador de massa molecular 1Kb.Plus (invitrogen)

Construção da biblioteca combinatorial de anticorpos (scFv) fusionados à proteína 3 de fagos filamentosos.

Para a construção da biblioteca, foi utilizado o vetor pComb3X (figura 9) digerido com a enzima *Sfi* I, a mesma enzima utilizada na digestão dos fragmentos scFv purificados do gel de agarose. Os fragmentos digeridos foram purificados do gel de agarose a fim de eliminar os resíduos de enzima que comprometem a eficiência da ligação. Os fragmentos foram então clonados no vetor. A eficiência de ligação não foi avaliada neste trabalho, mas nas mesmas condições, Lima (2005) observou uma eficiência de cerca de $3,0 \times 10^4$ clones/ μ g de DNA, enquanto Maranhão (2001) obteve uma eficiência de $8,3 \times 10^7$ clones/ μ g. A grande variação observada pode ser devido à qualidade dos reagentes utilizados principalmente enzima de restrição e ligação. Neste caso é recomendada uma ligação teste anterior a uma ligação de todos os fragmentos, pois falhas durante esta fase significam menor variabilidade de sua biblioteca.

Para garantir um mínimo de eficiência da ligação, afim de não, perder variabilidade, optamos por fazer duas reações de ligação que foram misturadas para a utilização na construção da biblioteca. Parte da reação de ligação foi analisada em gel de agarose 1% e podemos observar uma eficiência satisfatória de ligação com quase nenhuma sobra de fragmento scFv no gel (figura 10). O volume total da ligação foi dividido em alíquotas de 3 μ L utilizadas para cada transformação em XL1-Blue eletrocompetente em um total de cinco transformações para teleóginas e oito para larvas. O tamanho observado da biblioteca utilizando todo o sistema de ligação foi de aproximadamente $3,0 \times 10^6$ ufc/ml.

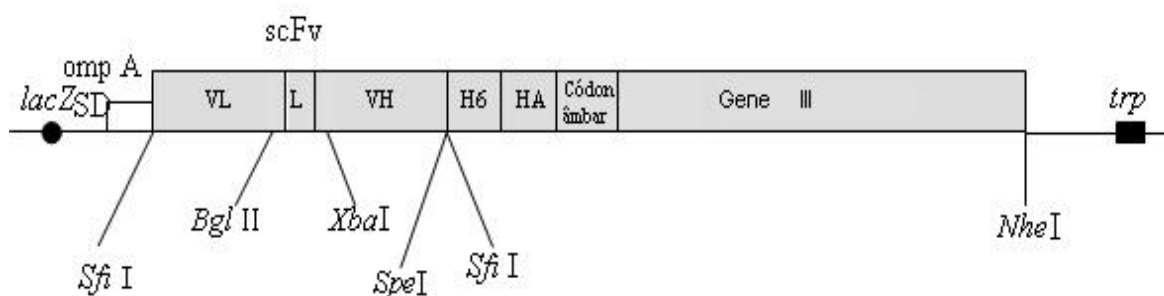


Figura 9. Representação esquemática do vetor Pcomb3X. (H6) região com seis histidinas utilizada para purificação do fragmento em coluna de Níquel. (HA) epítipo de hemaglutinina que possibilita a detecção por anticorpos anti-HA, Códon âmbar (TAG) que dependendo da linhagem bacteriana utilizada permite a produção do fragmento scFv solúvel.

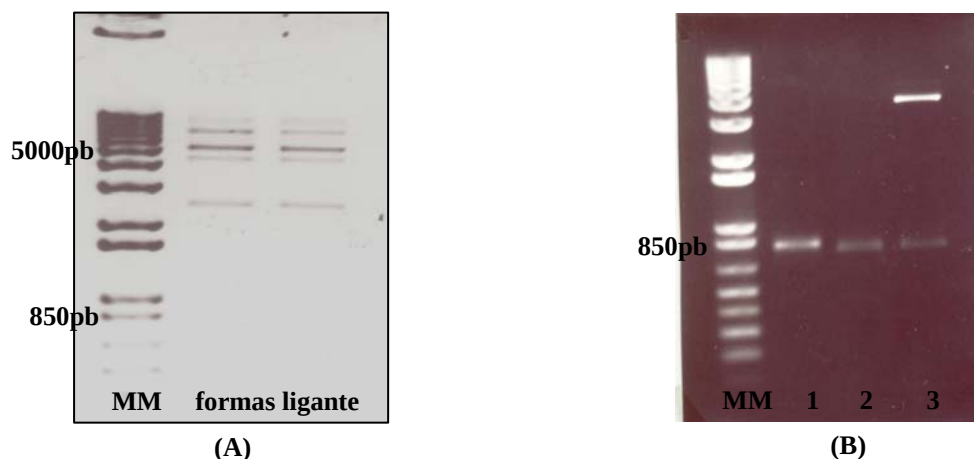


Figura 10. (A) Análise em gel de agarose 1% das formas ligantes obtidas da ligação do fragmento scFv ao vetor pComb3X. (B) 1-Fragmento scFv antes da restrição com *Sfi* I; 2- Fragmento scFv depois da restrição com *Sfi* I; 3- Vetor pComb3X depois da restrição com *Sfi* I para liberação do fragmento scFv (anticorpo B10 controle) MM – Marcador de massa molecular 1Kb.Plus (invitrogen)

Seleção da biblioteca combinatorial de anticorpos contra antígenos totais de larvas e teleóginas imobilizados em placas de microtitulação (*biopanning*)

Esta fase do processo de construção da biblioteca de anticorpos teve como objetivo a seleção dos clones gerados contra antígenos desejados. As galinhas utilizadas para a imunização não eram livres de patógeno e nem o ambiente no biotério era estéril. Sendo assim, as galinhas entraram em contato com uma infinidade de microorganismos (vírus e bactérias) presentes no ambiente, alimentos e água. Este contato gera uma resposta imunológica contra estes organismos e consequentemente a amplificação de fragmentos gênicos de anticorpos indesejados.

A afinidade e enriquecimento dos clones imunoreativos foram feitos por meio de cinco ciclos de seleção sobre proteínas totais imobilizadas em placas de microtitulação. Isto permitiu o reconhecimento dos antígenos pelos anticorpos imunoreativos e sua posterior amplificação pela infecção de *E. coli*. Foi observado durante os ciclos de seleção um aumento da quantidade e especificidade dos clones às proteínas alvo, pois mesmo aumentando a estringência da reação (quantidades de lavagens em cada ciclo) ocorreu enriquecimento dos clones (tabela 1).

Tabela 1. Seleção por cinco ciclos, de fragmentos scFv de galinha contra proteínas totais de larva e teleóquina adsorvidas em placa de microtitulação, demonstrando títulos de entrada e saída e as condições de estringência das lavagens em cada ciclo

Ciclos (Rounds)	Proteínas (µg)	Teleóquinas		Larvas		PBST 0,05%
		Entrada ufc/ml	Saída ufc/ml	Entrada ufc/ml	Saída ufc/ml	
1	250	$9,22 \times 10^{11}$	$3,90 \times 10^5$	$1,21 \times 10^{12}$	$4,00 \times 10^4$	5 X
2	250	$9,99 \times 10^{11}$	$4,08 \times 10^5$	$2,38 \times 10^{12}$	$4,24 \times 10^5$	5 X
3	250	$6,00 \times 10^{11}$	$3,37 \times 10^6$	$1,12 \times 10^{12}$	$2,56 \times 10^6$	10 X
4	250	$4,99 \times 10^{11}$	$1,34 \times 10^6$	$5,40 \times 10^{11}$	$5,56 \times 10^7$	10 X
5	250	$6,3 \times 10^{11}$	$3,40 \times 10^7$	$8,40 \times 10^{11}$	$1,77 \times 10^8$	15 X

Um imunoenensaio com os ciclos 0, 2 e 5 da seleção, foi realizado para demonstrar a especificidade dos clones às proteínas alvo. Para isto foram utilizando 15 µg/ mL de proteínas totais/poço, 10^{10} ufc de fagos como anticorpos primários e Anti-M13 marcado com peroxidase como anticorpo secundário, revelados com OPD. A leitura (OD) observada evidenciou um aumento da reatividade (afinidade) dos clones durante os ciclos de seleção contra proteínas totais para as duas fases do parasita (figura 11). Nenhuma reação inespecífica ocorreu entre as proteínas de carrapato e anticorpo Anti-M13 como demonstra a baixa leitura do branco (BR-ausência de clones scFv). A baixa leitura do controle negativo (fago selvagem M13) mostra que durante o processo de seleção dos clones contra as proteínas totais de larvas e teleóquinas, não houve interação entre proteínas do fago e proteínas do carrapato, demonstrando apenas a ligação entre os fragmentos de anticorpos e os antígenos desejados.

Pequenas interações entre proteínas podem ocorrer durante este processo, mas a técnica do *phage display* visa por meio dos ciclos de seleção contra antígenos alvos sob condições de estringência adequadas, a prevalência apenas dos clones fortemente reativos, ou seja, interações antígeno – anticorpos recombinantes.

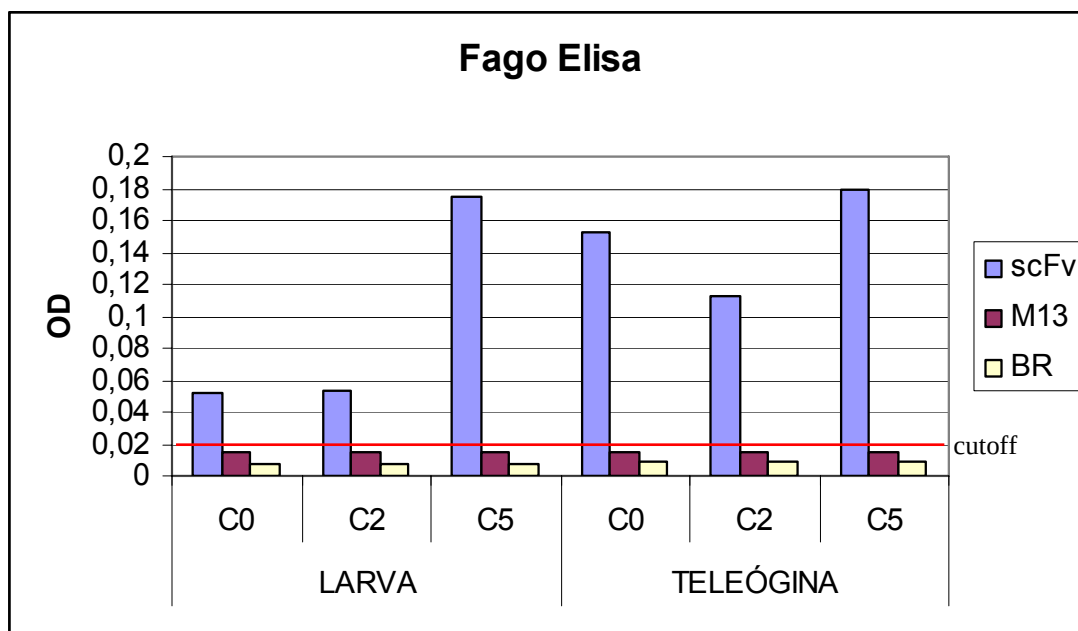


Figura 11. Imunoensaio dos clones dos ciclos 0, 2 e 5 contra proteínas totais de larvas e teleóginas. (C) ciclos de seleção. Foi utilizado como controle o fago selvagem M13. (BR) branco da reação (omissão dos clones scFv).

Análise dos clones selecionados por *dot blot*

O objetivo deste ensaio foi selecionar e avaliar a expressão dos fragmentos scFv indiretamente pela observação da expressão do epítipo da hemaglutinina (HA) fusionada ao anticorpo clonado no vetor pComb3X. O reconhecimento deste epítipo de hemaglutinina pelo anticorpo monoclonal Anti-HA reflete a correta expressão deste epítipo e consequentemente, pela sua proximidade ao fragmento scFv, podemos inferir sobre a integridade de todo o sistema de expressão.

Os clones obtidos do 5º ciclo de seleção foram cultivados individualmente em placas do tipo deep well. Após o crescimento dos clones, foi adicionado IPTG como indutor da expressão das proteínas heterólogas no sobrenadante da cultura. Os fragmentos scFv solúveis foram analisados por ensaio de *dot blot* em membrana de nitocelulose (figura 12). Podemos observar uma heterogeneidade da expressão de hemaglutinina dos clones scFv, mas a maioria dos clones tiveram níveis de expressão detectáveis visualmente. Os clones que apresentaram maior reatividade foram selecionados para reação de sequenciamento.

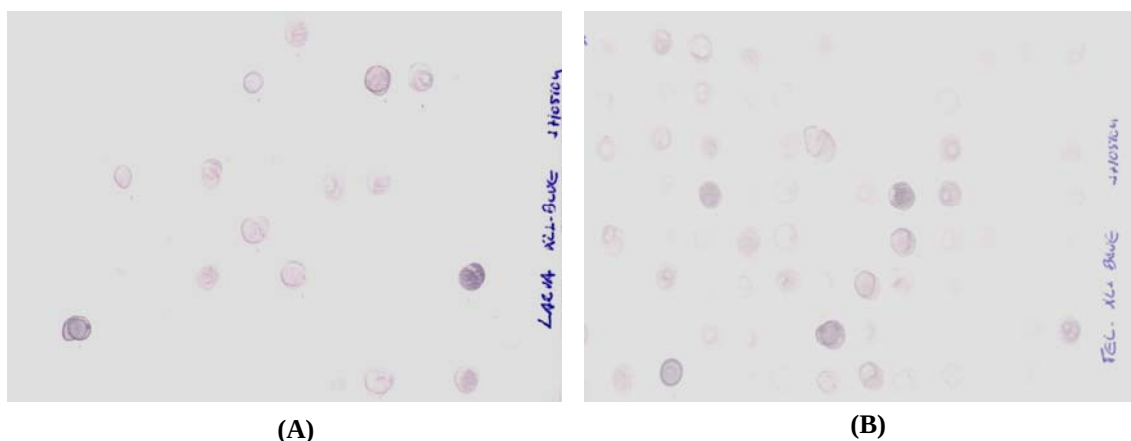


Figura 12. Análise por *dot blot* dos clones expressando fragmentos scFv de larvas (A) e teleóginas (B) em membrana de nitrocelulose

Sequenciamento e análise dos clones isolados

Todos os clones (larva e teleóquina) com expressão detectável de hemaglutinina, observados no ensaio de *dot blot* foram utilizados para reação de sequenciamento. O DNA para a reação de sequenciamento foi extraído segundo protocolo para preparação de DNA plasmidial em placa de microtitulação. As amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% para avaliação da qualidade e quantificação. Cada placa contendo amostras de DNA foi seqüenciada utilizando o iniciador mmB4 (extremidade 5' do fragmento scFv) e mmB5 (extremidade 3' do fragmento scFv). As reações foram injetadas no seqüenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences). Foi observada uma baixa qualidade das seqüências atribuídas possivelmente a problemas na extração do DNA com alguns contaminantes ou no próprio equipamento. Devido a estes problemas não foi possível determinar todas as CDRs presentes em todos os clones. Após o sequenciamento, as seqüências foram analisadas utilizando o programa Blastx e a seqüências protéicas alinhadas pelo programa Clustalw (tabela 2).

Observamos pelo sequenciamento que, no quinto ciclo de seleção houve uma predominância de determinados tipos de seqüências nos clones, um fator importante quando se utiliza este tipo de técnica para caracterização de novos antígenos, onde se espera a maior variabilidade possível para a caracterização do maior número de antígenos. Sequenciando o ciclo zero, constatamos a predominância das seqüências observadas no quinto ciclo de seleção (Dados não

mostrados) o que reforça a baixa variabilidade dos fragmentos scFv e logicamente, da biblioteca. Pelo resultado do imunoensaio (figura 11), podemos observar que no ciclo zero (antes da seleção contra as proteínas alvo), os fragmentos scFv, principalmente em teleógina, reconheceram com certa intensidade as proteínas totais. Uma predominância de certas proteínas presentes no extrato bruto de larvas e teleóginas poderiam estar interferindo na imunização provocando uma imunodominância e conseqüentemente um aumento da expressão gênica para fragmentos específicos amplificados, clonados e selecionados durante a construção da biblioteca. Sendo esta hipótese verdadeira, uma menor influência entre os antígenos, seria sentida pela construção e seleção de bibliotecas tecido-específica.

Alguns autores relatam problemas de crescimento celular nas culturas que expressam proteínas de fusão. O que poderia ocasionar uma relativa tendenciosidade da biblioteca, que passaria a expressar, preferencialmente, as formas mais toleradas pela bactéria (Kenan *et al.*, 1994). Outro problema é a instabilidade observada em bibliotecas que apresentam alguns tipos de anticorpos e durante os passos de amplificação que envolve processo de transfecção viral (Rapoport *et al.*, 1995, citado por Brígido & Maranhão, 2002), favorecendo então alguns tipos de anticorpos durante a seleção.

Mesmo com baixa variabilidade, o número de clones gerados foi suficiente para utilização na descoberta de antígenos do carrapato bovino *B. microplus*.

Tabela 2. Alinhamento das cadeias variáveis pesadas e leves dos clones do 5º ciclo de seleção com antígenos totais de larva (L) e teleógena (T). Em vermelho as *frameworks*. Em preto CDRs

Alinhamento das cadeias pesadas seqüenciadas do 5º ciclo de seleção		
SSRSSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRHTKYGAA-VQG...	YFCAKGTSGYSNSVGEIDVWG	(T2H)
SSRSSAVTLDESEGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRHTKYGAA-VQG...	YFCAKGTSGYSNSVGEIDVWGHGTE	(L11H)
SSRSSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRHTKYGAA-VQG...	YFCAKGTSGYSNSVGEIDVWGHGTE	(L8D)
SSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRHTKYGAA-VQG...	YFCAKGTSGYSNSVGEIDVWGHGTE	(T3C)
SSRSSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRHTKYGAA-VQG...	YFCAKGTSGYSNSVGEIDVWGHGTE	(T6G)
SSRSSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRHTKYGAA-VHV...	YFCAKGTSGYSNSVGEIDVWGHGTE	(L11F)
SSRSSAVTLDESEGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRHTKYGAA-VQG...	YFCAKGTSGYSNSVGEIDVWGHGTE	(T1E)
SSRSSAVTLDESEGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRHTKYGAA-VQG...	YFCAKGTSGYSNSVGEIDVWGHGTE	(T7F)
SSRSSAVTLDESEGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRHTKYGAA-VQG...	YFCAKGTSGYSNSVGEIDVWGHGTE	(L7A)
SSRSSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGGHTKYGAA-VQG...	YFCAKGTSGYSNSVGEIDVWGHGTE	(T5D)
SSRSSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRHTKYGAA-VQG...		(L10B)
SSRSSAVTLDESGGGLQTPGGPLSLVCKASGFTFSSYGMGWVRQAPGKGLEFVAGIRRSGSSTYYGAA-VQG...	YFCAKGTSGYSNSVGVIDVWGHGTE	(T5F)
SSRSSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAGISNTGRRTKYGRGAVQG...	YFCAKGTSGYSNSVGVIDVWGHGTE	(T5C)
SSRSSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMYWVRQAPGKGLEFVAG		(L9B)
Alinhamento das cadeias leves seqüenciadas dos 5º ciclo de seleção		
GETVKITCSGGGSSYYG--WFQKAPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSA--GIFGAGTNLTVLG		(T2H)
GETVKITCSGGGSSYYG--WFQKAPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSA--GIFGAGTNLTVLG		(L11H)
GETVKITCSGGGSSYYG--WFQKAPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSA--GIFGAGTNLTVLG		(T3C)
GETVKITCSGGGSSYYG--WFQKAPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSA--GIFGAGTNLTVLG		(T5F)
GETVKITCSGGGSSYYG--WFQKAPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSA--GIFGAGTNLTVLG		(T6G)
GETVKITCSGGGSSYYG--WFQKAPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSA--GIFGAGTNLTVLG		(L11F)
GETVKITCSGGGSSYYG--WFQKAPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSA--GIFGAGTNLTVLG		(T5C)
GETVKITCSGGGSSYYG--WFQKAPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSA--GIFGAGTNLTVLG		(T1E)
GETVKITCSGGGSSYYG--WFQKAPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSA--GIFGAGTNLTVLG		(T7F)
GETVKITCSGGGSSYYG--WFQKAPGSAPVTLIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSA--GIFGAGTNLTVLG		(L7A)
GETVEITCSGGSGSYG--WFQKSPDSAPVTVIYSNNQRPSNIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSFDRGTGGNVGIFGAGTT		(L8D)
GETVEITCSGGSGSYG--WFQKSPDSAPVTVIYSNNQRPSNIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYFCGSFDRGTGGNVGIFGAGTTLTVLG		(T12G)

CONCLUSÕES

Uma biblioteca de anticorpos scFv apresentada em fagos foi construída com sucesso a partir de fragmentos gênicos amplificados das cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas geradas pela imunização de galinhas com proteínas totais das fases larval e adulto de carrapato bovino.

A biblioteca teve uma baixa variabilidade das seqüências da cadeia leve e pesada observada nos clones seqüenciados com uma predominância de Regiões Determinantes de Complementaridade (CDR) idênticas nas duas construções (larva e adulto).

O imunoensaio confirmou a afinidade dos fragmentos scFv às proteínas totais das fases larval e adulta de carrapato bovino demonstrando a validade do processo de seleção

BIBLIOGRAFIA

Angus, B.M. The history of the cattle tick, *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. Int J Parasito, 26: 1341–1355. 1996

Arakawa, H. Furusawa, S., Ekiro, S., Yamagishi, H. Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal center. Embo J., 15; 15(10): 2540-2546. 1996.

Arthur, D.R. Ticks. A monograph of the Ixodoidea. On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomna* *Boophilus* and *Margaropus*. London. Cambridge Univ. Press, 1960.

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.

Bowman, A.S., Dillwith, J.W. and Sauer, J.R. Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. Parasitol Today 12: 388–396, 1996.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. Analytical Biochem., 72, 248-254, 1976.

Brígido, M.M., Maranhão, A.Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 26, 2002.

Cotton, E.C. Tick eradication. Bull.Agric.University Tenn.,81:53-71, 1908.

Cotton, E.C. The North American Fever tick. Agric. Exp. Sta., 113: 33-67, 1915

Da Silva Vaz Jr., I. Termignoni, C., Masuda, A., Oliveira, P. Vacina contra garrapato. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.13, 18-23, 2000.

Dantas-Barbosa, C.; Lima, L.M.; Albuquerque, F.C.; Costa, C.S.; Vieira, P.M.M.M.; Brígido, M.M.; Maranhão, A.Q. Bibliotecas Combinatórias de Anticorpos

Apresentadas em Fagos – Construção e Utilização. Biosci. J., Uberlândia, Especial, 17-29, 2004.

Diehl, P.A .; Aeschlimann, A .; Obenchain, F.D. Tick reproduction: oogenesis and oviposition, In: Obenchain, F.D. & Galun, R. Physiology of ticks. Pergamon Press Ltda 1st, Oxford, 77-349, 1982.

Evans, D.E. Ecologia e o carrapato *Boophilus microplus*. In: Seminário Nacional parasitoses dos bovinos. Campo Grande, MS. EMBRAPA/CNPQC, 217-229, 1979.

Ferreira, A.P., Teixeira, H.C. Tópicos de imunologia básica. Juiz de Fora, 83p
Furlong, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG. n. 8, 46-61, 1993.

Furlong, J.; Martins, J.R.; Prata, M.C.A . Controle estratégico do carrapato dos bovinos. A Hora Veterinária, v. 23, n. 137, 53-56, 2004.

González, J.C. O controle do carrapato dos bovinos. Porto Alegre, Sulina, 103p, 1975.

Grisi, L.; Massard, C.L.; Moya Borja, G.E.; Pereira, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. A Hora Veterinária, v. 21, n. 125, 8-10, 2002.

Horn, S.C.; Artech, C.C.P. Carrapato, berne e bicheira, inquérito nacional, 1983, divulgado pelo Ministério da Agricultura, Brasília, maio de 1984.

Holliger, P., Williams R.L. Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: evidence for conformational lability. Journal of Molecular Biology. 288. 649-657. 1999.

Hoogenboom, H.R., Winter, G. By-passing immunization. Human antibodies from synthetic repertoires of germlines VH genes segments rearranged *in vitro*. J. Mol. Biol. 227 :381-388, 1992.

Ivancovich, J.C. Biología de la garrapatas del Ganado *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888). Ver. Invest. Agropec. Ser. Patol. Buenos Aires, Argentina, 12(1): 1-54, 1975.

Kenan, D.J., Tsai, D.E., Keene, J.D. Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries. Trends Biochem. Sci., 19:57-63, 1994.

Legg, J. Some observations on the life history of the cattle tick (*Boophilus australis*). Proc. R. Soc. Queensland, 41, 121-132, 1930.

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, 80, 896-902, 1999.

Lima, L. M. Caracterização molecular e imunológica de anticorpos desenvolvidos contra proteínas de nematóide de galhas de raiz. Tese de doutorado. Brasília-DF. 122p, 2005.

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

Mansikka, A., Sandberg, M., Lassila, O., Toivanen, P. Rearrangement of immunoglobulin light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of fabricius. Immunology, 87, 9416-9420, 1990.

Maranhão, A. Q. Utilização de bibliotecas apresentadas em fagos para seleção de anticorpos ligantes a ácidos nucleicos. Tese de Doutorado. UnB, Brasília DF, 167p, 2001.

Nuñez, J.L.; Cobeñas, M.E.M.; Moltedo, H.L. *Boophilus microplus*, La garrapata comum del ganado vacuno. Hemisfério Sur 1a Ed. Bs. Rep. Argentina, 184p, 1982

Pereira, M.C. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): revisão taxionômica e morfobiológica. Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo, 123p, 1980.

Rader, C., Steinberg, P., Barbas III, C.F. Selection from antibody libraries. In Phage Display – a laboratory manual. 1a Edition. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 10.1-10.9, 2000.

Rapoport, B., Portolano, S., McLachlan, S.M. Combinatorial libraries: new insights into human organ specific autoantibodies. Immunology today, 16: 43-49, 1995.

Ratcliffe, M.J.H. & Jacobsen, K.A. Rearrangement of immunoglobulin genes in chicken B cell development. Seminars in immunology, 6, 175-184, 1994.

Reynaud, C.A., Anquez, V., Grimal, H., Weil, J.C. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. Cell. 48: 379-388, 1987.

Reynaud, C.A., Dahan, A., Anquez, V., Weil, J.C. Somatic hiperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region. Cell, 5, 171-183, 1989.

Riek, R.F. Studies on the reaction of animals to infestation with ticks. V. Laboratory animals as hosts for cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). Austral. J. Agric. Res., n. 10, 614-619, 1959.

Rocha, U.F.; Banzatto, D.H.; Costa, A. J.; Galluzzi, F.D.; Garcia, M.C.C.; Faleiros, R.B.; Vidotto, O. Nova técnica de cubagem para estudo de correlações entre

volume e peso de carrapatos e sua longevidade e prolificidade. Sêmima, v. 6, n. 2, 69-74, 1985.

Rodriguez, M., Massard, C.L., Fonseca, A.H., Ramos, N.F., Machado, H. , Labarta, De La Fuentes, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestation of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred-cattle in Brazil. Vaccine, 13: 1804-1808, 1995

Sachdev S. S. & Fellouse F. A., Synthetic therapeutic antibodies. Nature chemical biology, 682-688, 2006.

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

Smith , G.P. Surface display and peptide libraries. Gene. 128:1-2,1993

Smith , G.P. & Scott, J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. Methods of Enzymology, 217, 228-257,1993.

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

Teixeira Leite, N.; Ariza, A.T.O.; Gianini, M.C.; Miranda, M.A. Alguns prejuízos que os carrapatos bovinos (*Boophilus microplus*) podem causar. Ecosistema, v. 16, 137-141,1991.

Walker, A.R. Estudios inmunologicos em relación al control de garrapatas. In: Semin. Intern. Med. Bovina 4 Memorias, 80-87, 1987

Weill, J.C.& Reynaud, C.A. The chicken B cell compartment. Science 238: 1094-1098, 1987.

Wharton, R.H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: PAL, R. & WHARTON, R.H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. Plenum Press, London, 1974.

Wilkinson, P.R. Observation on the sensory physiology and behavior of larvae of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae). Austral. J. Zool., v. 1, 345-356, 1953.

Wyngaardt, W.V., Malatji, T., Mashau, C., Fehrsen, J., Jordaan, F., Miltiadou, D.R., Plessis, D.H. A large semi-synthetic single-chain Fv phage display library based on chicken immunoglobulin genes. BMC Biotechnology, 2:(4), 1-44, 2004.

CAPÍTULO II

UTILIZAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS APRESENTADA EM
FAGOS PARA ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE ALVOS PROTÉICOS PARA
O CONTROLE DO CARRAPATO BOVINO (*Boophilus microplus*)

RESUMO

Uma biblioteca de anticorpos scFv recombinantes apresentada em fagos filamentosos foi utilizada para análise e caracterização de alvos protéicos contra o carrapato bovino. Uma proteína com alta similaridade a proteína GP80, similar a vitelina, uma abundante proteína encontrada nos ovos de parasitas adultos e larvas, foi reconhecida pelos anticorpos (Fragmentos scFv) nos testes de western blot e sua seqüência foi determinada por sequenciamento N-terminal. Os mesmos clones foram utilizados para seleção de epitopos, em uma biblioteca de peptídeos construída de sete resíduos flanqueados por duas cisteínas (C7C) expressos em fagos, para obtenção de peptídeos miméticos às proteínas de carrapato. O resultado obtido foi confirmado com a identificação, pelo Fragmento scFv, de motivos protéicos (GP80 e outras proteínas definidas como promissores imunógenos como receptores de serotonina, antígeno B de membrana e outras), expressos na biblioteca de peptídeos recombinantes C7C. A vitelina e outras proteínas já descritas por alguns autores como sendo promissores antígenos vacinais, aqui neste experimento aparecem melhor caracterizada, com regiões imunogênicas reconhecidas por afinidade ao anticorpo recombinante gerado por phage display. Os resultados demonstram a eficiência da utilização de bibliotecas scFv na seleção de novos alvos protéicos contra o carrapato bovino.

Palavras-chave: Phage display, biblioteca de anticorpos, biblioteca de peptídeos, *Boophilus microplus*.

ABSTRACT

With the objective of selecting and characterizing new ticks vaccine targets, we developed a combinatorial antibody fragment library (scFv), expressed in the capsid of bacteriophages, produced from tick larval and adult protein immunized chicken Ig repertoire. These antibodies (scFv) recognize a protein of the total larval and adult's extract of the proximally 80 Kd, by western blotting tests, and the sequence of these reactive proteins was checked by N-terminal sequencing. The band corresponded to a GP80 protein with high similarity and is found in huge quantities in parasite eggs and larval stages. With the objective of selecting mimotopes of *B. microplus* by phage displayed epitope characterization, the recombinant antibodies with major frequency were submitted to a selection against a constricted peptide library displayed on phages. The cross reactivity was confirmed by the recognition of one of those recombinant antibodies (scFv) to a motif similar to GP80 sequence and others peptide (Serotonin receptor, Notch-like protein, Paramiosin and Antigen B membrane) obtained from peptide library selection. This work confirms the GP80 as a vaccine candidate and points out the usefulness of phage display methodology for selection of new represents the selection efficiency of new *B. microplus* vaccine targets.

Keywords: Phage display, antibodies library, peptide library, *Boophilus microplus*.

INTRODUÇÃO

Várias são as formas de controle do carrapato, porém a mais praticada pelos produtores rurais é o controle químico quando o número de parasitas no rebanho é visivelmente elevado, com perdas significativas na produção e na maioria das vezes não sentida ainda pelo produtor rural. As dificuldades no uso de produtos químicos, entretanto, têm aumentado cada vez mais, pois os carrapatos têm desenvolvido rapidamente resistência aos diferentes princípios ativos utilizados nos carrapaticidas.

Em média as diferentes bases químicas utilizadas para o controle do carrapato apresentam uma vida útil de pouco mais de uma década, quando quase que a totalidade das populações de carrapato presentes no campo apresenta resistência à droga utilizada (Da Silva Vaz Jr. *et al.*, 2000).

Os custos para desenvolvimento de novas drogas, o curto período de vida útil dos carrapaticidas, a crescente exigência do mercado consumidor por alimentos sem resíduos químicos e a preocupação com o meio ambiente tem despertado o interesse no desenvolvimento de novos métodos de controle (Rodriguez *et al.*, 1995).

O controle imunológico é uma alternativa, pois o uso de vacinas reúne algumas vantagens quando comparada aos produtos químicos como: melhor relação custo/benefício, segurança tanto para o aplicador quanto para o consumidor, nenhuma contaminação ambiental e ausência de período de carência após a aplicação, fator importante principalmente na pecuária de leite (Da Silva Vaz Jr. *et al.*, 2000).

Os antígenos que são oferecidos ao hospedeiro durante o parasitismo, ou seja, antígenos específicos da saliva do carrapato apresentam baixa eficiência, pois mecanismos de escape da resposta imune são largamente utilizados pelo carrapato, aprimorados durante sua coevolução com o hospedeiro (Willadsen, 1999).

Um novo conceito (antígeno oculto) surgiu, para definir uma ou mais proteínas imunogênicas do parasita, que durante a infestação, não são apresentadas ao sistema imune do hospedeiro e portanto não induzem resposta imune natural, mas que se administrada artificialmente, produziriam anticorpos e

outros elementos efetores que poderiam provocar, quando ingeridos, danos ao parasita, teoricamente mais eficaz que uma resposta imune natural (Willadsen e Kemp, 1988). Vários antígenos estão sendo estudados, na tentativa de desenvolver uma vacina eficaz. Neste caso o caráter poli-antigênico de uma vacina passa a ser interessante, causando danos em vários órgãos aumentando sua eficácia no controle do parasita.

Um destes antígenos responsáveis por lesões intestinais foi purificado e caracterizado, recebendo a denominação de Bm86. Trata-se de uma glicoproteína de 89 kDa e ponto isoelétrico de 5.1 a 5.6 (Willadsen *et al.*, 1989). Rand *et al.* (1989) isolaram e caracterizaram o cDNA que codificava a Bm86. A sequência de nucleotídeos do cDNA continha 1982 pares de base que precediam os 650 aminoácidos da Bm86, dos quais 10% eram cisteínas. Esta sequência tinha grande afinidade com o precursor do fator de crescimento epidérmico e a Bm86 poderia ter alguma função semelhante a este fator só que nas células intestinais. Esta proteína foi clonada e expressa em *Escherichia coli*.

A Bm86 está localizada nas microvilosidades da membrana das células epiteliais do intestino e pode ter alguma função diretamente relacionada à pinocitose (Gough & Kemp, 1993). Willadsen *et al.* (1995) verificaram que a Bm86 está presente nas larvas, ninfas e adultos, mas em bovinos vacinados com esse antígeno, os carrapatos adultos são os mais afetados principalmente as fêmeas após o repasto sangüíneo.

A vacina, composta pela Bm86 e adjuvante oleoso, é produzida em larga escala na Austrália, por engenharia genética em *E. coli* e tem o nome comercial de TickGard (willadsen *et al.*, 1995). Fêmeas ingurgitadas provenientes de animais vacinados apresentaram danos significantes, como resultado da resposta imunológica. A mesma Bm86 clonada em *Pichia pastoris* associada a um adjuvante oleoso tornou-se a segunda vacina contra carrapatos comercialmente utilizada, com o nome de Gavac. Um novo adjuvante, *Vaximax*, foi utilizado na composição da vacina com Bm86, comercialmente chamada de TickGard Plus, que possui uma maior eficácia induzindo a produção de títulos mais altos de anticorpos (Willadsen, 1997).

Estas vacinas comerciais em testes de campo realizados no Brasil, entretanto, apresentaram uma eficácia moderada havendo a necessidade da aplicação concomitante de produtos químicos.

Willadsen (1997) sugeriu que o futuro das vacinas dependeria do reconhecimento de antígenos alvos específicos, ou seja, a eficácia das vacinas estará ligada às características da espécie de parasita, em particular do sistema digestivo.

Mais recentemente, três peptídeos sintéticos (SBm4912, SBm7462 e SBm19733) derivados da Bm86 foram construídos e utilizados para a imunização de animais. Os peptídeos foram inoculados nos animais com saponina como adjuvante. Os melhores resultados de eficácia, 81,05%, foram obtidos com o peptídeo sintético SBm7462 (Patarroyo *et al.*, 2002)

Bm91, em glândulas salivares (Riding *et al.* 1994); O antígeno BMA7, similar a mucinas de vertebrados (Mckenna *et al.*, 1998); Bm95 (García-García, 2000); BYC (*Boophilus* *Yolk pro-Cathepsin*), isolado de ovos (Logullo *et al.*, 1998); proteína inibidora de serino-proteases (BMTI) (Andreotti *et al.* 2002), Antígeno B (Willadsen, 2001), também já foram isoladas e testadas como antígenos vacinais com eficiência moderada no controle.

Uma vitelina, proteína presente em maior quantidade nos ovos do *B. microplus* foi isolada e purificada, assim como a proteína GP80 que foi purificada de larvas. Anticorpos produzidos contra estas duas proteínas reconhecem um polipeptídeo de 200 kDa presente na hemolinfa de fêmeas adultas de carrapato. Ovinos vacinados com estas proteínas tiveram redução no número e no peso das fêmeas de carrapatos ingurgitadas e também redução na oviposição (Tellam *et al.*, 2002).

Neste trabalho, uma nova abordagem para identificação de novas proteínas ou peptídeos para o controle do carrapato bovino vem sendo desenvolvida por nosso grupo no Laboratório de Genética Molecular, no Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. A metodologia utiliza uma biblioteca de anticorpos apresentada em fagos para análise e caracterização de novos alvos protéicos para o controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*) selecionados a partir de uma biblioteca comercial de

peptídeos recombinantes apresentada na superfície de fagos filamentosos (*peptide phage display libraries*).

Biblioteca de peptídeos apresentados em fagos (*Peptide Phage Display Libraries*)

A metodologia consiste em uma técnica de seleção na qual um peptídeo ou proteína é expresso fusionado a uma proteína do capsídeo de um bacteriófago e permite a seleção de uma grande variedade de peptídeos ligantes a moléculas alvo. A biblioteca de peptídeos ou proteínas com as seqüências randomizadas é expressa no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada seqüência encontra-se no genoma viral (Parmley & Smith, 1988). Com isto, é possível a correlação entre cada seqüência da proteína variante e sua respectiva seqüência de DNA, facilitando sua caracterização baseada na afinidade de ligação a outras moléculas como anticorpos.

Foram expressos na superfície viral, além de peptídeos (Noren & Noren, 200) e anticorpos (Barbas *et al.*, 1992; Hoogenboom, 1997; Rader *et al.*, 1997), enzimas (Soumillion *et al.*, 1994), receptores de superfície celular (Robertson, 1993), entre outras estruturas.

O bacteriófago M13 (Sidhu, 2001), ou simplesmente fago, é um vírus filamentoso que parasita bactérias Gram-negativas, que apresentam pilus F. O vírus 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 fago M13KE, derivado do vetor de fagos m13mp19 possui uma rápida propagação e não necessita de seleção por antibiótico ou superinfecção por fago auxiliar (*helper*). Além disto, o gene *lacZ*, presente neste vetor, facilita a seleção entre colônias bacterianas infectadas com fagos de bibliotecas (colônias azuis) e colônias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (colônias brancas) (Messing *et al.*, 1977; Messing, 1983). O vetor M13KE permite a construção e propagação de bibliotecas de *phage display* pelo uso de técnicas padronizadas para fagos M13. Para pequenos insertos, a biblioteca pode ser amplificada

repetidamente com pouca perda de seqüências e diversidade (Barbas *et al.*, 2001).

O peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago possibilita a seleção de seqüências baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (Parmley & Smith, 1988).

Seleção de ligantes (*Biopanning*)

O *biopanning* é um processo de seleção *in vitro* realizada pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra um alvo imobilizado em um suporte sólido (placas de microtitulação, *beads*, membranas, etc.). Lavagens sucessivas eliminam os fagos não ligantes e fagos com alta afinidade permanecem ligados e são eluídos com soluções tampões adequadas. O *pool* de fagos específicos é amplificado em *E. coli* para serem utilizados nos ciclos posteriores de seleção para enriquecimento e maturação da afinidade ao alvo durante todo o processo (ciclos de ligação, eluição e amplificação). Após três ou quatro ciclos, os clones individuais são caracterizados por seqüenciamento de DNA ou imunoenaios (ELISA e *western blot*) (Figura 13).

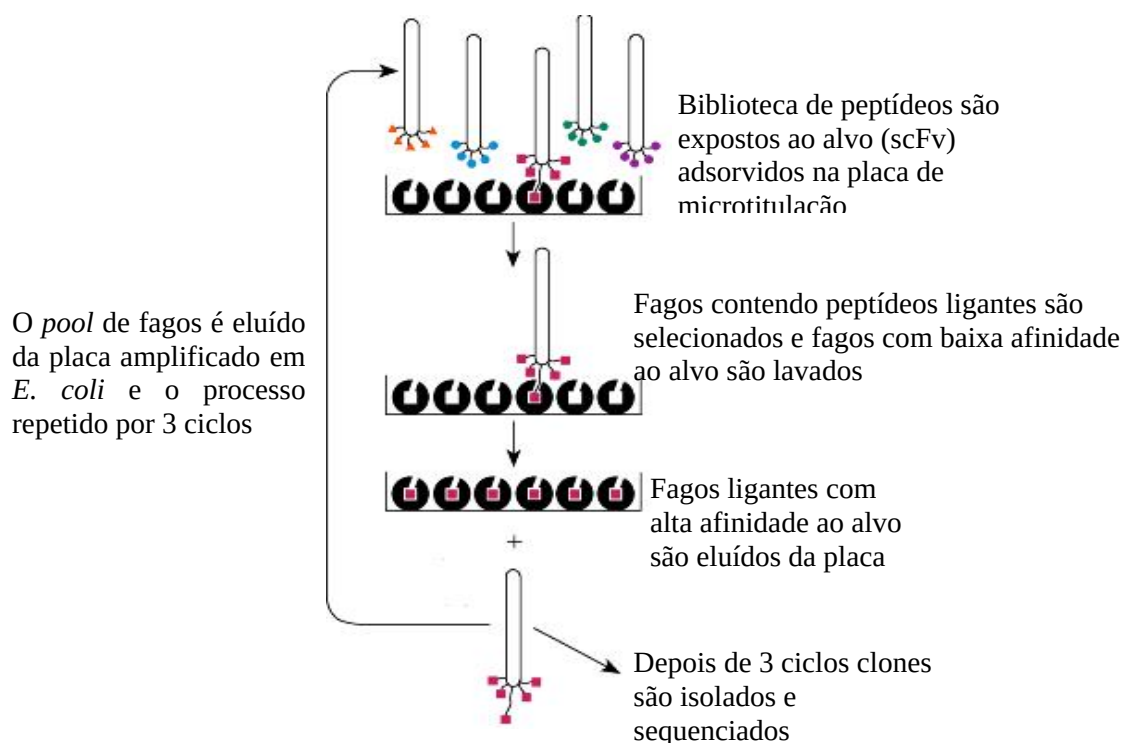


Figura 13. Representação esquemática de um processo de seleção (*biopanning*) de peptídeos contra um alvo (scFv) imobilizado em uma placa de microtitulação

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo principal, a utilização de clones isolados de uma biblioteca de anticorpo scFv, gerada pela imunização de galinhas com proteínas totais de carrapato bovino, para selecionar e caracterizar novos peptídeos que possam ser utilizados como antígenos vacinais na produção de uma vacina recombinante contra o carrapato bovino *Boophilus microplus* . Para isto foi utilizada, como alvo, uma biblioteca comercial de peptídeos randômicos expressos na superfície de bacteriófagos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Biblioteca de anticorpos

Quatro clones foram utilizados como ligantes no processo de seleção com peptídeos randômicos. A escolha destes anticorpos (scFv) foi feita baseada no sequenciamento dos clones, procurando seqüências que tivessem uma variabilidade entre as CDRs, já que observou-se uma baixa variabilidade da biblioteca de anticorpos. O clone L11H foi escolhido por ser o mais representativo da biblioteca, aproximadamente 60% do total de clones com seqüências (VH e VL) completas observada pelo sequenciamento. Esta porcentagem de clones idênticos pode ser maior, pela observação de partes das CDRs das scFv seqüenciadas e não aproveitadas para este experimento pela baixa qualidade do sequenciamento. Os demais clone foram escolhidos pela variabilidade de suas CDRs (tabela 3).

Tabela 3. Representação das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dos fragmentos variáveis de cadeia leve e pesada de quatro clones (L11H, L8D, T5F, T5C) seqüenciados.

Clones	Fragmento variável de cadeia leve			Fragmento variável de cadeia pesada		
	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
L11H	SGGGSSYYG	GSADSSSAGI	ANTNRPSDI	GFTFSDRGMY	ISNTGRHTKYGAA	GTSGYSNSVGEIDV
L8D	SGGSGSYG	SNNQRPSNI	GSFDRTGGNVGI	GFTFSDRGMY	ISNTGRHTKYGAA	GTSGYSNSVGEIDV
T5F	SGGGSSYYG	ANTNRPSDI	GSADSSSAGI	GFTFSSYGMG	IRRS GSSTYYGAA	GTSGYSNSVGVIDV
T5C	SGGGSSYYG	ANTNRPSDI	GSADSSSAGI	GFTFSDRGMY	ISNTGRRTKYGRGA	GTSGYSNSVGVIDV

Ensaio de *western blot* dos clones selecionados

O objetivo deste ensaio foi expressar os anticorpos selecionados para caracterizá-los quanto à capacidade de ligação aos antígenos naturais presentes nas fases de larvas e teleóginas de carrapato bovino. Foram utilizados para transformação, o DNA plasmidial dos quatro clones scFv selecionados. Após a expressão dos anticorpos, 5µL do sobrenadante foi aplicado no gel SDS PAGE 12% conforme Sambrook *et al.*(1989) para avaliação da expressão juntamente com 10 µg de proteínas totais extraídas de larva e teleógina. Após a separação no

gel, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 μ m (*Hybond C*) durante toda a noite a 80 mA em sistema de transferência úmida (Bio-Rad).

Após a transferência a membrana foi bloqueada com solução de BSA 3% em PBS 1X durante 2 horas a temperatura ambiente, sob leve agitação. Para os clones scFv, a membrana foi lavada em tampão PBST 0,05% e colocada em tampão PBS 1X contendo anticorpo Anti-HA produzido em coelho na diluição 1:2500 e incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. A membrana então foi lavada 3 vezes com PBST 0,05% e incubada com anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina por 1h temperatura ambiente. A membrana então foi lavada 3 vezes com PBST 0,05% e APB e a reação foi revelada com o substrato NBT/BCIP e parada com água corrente.

Para as proteínas totais de larva e teleógina, cada “tira” de membrana foi cortada longitudinalmente a fim de ter um número suficiente de amostras para os testes. As membranas (larva e teleógina) foram colocadas separadamente na presença dos clones scFv expressos em meio SB por 2 horas a 4°C sob leve agitação. A membrana foi lavada três vezes em tampão PBST 0,05% e colocada em tampão PBS 1X contendo anticorpo Anti-HA produzido em coelho na diluição 1:2500 e incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. A membrana então foi lavada 3 vezes com PBST 0,05% e incubada com anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina por 1 hora temperatura ambiente, novamente lavada 3 vezes com PBST e APB e a reação foi revelada com o substrato NBT/BCIP e parada com água corrente.

Como controle negativo foi utilizado um anticorpo irrelevante (B10: scFv ligante de DNA, gentilmente cedido pela Prof^a. Dra. Andréa Maranhão, UnB). Uma tira de membrana foi utilizada como Branco (B) da reação, omitindo os clones scFv durante a reação.

Sequenciamento N-terminal

Paralelamente, nas mesmas condições do ensaio de *western blot* anterior, um outro gel SDS PAGE com as mesmas proteínas foi feito e transferido para uma membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride - *Sequi-Blot Membrane for Protein Sequencing*), específica para sequenciamento de proteínas nas mesmas

condições anteriores com modificações no tampão de transferência (NaHCO_3 10mM; Na_2CO_3 3mM; SDS 0,01%; Metanol 20%). A membrana foi lavada em água ultrapura e corada com corante *Pounceau*. A banda desejada foi retirada do gel com o auxílio de um estilete e enviada para o Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para sequenciamento da porção N-terminal em seqüenciador de proteínas (*Shimadzu PPSQ-21A Protein Sequencer*).

Seleção dos peptídeos recombinantes apresentados em fagos (*Peptide phage display libraries*) reativos aos clones scFv

Foi utilizada uma biblioteca de peptídeos de sete resíduos flanqueados por dois resíduos de cisteína (Ph.D.-C7C New England Biolabs) ligados entre si por pontes dissulfeto resultando em um peptídeo com uma conformação mais estável. Este tipo de biblioteca, denominada constrita, tem uma certa estabilidade estrutural, fator este muito importante durante o processo de seleção onde variações na estrutura tridimensional podem acarretar mudanças conformacionais do peptídeo e o não reconhecimento pelo alvo durante os vários ciclos de seleção. Esta biblioteca possui uma complexidade de mais de dois bilhões de clones independentes. Os peptídeos randômicos são expressos na porção N-terminal das cinco cópias da proteína PIII do fago. Isto só é possível graças ao pequeno tamanho do peptídeo fusionado, pois grandes proteínas expressas em todas as cópias da proteína III prejudicariam a infectividade do vírus que necessita da PIII para reconhecimento do Pilus F da bactéria para uma eficiente transfecção do DNA viral. Para a biblioteca de anticorpos aproximadamente três cópias da PIII são requeridas para expressão da proteína fusionada, pois como o tamanho do fragmento é maior, há a necessidade de se manter intactas algumas cópias da PIII afim de não prejudicar a infectividade do vírus. A biblioteca de peptídeos contém uma seqüência ligante (Gly-Gly-Gly-Ser) entre o peptídeo randômico e a proteína PIII do fago.

Aproximadamente 50 μL de meio de cultura SB foram colocados em 3 poços de uma placa de microtitulação (Maxisorp - Nunc) e incubados a 4°C em câmara úmida durante toda a noite. O meio de cultura foi retirado e a placa foi bloqueada com 250 μL de um tampão de bloqueio (0.1 M NaHCO_3 , pH 8.6, 5

mg/mL BSA) por 2 horas à temperatura de 4°C. O tampão de bloqueio foi retirado e a placa foi lavada seis vezes com TBST (TBS contendo 0.1% Tween-20), para retirada do excesso de proteínas não ligantes. Dez microlitros da biblioteca de peptídeos original (aproximadamente 4×10^{10} fagos) foram diluídos em 100 µL TBST e acrescentados no poço da placa e mantidos sob agitação por 1h a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram eluídos com o auxílio de uma pipeta e colocados nos outros poços contendo meio SB repetindo o mesmo procedimento nos três poços sensibilizados com meio SB.

O objetivo deste procedimento inicial foi apenas a seleção negativa (eliminação) dos fagos da biblioteca de peptídeos ligantes às proteínas do meio de cultura SB. Não foi feita nenhuma amplificação durante este procedimento para não influenciar na variabilidade da biblioteca original. No final do terceiro ciclo desta seleção, obtivemos um pool da biblioteca de peptídeos prontos para a seleção contra os fragmentos de anticorpos.

Uma nova sensibilização da placa foi feita utilizando 50µL de um pool dos quatro clones expressos em meio SB contendo a proteína heteróloga scFv solução e incubados a 4°C em câmara úmida durante toda a noite. A placa foi bloqueada com 250 µL de um tampão de bloqueio (0.1M NaHCO₃, pH 8.6, 5 mg/mL BSA) por 2 h à temperatura de 4°C. A placa foi lavada seis vezes com TBST (TBS contendo 0.1% Tween-20). O eluato da biblioteca de peptídeos reservados do procedimento anterior (seleção negativa) foi adicionado ao poço contendo o pool de anticorpos e mantido sob agitação por 1h a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos pela lavagem dos orifícios da placa por dez vezes com TBST (0.1% Tween-20) no primeiro ciclo de seleção e nos dois ciclos subseqüentes com TBST (0.5% Tween-20). Os fagos ligantes foram eluídos com 100 µL do tampão de eluição (0.2 M glicina-HCl, pH 2.2, contendo 1 mg/mL BSA) por 10 min a temperatura ambiente e imediatamente neutralizados com 15 µL do tampão de neutralização (1 M Tris-HCl, pH 8.0). Alíquotas dos fagos eluídos foram utilizadas para a determinação do título e o eluato remanescente, contendo fagos, foi utilizado para a reamplificação para a próxima passagem, pela infecção em *E. coli* ER2738 segundo protocolo descrito no Kit (*Ph.C7C Phage Display Peptide Library Kit*). Foram realizados três ciclos de

seleção (*biopanning*) para o enriquecimento dos fagos contendo os peptídeos ligantes (figura 13)

Sequenciamento e análise em bancos de dados protéicos dos clones (peptídeos) reativos aos fragmentos scFv.

A obtenção de DNA de bacteriófagos filamentosos foi realizada segundo protocolo descrito no Kit (*Ph.C7C Phage Display Peptide Library*). Colônias azuis obtidas após o terceiro ciclo de seleção, foram transferidas separadamente das placas de meio sólido para microtubos e crescidas em meio LB líquido por 4,5-5 horas. Os tubos foram centrifugados por 5 min/10000 rpm e o sobrenadante transferido para um novo tubo estéril. Os fagos foram precipitados com 20% PEG/NaCl, seguido da adição de iodeto de sódio 4M para ruptura do fago e liberação do ácido nucléico para posterior precipitação com etanol. A qualidade e quantidade do DNA fita simples foi verificada em gel de agarose 0,8 %. O seqüenciamento foi realizado utilizando o *DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences) utilizando o seqüenciador automático capilar MegaBace. Para a reação do seqüenciamento, foi utilizado o iniciador 5' CCCTCATAGTTAGCGTAACG 3' que flanqueia a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionado nos fagos M13.

A seqüência de aminoácidos foi deduzida usando o software DNA2PRO12 <http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>, traduzindo as seqüências nucleotídicas obtidas no seqüenciamento. Este programa é específico para os insertos da biblioteca de peptídeos (*Ph.D.C7C Peptide Phage Display Library*-New England Biolabs). Os alinhamentos foram feitos utilizando o Clustalw e foram feitas análise para homologias BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*) dos peptídeos isolados com as seqüências de *Boophilus microplus* depositadas no GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

Ensaio de *dot blot* para caracterização dos peptídeos selecionados quanto a capacidade de ligação aos fragmentos scFv utilizados na seleção.

O objetivo deste ensaio foi confirmar o reconhecimento dos peptídeos selecionados da biblioteca de peptídeos randômicos pelo *pool* de clones (scFv) selecionados da biblioteca de anticorpos.

Em uma membrana de nitrocelulose (*hybond* C) foram colocados aproximadamente 10^{10} fagos de cada clone (peptídeo) separadamente incubados a temperatura ambiente por alguns minutos até a secagem completa da membrana. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (BSA 3% em PBS 1X) por 2 horas a uma temperatura ambiente. Foram feitas posteriormente três lavagens com PBST (PBS contendo 0.05% Tween-20) e incubada com o pool de scFv expressos em solução no meio de cultura por 1h a 4°C sob leve agitação. A membrana foi lavada três vezes em tampão PBST 0,05% e colocada em tampão PBS contendo anticorpo Anti-HA produzido em coelho na diluição 1:2500 e incubado durante 1 horas a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada 3 vezes com PBST e incubada com anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina por 1h temperatura ambiente, novamente lavada 3 vezes com PBST e APB e revelada com o substrato NBT/BCIP. A reação foi parada em água corrente.

Como controle positivo da reação foi utilizado o meio de cultura dos clones scFv diretamente na membrana para confirmação da expressão e como controle negativo foi utilizado o fago auxiliar VCSM13 para descartar a possibilidade de ligações inespecíficas dos scFvs nas proteínas do fago.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio de *Western Blot* dos clones selecionados

A figura 14 mostra o reconhecimento, de apenas uma proteína tanto em larvas quanto teleóginas, por todas as quatro variantes de fragmentos scFv utilizados. O fragmento scFv (B10) utilizado como controle negativo (anticorpo irrelevante contra proteínas totais de teleóginas) não reconheceu nenhuma proteína de carrapato. O branco (B) da reação (omissão do scFv), foi utilizado para confirmação de nenhuma reação ‘falso-positivo’ originária da ligação do anticorpo secundário anti-HA nas proteínas totais de carrapato.

O reconhecimento de uma única proteína por clones diferentes pode ser pelo fato das pequenas alterações observadas na CDRs não serem suficientes para alterar a conformação das moléculas de anticorpo a ponto destas, reconhecerem proteínas distintas. Outra sugestão seria a ligação destes fragmentos scFv em vários epítomos diferentes de uma mesma proteína.

A caracterização de peptídeos utilizando bibliotecas de peptídeos recombinantes ligantes aos scFvs discutidos posteriormente, levam à um indício de um provável reconhecimento de epítomos diferentes desta proteína pelos clones utilizados. Outras proteínas de alto peso molecular fracamente marcadas na membrana foram observadas. Consideramos estas marcações como *background* da reação, provavelmente pelas condições baixas de estringência utilizadas no ensaio ou concentrações altas de anticorpos primários e secundários utilizados.

Como não temos a estrutura tridimensional dos anticorpos e proteínas envolvidas na reação, fica difícil concluir sobre as interações entre elas. O sequenciamento N-terminal da proteína reconhecida pelos clones e a caracterização dos peptídeos selecionados posteriormente nos darão indícios mais conclusivos sobre tais interações. Estudos baseados na estrutura destas proteínas podem elucidar com mais precisão os eventos observados nos ensaios de *western* e *dot blot*.

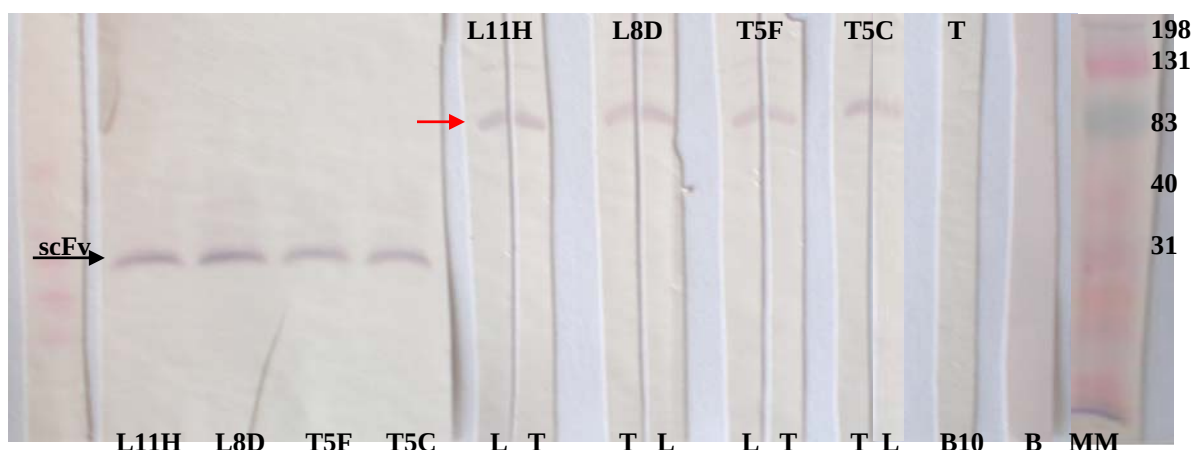


Figura 14. *Western Blot* em membrana de nitrocelulose (*Hybond*). L11H, L8D, T5F e T5C representa os fragmentos scFv escolhidos para os testes. L e T - proteínas totais de estágios de larva e teleógena *B. microtus* respectivamente. B10 - fragmento scFv irrelevante. B - branco da reação. MM - marcador de massa molecular em kDa (BioRad). A seta indica a proteína fortemente reconhecida pelos clones scFv (seta preta)

Sequenciamento N-terminal

Uma única sequência de treze resíduos de aminoácidos, reconhecida pelos fragmentos de anticorpo scFv, foi identificada pelo sequenciamento N-terminal da proteína retirada da membrana de PVDF. A sequência foi submetida à análise nos bancos de dados protéicos pelo alinhamento no BLASTp tendo como resultado uma identidade de 92% ou seja, doze dos treze resíduos sequenciados, foram idênticos à GP80 (**SYKPATPGYLTYE**) uma proteína relacionada à uma vitelina, conhecida como uma das proteínas mais abundantes em ovos e presente também em larvas de carrapato bovino. Como vários autores relacionam GP80 e vitelina como um produto do processamento de vitelogenina (Tellan *et al.*, 2002) e que vitelogenina não tem função apenas como proteína de reserva, mas participa também de processos fisiológicos mais diversos (Bownes *et al.*, 1988; Dallacqua *et al.*, 2007; Coons *et al.*, 1989; Wikel, 1986), nós acreditamos que mimetópos relacionados à proteína natural (vitelogenina) podem ser utilizados como imunógenos e interferir nas várias funções que esta proteína exerce no carrapato bovino. Além disso, o processamento e a conservação das sequências de aminoácidos da vitelogenina entre espécies diferentes de carrapato e outros organismos demonstram uma versatilidade na sua utilização como antígeno vacinal.

A técnica de mapeamento de epítomos por *phage display* utilizada neste trabalho possibilitou o mapeamento e identificação de epítomos reconhecidos por anticorpos recombinantes contra proteínas totais de larvas e teleóginas. A identificação destes epítomos tem como vantagem a utilização, em sistemas de expressão de proteínas recombinantes, de partes da proteína natural que realmente participam do processo de reconhecimento do antígeno pelo anticorpo.

Testes para comprovação do efeito protetor destes epítomos presentes na proteína nativa é de fundamental importância para a utilização da vitelina como componente de uma vacina.

Seleção e sequenciamento dos peptídeos recombinantes apresentados em fagos (*Peptide phage display libraries*) reativos aos clones scFv

- **Seleção (*biopanning*) dos clones selecionados da biblioteca de peptídeos**

A seleção foi realizada em três ciclos como descrito anteriormente e os títulos de entrada e saída bem como as condições de eluição são mostrados na tabela 4. Podemos observar que houve um enriquecimento da biblioteca de peptídeos mesmo aumentando a estrigência durante as lavagens para retirada dos fagos não ligantes. A opção por realizar apenas três ciclos comparados com os cinco ciclos da seleção da biblioteca de anticorpos foi devido ao resultado do sequenciamento do terceiro ciclo onde foram verificadas seqüências consenso entre os peptídeos. Ciclos subseqüentes poderiam favorecer a seleção de apenas um peptídeo altamente reativo, eliminando a possibilidade de caracterização de outros motivos protéicos importantes relacionados a prováveis alvos antigênicos.

- **Sequenciamento dos clones selecionados da biblioteca de peptídeos**

Foram seqüenciados trinta clones selecionados pela afinidade entre os fragmentos de anticorpos scFv e a biblioteca de peptídeos recombinantes (*peptide phage display libraries*). A tabela 5 mostra as seqüências dos peptídeos selecionados e seu alinhamento com proteínas de carrapato bovino depositadas nos banco de dados. A identificação de motivos protéicos definidos foi verificada

nas seqüências dos clones do terceiro ciclo de seleção. As seqüências foram submetidas para alinhamento BLASTp em bancos de dados protéicos e várias proteínas foram identificadas com certa identidade às seqüências peptídicas. O clone mais freqüente (TPTPFRH) carrega um motivo protéico (TP-PF--) identificado na proteína GP80 de *Boophilus microplus*. Este resultado explica o reconhecimento do fragmento scFv à uma GP80 natural caracterizada por sequenciamento N-terminal. Outro motivo GP80 (PY---YA) foi selecionado da biblioteca de peptídeos. Este resultado sugere o reconhecimento de outras regiões (epítomos) da mesma proteína, por fragmentos scFv diferentes gerados durante a imunização com proteínas de carrapato. Outra sugestão para este duplo reconhecimento seria que os dois epítomos mesmo apresentando seqüências diferentes possuem estrutura conformacional parecidas que justifique o reconhecimento pelo mesmo anticorpo.

Tabela 4. Seleção por três ciclos de fagos da biblioteca de peptídeos contra fragmentos de anticorpos scFv adsorvidos em placa de microtitulação, demonstrando títulos de entrada e saída e as condições de estringência das lavagens em cada ciclo.

Ciclos de seleção	Título de entrada ufc/ μ L	Título de Saída ufc/ μ L	Lavagens TBST [%] Tween 20
1º	$4,0 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^3$	0,1%
2º	$3,0 \times 10^9$	$9,0 \times 10^3$	0,5%
3º	$5,0 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^4$	0,5%

Tabela 5. Alinhamento dos clones seqüenciados da biblioteca de peptídeos recombinantes selecionados por afinidade aos fragmentos scFv. Em vermelho, resíduos comuns entre os peptídeos seqüenciados e proteínas de *Boophilus microplus* depositadas no banco de dados GenBank alinhadas utilizando BLASTp.

Peptide	Peptide frequência	Epitope	Protein	Motivo	Frequência
T P T P F R H	7/30	T P x P F x x T P x x F R x	GP80 Proteína Notch-like	TP	26/30
T P T P F S H	1/30	T P x x x S H	Antígeno B de membrana	PTPT	14/30
T P T P F Q A	1/30	T P x P F x x	GP80	TPQ	08/30
I Q T P Q H T	4/30	x x T P Q H x x x T P Q H x I Q x x Q H x	Receptor de serotonina Proteína Notch-like Paramiosina	IQTP	07/30
I Q T P Q P T	1/30	x x T P Q x x	Receptor de serotonina		

A baixa variabilidade da biblioteca gerada e o reconhecimento de apenas uma proteína GP80 pelos fragmentos de anticorpos podem ter sido favorecidos pelo uso de proteínas totais de teleóginas e larvas durante a imunização. Teleóginas ingurgitadas possuem uma grande quantidade de ovos e consequentemente vitelina, proteína responsável por uma provável imunodominância durante a imunização das galinhas. Com relação às larvas, além da vitelina naturalmente presente, fragmentos de ovos ou ovos não eclodidos podem ter sido utilizados durante o processo de extração das proteínas totais, levando ao mesmo problema de dominância destes antígenos.

Outras proteínas com motivos protéicos relacionados foram selecionadas a partir da biblioteca de peptídeos. Como os clones scFv utilizados nos ensaio de western blot identificaram apenas a proteína GP80 e estes mesmos clones selecionaram peptídeos relacionados com outras proteínas de carrapato como receptor de serotonina (--TPQH-), antígeno B proteína de membrana (TP---SH), proteína notch-like (--TPQH- / TP--FR-) e paramiosina (IQ--QH-) sugerimos que estes epítomos em suas proteínas naturais demonstram uma conformação semelhante àquelas apresentadas reconhecidas pelos anticorpos recombinantes na proteína GP80, relacionada à vitelina. Como a biblioteca é constrita, isto é, em forma de um *loop* (volta) ligadas pela cisteínas flaqueadoras, os resíduos internos são quem “ditam as regras” na estrutura tridimensional do peptídeo. Considerando as seqüências dos três peptídeos principais comuns às proteínas do carrapato descritas acima, podemos observar que o centro do peptídeo sendo composto em todos por uma prolina e uma treonina (TP), garantem a

conformação na ponta superior do *loop*. Uma histidina adjacente (H) presente em todos os peptídeos sugere uma conformação estável em um dos lados da molécula, enquanto do outro lado temos os resíduos treonina (T) e glutamina (Q) dois resíduos polares e acíclicos e, prolina (P) isoleucina (I) resíduos neutros e apolares:

```

T P T P F R H
T P T P F S H
I Q T P Q H T

```

A figura 15 mostra um *dot blot* utilizando aproximadamente 10^{10} ufc em PBS dos fagos expressando os peptídeos GP80 (TP-PF--); proteína notch-like (TP--FR-) e (--TPQH-); antígeno B (TP---SH); receptor de serotonina (--TPQH-); paramiosina (IQ--QH-), adsorvidos na membrana de nitrocelulose. A membrana foi lavada uma vez com PBST 0,05% e incubada com o clone mais freqüente da biblioteca scFv (clone L11H) expresso em meio de cultura. A membrana foi incubada com anticorpo Anti-HA (coelho) por 1 hora a temperatura ambiente e posteriormente com Anti-IgG coelho fosfatase alcalina por mais 1 hora a temperatura ambiente e revelada com NBT/BCIP. Um ensaio paralelo utilizando os mesmos peptídeos nas mesmas condições acima citadas com a omissão do fragmento scFv e fago auxiliar (VCSM13) foram utilizados como controle negativo da reação. Os controles negativos utilizados confirmam a não existência de falsos positivos ou reconhecimento inespecíficos das proteínas do capsídeo de fagos pelo anticorpo scFv, garantindo a eficiência do processo de seleção apenas dos peptídeos recombinantes

A pequena marcação observada na membrana controle pode ser devido à insuficiente quantidade de lavagens durante o ensaio.

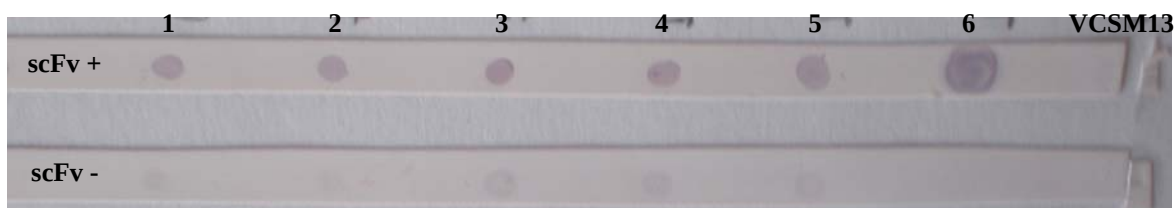


Figura 15. Análise por *dot blot* dos peptídeos selecionados reconhecidos pelo fragmento scFv (clone L11H) membrana de nitrocelulose. (+) membrana incubada com scFv. (-) membrana não incubada com scFv. (1) TPTPFSH, (2) TPTPFRH, (3) IQTPQHT, (4) TPTPFQA, (5) IQTPQPT, (6) meio de cultura com scFv (controle positivo) . VCSM13-fago auxiliar (controle negativo).

Os resultados obtidos do ensaio de *dot blot* (figura 15), reforçam a hipótese de que todos os peptídeos selecionados podem apresentar uma conformação semelhante na biblioteca de peptídeo, pois o mesmo fragmento scFv (clone L11H) reconhece os peptídeos descritos acima. Neste caso é razoável sugerir que animais imunizados com o peptídeo recombinante relacionado à GP80, possam produzir anticorpos que reconheçam todas as outras proteínas descritas acima, podendo ser um bom imunógeno na produção de uma vacina polivalente.

Estudos futuros deverão ser realizados para a confirmação da antigenicidade e imunogenicidade destes peptídeos como antígenos vacinais bem como seu modo de administração e usos de adjuvantes eficientes.

Além da importância da GP80 descrita acima, uma atenção deve ser dada ao peptídeo relacionado a um epítipo do receptor de serotonina. Estudos revelam que esta proteína está envolvida em vários processos fisiológicos em carrapato dentre eles na alimentação, pois funcionam como importante mediadores da resposta inflamatório em diversas espécies de carrapatos (Paine *et al.* , 1983).

Nas salivas dos carrapatos bovinos existem proteínas ligantes de histamina ou receptores de histamina (HPB), que seqüestram estas moléculas produzidas pelo hospedeiro e tem ativa participação em processos inflamatórios durante a picada do parasita. Cristais de HPBs demonstraram uma estrutura composta de folhas β em forma de barril com dois sítios de ligação internos: Sítio 'H' fortemente ligante de histamina e um sítio 'L', fracamente ligante de histamina nos carrapatos bovinos, mas fortemente reconhecido por serotonina (receptores de serotonina) nos carrapatos de roedores *Dermacentor reticulatus* (Sangamnatdej *et al.*, 2002). Além da função de mediação dos processos inflamatórios na saliva dos carrapatos, estudos de vários autores demonstram um papel bem mais amplo para estas proteínas. Chen *et al.* (2004), isolaram mRNA de serotonina em ovos de *Boophilus microplus* e sugerem a participação da serotonina em processos de formação do sistema nervoso e outros tecidos embrionários e em todos os estágios de vida do parasita.

A utilização como imunógeno, do peptídeo sintético descrito neste trabalho relacionado a um epítipo do receptor de serotonina, pode, além de interferir em vários estágios do parasita, modificar a estrutura das HBPs, pela ligação dos anticorpos gerados pela imunização, nos sítios 'L' (receptores de serotonina),

dificultando sua ação como ligantes de histamina e promover uma maior reação inflamatória do hospedeiro à picada o parasita, prejudicando todo o processo de alimentação.

CONCLUSÕES

A metodologia utilizada neste trabalho revelou ser eficiente no reconhecimento e seleção de epítomos (mimetopos) de proteínas importantes do carrapato bovino

Os anticorpos reconheceram uma proteína natural similar a uma GP80 ou vitelina.

O reconhecimento de dois peptídeos recombinantes relacionados a GP80 (vitelina) na biblioteca de peptídeos possibilitou uma melhor caracterização das regiões imunogênicas desta proteína

A seleção de vários outros epítomos pelos mesmos fragmentos scFv, sugere uma semelhança estrutural destes peptídeos entre as proteínas de carrapato. Novos ensaios devem ser conduzidos para confirmação desta hipótese.

Alguns dos peptídeos selecionados fazem parte de importantes epítomos de proteínas descritas como potenciais antígenos vacinais

PERSPECTIVAS FUTURAS

Utilização da biblioteca de anticorpos em diferentes tecidos de carrapato como: aparelho bucal, intestino e ovário separadamente para seleção de antígenos específicos destes que são os principais órgãos alvos para o controle do carrapato bovino através da ingestão do sangue de animais imunizados.

Pela importância fisiológica das proteínas identificadas neste trabalho pelos seus epítomos selecionados da biblioteca de peptídeos recombinantes, é necessário testar *in vivo*, como antígenos vacinais os clones (peptídeos) selecionados.

Testar diferentes formas de administração destes antígenos. Fusionados na partícula viral (descrita em muitos trabalhos como adjuvante) ou utilização do peptídeo sintetizado artificialmente.

Testar diferentes combinações e concentrações dos clones selecionados para produção de vacinas poligênicas.

Alguns peptídeos selecionados por nosso grupo por meio dos soros policlonais de galinha imunizadas com proteínas de carrapato bovino já se encontram em fase de patenteamento e testes *in vivo*. Resultados preliminares utilizando estes peptídeos fusionados em fagos como vacina, demonstram uma eficiência no controle do carrapato bovino com visível diminuição da postura.

BIBLIOGRAFIA

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.

Azzazy, H.M.E. Highsmith, W.E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clinical Biochemistry, 35, 425 - 445, 2002.

Bownes, M., Shirras, A., Blair, M., Collins, J., Coulson, A.,. Evidence that insect embryogenesis is regulated by ecdysteroids released from yolk platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1554–1557, 1988.

Chen A., Holmes S. P., Pietrantonio P. V. Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from the Southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Insect Molecular Biology 13(1), 45–54, 2004.

Coons, L.B., Lamoreaux, W.J., Rosell-Davis, R., Tarnowski, B.I. The onset of vitellogenin production and vitellogenesis and their relationship to changes in the midgut epithelium and oocytes in the tick *Dermacentor variabilis*. Exp. Appl. Acarol. 6, 291–305, 1989.

Da Silva Vaz Jr., I. Termignoni, C., Masuda, A., Oliveira, P. Vacina contra garrapato. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 13, 18-23, 2000.

Dallacqua, R.P., Simões, Z.L.P., Bitondi, M.M.G. Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. Insect. Soc, 54, 70 – 76, 2007.

Ferreira, C.A.S.; Barbosa, M.C.; Silveira, T.C.L.; Valenzuela, J.G.; Da Silva Vaz Jr, I. Masuda. A. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. Parasitology, 125 (3):265-74, 2002.

Garcia-Garcia J.C., Montero C., Redondo M., Vargas M., Canales M., Boue O., Rodriguez M., Joglar M., Machado H., Gonzalez I.L., Valdes M., Mendez L., De La Fuente. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus* J. Vaccine. v.18, n. 21, p.2275-87, 2000.

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.

Logullo, C.; Da Silva Vaz, J.R.; Sorgine, M.H.F.; Paiva, I.; Silva, G.O.; Faria, F.S.; Zingali, R.; Rosa De Lima, M.; Abreu, L.; Oliveira, E.F.; Alves, E.W.; Masuda, H.; Gonzales, J.C.; Masuda, A.; Oliveira, P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. Parasitol., v. 116, p. 525-532, 1998.

Mckenna, R.V.; Riding, G.A.; Jarmey, J.A.; Pearson, R.D.; Willadsen, P. Vaccination of cattle against *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. Parasite Immunology, v. 20, p. 325-36, 1998.

Paine, S.H., Kemp, D.H. and Allen, J.R. In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. Parasitology 86: 419–428. 1983

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.

Rand, K.N.; Moore, T.; Sriskantha, A.; Spring, K.; Tellam, R.; Willadsen, P.; Cobon, G.S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 86, p. 9657-9661, 1989.

Riding, G.A.; Jarmey, J.; McKenna, R.V.; Pearson, R.; Cobon, G.S.; Willadsen, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*: purification, localization and possible function. J. Immunol., v. 153, p. 5158–5166, 1994.

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

Sangamnatdej, S., Paesen, G.C., Slovak, M. and Nuttall, P.A. A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. Insect Mol Biol 11: 79–86, 2002.

Tellam, 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.

Wikel, S.K., Whelen, A.C. Ixodid-host immune interaction. Identification and characterization of relevant antigens and tick-induced host immunosuppression. Vet. Parasitol. 20, 149–174, 1986.

Willadsen, P.; Kemp, D.H. Vaccination with concealed antigens for tick control. Parasitology Today, v.4, p. 196-198, 1988.

Willadsen, P.; Riding, G.A.; McKenna, R.V.; Kemp, D.H.; Tellam, R.L.; Nielsen, J.N. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. J. Immunology, v. 143, p. 1346–51, 1989.

Willadsen, P.; Cobon, G.; Hungerford, J. The role of vaccination in current and future strategies for tick control. In: Seminário Internacional de Parasitologia Animal. Acapulco, Mexico. Proceedings, p. 88-100, 1995.

Willadsen, P. Novel vaccines for ectoparasites. Veterinary Parasitology, v. 71, p. 209-22, 1997.

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

Willadsen, P., Jongejan, F. Immunology of the tick host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitology Today*. 15:258-262, 1999.