

Sintia Silva de Almeida

**Identificação e caracterização de peptídeos bioativos através de
Phage display usando genoma completo de *Corynebacterium
pseudotuberculosis***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Co-orientadores: Prof. Dr. Anderson Miyoshi
Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

BELO HORIZONTE
Julho/2011

Dedico este trabalho, aos meus pais, José Maria de Almeida e Albertina Silva de Almeida, por todo amor, compreensão, apoio, dedicação e estímulo durante minha jornada acadêmica, na realização deste e com certeza de outros futuros trabalhos, às minhas irmãs Márcia Cristina Silva de Almeida e Lílian de Almeida Kuroishi, que sempre me apoiaram durante toda a vida estudantil. Também dedico este trabalho ao meu companheiro de cada dia Vinícius Abreu e aos meus grandes amigos, que vivem este sonho junto comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus, porque Ele é o criador.

Agradeço aos meus pais José Maria de Almeida e Albertina Silva de Almeida, pois eles me criaram, educaram e me guiaram pelos caminhos certos, e graças a eles cheguei onde estou e às minhas irmãs Márcia Cristina Silva de Almeida e Lílian Silva de Almeida, pelo apoio que me deram desde a infância. Ao meu companheiro e amigo Vinícius Augusto Carvalho de Abreu, que sempre apoiou e incentivou minhas decisões. A essas pessoas toda a forma de agradecimento é pequena.

Ao meu orientador Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, por ter me aceitado como doutoranda, por ter depositado confiança no meu trabalho, pela amizade, e por todo o apoio, incentivo, sugestões e críticas, pelo entusiasmo com o trabalho, e pelo grande exemplo de vida.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Anderson Miyoshi pela disponibilidade, sugestões e críticas e Dr. Luiz Ricardo Goulart pela oportunidade e orientação durante o desenvolvimento do trabalho na Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Às Profas. Dra. Tereza Cristina de Oliveira Corvelo e Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro, que me iniciaram e contribuíram na minha vida acadêmica, e por todo o apoio e incentivo dados, por nunca se negarem a me ajudar nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Maria Paula Schneider, um dos motivos por eu estar aqui, por ser fonte de inspiração para a construção do futuro científico do estado do Pará.

Ao Prof. Artur Silva, grande colaborador e incentivador, presente sempre quando dele precisei.

À Profa. Héliida Monteiro de Andrade e aos Profs. Sérgio Costa Oliveira e Frederic Jean Georges Frézard por todo o suporte durante a realização de algumas metodologias utilizadas neste trabalho.

Às queridas alunas de Iniciação científica Larissa Minari (UFU) e Aryane Magalhães (UFMG) pela inestimável ajuda em todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Patrícia Tiemi, Siomar Soares, Núbia Seyffert, Natália Carvalho, Fernanda Dorella, Anderson Santos, Anne Pinto, Tessália Saraiva, Angélica Faria, Dayana Ribeiro, Amjad Ali, Marcia Natalia Dutra, Fernanda Magalhães, Carlos Prudêncio, Jair Cunha Jr., Fabiana Almeida, Carol Reis, Luis Pacheco, Luis Guimarães, Thiago Castro,

Wanderson Marques, Carlos Ueira, Alfonso Gala-Garcia, Yara Paiva e Juliana Almeida, pelo excepcional apoio nas diversas partes deste trabalho.

A todos os demais companheiros de trabalho do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da UFMG, do Laboratório de Polimorfismo de DNA (LPDNA) da Universidade Federal do Pará e Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU, que de alguma maneira contribuíram para o meu crescimento pessoal, científico, e que me apoiaram nos momentos difíceis.

Aos funcionários e professores do ICB/UFMG e da Pós-Graduação em Genética.

E, finalmente eu gostaria de agradecer à Universidade Federal de Minas Gerais pela excelente formação profissional, e pela enorme contribuição para minha formação pessoal e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela indispensável contribuição para o custeio de todos os meus anos na Pós-Graduação.

*"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

RESUMO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que acomete principalmente caprinos e ovinos. Esta enfermidade é responsável por perdas econômicas significativas relacionadas à produtividade dos animais infectados. E, apesar de sua importância, atualmente não existem vacinas, diagnóstico e tratamentos satisfatórios para LC. No presente trabalho, foi utilizada a ferramenta *Phage Display* a qual seleciona peptídeos através de bacteriófagos geneticamente modificados para expressar aleatoriamente sequências de peptídeos na sua superfície. Estas bibliotecas têm demonstrado sucesso em numerosas aplicações, como mapeamento e mimetismo de antígenos reconhecidos por anticorpos, desenvolvimento de vacinas, e em testes de imunogenicidade. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos selecionar e identificar pela técnica de *Phage Display* peptídeos ligantes específicos para proteínas secretadas e/ou excretadas e totais de *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002. Para isso foi utilizada uma biblioteca comercial de 12 peptídeos lineares (Ph.D.TM-12 mer - New England Biolabs - NEB) e após três ciclos de seleção foram obtidos 366 peptídeos, sendo que 116 são sequências distintas. Foram realizadas análises *in silico* desses peptídeos com o proteoma predito de *C. pseudotuberculosis*, onde apresentaram similaridade com proteínas envolvidas na sinalização, nutrição, metabolismo, patogênese bacteriana e fatores de transcrição entre outras. A reatividade e especificidade dos clones isolados foram testadas por ELISA e *Spot* síntese. Através de imunoenaios para ambas as metodologias foi possível selecionar 12 peptídeos (dos 116 identificados por *Phage Display*), entre os quais três foram sintetizados, agregados a duas formulações distintas de lipossomas, uma com fosfatidilcolina hidrogenada (HPC) e a outra com fosfatidilcolina de soja (SPC), e utilizados em ensaios de imunização de camundongos BALB/c. A imunização com os peptídeos sintetizados foi capaz de induzir uma elevada resposta imune do tipo Th1 antes da infecção. Após o desafio, foi observada uma produção elevada de IFN- γ nos animais imunizados tanto com peptídeo/SPC quanto com peptídeo/HPC, e os níveis de IL-10 foram mais elevados nos animais imunizados com peptídeo/SPC. Em contraste, camundongos dos grupos controle exibiram baixos níveis de IFN γ e de IL-10. A identificação de novos antígenos ou genes específicos de *C. pseudotuberculosis* pode prover novos biomarcadores específicos potencialmente antigênicos para a obtenção de antígenos candidatos à vacina e diagnósticos subclínicos mais acurados para o controle e erradicação da LC.

Palavra-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Linfadenite Caseosa, *Phage Display*, *biopanning*, biomarcadores antigênicos, diagnóstico.

ABSTRACT

The Caseous Lymphadenitis (CL) is a disease caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, which affects mainly sheep and goats. This illness is responsible for significant economic losses related to productivity of animals. Currently, there is no satisfactory diagnosis for CL. In this work the tool Phage Display was used that selects peptides using bacteriophages to express random sequences of peptides on their surface. Phage Display has been used successfully in many applications such as mapping and mimicry antigens, vaccine development and immunogenicity tests. The main goal of the study was to perform the selection and identification of mimotopes peptides of secreted and /or excreted and total *C. pseudotuberculosis* 1002 proteins through Phage Display technique. A commercial library of 12 linear peptides (Ph.D.TM-12 mer - New England Biolabs - NEB) was used. After three cycles of selection, 366 peptides were obtained, including 116 distinct sequences. *In silico* analysis of the peptides obtained in Phage Display were tested against the predicted proteome of *C. pseudotuberculosis* 1002. The identified proteins showed similarity to protein involved in signaling, nutrition, metabolism, bacterial pathogenesis and transcription factors. The reactivity and specificity of isolated clones were tested by ELISA and Spot synthesis. Through immunoassays for both methods, was possible to select 12 peptides among them three were synthesized, bound to two different formulations of liposomes, with a hydrogenated phosphatidylcholine (HPC) and soy phosphatidylcholine (SPC), the three peptide were used for testing and immunization of BALB/c. Immunization with the peptides 1 and 2 was able to induce a high Th1 immune response before infection. After the challenge, we observed a high production of IFN- γ in animals immunized with either peptide/SPC or peptide/HPC, and the levels of IL-10 were higher in animals immunized with peptide/SPC only. In contrast, control groups of mice exhibited low levels of IFN- γ and IL-10. The identification of new antigens or *C. pseudotuberculosis* specific genes can potentially provide new specific biomarkers with antigens for obtaining vaccine candidate antigens and sub-clinical diagnosis tests for more accurate control and eradication of the CL.

Keyword: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Caseous Lymphadenitis, Phage Display, biopanning.