

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Eduardo Lara Ribeiro

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS E ANTICORPOS
MONOCLONAIS (SCFV) PARA *Campylobacter fetus* SUBSP. *venerealis*
POR PHAGE DISPLAY**

Belo Horizonte

2013

Eduardo Lara Ribeiro

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS E ANTICORPOS
MONOCLONAIS (SCFV) PARA *Campylobacter fetus* SUBSP. *venerealis*
POR PHAGE DISPLAY**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Marcos Bryan Heinemann

Co-orientadores: Prof. Andrey Pereira Lage

Prof. Carlos Ueira Vieira

Belo Horizonte

2013

R484s

Ribeiro, Eduardo Lara, 1981-

Seleção e caracterização de peptídeos miméticos e anticorpos monoclonais e anticorpos anticorpos monoclonais (scFv) para *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* por Phage display/
Eduardo Lara Ribeiro. 2013

112 f.: il.

Orientador: Marcos Bryan Heinemann

Coorientadores: Andrey Pereira Lage

Carlos Ueira Vieira

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor.

Bibliografias: f. 101 a 112.

1. Bovinos - Teses - 2. Bovinos - doenças - Teses - 3. *Campylobacter* - Teses - I. Heinemann, Marcos Bryan - II. Lage, Andrey Pereira - III. Vieira, Carlos Ueira - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD - 636.089

Bibliotecário responsável Marcio Alves dos Santos CRB. 35890

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

FOLHA DE APROVAÇÃO

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS E ANTICORPOS
MONOCLONAIS (SCFV) PARA *Campylobacter fetus* SUBSP. *venerealis*
POR PHAGE DISPLAY

Autor: EDUARDO LARA RIBEIRO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Escola de Veterinária da UFMG, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

Aprovada em 30 de abril de 2013 pela banca constituída pelos membros:



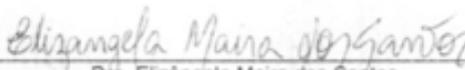
Prof. Marcos Bryan Heinemann
Presidente - Orientador



Dr. Juliana Pinto da Silva Mol
Pós-Doutoranda - EV / UFMG



Dr. Telma Maria Alves
Pós-Doutoranda - EV/UFMG



Dr. Elizângela Maira dos Santos
Pós-Doutoranda - EV/UFMG



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Escola de Veterinária - UFMG

Aos meus irmãos, Denise, Dulcemar e Leonardo, pelos exemplos.

Aos meus pais, por isso e por todo o resto

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque d'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais, Eldy e Lenir, que nunca mediram esforços para que meus sonhos fossem possíveis.

Aos meus irmãos, Denise, Dulcemar e Leonardo, por todos os bons exemplos.

Aos meus amigos, de profissão, de vida acadêmica, de laboratório, de caminhada religiosa, do “mundo lá fora”... Conviver mais de sete anos com um jovem cientista não parece ser fácil. Tenho a certeza do dever de partilhar os resultados com todos vocês.

À Lilian, meu grande amor. Grato sou, eternamente, por todo o apoio, preocupação, compreensão e até o auxílio nos momentos mais difíceis da reta final.

Ao Prof. Marcos Bryan Heinemann, pela confiança desde o início e por todo o amparo de orientador que recebi.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage, co-orientador e mentor deste projeto, agradeço imensamente por todo o apoio, sinceridade e atenção.

Aos Profs. Carlos Ueira Vieira e Luiz Ricardo Goulart Filho pela co-orientação recepção em seu laboratório na Universidade Federal de Uberlândia.

A todos os colegas de Uberlândia, em especial Patrícia Fujimura e Fabiana Santos, por tudo que me ensinaram e por tudo em que pude partilhar e colaborar.

Aos demais professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e a todos o funcionários, por tudo que me foi disponibilizado em seus laboratórios, e pelas colaborações pessoais com seus conhecimentos e serviços.

Aos colegas acadêmicos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por toda a convivência e partilha. Em especial, minha gratidão ao Laboratório de Bacteriologia Aplicada e ao Laboratório de Vírus II.

Agradecimento especial à Telma Alves e Elisângela Maira dos Santos, pela colaboração maciça neste experimento.

Aos “irmãos” de Laboratório: Fernanda, Fernando, Bruno, Amanda, Jamili, Luiz, Vinícius.

Aos professores de outros departamentos que colaboraram, sobretudo com equipamentos: Santuza Moreira, Carlos Chávez, Vasco Azevedo, Héliida Andrade. E também aos colegas Tessália Saraiva, Ricardo Andrés e Bruna Santos.

Ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Aos chefes do DMVP deste período, Prof. Rômulo Cerqueira Leite e Prof. Israel José da Silva.

Ao CNPq e à FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

“Esta é a minha alegria e ela é muito grande. É preciso que Ele cresça e eu diminua.”

Jo 3, 30

Resumo

Campilobacteriose Genital Bovina é uma doença venérea que causa problemas reprodutivos em rebanhos, com grande importância em países onde há largo emprego da monta natural. *Phage Display* é uma técnica que aplica bibliotecas de bacteriófagos que expõem peptídeos fusionados ao capsídeo viral em seleções biológicas contra proteínas alvo. Com o objetivo de selecionar peptídeos miméticos à bactéria *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e fragmentos de anticorpos recombinantes (scFv) foram empregadas biblioteca comercial de peptídeos conformacionais de sete aminoácidos e biblioteca de scFv construída contra células tumorais. Foram selecionados cinco peptídeos considerados miméticos a *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3, com os quais foram produzidos soros hiperimune em camundongo e realizados imunoenaios com antígenos bacterianos e amostras de muco cérvico-vaginal de novilhas. Oito clones que expressam moléculas de scFv reativos contra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3 foram selecionados e triados por meio de ELISA Indireto com outras bactérias. Dentre os peptídeos miméticos, dois foram considerados promissores (ALASLPL e LSYLFPP) devido à reação do soro hiperimune contra a bactéria e dos peptídeos sintéticos com muco cérvico-vaginal. Os clones de scFv apresentaram reações cruzadas entre bactérias do gênero *Campylobacter* e dois (3H6 e 4G7) apresentaram baixa reatividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Campilobacteriose, *Phage Display*, peptídeos, anticorpos monoclonais

Abstract

Bovine genital Campylobacteriosis is a venereal disease that causes reproductive problems in herds, with great importance in countries where there is widespread use of natural service. Phage display is a technique that applies bacteriophage libraries that displays peptides fused to the viral capsid proteins in selections against biological target. The aim of the present study was to select mimetic peptides to *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and recombinant monoclonal antibody fragments (scFv). Library of conformational seven aminoacids peptides and scFv library constructed from tumor cells were uses. Five peptides was considered mimetics to *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 - P3, and hyperimmune sera were produced in mice and performed immunoassays with bacterial antigens and samples of cervical-vaginal mucus of heifers. Eight clones expressing scFv antibodies reactive against *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 - P3 were selected and screened by ELISA. Among the mimetic peptides, two were considered promising (ALASLPL and LSYLFPP) due to the reaction of hyperimmune serum against bacteria and synthetic peptides with cervical-vaginal mucus. ScFv antibodies showed cross-reactivity between bacteria of the genus *Campylobacter* and two clones (3H6 and 4G7) showed low reactivity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Key words: Campylobacteriosis, Phage Display, peptides, monoclonal antibodies

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de bactérias de referência utilizadas nos experimentos.....	35
Tabela 2 – Titulação dos fagos (UFC/ μ L) no processo de seleção a partir da biblioteca, apresentando as concentrações de entrada e de saída em cada ciclo de seleção.....	62
Tabela 3 – Relação dos peptídeos deduzidos a partir do sequenciamento do DNA, frequência e origem do clone isolado quanto ao ciclo de seleção e <i>biopanning</i>	63
Tabela 4 – Peptídeos mais reativos aos testes ELISA de captura e dados de origem com relação aos <i>biopannings</i>	66
Tabela 5 – Frequência dos aminoácidos presentes nos 47 peptídeos selecionados nos dois <i>biopannings</i> , de acordo com a posição dentro da sequência heptapeptídica.....	69
Tabela 6 – Frequência dos aminoácidos presentes nos 12 peptídeos selecionados nos terceiros ciclos de seleção dos dois <i>biopannings</i> , de acordo com a posição dentro da sequência heptapeptídica.....	70
Tabela 7 - Relação de proteínas de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354 anotadas no banco de dados do GenBank que apresentaram maior similaridade de sequências de aminoácidos com os cinco peptídeos selecionados por Phage Display, conforme alinhamento feito pelo programa BLAST, e números de acesso.....	71
Tabela 8 - Titulação dos fagos (UFC/ μ L) no processo de seleção apresentando as concentrações de entrada e de saída em cada ciclo de seleção.....	80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema representativo de um bacteriófago de classe Ff mostrando as proteínas do capsídeo viral e três modelos de exposição de peptídeos exógenos, respectivamente em pIII, pVIII e simultaneamente em pVII e pIX. (Adaptado: <http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html>).....24
- Figura 2 - Estrutura de uma molécula de IgG mostrando os domínios de cadeias variáveis pesadas (VH) e leves (VL) e cadeias constantes (CH e CL), o domínio de ligação do antígeno formado por VH e VL, onde fica a região específica da imunoglobulina (paratopo) e os fragmentos monoméricos de anticorpos: Fab, Fv (fragmento variável) e scFv (fragmento variável de cadeia única).
(Adaptado de Azzazy e Highsmith, 2002, *Clinical Biochemistry*).....27
- Figura 3 – Gráfico comparativo das absorvâncias (DO_{450nm}) encontradas nos *Bead-ELISA*, em que foram empregadas microesferas magnéticas carregadas com moléculas de IgG do soro hiperimune de coelhos e anticorpos anti-coelho peroxidase (1:5000). No controle da reação, foi usado anti-ovino-peroxidase, anticorpo inespecífico, porém marcado com a mesma enzima. Para controle negativo, as microesferas carregadas foram incubadas com PBS.....59
- Figura 4 – Gráficos das reações em ELISA de captura dos 47 peptídeos selecionados, com valores médios das triplicatas, para determinação dos fagos mais reativos ao soro hiperimune de coelhos, com base na absorvância do fago selvagem e na reatividade ao soro pré-imune de coelhos. Os controles da reação foram feitos mediante a omissão das etapas de incubação com fagos. A linha pontilhada destaca o valor da absorvância equivalente à reatividade do fago selvagem frente ao soro hiperimune, para comparação com os peptídeos de cada placa.....67
- Figura 5 - Alinhamento de 47 peptídeos selecionados a partir da biblioteca Ph.D – C7CTM realizado pelo programa Clustal W.....72

Figura 6 - Alinhamento de 12 peptídeos oriundos dos terceiros ciclos de seleção selecionados a partir da biblioteca Ph.D – C7C™ realizado pelo programa Clustal W. Nos destaques sombreados, as sequências de aminoácidos alinhadas mais frequentes.....73

Figura 7 – Gráficos dos grupos de camundongos representando a evolução da produção de anticorpos contra os cinco peptídeos e BSA de zero a 45 dias por ELISA. Valores médios de absorvâncias (DO_{490 nm}) de duplicatas de poços sensibilizados com 1 µg de peptídeo ou BSA; pool de soros dos quatro camundongos de cada grupo em cinco diluições. No controle, pool de soros de camundongos (1:25) do grupo Controle, os quais receberam placebo por via intraperitoneal.....81

Figura 8 – Gráfico representativo das médias das absorvâncias (DO_{490 nm}) encontradas por ELISA indireto nas reações entre soro de coelhos hiperimune (1:100), produzidos contra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, e os cinco peptídeos selecionados por *Phage Display* e BSA (1 µg/poço). No controle de cada reação, soro de coelho pré-imune (1:100).....82

Figura 9 – Gráfico representativo das médias das absorvâncias (DO_{490 nm}) encontradas por ELISA Indireto dos pools de soros de camundongos de cada grupo, sendo cinco respectivos aos peptídeos sintéticos e dois controles, reativos contra 1 µg por poço de proteínas extraídas por sonicação de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3.....82

Figura 10 - Gráfico representativo das reações de ELISA envolvendo amostras de muco cérvico-vaginal e proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3 (250 ng/poço) obtidas por sonicação . À esquerda do gráficos, as 27 amostras oriundas da Fazenda Nhumirim, cujo rebanho tem histórico de CGB. À direita, 11 amostras de novilhas oriundas de duas fazendas livres para a doença.....83

Figura 11 - Gráfico representativo das reações de ELISA envolvendo 12 amostras de muco cérvico-vaginal selecionadas por serem reativas contra proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3 e os cinco peptídeos sintéticos selecionados por *Phage Display* e BSA. No controle negativo, duas amostras negativas, oriundas de rebanhos livres para a CGB.....84

Figura 12 – Valores em ordem decrescente das absorvâncias (DO 490 nm) obtidas nas reações dos 540 clones selecionados no ELISA <i>pré-screening</i> , no qual 1 µg de antígenos de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> foram empregados para o teste, em reação com sobrenadante do lisado de bactérias <i>E. coli</i> Top 10.....	85
Figura 13 – Gráfico representativo das reações de ELISA de 40 clones de scFv contra 1 µg de proteínas de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> , <i>E. coli</i> XL1 Blue e <i>S. aureus</i> 25923. Destaque para o clone 3B9, escolhido para ser controle positivo do ELISA nos demais ensaios, como altamente reativo.....	92
Figura 14 – Gráfico representativo dos valores das razões calculadas, para cada clone de scFv, entre a absorvância (DO 490 nm) do ensaio ELISA frente a proteínas de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e as absorvâncias dos ELISA contra <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> . Compõem o gráfico os oito clones cujas razões calculadas tiveram valor mínimo de 2,0.....	93
Figura 15 – Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, indicando os fragmentos de DNA de cadeias pesada e leve de scFv amplificados pela reação de PCR, a partir do DNA plasmidial (vetor pCOMB3Xss) dos oito clones selecionados após os testes de ELISA.....	94
Figura 16 – Reatividade da amostra de scFv purificada 3B9 e do controle negativo em ELISA contra bactérias do gênero <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> XL1 Blue e <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	96
Figura 17 – Reatividade das oito amostras de scFv purificada e do controle negativo em ELISA contra seis bactérias do gênero <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> XL1 Blue e <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	98
Figura 18 - Gráfico representativo dos valores das razões entre as absorvâncias (DO 490 nm) obtidas pelas oito amostras de scFv purificadas e o controle negativo em ELISA contra seis bactérias do gênero <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> XL1 Blue e <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	99
Figura 19 - Gráfico representativo dos valores das diferenças entre as absorvâncias (DO 490 nm) obtidas pelas oito amostras de scFv purificadas e o controle negativo em ELISA contra seis bactérias do gênero <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> XL1 Blue e <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 - Campilobacteriose Genital Bovina.....	20
2.2 - <i>Phage Display</i>	23
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 - Preparo de material biológico.....	34
4.1.1 - Amostras bacterianas.....	34
4.1.2 - Extração de proteínas bacterianas.....	35
4.1.2.1 – Extração com sonicação.....	35
4.1.2.2 - Extração com tampão de lise.....	36
4.1.3 - Produção de soro hiperimune em coelhos.....	36
4.1.4 - Coleta de muco cérvico-vaginal e de soro de novilhas.....	37
4.2 - Seleção de peptídeos miméticos a <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	37
4.2.1 - Biblioteca de fagos.....	37
4.2.2 - Acoplamento de IgG do soro hiperimune em microesferas magnéticas.....	38
4.2.3 – <i>Biopannings</i>	39
4.2.3.1 - Ciclos de seleção.....	39
4.2.3.3 - Amplificação e precipitação dos fagos.....	40
4.2.3.3 - Titulação dos fagos dos eluatos.....	41
4.2.4 - Isolamento de colônias, amplificação em deep well e extração de DNA....	41
4.2.5 - Sequenciamento do DNA.....	42
4.2.6 - Dedução das sequências de aminoácidos dos peptídeos.....	43
4.2.7 - Amplificação dos fagos escolhidos.....	43
4.2.8 - ELISA de captura.....	44
4.2.9 - Análise das sequências de aminoácidos.....	44
4.2.11 - Síntese de peptídeos escolhidos.....	45
4.2.11 – Produção de soro hiperimune em camundongos e avaliação da soroconversão.....	45

4.2.11 - Reatividade dos peptídeos sintéticos com soro hiperimune de coelhos.....	46
4.2.12 - Reatividade dos soros hiperimunes de camundongos com <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354 - P3.....	47
4.2.13 - Reatividade de muco cérvico-vaginal de novilhas com os peptídeos sintéticos.....	47
4.3 - Seleção de anticorpos monoclonais recombinantes (scFv).....	48
4.3.1 - Biblioteca de scFv.....	48
4.3.2 - Amplificação e titulação do fago auxiliar.....	48
4.3.3 - Amplificação da biblioteca de ScFv.....	49
4.3.4 – <i>Biopannings</i>	50
4.3.4.1 - Primeiro ciclo.....	50
4.3.4.2 - Segundo ao quarto ciclo de seleção.....	51
4.3.4.3 - Titulação dos eluatos.....	51
4.3.5 - Extração de DNA plasmidial após o quarto ciclo de seleção.....	52
4.3.6 - Transformação de <i>E. coli</i> Top 10 com o DNA plasmidial.....	52
4.3.7 - Produção de scFv na forma solúvel.....	53
4.3.8 - Ensaio de ELISA.....	54
4.3.8.1 - Reatividade dos scFv selecionados à <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354.....	54
4.3.8.2 - Reatividade cruzada dos scFv com outras bactérias.....	55
4.3.9 - Extração de DNA plasmidial e PCR.....	55
4.3.10 - Obtenção de scFv em grande escala.....	56
4.3.11 - Purificação de scFv por cromatografia de afinidade em HPLC.....	56
4.3.12 Imunoensaios com scFv purificado.....	57
4.4 - Ética em Experimentação Animal.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 - <i>Biopanning</i> de peptídeos.....	58
5.2 <i>Biopanning</i> de scFv.....	87
6. CONCLUSÕES.....	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas nos campos da Imunologia, Genética e Biologia Molecular têm trazido grandes avanços para as ciências da saúde, com o desenvolvimento de novas técnicas aplicadas ao diagnóstico de doenças, identificação de agentes patológicos e ampliação dos conhecimentos sobre eles e aumento da imunização das populações animais e humana. Proteínas, antígenos e anticorpos sintéticos têm sido empregados com êxito para diagnóstico e terapêutica de várias enfermidades, sendo esses obtidos por meio da manipulação do genoma de parasitos, bactérias, protozoários, fungos, vírus, artrópodes e animais peçonhentos em geral. A Medicina Veterinária, fazendo uso de suas interfaces com os diversos ramos de biotecnologia, e ao mesmo tempo, incorporando tecnologias já consagradas na medicina humana, é um vasto campo para o surgimento de alternativas e soluções tangentes à sanidade, visando o melhoramento animal, o aumento da produtividade, a erradicação de doenças e o controle de zoonoses.

Desde a sua descrição por George Smith, em 1985, a tecnologia de *Phage Display*, a exposição de biomoléculas em fagos, tem apresentado uma crescente utilização em diversas áreas das ciências, por meio da qual diversos produtos sintéticos têm sido obtidos, via de regra, com a propriedade mimética ou afim a uma estrutura proteica de um organismo vivo. A técnica envolve a expressão de peptídeos, incluindo partículas de anticorpos, na superfície de vírus bacteriófagos, cuja sequência de DNA é manipulada a fim de incluir genes que codificam para as moléculas proteicas expostas em questão.

Campilobacteriose Genital Bovina, doença sexualmente transmissível causada pela bactéria *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, é causadora de expressivas perdas econômicas, por problemas reprodutivos, para a bovinocultura brasileira. É uma enfermidade de difícil controle em grandes rebanhos, sobretudo onde o sistema de manejo utiliza a monta natural e touros de repasse. Por se tratar de uma doença reprodutiva sub-clínica, de sinais pouco evidentes, quando sua prevalência é constatada num rebanho, as perdas econômicas já são significativas.

O presente trabalho apresenta resultados obtidos a partir da aplicação de duas técnicas de *Phage Display* com o objetivo de se obter peptídeos miméticos a antígenos de *C. fetus* subsp.

venerealis e anticorpos monoclonais recombinantes, do tipo scFv, ambos expressos na superfície de fagos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Campilobacteriose Genital Bovina

A Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) é uma doença subclínica e de sinais pouco perceptíveis nos grandes rebanhos, principalmente na ausência de controles zootécnicos. É uma doença de caráter venéreo, cuja infecção é restrita ao trato genital feminino, sendo os touros animais assintomáticos quando portadores da bactéria causadora, o *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. (Pellegrin et al., 1998).

As perdas econômicas decorrentes da CGB são representadas por morte embrionária, repetição de cios, abortos, vacas vazias no final da estação de monta, necessidade de maior frequência na reposição de touros, aumento do período entre partos, queda na produção de bezerros nascidos e produção de leite (Leite, 1977; Pellegrin, 1999; Lage, 2001).

Nos touros, o prepúcio é o *habitat* do microrganismo, que se mantém predominantemente nas criptas do epitélio, e também nas glândulas do pênis e na uretra distal. Touros jovens são relativamente resistentes à infecção, enquanto nos touros mais velhos a frequência é maior em função do aumento do tamanho e do número das criptas no epitélio do prepúcio, o que proporciona condições de microaerofilia e o crescimento da bactéria (Dekeyser, 1984). Essas condições, aliadas ao fato de serem animais assintomáticos, fazem os touros serem considerados os grandes responsáveis pela difusão da CGB em rebanhos bovinos (Garcia e Brooks, 1993).

A transmissão do *C. fetus* subsp. *venerealis* em bovinos é essencialmente sexual, porém pode acontecer também por sêmen contaminado não-tratado com antibióticos ou com fômites contaminados, sobretudo durante as coletas de sêmen (Roberts, 1971; Lage e Leite, 2000). O

comportamento homossexual de touros confinados em alta densidade também permite a transmissão de macho para macho (Dekeyser, 1984).

Em vacas e novilhas, *C. fetus* subsp. *venerealis* infecta a vagina, a cérvix, o útero e as tubas uterinas, de forma ascendente. A patogenia da CGB envolve a colonização e inflamação do trato genital pelo microrganismo, sendo que no útero ocorre inibição da implantação embrionária ou a morte do embrião já implantado. A infecção nas fêmeas resulta primariamente em infertilidade temporária com repetição de cio a intervalos aumentados e irregulares, em geral maiores que 35 dias, decorrente de falhas no desenvolvimento embrionário, endometrites secundárias, cervicite, salpingite e abortos (menos frequentes), levando às grandes perdas econômicas supracitadas (Stoessel, 1982; Dekeyser, 1984).

O *C. fetus* é um bastonete Gram-negativo, curvo, descrito na literatura como espiralado, em forma de “asa de gaivota”, de letra “S”, ou ainda, de “vírgula”. É um microrganismo causador de doenças nos animais e no homem, sendo classificado em dois sorotipos (A e B), com base na composição do lipopolissacarídeo da membrana externa. A espécie pode ser dividida em duas subespécies, *C. fetus* subsp. *fetus* que pode ser do sorotipo A ou B e *C. fetus* subsp. *venerealis* que possui apenas o sorotipo A (Brooks et al., 2004). São bactérias microaerófilas, pois necessitam de uma atmosfera rica em CO₂ (10%) e reduzida concentração de O₂ (5%) para seu crescimento (Vandamme, 2000). Possuem um ou dois flagelos polares, sendo sua motilidade característica melhor observada em microscopia de contraste de fase ou de campo escuro (Dekeyser, 1984).

Campylobacter sp. possui biomoléculas que são imunogênicas e importantes para a colonização do hospedeiro (Thompson e Blaser, 2000). As principais proteínas encontradas em *C. fetus* são: flagelo, com peso molecular de 63 kDa; proteínas de membrana externa, de baixo peso molecular variando de 43 a 44 kDa e glicopolissacarídeos com peso molecular de 100 kDa (Dunn et al. 1987). Pode ser encontrada em *C. fetus* uma camada externa (camada S, superficial) constituída principalmente de proteínas de alto peso molecular, de aproximadamente 97 a 149 kDa, denominadas SAP (Surface Array Proteins), que podem ser modificadas após passagens sucessivas em meio artificial, diminuindo a virulência das amostras (Blaser et al. 1994; Garcia et al., 1995; De Vargas et al., 2002). Variações antigênicas das proteínas de camada S protegem contra a opsonização mediada por anticorpos e da fagocitose, sendo, então, mecanismos evasivos que efetivamente facilitam a persistência do *C. fetus* no hospedeiro (Garcia et al., 1995). Essas mudanças antigênicas das proteínas SAP

também podem explicar o fenômeno observado em vacas portadoras, em que o animal não tem condições imunológicas de responder prontamente a estas variações durante o curso da infecção (Garcia e Brooks, 1993; Garcia et al., 1995, Thompson e Blaser, 2000). Stynen (2009) verificou que amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* passadas seriadamente em novilhas levam ao aumento gradual de aderência e de indução de IL-8 em células HeLa, ocorrendo diferenças de expressão de proteínas entre as amostras sugerindo a interação dessas proteínas com a patogenia.

Estabelecida uma infecção em vacas, a classe de imunoglobulinas que aparece primeiramente é a IgM, seguida da IgA, e por último da IgG1, que ocorre aproximadamente na 8^o semana após a infecção. Isto indica a importância da imunidade conferida pela IgA para a resistência à infecção natural pelo *C. fetus*. (Corbeil et al., 1974; Cobo, 2004).

O diagnóstico da CGB é realizado principalmente em touros por esses animais estarem presentes em menor número nos rebanhos, além de serem os grandes responsáveis pela disseminação da doença. As técnicas laboratoriais rotineiramente utilizadas para o diagnóstico da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* são, além do isolamento e identificação do microrganismo, o teste de imunofluorescência direta (IFD), que tem sido utilizado para detecção da bactéria em lavado prepucial e muco vaginal (Clark, 1971; Pellegrin, 1999; Figueiredo et al., 2002), e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Stynen e Lage, 2000), que é um teste mais específico e sensível, porém mais caro e laborioso. Os testes sorológicos de aglutinação e de imunoadsorção enzimática (ELISA) (Hewson et al., 1985, Hum et al., 1994) têm sido usados para detecção de anticorpos contra *C. fetus* subsp. *venerealis* em amostra de muco vaginal. O teste ELISA Direto para detecção do microrganismo em lavado prepucial e muco vaginal foi realizado por Brooks et al. (2004), utilizando anticorpos monoclonais contra o lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria, mas os resultados alcançados não possuem um bom limite de detecção (de 10^4 a 10^6 UFC/mL) apesar de utilizarem anticorpos monoclonais para aumentar a sensibilidade e especificidade. A Imunofluorescência Direta possui uma sensibilidade analítica melhor com uma detecção de 10^2 UFC/mL (Figueiredo et al., 2002).

As estratégias de controle da CGB incluem o estabelecimento de um programa de inseminação artificial na propriedade, a segregação de animais jovens e vacinação. (Lage e Leite, 2000). O uso de inseminação artificial com sêmen de qualidade em vez do uso de

touros bloqueia a transmissão da doença e favorece a erradicação da CGB (Stoessel, 1982). Entretanto, este método é difícil de ser empregado em grandes rebanhos de corte onde predomina o sistema de criação extensivo, devido ao alto custo do processo e de dificuldades tecnológicas e de recursos humanos. A separação de animais jovens para a formação de um plantel de reprodutores livre da CGB também é difícil de ser realizada na prática, porque é necessário que ocorra uma segregação total dos animais livres da infecção daqueles infectado, o que geralmente não é economicamente viável (Lage, 2001).

As vacinas contra *C. fetus* subsp. *venerealis* são fundamentais em rebanhos nos quais a introdução da inseminação artificial é difícil (Clark et al., 1974; Eaglesome et al., 1986). A relação custo-benefício do controle da CGB pela vacinação das fêmeas é positivo, demonstrado que o retorno é de cerca de 18 vezes os valores gastos na vacinação (Leite, 1977). A vacinação melhora a eficiência reprodutiva das fêmeas, pois ocorre um aumento de imunidade, mas não protege contra a infecção, quando em contato com touros infectados (Frank et al., 1967). Uma área de estudo na produção de vacinas contra doenças venéreas é a vacinação na mucosa genital sendo a resposta de anticorpos predominantemente da classe IgA. As mucosas estão em contato constante com o meio externo, possuem IgA com componente secretório (S-IgA) no epitélio e lâmina própria e contém folículos linfóides organizados na região subepitelial (Ogra, 1996).

2.2 - Phage Display

Os fagos filamentosos (M13, f1, fd e outros) pertencem à família *Inoviridae* e possuem como material genético um DNA fita simples (ssDNA) (Brigido e Maranhão, 2002). Suas partículas são como bastões flexíveis com aproximadamente 1µm de comprimento e 6 nm de diâmetro, compostos principalmente por moléculas da proteína pVIII, a principal do capsídeo, arranjadas em forma de hélice (Marvin, et al., 1994). Existem aproximadamente 2700 cópias de pVIII nos vírions selvagens codificadas pelo gene VIII, e dentro da estrutura helicoidal encontra-se protegido o DNA do vírus. Em uma extremidade da partícula existem cinco cópias de cada uma das proteínas pIII e pVI (codificadas pelos genes III e VI), e as proteínas pVII e pIX na outra extremidade (genes VII e IX) (figura 1). Os peptídeos exógenos, um dos

objetos da técnica de *Phage Display*, podem ser fusionados à pIII, pVIII e pVI (Smith e Petrenko, 1997).

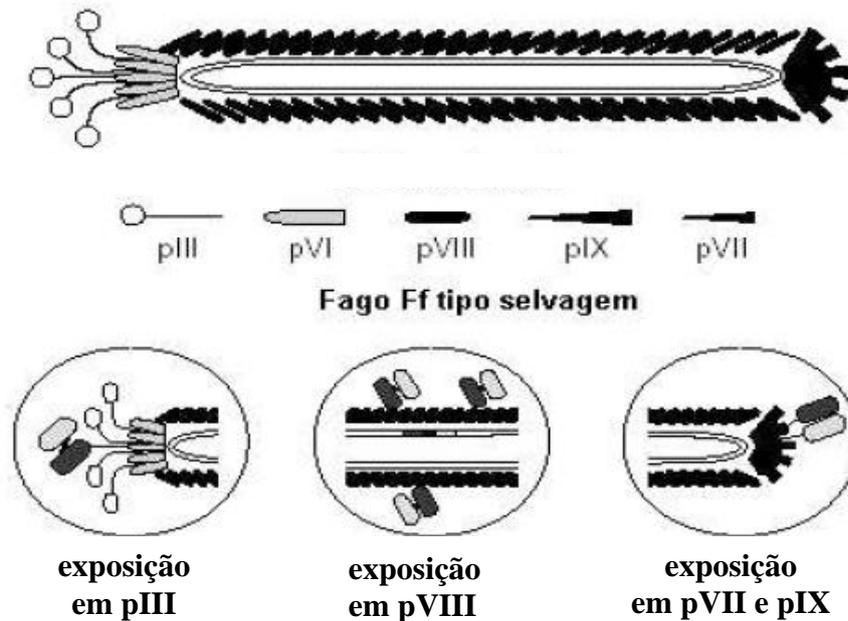


Figura 1 - Esquema representativo de um bacteriófago de classe Ff mostrando as proteínas do capsídeo viral e três modelos de exposição de peptídeos exógenos, respectivamente em pIII, pVIII e simultaneamente em pVII e pIX. (Adaptado: <http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html>).

Os fagos infectam uma variedade de bactérias Gram-negativo, como *Escherichia coli*, as quais possuem um apêndice filiforme denominado de *pilus* sexual, por onde bactérias trocam material genético entre si. A infecção é iniciada pela ligação da extremidade N-terminal da proteína pIII à extremidade do *pilus*. Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que estes não geram uma infecção lítica, mas a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago. Somente o DNA circular de fita simples do fago penetra na bactéria e convertido pela maquinaria de replicação do DNA bacteriano em uma forma replicativa de plasmídeo de fita dupla, a qual sofre constantes replicações do DNA circular para gerar DNA de fita simples e servir como molde para expressão das proteínas do capsídeo e, enfim, novas partículas virais. (Smith e Petrenko, 1997; Azzazy e Highsmith, 2002).

Em sistemas de *Phage Display* nos quais as proteínas pIII ou pVIII são utilizadas para a exposição de biomoléculas exógenas, o tamanho do peptídeo inserido é limitado, pois peptídeos grandes interferem nas funções do capsídeo, tornando o fago pouco infectivo. Este sistema foi criado para a exposição de pequenos peptídeos, de no máximo 30 aminoácidos (Phizicky e Fields, 1995).

Para que os vírus bacteriófagos exponham fragmentos de proteínas acopladas ao capsídeo é necessário que a sequência de DNA correspondente seja inserida no genoma do fago. É justamente esse o princípio da construção de uma biblioteca de fagos, que nada mais é que uma coleção de um vasto número de peptídeos randômicos (10^7 a 10^9 partículas) cujas sequências são geradas aleatoriamente por uma variedade de resíduos de aminoácidos em cada posição e apresentam-se fundidos a proteínas do capsídeo viral. Os peptídeos expressos, em forma linear ou circular, são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epitopos contínuos ou descontínuos. A construção dessas bibliotecas é feita principalmente pela inserção de oligonuclotídeos degenerados aleatoriamente e sintetizados quimicamente no gene que codifica a proteína do capsídeo. O fago M13 tem sido o mais utilizado para a construção de bibliotecas (Sidhu, 2000; Romanov et al., 2001; Azzazy e Highsmith, 2002; Dybwad et al., 2003).

As bibliotecas de peptídeos comerciais de sete e 12 aminoácidos (7 e 12-mer) apresentam uma complexidade de dois bilhões de clones independentes, que contêm muitas se não todas as $1,28 \times 10^9$ possíveis sequências heptapeptídicas e $4,1 \times 10^{15}$ sequências possíveis nas bibliotecas 12 aminoácidos (NEB, 2009). O sucesso da seleção por *Phage Display* depende da complexidade da biblioteca, ou seja, a maior diversidade de clones dentro da biblioteca aumenta a probabilidade de conter sequências que ligarão a um determinado alvo com maior afinidade (Noren e Noren, 2001).

Além das bibliotecas de peptídeos, existem atualmente vários tipos de bibliotecas utilizadas com diferentes propósitos. As bibliotecas de anticorpos têm sido utilizadas para estudos de mapeamento das respostas imunológicas, produção de anticorpos terapêuticos e outras aplicações (Liu et al., 2002; Groves et al., 2006). Bibliotecas de receptores de células T (TCR), bibliotecas de peptídeos-MHC, e bibliotecas de cDNA vem sendo construídas e exploradas com diversas finalidades (Sergeeva et al., 2006).

A construção de certas bibliotecas pode requerer o uso de vetores. No caso do fago M13, por exemplo, há duas formas de DNA: fita simples (ssDNA), presente no fago selvagem e fita dupla (dsDNA), conhecida como forma replicante plasmidial, a qual pode ser isolada apenas em bactérias infectadas e usada para clonar o fragmento desejado para o sistema *Phage Display*. *Fagemídeos* (ou *fagomídeos*, ou ainda, *fasmídeos*) são os vetores mais usados em *Phage Display* e são híbridos de vetores de fago e de plasmídeo. Contém as origens de replicação para o fago M13 em *E. coli*, além do gene III, sítios múltiplos de clonagem apropriados e um gene de resistência a um antibiótico. Porém, na falta de outros genes, estruturais ou não-estruturais, a inserção do fagemídeo em bactérias pode requerer uma infecção paralela de um fago auxiliar (*helper phage*) que não contém inserções de DNA exógeno e provê o código para gerar todas as proteínas estruturais de uma partícula viral inteira. Assim, ao serem eliminados de uma bactéria parasitada, partículas de fagos podem expor suas proteínas pIII, por exemplo, tanto como derivada do fago auxiliar, como na forma de um polipeptídeo pIII formado por peptídeos fundidos e codificado pelo fagemídeo (Mead et al., 1988; Benhar, 2001; Azzazy e Highsmith, 2002).

Enquanto peptídeos muito pequenos expressos em proteínas do capsídeo viral podem ser aderidos a ligantes específicos e serem, por isso, considerados portadores de propriedades miméticas a moléculas naturais, anticorpos recombinantes são exemplos de proteínas maiores que podem ser amplamente aplicados em *Phage Display*. Podem ser gerados anticorpos monoclonais a partir de uma população humana exposta a determinado agente microbiano, ou a partir de um seletivo grupo de pacientes com uma mesma enfermidade, com destaque para os cânceres. A hiperimunização de animais com determinado antígeno oferece a possibilidade de gerarem-se fragmentos de anticorpos com especificidade. Em ambos os casos, a construção de uma biblioteca de anticorpos parte da experiência do sistema imunológico com o antígeno alvo, sendo necessário, nesse caso, fazer uso da técnica de transcrição reversa do mRNA obtido de linfócitos B do sangue ou mesmo a partir da maceração de baço. Essas células, capazes de produzir anticorpos naturalmente, após a captura, apresentação e reconhecimento do antígeno, possuem em seu código genético a sequência de nucleotídeos codificadora para a cadeia variável específica de imunoglobulinas. (Griffith, 1993; Winter et al., 1994; Azzazy e Highsmith, 2002). Braganza et al.(2011) construíram uma biblioteca de scFV a partir de cDNA extraído de esplenócitos de cães imunizados contra parvovírus canino, possibilitando a seleção de anticorpos recombinantes com cadeias pesadas e leves, com alta especificidade ao

vírus, também expandindo a metodologia para a espécie canina e revelando a possibilidade de geração de anticorpos mais específicos com vistas à utilização na terapêutica canina.

Por questões práticas, a biblioteca pode expor no fago apenas a porção Fab' do anticorpo, que é formada por uma cadeia leve e uma pesada de cada uma das porções constante e variável da molécula, ou ainda, expor apenas o fragmento variável, formado por uma cadeia leve e uma cadeia pesada e as regiões determinantes de complementariedade (CDR) que detém a região específica do anticorpo chamada de *paratopo*, ao qual se liga o *epitopo* do antígeno. O fragmento variável recombinante é chamado de scFv (fragmento variável de única cadeia), em que as duas cadeias variáveis, leve e pesada, são unidas por uma curta sequência de aminoácidos (*linker*), formando-se, assim, um único polipeptídeo, mas com disposição e arranjo formando o paratopo específico, mimetizando o anticorpo natural (figura 2, Azzazy e Highsmith, 2002).

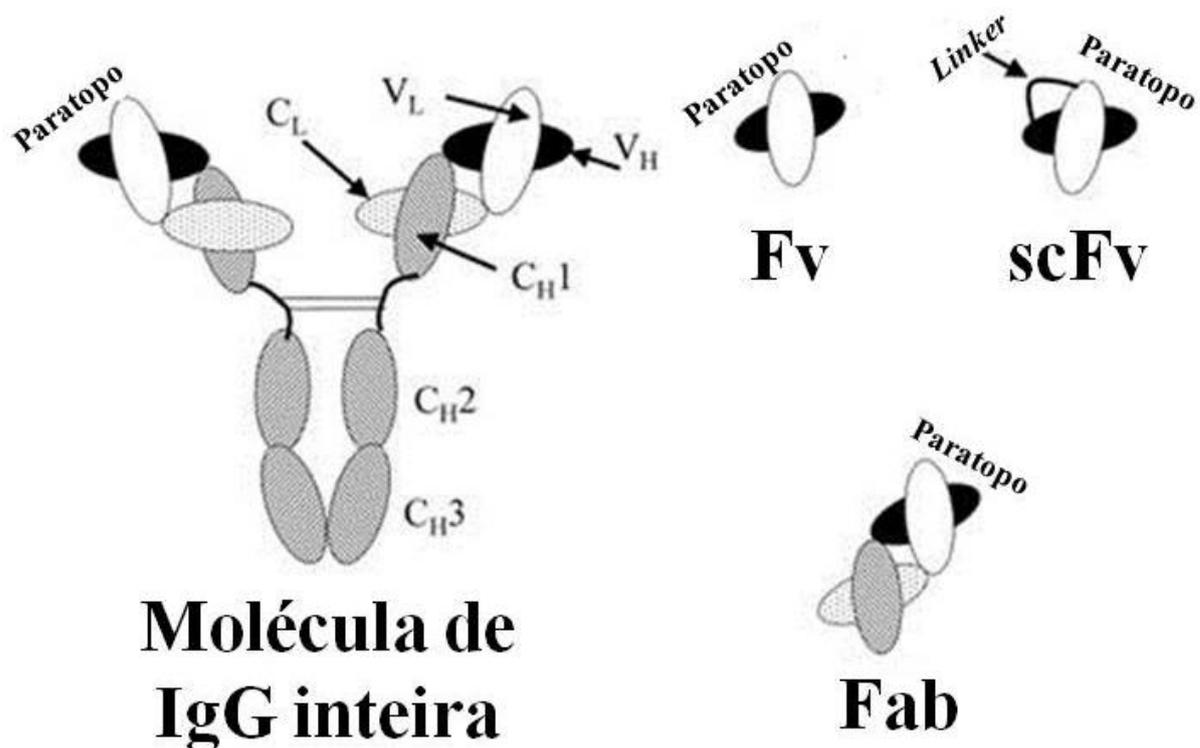


Figura 2 – Estrutura de uma molécula de IgG mostrando os domínios de cadeias variáveis pesadas (VH) e leves (VL) e cadeias constantes (CH e CL), o domínio de ligação do antígeno formado por VH e VL, onde fica a região específica da imunoglobulina (paratopo) e os fragmentos monoméricos de anticorpos: Fab, Fv (fragmento variável) e scFv (fragmento variável de cadeia única). (Adaptado de Azzazy e Highsmith, 2002)

A transcrição reversa permite a obtenção de DNA e amplificação dos genes para as cadeias variáveis leve (V_L) e pesada (V_H). O vetor fagemídeo é então construído contendo esses genes amplificados com o gene para o *linker* entre eles. O vetor é então introduzido em *E. coli*, sendo a etapa de ligação e transformação bacteriana muito importante e influente sobre o tamanho de clones que a biblioteca vai gerar. As bactérias contidas no fagemídeo são então infectadas com o fago auxiliar para, por fim, gerar as partículas inteiras de vírus contendo o fragmento scFv fundido à pIII. (Winter et al., 1994; Neri et al., 1995; Hoogenboom et al., 1998; Azzazy e Highsmith, 2002).

De posse de uma biblioteca de fagos, a partir de alvos bem estabelecidos, procede-se o processo de seleção biológica, cujo objetivo é formar subpopulações de peptídeos oriundos de fagos, a partir de uma população inicial, com aumentada aptidão de acordo com critérios pré-definidos. A mais comum pressão de seleção imposta sobre populações de peptídeos exibidos em fagos é a afinidade por um receptor-alvo (Smith e Petrenko, 1997). Geralmente, o receptor-alvo é adsorvido em um suporte sólido e a mistura de fagos é incubada sobre o receptor imobilizado (anticorpos específicos, por exemplo). Os fagos que exibem peptídeos ligantes ao receptor são capturados e os fagos não ligados são eliminados por lavagens com tampões (Lunder et al., 2008).

Os fagos capturados após a seleção são infectivos e podem ser amplificados por bactérias. Os clones de fagos selecionados e enriquecidos após dois a três ciclos de seleção, em que a afinidade para o receptor-alvo é aumentada podem ser caracterizados individualmente, tanto pela afinidade, em ensaios imunológicos, como ELISA, quanto pela determinação da sequência do DNA viral, que contém também a sequência da proteína exposta no fago que foi selecionada (Lane e Stephen, 1993; (Smith e Petrenko, 1997).

Como os fagos são clonados e caracterizados individualmente, é possível utilizar uma mistura complexa de receptores-alvo, tipo imunoglobulinas totais dos soros com milhares de anticorpos com diferentes especificidades, para selecionar uma ampla variedade de peptídeos. Essa estratégia serve como base para a descoberta de epítopos que é uma estratégia para identificar peptídeos com potencial para diagnóstico e vacinas (Folgori et al., 1994; Sioud et al., 1996).

Muitos grupos de pesquisa têm utilizado *Phage Display* para a seleção de peptídeos ligantes às proteínas purificadas com propósito de identificar interações entre proteínas e mapear seus

domínios de interação. Estes peptídeos têm sido também avaliados como agentes de distribuição direta de drogas. Pesquisas têm combinado a seleção de bibliotecas randômicas de peptídeos para identificar receptores de superfície celular em conjunto com os seus ligantes que podem ser diretamente utilizados como protótipos para alvos terapêuticos (Sergeeva et al., 2006) .

Peptídeos considerados alvos para receptores tumorais têm sido identificados, explorados e utilizados em estudos clínicos, sendo também demonstrado que as células tumorais podem ser agrupadas por padrões dos seus ligantes peptídicos, derivados do *Phage Display*, direcionados para receptores da superfície celular e diferencialmente expressos (Arap, et al., 1998; Brissette et al., 2006; Hajitou et al., 2006; Samoylova et al., 2006).

Algumas vezes, a identificação de peptídeos ligantes provenientes de uma biblioteca randômica pode servir para descoberta de um ligante natural ainda desconhecido (Smith e Petrenko, 1997). Peptídeos selecionados por *Phage Display* considerados miméticos antigênicos de epitopos naturais podem ser utilizados para imunizar animais sadios. Alguns deles são capazes de induzir novos anticorpos que reagem cruzadamente com o epitopo natural, sendo considerados miméticos imunogênicos. A mimeticidade antigênica e imunogênica é a base para a descoberta de epitopos com aplicações para o desenvolvimento de vacinas e plataformas de diagnóstico para as doenças (Folgori et al., 1994; Pasqualini et al., 1995; Sioud et al., 1996).

Os miméticos antigênicos apresentam vantagens sobre os antígenos naturais pois eles são mais simples e mais baratos para descobrir e produzir, além de possibilitarem focalizar uma especificidade em particular eliminando as possíveis reações cruzadas nos diagnósticos. Os miméticos podem ser utilizados quando antígenos naturais associados com a doença são ainda desconhecidos ou difíceis de serem obtidos. Outra possível aplicação seria a utilização dos miméticos como componentes de vacinas sintéticas (Smith e Petrenko, 1997).

A identificação de peptídeos por *Phage Display* pode trazer para a Medicina Veterinária grandes avanços, tanto com estratégia terapêutica quanto profilática. Os tratamentos antibioticoterápicos sempre trouxeram riscos de seleção de amostras resistentes de microrganismos, fazendo-se necessária a busca de alternativas, bem como a massiva imunização de plantéis e rebanhos. Em aves, assim como de uma maneira geral em todas as espécies animais, a imunização com vacinas vivas atenuadas sempre foi medida promissora.

Porém, em pintos e frangos a imunização insuficiente causada pela imaturidade do sistema imunológico é um ponto limitante. Para prevenção ou redução de infecções intestinais pode ser feita a imunização passiva pela administração oral de imunoglobulinas, especialmente IgA, que é o anticorpo secretado por mucosas (Czinn et al., 1993; Enriquez e Riggs, 1998; Wieland et al., 2004). Para a geração de fragmentos Fab de IgA específicos, Wieland et al. (2006) hiperimunizaram galinhas com oocistos esporulados de *Eimeria acervulina* e a partir de órgãos linfóides desses animais obtiveram RNA e desenvolveram o fagemídeo pChick3, montado com genes para a proteína pIII do fago M13 e para cadeias pesada e leve daquele tipo de anticorpo. A propagação desse vetor em bactérias transformadas, bem como a seleção biológica e testes imunológicos geraram 10 fragmentos diferentes de anticorpos IgA com alta especificidade para oocistos e esporozoítos do coccídeo, mostrando que a geração sintética de anticorpos é eficaz. Coccídeos de aves também foram objeto de estudo em seleções de peptídeos de bibliotecas Ph.D. 7 e 12, as quais resultaram na descoberta do peptídeo chamado PW2, composto por 12 aminoácidos e curiosamente reconhecido como capaz de romper a película de esporozoítos de *E. acervulina*, *E. tenella* e *Toxoplasma gondii*, além de ser molecularmente similar a peptídeos antimicrobianos naturais (Silva Jr. et al., 2002).

Estudos com o vírus influenza aviário H9N2 demonstraram que um peptídeo selecionado proveniente de bibliotecas apresentou significativa atividade anti-viral, inibindo a replicação viral por ligação com a proteína hemaglutinina (HA) do vírus. De acordo com os resultados, foi sugerido o uso deste peptídeo como agente anti-viral alternativo em substituição às drogas ineficientes atualmente utilizadas (Rajik et al., 2009).

Peptídeos miméticos a proteínas recombinantes dos vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) e da Anemia Infecciosa Equina (AIE) foram obtidos a partir de bibliotecas comerciais de 7 e 12 aminoácidos. A técnica empregada foi eficiente para a descoberta de um peptídeo mimético antigênico que apresenta potencial para ser utilizado como antígeno no diagnóstico da AIE e da LEB, além de servir de base para a construção de peptídeos sintéticos a partir da sequência de aminoácidos caracterizada (Santos, 2010b).

A identificação de peptídeos miméticos proporciona outras formas de manipulação e aplicação em animais, como na seleção de um dodecapeptídeo muito similar a antígenos de *Avibacterium paragallinarum*, o agente causador da coriza infecciosa das galinhas (Wang et al., 2007). Esse peptídeo foi usado para orientar a construção de um vetor de *E. coli* que, ao

ser inserido no genoma bacteriano promoveu a expressão de mimetopos na superfície da membrana celular, e ainda induziu a produção de anticorpos contra *A. paragallinarum* em galinhas imunizadas com a *E. coli* recombinante.

Proteínas bem identificadas e já consagradas em testes imunológicos podem servir de base para a seleção de peptídeos em *Phage Display* que, diferentemente do antígeno original que mimetizam, não tenham reações cruzadas com anticorpos específicos para outros agentes. Um exemplo disso foi a montagem de um vetor fagemídeo a partir de fragmento de cDNA contendo gene para a proteína não-estrutural NS1 do vírus da Doença da Língua Azul, o que resultou na expressão de diversos peptídeos em fagos. Dentre esses peptídeos foi possível identificar um de 28 aminoácidos bem reconhecido por anticorpos de coelhos contra a NS1 e não reativo à presença de antissoro contra o vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica, que assim como a Língua Azul, pode acometer ovinos (Plessis et al., 1995).

A exposição de peptídeos miméticos a uma proteína viral específica de rotavírus isolado de suíno, a VP7, também foi conseguida a partir do isolamento do gene em cDNA e inclusão no genoma de um vetor de fago (Huang et al., 2000).

Streptococcus equi subsp. *equi*, bactéria causadora do garrotilho, teve uma de suas proteínas de membrana, a ScIB, identificada como semelhante a peptídeos selecionados por *Phage Display*, os quais também foram reativos em ensaios imunológicos empregando soros de cavalos doentes. Neste caso, além de toda a descrição bioquímica e molecular, a técnica mostrou que o aumento de títulos de anticorpos contra os novos peptídeos selecionados em cavalos convalescentes revela um aumento da expressão da proteína bacteriana durante a infecção estreptocócica. Ainda que a função patológica e infecciosa da proteína natural não tenha sido determinada, os resultados da aplicação dos peptídeos que a mimetizam sugerem sua importância na patogenia desta doença e indicam-na como candidata ao desenvolvimento de vacinas (Karlström et al., 2004).

Anticorpos policlonais de soros de pacientes humanos com leishmaniose visceral foram eficazes na seleção biológica de peptídeos miméticos à *Leishmania* sp., os quais apresentaram grande similaridade a glicoproteínas de membrana do protozoário, e também foram bem reativos, com 83% de sensibilidade, em ELISA em que se empregaram soros de cães com a zoonose (Almeida et al., 2009).

Naseem et al. (2010) realçaram a valiosa contribuição da técnica de *Phage Display* para a identificação de mais de vinte peptídeos miméticos a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, o agente causador da Pleuropneumonia Bovina Contagiosa, de modo que os mais reativos a diversas espécies de micoplasmas empregadas neste estudo são candidatos a serem usados com fins diagnósticos. Esta doença é um sério problema na África Sub-Saariana onde os rebanhos se infectam e transmitem a bactéria pelo contato animal-animal e tem, até o momento, como grande entrave para seu controle a falta de um teste diagnóstico com alta sensibilidade. Os testes atuais são a fixação de complemento e ELISA, que correlacionados alcançam 64 a 70% de sensibilidade e 98% de especificidade. Por ser uma grave epidemia bovina local, a amostra de micoplasma usada foi isolada de um surto da doença ocorrido no Quênia, o que aumenta a chance de anticorpos produzidos contra os peptídeos miméticos serem bem empregados em ensaios diagnósticos, bem como protegerem os rebanhos num possível desenvolvimento de uma vacina.

Uma sequência de trabalhos envolvendo reconhecimento de mimetopos, comparações com antígenos naturais, produção de anticorpos e imunizações contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* têm levado a pesquisa com *Phage Display* a ficar próxima do desenvolvimento de uma vacina (Souza, 2007; Prudêncio, 2008; Prudêncio et al., 2009a, 2009b, 2011a, 2011b; Souza et al., 2009). Selecionaram-se de bibliotecas de peptídeos de sete ou 12 aminoácidos alguns que apresentaram homologia com proteínas conhecidas do carrapato e outros com motivos até então desconhecidos. A hiperimunização de camundongos com tais peptídeos levou à obtenção de anticorpos reativos em ensaios imunológicos em que se empregaram antígenos do carrapato. Os peptídeos identificados auxiliaram, também, na elucidação da atividade reconhedora de anticorpos scFv obtidos a partir de uma biblioteca construída, os quais reconhecem também uma das proteínas presentes em extrato total de carrapatos em fase larval ou adulta. Finalmente, os resultados com a imunização de bovinos com os diferentes peptídeos obtidos apresentaram respostas de produção sérica de imunoglobulinas. Após uma infestação experimental desses animais com larvas do carrapato, apesar de não ter sido observada redução da carga parasitária, teleóginas recolhidas dos animais mostraram queda na ovoposição e escurecimento de coloração, sugestivos de danos hemorrágicos sobre os tratos reprodutivo e gastrintestinal dos parasitos.

Os resultados, antigos e recentes, das pesquisas que empregaram *Phage Display*, indicam uma grande variedade de aplicações para a técnica, proporcionando a geração de avanços na área

do imunodiagnóstico e da terapêutica veterinária. É uma técnica bem difundida e amparada pela literatura científica especializada, inclusive a brasileira, o que alimenta os anseios por inovações que tornem mais fáceis e acessíveis a ampliação e o uso de técnicas laboratoriais avançadas, com melhor relação custo-benefício, seguridade ambiental e produtividade científica. Por esses motivos, é uma técnica que pesquisadores ainda podem aplicar em muito no vasto campo das ciências veterinárias e agrárias.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Obtenção de anticorpos monoclonais (scFv) e peptídeos miméticos a antígenos de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* pela técnica de *Phage Display*.

Objetivos específicos:

- Seleção de anticorpos monoclonais (scFv) em uma biblioteca de fagos utilizando-se de *C. fetus* subsp. *venerealis*.

- Caracterização dos anticorpos monoclonais selecionados e avaliação de reatividade contra *C. fetus* subsp. *venerealis*.

- Seleção de peptídeos randômicos de sete aminoácidos em uma biblioteca de fagos comercial utilizando-se soro hiperimune de coelhos contra *C. fetus* subsp. *venerealis*;

- Caracterização dos peptídeos selecionados e avaliação da reatividade enquanto antígenos miméticos da bactéria.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Preparo de material biológico

4.1.1 – Amostras bacterianas

As amostras bacterianas utilizadas neste trabalho estão apresentadas na tabela 1.

Amostras de referência do gênero *Campylobacter*, estocadas a -80°C foram cultivadas em ágar infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, EUA), acrescido de 5% de sangue equino desfibrinado, em condições de microaerofilia (5% O_2 , 5% H_2 , 10% CO_2 e 80% N_2) a 37°C por 48 h (Vandamme, 2000). A pureza das amostras foi avaliada microscopicamente pelo método de Gram (Laborclin, Paraná).

Pré inóculos de *E. coli* ER2738 foram cultivados em caldo Luria-Bertani (LB, NaCl 1%, LabSynth, São Paulo; triptona 1%, Oxoid, Inglaterra; extrato de levedura 0,5%, BD, França), suplementado com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solução hidroalcoólica de tetraciclina (Sigma-Aldrich, Alemanha) a 37°C por 16h.

Pré-inóculos de *E. coli* XL1-Blue foram cultivados em meio Super Broth (SB) composto de peptona de caseína 3% (BD, França), extrato de levedura 2% e Ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico 1% (MOPS, Sigma-Aldrich, Alemanha) suplementado com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solução hidroalcoólica de tetraciclina a 37°C por 16 h. Pré-inóculos de *E.coli* Top 10 foram cultivados em meio LB suplementado com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solução de estreptomicina (Sigma-Aldrich, Alemanha) a 37°C por 16 h

Staphylococcus aureus foram cultivadas em caldo LB a 37°C por 16 h. A pureza da amostra foi avaliada microscopicamente pelo método de Gram.

Tabela 1 - Amostras de bactérias de referência utilizadas nos experimentos.

Espécie	Amostra
<i>Campylobacter. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	ATCC ¹ 27374 ^T
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	NCTC ² 10354 – P3 ³
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	LCDC ⁴ 17398
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	NCTC 11351 ^T
<i>C. sputorum</i> biovar <i>paraureolyticus</i>	LCDC 6939
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i>	LMG ⁵ 6647
<i>Escherichia coli</i>	ER2738 ⁶
<i>E. coli</i>	Top 10 ⁷
<i>E. coli</i>	XL1 – Blue ⁸
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923

T – Amostra tipo

1 - *American Type Culture Collection*, EUA

2 - *National Type Culture Collection*, Inglaterra

3 - A amostra NCTC 10354 - P3 foi isolada e armazenada pelo Laboratório de Bacteriologia Aplicada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Escola de Veterinária, UFMG (Stynen, 2009) após infecção experimental por via vaginal de novilhas virgens (três passagens) com a amostra padrão NCTC 10354.

4 – *Laboratory Center for Disease Control*, Canadá

5 – *Laboratorium voor Microbiologic* – Rijksuniversiteit Gent, Bélgica

6 - *New England BioLabs*, EUA

7 – *Invitrogen*, EUA

8 – *Stratagene*, EUA

4.1.2 - Extração de proteínas bacterianas

4.1.2.1 – Extração por sonicação

Colônias puras da amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3 de placas de ágar BHI foram coletadas com *swabs* estéreis, ressuspensas em solução salina fosfatada tamponada (PBS - 0,01M NaHPO₄, Proquimios, Rio de Janeiro; 0,15M NaCl, pH 7,4) e padronizadas na escala 10 de McFarland, resultando em volume final de 10 mL. A amostra foi, então, sonicada em gelo por seis ciclos de 30 s, com intervalos de 1 min de repouso, a uma frequência de 70 kHz. A sonicação foi avaliada por microscopia óptica por coloração com fucsina fenicada estabelecendo-se um padrão de 60% de lise das células bacterianas. A amostra sonicada foi distribuída em alíquotas de 250 µL e estocadas a -80°C. A concentração de proteínas dos antígenos sonicados foi dosada pelo método de Bradford (1976).

4.1.2.2 - Extração com tampão de lise

Foi feita a extração de proteínas de todas as amostras do gênero *Campylobacter* (tabela 1), além de *E. coli* XL1 blue e *S. aureus* ATCC 25923. Colônias de placas de ágar BHI-sangue foram ressuspensas em tampão de lise, composto de uréia 8M, thiourea 2M, 4% CHAPS, dithiothreitol – DTT, 65mM, Tris base 40 mM, e de inibidor de protease (Protease Inhibitor, GE Healthcare, San Francisco, CA). Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 h à temperatura ambiente. Depois a solução passou por um processo de lise mecânica utilizando uma agulha 26G e o conteúdo foi, então, centrifugado por 30 minutos a 5000 x g e o sobrenadante distribuído em alíquotas e congeladas a – 80° C. A concentração de proteínas extraídas foi dosada pelo método de Bradford (1976).

4.1.3 - Produção de soro hiperimune em coelhos

Para produção de soro hiperimune foram utilizados três coelhos da raça Nova Zelândia de aproximadamente 2,5 kg (Figueiredo, 2002). Após a coleta de 5 mL de sangue para a obtenção de soro pré-imune, os coelhos foram submetidos a uma primeira inoculação intramuscular (IM) constituída de 0,5 mL de adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, Alemanha) acrescido de 0,5 mL de suspensão de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, padronizada para o tubo 10 da escala de McFarland em PBS pH 7,4.

Os coelhos receberam outras quatro inoculações, intervaladas de uma semana, de 0,5 mL; 1,0 mL; 2,0 mL e 4,0 mL, respectivamente, de suspensão bacteriana semelhante sem adjuvante, aplicadas por via endovenosa. Foram feitas sangrias nos animais para análise da soroconversão pelo teste de aglutinação, realizadas com intervalos de 15 dias, iniciando antes da primeira inoculação. Após a obtenção de título >1000 foi realizada punção endovenosa de aproximadamente 30 mL para obtenção do soro hiperimune.

Durante todos os procedimentos foram adotadas medidas humanitárias para o manuseio dos animais (COBEA, 1996).

4.1.4 – Coleta de muco cérvico-vaginal

Foram coletadas 11 amostras de muco cérvico-vaginal de novilhas da Fazenda Hélio Barbosa, em Igarapé, MG e da Fazenda Modelo, em Pedro Leopoldo, MG, ambas da Escola de Veterinária da UFMG, cujos rebanhos são negativos para CGB. Amostras de 27 novilhas de rebanho com histórico de CGB foram obtidas da Fazenda Nhumirim, Embrapa Pantanal (Corumbá, MS).

A coleta de muco cérvico-vaginal foi feita com absorventes internos femininos (Johnson & Johnson, São Paulo) introduzidos na vagina de novilhas com auxílio de um aplicador acoplado a um tubo de metal. Os absorventes permaneceram em contato com a mucosa vaginal por pelo menos 30 minutos e, embebidos de muco, foram colocados em tubos estéreis e refrigerados. Pela diferença de peso foi calculado o volume de tampão (PBS, Tween 20 a 0,05%, pH 7,4) a ser usado para diluir o muco à razão de 1:10. Adicionado o tampão diluente, cada absorvente foi pressionado com um bastão de vidro estéril, o muco diluído foi recolhido, homogeneizado, dividido em alíquotas e congelado a -20° C.

Durante todos os procedimentos foram adotadas medidas humanitárias para o manuseio dos animais (COBEA, 1996).

4.2 - Seleção de peptídeos miméticos a *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

4.2.1 - Biblioteca de fagos

Para a seleção de peptídeos miméticos a antígenos de *C. fetus* subsp. *venerealis* foi empregada a biblioteca comercial de fagos M13 (Ph. D. – C7C™, New England BioLabs, EUA) expressando peptídeos conformacionais randômicos de sete aminoácidos na porção amino-terminal da proteína pIII

4.2.2 - Acoplamento de IgG do soro hiperimune em microesferas magnéticas

Para o processo de seleção de peptídeos da biblioteca, foi utilizado acoplamento de IgG do soro hiperimune de coelhos em microesferas magnéticas (Dynabeads® - Invitrogen – EUA) com anticorpos monoclonais anti-IgG de coelhos aderidos às suas superfícies. Cem microlitros de suspensão de microesferas foram lavados em um microtubo com PBS pH 7,4 por três vezes, por meio da sedimentação das microesferas mantendo-se o microtubo em contato com um anteparo magnético por dois minutos, seguido do recolhimento do sobrenadante e ressuspensão na mesma solução tampão e mesmo volume. Em seguida, foram adicionados 200 µL de soro hiperimune e incubados por 30 min a 2-8°C. Após nova lavagem, as microesferas foram ressuspensas e mantidas de um dia para o outro a 4°C, sob agitação lenta. Os anticorpos ligados às esferas passaram por um tratamento de ligação covalente por meio de lavagem com 1,0 mL de trietanolamina (Garden Química, São Paulo) 0,2M, pH 8,2 por duas vezes e ressuspensão e incubação por 30 min a temperatura ambiente, sob agitação rotacional, com solução de dimetil pimelimidato diidrocloreto (DMP,) 20mM, dissolvido em trietanolamina. Após sedimentação e descarte do sobrenadante, a reação foi interrompida por incubação com tampão Tris (25 mM), pH 7,5 por 15 min. Novamente foi feita sedimentação magnética, retirada do sobrenadante e lavagem do sedimento com 1mL de PBS acrescido de 5% de albumina sérica bovina (BSA) por duas vezes e incubação com o mesmo tampão por 1h a 37°C, para bloqueio. Em seguida, as microesferas foram copiosamente lavadas com 1,0 mL de PBS Tween 0,1% por três vezes e ressuspensas em 200 µL de PBS.

Para comprovar o acoplamento das moléculas de IgG às microesferas, procedeu-se um *Bead-ELISA*. Duas alíquotas de 5 µL da suspensão de microesferas foram adicionadas a 50 µL de anticorpos conjugados com peroxidase diluídos em PBS, sendo uma alíquota com anti-coelho (Sigma-Aldrich, Alemanha) na diluição de 1:5000 e a outra anti-ovino (1:5000) e incubadas sob agitação em um microtubo por 1h, a temperatura ambiente. Uma terceira alíquota foi adicionada a PBS sem anticorpos, para servir de controle negativo. Em seguida, procedeu-se a lavagem com PBS-T 0,1% por três vezes, por meio da sedimentação magnética das microesferas e ressuspensão final em 50 µL de PBS. Foram adicionados 50 µL de revelador cromógeno TMB (tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich, Alemanha) para reagir durante 5 minutos em cada microtubo e a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. A leitura da absorbância foi feita em aparelho espectrofotômetro a densidade óptica (DO) de 450 nm.

4.2.3 - *Biopannings*

4.2.3.1 - Ciclos de seleção

Foram usados 40 μL de suspensão de microesferas preparadas para cada ciclo de seleção. Após sedimentação magnética e retirada do sobrenadante foi adicionada a biblioteca de peptídeos, sendo 10 μL da solução de fagos diluídos em 200 μL de TBS-T 0,1% (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 0,1% Tween 20). A mistura foi homogeneizada e incubada por 30 min em agitação rotacional lenta à temperatura ambiente. Após sedimentação e recolhimento do sobrenadante, as microesferas foram lavadas 10 vezes com 500 μL de TBS-T 0,1%, observando-se o período de um minuto para a sedimentação ante o anteparo magnético.

Foram realizados dois *biopannings*, então, em que diferiram as estratégias de dissociação positiva e negativa dos fagos ligados às microesferas entre os ciclos de seleção. No primeiro *biopanning* (I BP), foi feita a subtração de inespecíficos apenas no primeiro ciclo de seleção, enquanto no segundo *biopanning* (II BP), a esta etapa foi realizada apenas no terceiro ciclo.

Para dissociação de fagos inespecíficos ligados às microesferas por competição (dissociação negativa) foram adicionados ao sedimento 200 μL soro negativo de coelho diluído (50 μL de soro mais 150 μL de TBS-T 0,1%) durante 1h a temperatura ambiente e sob agitação rotacional. Após foi feito o mesmo procedimento de sedimentação e lavagem da etapa anterior.

Para dissociação por competição dos fagos que permaneceram ligados às microesferas (dissociação positiva) foram adicionados ao sedimento 200 μL de solução na concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína bacteriana sonicada, com posterior incubação a temperatura ambiente durante 1h sob agitação rotacional.

A suspensão de células e microesferas foi sedimentada magneticamente apenas uma vez, com a separação do sobrenadante, chamado a partir de então de *eluato não-amplificado*, o qual foi estocado a 4°C.

Após a realização dos próximos passos, quando então é obtido o eluato amplificado, iniciou-se um segundo ciclo, repetindo-se todo o processo, e ao final deste, iniciado um terceiro e

último ciclo. Nestes dois outros ciclos, a única alteração metodológica foi a concentração do TBS-T usado, que é de 0,5%, em vez de 0,1% do primeiro ciclo.

4.2.3.2 - Amplificação e precipitação dos fagos

Uma alíquota de 10 μ L do eluato não-amplificado foi reservada para posterior titulação e o restante foi utilizado para reamplificação em *E. coli* ER 2738. Para tal, 50 mL de meio (LB) foram, anteriormente, inoculados com pré-inóculo de *E. coli* ER2738, acrescido de 20 μ g/mL de solução hidroalcoólica de tetraciclina (Sigma-Aldrich – EUA) e incubados sob agitação a 37°C até que fosse atingida a fase *early-log* do crescimento bacteriano (densidade óptica, DO_{600 nm} de 0,3). Nesse ponto, o eluato não-amplificado restante (cerca de 150 μ L) foi adicionado ao meio, o qual foi novamente incubado por 5h sob as mesmas condições. Após esse período, as suspensões bacterianas foram transferidas para tubos e centrifugadas (10000 x g, 10 min, 4°C), os sobrenadantes separados por inversão e novamente centrifugados, a fim de se obter sobrenadantes mais claros, os quais foram transferidos para outros tubos. Então, foram acrescidos de solução de polietilenoglicol (PEG 20% -NaCl 2,5 M, Promega, EUA) em volume equivalente a 1/6 do volume de sobrenadante obtido e estocados a 4° C, *overnight*. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados (15 min, 4° C, 10000 x g), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento dos fagos ressuspensionado em 1 mL de TBS e transferido para um microtubo e centrifugado para retirada das células residuais. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, para adição de PEG-NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada por 1h em gelo e então centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em tampão TBS, sendo assim obtidos o *eluato amplificado*. Uma alíquota de 10 μ L de cada eluato foi reservadas para posterior titulação. A partir do eluato de fagos amplificados um segundo ciclo de seleção foi feito iniciando-se com a incubação deste eluato com a suspensão de microesferas, em vez da biblioteca usada no primeiro ciclo, e repetindo-se todos os procedimentos citados. Ao se obter o eluato amplificado do segundo ciclo, foi iniciado um terceiro e último ciclo.

4.2.3.3 - Titulação dos fagos dos eluatos

Após a realização dos três ciclos dos *biopannings*, os eluatos amplificados e não-amplificados dos ciclos de seleção foram plaqueados a fim de se isolar clones e também determinar o título, ou seja, a quantidade de partículas virais de entrada e de saída a cada ciclo dos *biopannings*. Para isso, as soluções de fagos foram submetidas a diluições seriadas crescentes exponenciais sob logaritmo 10 em meio LB. Para eluatos não-amplificados foram utilizadas as diluições de 10^1 até 10^3 e para eluatos amplificados, de 10^6 a 10^9 . A cada diluição foram adicionados 200 μ L da cultura de ER2738 na fase *mid-log* ($DO_{600\text{ nm}}$ 0,5) com rápida agitação e imediata incubação por exatos cinco minutos a temperatura ambiente. As células bacterianas, infectadas após esse período, foram transferidas para tubos contendo 3 mL de ágar-top a 56°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido suplementado com IPTG - Xgal (200 mg/mL, BioBasic, Canadá) e tetracilina (20 μ g/mL). Foi feita uma placa controle em cada grupo de titulações, na qual não foram adicionados fagos. As placas foram incubadas a 37°C de um dia para o outro. As colônias azuis formadas nas placas, demonstrando a quebra do substrato X-gal, foram contadas e quantificadas, multiplicando-se o valor da contagem de colônias pelo fator de diluição para, assim, obterem-se os títulos de fagos nos eluatos.

4.2.4 - Isolamento de colônias, amplificação em deep well e extração de DNA.

As colônias azuis de *E.coli* ER2738 infectadas por fagos das placas de titulação foram isoladas com o auxílio de um palito de madeira estéril e, cada uma, adicionada a um poço de uma placa *deep well* (Eppendorf - Brasil) de 96 poços, contendo 1,2 mL de meio de cultura (LB) com *E. coli* ER2738 em fase inicial de crescimento ($DO_{600\text{ nm}}$ 0,3). Foram usadas duas placas, uma para cada *biopanning*, de modo que cada uma teve suas 12 colunas de poços divididas em três partes, por onde foram distribuídas as colônias de cada um dos três ciclos de seleção, a fim de se estimar, posteriormente, a frequência dos fagos selecionados em cada ciclo.

As placas *deep well* foram incubadas a 37° C sob vigorosa agitação (300 rpm) e depois de 5h de crescimento foi separada uma alíquota de 50 μ L de cada poço e congelada com 50 μ L de glicerol 50% a - 80° C, para servirem de *back-up*. Após mais 19h de incubação a 37°C, sob

agitação vigorosa, a placa foi centrifugada por 10 minutos, 4000 x g, a 4°C. Um volume de 800 µL de sobrenadante de cada poço foi transferido para poços de placas estéreis, com posterior adição de 200 µL PEG – NaCl, e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente para precipitação dos fagos. As placas foram centrifugadas durante 40 minutos, a 4000 x g, a 20°C e invertidas sobre papel absorvente. O sedimento foi ressuscitado em 100 µL de iodeto de sódio (Tris-HCl 10 mM pH:8,0, EDTA 1 mM e NaI 4M) e a precipitação do ácido nucléico foi realizada com 250 µL de etanol absoluto por 10 minutos a temperatura ambiente. As placas foram centrifugadas mais uma vez por 40 minutos, 4000 x g, a 20°C, e o conteúdo das placas descartado, com posterior acréscimo de 150 µL de etanol 70%. Após isso as placas foram centrifugadas por mais 15 min, 4000 x g, 20°C e o sobrenadante descartado. O conteúdo das placas foi ressuscitado em aproximadamente 20 µL de água deionizada. A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram verificadas por amostragem em eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

4.2.5 - Sequenciamento do DNA

Para a reação de sequenciamento do DNA dos fagos, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5 pmol do primer -96 gIII (5'- CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em um termociclador de placas (MasterCycler-Eppendorf) com o seguinte protocolo: desnaturação (95°C por 20 s); anelamento (50°C por 15 s) e extensão (60°C por um minuto). A precipitação do DNA sequenciado foi feita com 1 µL de acetato de amônio e 27,5µL etanol absoluto. Em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 3700 rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150µL de etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 minutos, a 3700 rpm. A solução de etanol foi descartada e a placa foi pulsada a 800 rpm durante um segundo invertida sobre papel absorvente. A placa foi coberta por papel alumínio e permaneceu em repouso durante 5 minutos e a partir de então, foi mantida sempre, dessa forma, ao abrigo da luz. Os precipitados resultantes foram ressuscitados em 10 ul do tampão de diluição padrão (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A leitura do sequenciamento foi realizada no sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU), segundo as recomendações do *software* próprio do equipamento (*Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Pred 15*).

4.2.6. - Dedução das sequências de aminoácidos dos peptídeos

As sequências de DNA obtidas foram traduzidas pelo programa DNA2PRO12 (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>), que é designado para tradução de sequências de insertos tanto de bibliotecas da New England Biolabs, USA (Ph.D.-12TM or Ph.D.-C7CTM) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as sequências inicial e final do vetor, no caso o bacteriófago M13. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na sequência, tais como códons inesperados ou erros na sequência próxima.

A partir dos resultados, foi determinado o número de peptídeos cujo sequenciamento e tradução foram possíveis, a frequência (repetições) de cada, bem como a distribuição de suas frequências nos

três ciclos de seleção dos dois *biopannings* realizados. Os peptídeos selecionados foram paralelamente denominados com suas sequências heptapeptídicas de aminoácidos, bem como por um código designativo do *biopanning* e do poço da placa *deep well* de onde fora isolada a mostra de DNA.

4.2.7 - Amplificação dos fagos escolhidos

Uma alíquota de 5 μ L do *back-up* de cada fago foi adicionada a poços de uma placa *deep well* contendo 1,2 mL de meio de cultura de *E. coli* ER2738 crescida em meio LB ($DO_{600\text{ nm}}$ de 0,5). A placa foi incubada a 37° C, sob agitação, de um dia para o outro, a fim de serem amplificados em meio de cultura os fagos, isoladamente em cada poço. Após o crescimento, a placa foi centrifugada (4000 x g, a 4°C) e aproximadamente 900 μ L de sobrenadante foram transferidos para outra placa *deep well*, a qual foi selada com adesivo próprio e armazenada a 4° C. Da mesma forma foi realizado o crescimento de uma amostra de *fago selvagem M13KE* (New England BioLabs), um fago que não expressa proteínas exógenas fusionadas às suas proteínas.

4.2.8 - ELISA de captura

Para as reações em duplicata, placas de microtitulação carregadas (Maxisorp – NUNC, EUA) foram sensibilizadas com 100 µg/poço de anticorpo monoclonal anti-M13 (GE Healthcare) diluídos em 50 µL em tampão bicarbonato (50mM, pH 9,6) *overnight* a 4°C. No dia seguinte as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS com 5% de leite desnatado, Nestlé Brasil Ltda, São Paulo), 300 µL/poço, por 1h a 37° C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (200 µL de PBS-T a 0,05) e incubadas com 50 µL/poço com sobrenadante de cultura dos fagos selecionados e de cultura de fago selvagem, para controle negativo, por 1h a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem e incubadas por 1h a 37° C com 50 µL de soros pré e hiperimune (negativo e positivo) de coelhos (item 4.1.3) na diluição de 1:100 em tampão de bloqueio. Após esse período as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e incubadas com 50 µL de anticorpos secundários (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, Sigma, EUA), diluídos a 1:5000 em tampão de bloqueio, por 1h a 37° C. Depois de cinco lavagens, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H₂O₂). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M. A reatividade foi obtida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA) pela leitura a 492nm.

Duplicatas das microplacas foram reservadas, em todos os ensaios, para reações de controle, em que foram omitidas as etapas de sensibilização, incubação com anticorpos primário e ambas.

Os valores de absorvância foram analisados a partir do cálculo das médias das duplicatas e comparados frente aos valores de absorvância do fago selvagem.

4.2.9 - Análise das sequências de aminoácidos

A análise das sequências de aminoácidos mais frequentes, a procura por similaridade entre sequências peptídicas e o alinhamento múltiplo dos peptídeos foram realizados utilizando o programa ClustalW, disponível *on line* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>). As sequências dos peptídeos selecionadas foram analisadas quanto à homologia com sequências de proteínas de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 (Taxid 983328)

depositadas no GenBank através do programa BLAST — *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul et al., 1990) , disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

4.2.10 - Síntese de peptídeos escolhidos

Os cinco peptídeos mais reativos nos ensaios preliminares e relevantes quanto à frequência nos *biopannings* realizados foram escolhidos para serem sintetizados, pela empresa GenScript (Nova Jersey, EUA). Cada peptídeo foi planejado para conter 14 aminoácidos, sendo os sete da sequência aleatória selecionada nos biopannings com dois resíduos de cisteína com uma ponte dissulfeto entre eles e uma sequência GGGS, tal qual ocorre nas bibliotecas Ph7 conformacionais, além da conjugação do $-NH_2$ com BSA e amidação do C-terminal.

Os peptídeos sintéticos liofilizados foram diluídos na concentração de 1 mg/mL segundo as recomendações do fabricante. Dessa forma os peptídeos ALASLPL e SLSPVNS foram ressuspensos em água *MilliQ*, enquanto a LFSPLSA, LSYLFPP e PFASFLS foi adicionado solvente orgânico, a base de isopropanol, dimetilformamida e ureia 8M. Os peptídeos foram distribuídos em alíquotas para uso posterior e mantido a -20°C .

4.2.11 – Produção de soro hiperimune em camundongos e avaliação da soroconversão

Vinte e oito camundongos fêmeas, linhagem Swiss, oriundos do biotério Bioitaúna (Itaúna, MG), com peso em torno de 28 g e seis semanas de idade foram distribuídos em sete grupos com quatro em cada. Cinco grupos foram imunizados contra os peptídeos sintéticos, um grupo foi imunizado com BSA e um grupo recebeu placebo (PBS).

Cada camundongo foi inoculado pela via intraperitoneal com 200 μL de emulsão, preparada com 100 μL de peptídeo (25 μg) e 100 μL de adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, Alemanha). Foram feitas três imunizações, com intervalos de 15 dias, sendo que cada

uma foi acompanhada de coleta de sangue do plexo lacrimal, com auxílio de uma pipeta de vidro, obtendo-se soro para ser usado em imunoenaios para atestar a soro conversão.

Os soros coletados antes da primeira inoculação, e aos 15, 30 e 45 dias foram empregados em teste ELISA. Placas de microtitulação carregadas (Maxisorp – NUNC, EUA) foram sensibilizadas com 1 µg/poço de cada um dos cinco peptídeos e de BSA diluídos em 50 µL em tampão bicarbonato (50mM, pH 9,6) *overnight* a 4°C. No dia seguinte as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS com 5% de leite desnatado, Nestlé Brasil Ltda., São Paulo), 300 µL/poço, por 1h a 37° C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (200 µL de PBS-T a 0,05%) e incubadas com 50 µL/poço com soro dos camundongos de cada grupo, nas diluições de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400 por 1h a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem e incubadas com 50 µL de anticorpos secundários (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, Sigma, EUA), diluídos a 1:5000 em tampão de bloqueio, por 1h a 37° C. Depois de cinco lavagens , a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão OPD a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H₂O₂). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M. A reatividade foi obtida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA) pela leitura a 492nm. Como controles de todos os ensaios, foram usados soros dos grupos controles (BSA e placebo) nas mesmas condições.

Após a realização do ELISA e da verificação da soroconversão, foi feita a eutanásia dos camundongos. Procedeu-se a anestesia geral com 60 mg/kg de cetamina e 8 mg/kg de xilazina aplicados por via intraperitoneal, seguida de abertura da cavidade torácica e punção cardíaca.

Durante todos os procedimentos foram adotadas medidas humanitárias para o manuseio dos animais (COBEA, 1996).

4.2.12 – Reatividade dos peptídeos sintéticos com soro hiperimune de coelhos

Procedeu-se o ensaio ELISA, tal qual descrito para a triagem dos fagos, descrita no item 4.2.8, porém, fazendo-se a sensibilização das placas, em duplicatas, com 1 µg de cada peptídeo sintético por poço. Também foram, neste imunoenasiao, empregados tanto o soro de

coelhos hiperimunizados contra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, quanto o soro pré-imune, como controle negativo.

4.2.13 – Reatividade dos soros hiperimunes de camundongos com *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 - P3

Procedeu-se o mesmo princípio metodológico descrito no item 4.2.12, para a avaliação da soroconversão dos soros hiperimunes de camundongos, porém, as placas de ELISA foram sensibilizadas com 500 ng por poço, em duplicatas, de extrato sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 - P3.

4.2.14 – Reatividade de muco cérvico-vaginal com os peptídeos sintéticos

Os 11 mucos cérvico-vaginais coletados de rebanhos negativos para CGB e os 27 de rebanhos positivos foram testado em ELISA para seleção das amostras mais reativas. Para isso, placas de microtitulação carregadas (Maxisorp – NUNC, EUA) foram sensibilizadas com 250 ng de extrato sonicado *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 - P3 em 100 µL em tampão bicarbonato (50mM, pH 9,6) *overnight* a 4°C. No dia seguinte as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS com 5% de leite desnatado, Nestlé Brasil Ltda., São Paulo), 300 µL/poço, por 1h a 37° C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (200 µL de PBS-T a 0,05%, leite em pó desnatado 1%) e incubadas com 100 µL/poço com muco cérvico-vaginal, em duplicatas, diluído 1:50 em tampão de bloqueio, por 1h a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem e incubadas com 100 µL anti-IgG de bovino (Serotec, EUA), diluídos a 1:500 em tampão de bloqueio, por 1h a 37° C. Depois de cinco lavagens , foi adicionado 100 µL/poço do anticorpo conjugado (anti-IgG de camundongo-peroxidase, Sigma, EUA), diluídos a 1:5000 em tampão de bloqueio, por 1h a 37° C. Após mais cinco lavagens, a reação antígeno-anticorpos foi detectada pela adição de tampão OPD a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H₂O₂). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M. A reatividade foi obtida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA) pela leitura a 492nm.

Os doze mucos mais reativos neste imunoensaio foram selecionados, junto de dois controles negativos, para o teste ELISA empregando peptídeos sintéticos. Para isso, todo o procedimento descrito anteriormente foi empregado, porém, fazendo-se a sensibilização das placas de microtitulação carregadas com 1 µg/poço dos cinco peptídeos sintéticos, em duplicatas.

4.3 - Seleção de anticorpos monoclonais recombinantes (scFv)

4.3.1 - Biblioteca de scFv

Para a seleção fragmento variável de anticorpos de cadeia simples (scFv) foi utilizada uma biblioteca reamplificada desenvolvida no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Santos, 2010a), construída a partir de RNA total de leucócitos de pacientes com carcinoma bem diferenciado de tireoide. Essa biblioteca foi considerada *naive* para *Campylobacter* sp.

4.3.2 - Amplificação e titulação do fago auxiliar

Dez mililitros de meio SB acrescidos de 5 µL de tetraciclina (20 µg/mL) foram incubados a 37° C por 1h, sob agitação (250 rpm), com 10 µL de *E. coli* XL1-Blue (New England BioLabs, EUA) eletrocompetente. Após o crescimento, foi inoculada uma colônia de uma placa de fago auxiliar VCSM13 (New England BioLabs, EUA), previamente preparada e estocada e a cultura incubada por 2h nas mesmas condições. A cultura foi, em seguida, transferida para 500 mL de meio SB contendo 250 µL de tetraciclina (20 mg/mL) e 700 µL de canamicina (Sigma-Aldrich – Alemanha) (50 mg/mL) e incubada de um dia para o outro. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada (2500 x g, 15 min), os sobrenadantes incubados a 70° C para eliminação de células restantes e novamente centrifugados. Os sobrenadantes finais estocados a 4° C.

Para a determinação do título de fagos auxiliares obtido, 2 µL de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetente foram inoculados em 2 mL no meio SB com tetraciclina e incubados a 37° C, até atingir a DO_{600nm} 0,3. Um microlitro de diluições seriadas de uma alíquota do meio com fagos foi adicionado à cultura bacteriana, distribuídas em placas de Petri com meio LB sólido suplementado com tetraciclina (10 µg/mL) e incubadas a 37° C de um dia para o outro. As colônias de lise formadas nas placas, demonstrando infecção das bactérias pelo fago

auxiliar, foram contadas e quantificadas, multiplicando-se o valor da contagem de colônias pelo fator de diluição para, assim, obterem-se os títulos de fagos no sobrenadante. O título mínimo desejável de fagos auxiliares a ser usado é 10^{11} / μL .

4.3.3 - Amplificação da biblioteca de ScFv

Foi preparada uma cultura de 200 μL de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetente em 50 mL de meio SB suplementado com 25 μL de tetraciclina (20 mg/mL) incubada a 37° C, sob agitação, até atingir-se a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 1,0. Em seguida, 10 μL da biblioteca de scFv estoque foram transferidos para o meio e incubado por 1h em temperatura ambiente. Após esse período, destinado à infecção das bactérias pelos fagos da biblioteca, foi feita uma alíquota de 500 μL para posterior definição do título de entrada da biblioteca. Em seguida, foi feita a suplementação com 10 μL de carbenicilina (Sigma-Aldrich – Alemanha) (100 mg/mL) e 1 mL de solução de glicose 2M e o meio de cultura foi incubado novamente a 37° C por 1h. Mais 15 μL de carbenicilina foram adicionados para outra incubação a 37° C por 1h. Após os períodos de incubação, a cultura foi centrifugada (3000 x g, 10 min). O sedimento bacteriano foi ressuscitado em 200 mL de meio SB contendo 100 μL de carbenicilina (100 mg/mL) e 100 μL de tetraciclina (20 mg/mL). Foram, então, adicionados 10 mL da solução de fago auxiliar com a titulação mínima desejável de 1×10^{11} / μL . Para a amplificação, o meio foi incubado a 37° C sob agitação. Após 2h, foram adicionados à cultura 140 μL de canamicina (100 mg/mL) e a incubação prosseguiu nas mesmas condições até o dia seguinte.

Para a precipitação dos fagos amplificados, contendo os fragmentos de scFv, a cultura foi centrifugada duas vezes (3000 x g, 15 min, 4° C) e 35 mL de sobrenadante foram distribuídos em quatro tubos de 50 mL acrescidos de 1,4 g de PEG e 1,05 g de NaCl, homogeneizados e incubados em gelo por 30 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 15000 x g por 15 min a 4° C. O sedimento de fagos de cada tubo foi ressuscitado em 350 μL de TBS-BSA 1% e as suspensões foram reunidas em um único microtubo para a última centrifugação (14000 rpm, 5 min, 4° C). O sobrenadante final obtido foi separado e mantido em gelo até o começo do primeiro ciclo do *biopanning*.

4.3.4 - Biopannings

Foram realizados quatro ciclos de seleção, empregando-se *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11351, *E. coli* XL1-Blue e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na etapa de subtração de inespecíficos e *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 na seleção positiva de fagos.

4.3.4.1– Primeiro ciclo

Para a subtração de inespecíficos, adsorvendo da biblioteca fagos potencialmente reativos contra outras bactérias, foram usados suspensões de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11351, *E. coli* XL1-Blue e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sendo 100 µL de cada, na concentração de 1×10^6 UFC/ µL. Num mesmo microtubo, os 300 µL de bactérias foram adicionados de 700 µL de biblioteca amplificada de fagos, do passo anterior, o qual foi incubado por 1h a temperatura ambiente, sob agitação lenta. Em seguida, procedeu-se a centrifugação da suspensão (14000 x g, 90 segundos) e recolhimento do sobrenadante.

Para a seleção positiva de fagos, 400 µL do sobrenadante obtido após a adsorção foram adicionados a 100 µL de suspensão de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 - P3 na concentração de 1×10^6 UFC/ µL e incubados por 1h a temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após esse período, procedeu-se a centrifugação da suspensão (14000 x g, 90 segundos) seguida da ressuspensão do sedimento bacteriano com 200 µL de tampão TBS, sendo repetida essa lavagem por sete vezes.

O procedimento seguinte foi a eluição ácida das partículas virais com scFv que permaneceram aderidas ao sedimento bacteriano, utilizando-se 500 µL de glicina (0,2M, pH 2,2). Após incubação à temperatura ambiente por 10 min, foi feita a centrifugação (14000 x g, 5 min) e recolhimento de todo o sobrenadante. Para neutralização do sobrenadante, após a eluição, foram adicionados 75 µL de tampão Tris (1M, pH 9,0). Foi obtido, assim o eluato não-amplificado do 1º ciclo de seleção.

Na sequência, o eluato não-amplificado foi submetido aos mesmos procedimentos relatados para a amplificação da biblioteca, quando foi, então, feita a infecção de 50 mL de um meio de

cultura de XL1-Blue (DO_{600nm} 1,0) cultivado previamente em meio LB. Após 1h de incubação, foi feita, também, a alíquota de 500 μ L para posteriores titulações e em seguida, repetiu-se todo o procedimento listado no item 4.3.3.

4.3.4.2 – Segundo ao quarto ciclo de seleção

No dia seguinte, após a precipitação dos fagos que figuraram o eluato amplificado do 1º ciclo, procedeu-se o segundo ciclo de seleção, em que foi feita, novamente, a subtração de inespecíficos do eluato com três bactérias, seguida da seleção positiva com *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 - P3, nas mesmas condições descritas para o primeiro ciclo de seleção. Nos dois dias seguintes, a partir da precipitação dos fagos e obtenção dos eluatos amplificados do 2º e do 3º ciclos, foram realizados, o 3º e o 4º ciclos, respectivamente.

No 4º ciclo de seleção, após a ressuspensão do sedimento bacteriano em novo meio SB, não foi mais adicionados o fago auxiliar, porém, acrescentaram-se 4 mL de glicose 2% ao meio de cultura, que permaneceu incubado nas mesma condições, até o dia seguinte.

4.3.4.3 – Titulação dos eluatos

As amostras da biblioteca amplificada, da cultura bacteriana após a infecção do eluato não-amplificado nos dois ciclos de seleção e do eluato amplificado do 1º ciclo foram submetidos ao processo de titulação. As soluções de fagos ou alíquota da cultura foram submetidas a diluições seriadas crescentes exponenciais sob logaritmo 10 em meio LB. Para culturas com eluatos não-amplificados foram utilizadas as diluições de 10^1 até 10^4 e para a biblioteca e eluato amplificado do 1º ciclo, de 10^8 a 10^{13} . A cada diluição foram adicionados 200 μ L da cultura de XL1-Blue (DO_{600nm} 1,0) com rápida agitação e imediata incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. As células bacterianas, infectadas após esse período, foram transferidas para tubos contendo 3 mL de ágar-top a 56°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido suplementado com IPTG - Xgal (200 mg/mL , BioBasic, Canadá), tetraciclina (20 mg/mL), carbenicilina (100 mg/mL) e glicose 2%. Foi feita uma

placa controle para cada grupo de titulações, em que não foram adicionados fagos à cultura de XL1-Blue. As placas foram incubadas a 37°C de um dia para o outro. As colônias formadas nas placas foram contadas e quantificadas, multiplicando-se o valor da contagem de colônias pelo fator de diluição para, assim, obterem-se os títulos de fagos nos eluatos.

4.3.5 - Extração de DNA plasmidial após o quarto ciclo de seleção

No dia seguinte, após o crescimento do meio de cultura inoculado com o eluato não-amplificado do 4º ciclo dos *biopannings*, foi sucedida a extração do DNA plasmidial das bactérias *E. coli* XL1-Blue utilizando-se o kit comercial GenElute™ Plamid Miniprep (Sigma-Aldrich, Alemanha).

4.3.6 - Transformação de *E. coli* Top 10 com o DNA plasmidial

O método escolhido para transformar as bactérias foi o por choque térmico em cloreto de cálcio (CaCl₂), adaptado de Azevedo et al., (2003).

Um pré-inóculo de 500 µL de *E. coli* da cepa não supressora Top 10 (Invitrogen), crescida durante a noite, foi adicionado a 50 mL de LB suplementado por estreptomicina (Sigma, EUA) (100 µg/mL) e incubada a 37° C sob agitação até que fosse atingida a densidade óptica 0,3, a 600 nm. Nesse ponto, o crescimento foi interrompido, as células foram centrifugadas (3000 x g, 4° C, 15 minutos), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão em um tubo com 10 mL de solução gelada de CaCl₂ (50 mM) com suave agitação. A partir de então, as células permaneceram sempre em banho de gelo e água ou a 4° C nas centrifugações. Foi feita outra centrifugação, nas mesmas condições da anterior, e o sedimento de bactérias foi ressuspensão em 1 mL de CaCl₂. A suspensão foi mantida no gelo por 1h. Após esse período, as células bacterianas são consideradas quimiocompetentes.

Em um microtubo, foram adicionados 200 μL de bactérias competentes e 500 ng de fagomídeos do 4º ciclo de seleção, extraídos na etapa anterior. Esse sistema de transformação permaneceu em banho de gelo e água por 30 minutos e, em seguida, foi submetido a um choque térmico, a 42° C por 3 minutos. Logo depois, acrescentou-se 1 mL de meio LB ao tubo, o qual foi incubado a 37° C por 1h, sob agitação.

Cinquenta e 100 μL da cultura de células transformadas foram semeados em placas de meio LB sólido contendo carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 2% de glicose e incubados a 37° C, *overnight*.

Para controle de todas as etapas seguintes, foi empregada uma amostra de *E. coli* Top 10 transformada com o vetor pCOMB3xSS sem inserto.

4.3.7 - Produção de scFv na forma solúvel

Colônias isoladas das placas cultivadas no item anterior foram separados com palitos de madeira autoclavados e inoculados em poços de seis placas *deep well* (pré-inóculo), contendo, em cada um, 1 mL de meio SB suplementado com carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 2% de glicose, totalizando de 540 colônias selecionadas. As placas foram seladas e incubada a 37° C sob agitação rotacional (300 rpm), *overnight*.

No dia seguinte, outras seis placas *deep well* (placas de expressão) foram preparadas nas mesmas condições das anteriores. Foram transferidos 50 μL das culturas de bactérias das placas de pré-inóculo para os mesmos poços correspondentes nas placas de expressão, as quais foram incubadas a 37° C, sob agitação, por 4h. Das placas de pré-inóculo foram retiradas alíquota de cada poço, adicionadas de glicerol 50% estéril e congeladas em placas de microtitulação a -80° C, configurando, assim, o back-up dos clones isolados no *biopanning*.

Após o período estipulado para a incubação da placa de expressão, esta foi centrifugada (3700 rpm, 4° C, 10 minutos), os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram ressuspensos com 1 mL de meio SB suplementado com carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o

indutor IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopranoside), com uma concentração final de 2,5 mM. A placa de expressão, então, foi incubada a 30° C, sob agitação (300 rpm), por 16h.

Em seguida, as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram transferidos para outra placa estéril, enquanto os sedimentos, mantidos na placa de expressão, foram ressuspensos, em cada poço, com 1 mL de tampão de lise (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 500mM, imidazole 10mM), contendo 0,4 mg/mL de lisozima (Calbiochem, EUA). Após 30 min, as placas foram congeladas rapidamente e descongeladas por três vezes e, por último, centrifugadas, para obtenção do sobrenadante após a lise do sedimento de bactérias.

4.3.8 - Ensaio de ELISA

4.3.8.1 – Reatividade dos scFv selecionados à *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3

Foram sensibilizadas seis placas de microtitulação carregadas (NUNC MaxSorp) com 1,0 µg de sonicação de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3 por poço, diluídas em 50 µl de tampão bicarbonato (50mM, pH 9,6), *overnight* a 4° C, contemplando, assim, os 540 clones selecionados.

No dia seguinte as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS com 3% de BSA), 300 µL/poço, por 1h. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (200 µL de PBS-T a 0,05%) e incubadas com 50 µL/poço com sobrenadante do lisado do sedimento de bactérias por 1h a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas seis vezes com solução de lavagem e incubadas por 1h a 37° C com 50 µL de anticorpos anti-HA conjugado com peroxidase (GE Healthcare, EUA) diluídos a 1:2500 em tampão de bloqueio, por 1h a 37° C. Depois de seis lavagens , a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão OPD a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H₂O₂). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M. A reatividade foi obtida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA) pela leitura a 492nm.

Poços das placas foram reservados, em todos os ensaios, para reações de controle, em que foram omitidas as etapas de sensibilização, incubação com scFv e ambas, além do emprego da amostra de *E. coli* Top 10 negativa para scFv.

4.3.8.2 - Reatividade cruzada dos scFv com outras bactérias

Os 40 clones que apresentaram maiores valores de absorvância nos ELISA da etapa anterior foram selecionados para ensaios de reatividade cruzada com outras bactérias. Para isso, as amostras de scFv isoladas foram empregadas em novo ensaio de ELISA, sob a mesma metodologia descrita, porém reagindo em placas sensibilizadas com proteínas de *E. coli* XL1-Blue e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Poços das placas foram reservados, em todos os ensaios, para reações de controle, em que foram omitidas as etapas de sensibilização, incubação com scFv e ambas, além do emprego da amostra de *E. coli* Top 10 negativa para scFv. Os clones que apresentaram relação de absorvância entre *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 e as outras duas bactérias maior que dois (2) foram selecionados para as etapas posteriores dos ensaios. Foi selecionado um clone altamente reativo contra as três bactérias testadas nessa etapa para funcionar como controle positivo das reações seguintes.

4.3.9 - Extração de DNA plasmidial e PCR

Foi realizada a extração do DNA plasmidial dos oito clones selecionados utilizando-se o kit comercial GenElute™ Plamid Miniprep (Sigma-Aldrich, Alemanha) .

A reação de PCR foi feita empregando-se os iniciadores MMB4 (5'GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG T 3') e MMB5 (5'CGT TTG CCA TCT TTT CAT AAT 3'), para fins de amplificação do inserto de DNA que codifica as cadeias VH e VL da molécula de scFv presentes no vetor pCOMB3Xss. Para cada reação foram usados 2 µL de DNA plasmidial (50 ng/µL), 0,2 µL de Taq Platinum, 2,5 µL de tampão de PCR 10X, 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM, Invitrogen, EUA), 0,125 µL de cada iniciador e 18,8 µL de água ultra-pura (Invitrogen, EUA), completando o volume total de 25 µL para cada reação. Para controle negativo, uma reação foi realizada contendo 2 µL de água ultra-pura, em vez de DNA. Foram seguidos os seguintes parâmetros para a reação em aparelho termociclador (Veriti 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems, EUA):

5 min – 94° C

25 ciclos

60 s – 94° C

60 s – 54° C

60 s – 72° C

10 min – 72° C

Os produtos de PCR foram corridos em eletroforese em gel de agarose 1,5 % com brometo de etídio, juntamente com o marcador padrão 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, EUA).

4.3.10 - Obtenção de scFv em grande escala

Os oito clones selecionados nas etapas anteriores foram utilizados para nova indução de expressão, porém, dessa vez, crescidos em 200 mL de meio SB, nas mesmas condições descritas no item 4.3.9. Ao final do processo, foram obtidos 10 mL de sobrenadante, após a lise do sedimento de bactérias *E. coli* Top 10.

4.3.11 - Purificação de scFv por cromatografia de afinidade em HPLC

Foi utilizado Kit HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences), desenvolvido para uma rápida e reproduzível purificação de proteínas recombinantes expressas com cauda de histidina (HisTag). O sobrenadante obtido após a lise do sedimento de bactérias foi filtrado em filtro de 0,45 µm (Millipore). A coluna HisTrap de 5 mL foi umidificada pela injeção de 5 mL de água destilada e conectada ao aparelho HPLC (Akta Plus GE Healthcare Life Sciences, EUA). Em seguida, a coluna foi equilibrada com 10 mL de tampão de ligação (Fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazole 20 mM, pH 7,4). A amostra foi aplicada à coluna sob fluxo de 1 mL/min até o volume final de 5 mL por purificação. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com aproximadamente 80 mL de tampão de ligação para lavagem das moléculas não ligantes. Após a lavagem, os fragmentos de anticorpos foram eluídos com 20 mL de tampão de eluição (Fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazole 500 mM, pH 7,4), que foram coletados em alíquotas de 1,0 mL. As alíquotas foram armazenadas a 4°C e foi feita a dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976). As frações que apresentaram maiores concentrações proteicas foram congeladas a -80°C, liofilizadas e ressuspendidas em 100 µL de água MilliQ. A

concentração final de proteínas de cada amostra purificada foi determinada pelo método de Bradford.

4.3.12 - Imunoensaios com scFv purificado

Os clones selecionados previamente na primeira etapa de imunoensaios foram empregado novamente, sob a mesma metodologia descrita no item 4.3.11, porém foi padronizada a concentração de scFv de 2 µg/poço. Nestes ensaios foram observadas a reatividade dos clones de scFv com outras bactérias do gênero *Campylobacter*, além de *E. coli* X11-Blue e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, já utilizadas anteriormente (tabela 1). Como controle negativo, foi usada a amostra de *E. coli* Top 10 negativa para scFv diluída em tampão de bloqueio 1:2.

4.4 - Ética em Experimentação Animal

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA, UFMG) sob protocolo de número 274/2010, em 23/02/2011.

Durante todos os procedimentos foram adotadas medidas humanitárias para o manuseio dos animais (COBEA, 1996).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - *Biopanning* de peptídeos

Neste trabalho, os peptídeos identificados foram obtidos a partir da aplicação de metodologias clássicas preconizadas pela técnica de *Phage Display*. Para isso, foi necessário partir de uma amostra bacteriana característica para a CGB. A escolha da amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* utilizada nos *biopannings* é consequência das experiências prévias e de resultados obtidos por Cotorello (2006), Stynen (2009) e Alves (2010), nos quais ensaios sobre aderência celular, expressão de citocinas, análises proteômicas e ativação de receptores da imunidade inata demonstraram que existem diferenças entre amostras de referência mantidas em laboratório (no caso a *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354) e amostras ativadas inoculadas e depois isoladas do muco do trato genital de vacas. Mecanismos de virulência necessários à colonização da mucosa do hospedeiro são ativados após a passagem da amostra bacteriana no animal, como a camada “S”, uma cápsula que possui arranjos de subunidades proteicas, as chamadas proteínas SAP (“Surface Array Proteins”). A camada “S” recobre estruturas imunogênicas da bactéria, incluindo o lipopolissacarídeo (LPS), tornando-o inacessível às defesas do hospedeiro. Além disso, a variação antigênica das proteínas da camada “S” protege contra a opsonização de anticorpos e fagocitose, mecanismos de evasão que permitem a persistência da bactéria no hospedeiro (Garcia e Brooks, 1993; Garcia et al., 1995).

A amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 - P3 foi cultivada tomando-se o cuidado para obterem-se antígenos de bactérias passadas em meio de cultivo não mais que três vezes, para evitar que a expressividade das proteínas, conseguida com a ativação após a colonização da mucosa genital, seja diminuída. Neste presente trabalho, sugeriu-se que, embora o soro hiperimune empregado tenha sido produzido a partir da imunização de coelhos contra antígenos da amostra de referência parental, a utilização de antígenos obtidos por sonicação da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 - P3 maximizaria a reação antígeno-anticorpo necessária às etapas de obtenção dos eluatos não-amplificados no final de cada ciclo de seleção dos *biopannings* realizados para a seleção de peptídeos da biblioteca.

Em função da metodologia escolhida para os *biopannings* que selecionaram os peptídeos miméticos a *C. fetus* subsp. *venerealis*, fez-se necessário utilizar soro hiperimune, produzido

contra a bactéria, como fonte de anticorpos de classe IgG para serem empregados na seleção de peptídeos ligados aos fagos da biblioteca comercial. A CGB é uma doença caracterizada pela ocorrência restrita ao trato genital feminino, sem infecção sistêmica, e portanto, de baixa soroconversão, característica que limitou o uso de amostras de campo na etapa do *biopanning*.

A figura 3 apresenta os valores de absorvância alcançados na leitura espectrofotométrica, após a realização do *bead-ELISA*, na qual foi observada a alta reatividade do anticorpo anti- IgG de coelho marcado com peroxidase com as microesferas magnéticas recém acopladas com as IgG do soro hiperimune de coelhos, e baixa reatividade do anticorpo conjugado inespecífico (anti-ovino), comparável à do controle negativo feito com tampão PBS.

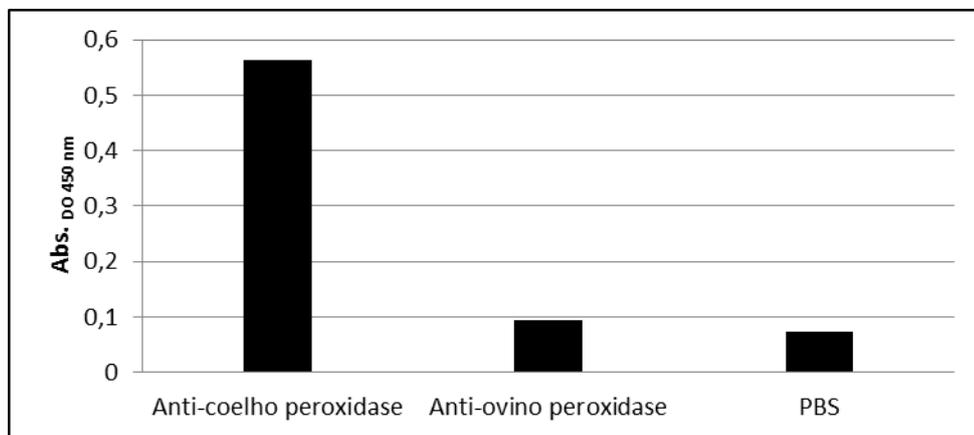


Figura 3 – Gráfico comparativo das absorvâncias (DO_{450nm}) encontradas nos *Bead-ELISA*, em que foram empregadas microesferas magnéticas carregas com moléculas de IgG do soro hiperimune de coelhos e anticorpos anti-coelho peroxidase (1:5000). No controle da reação, foi usado anti-ovino-peroxidase, anticorpo inespecífico, porém marcado com a mesma enzima. Para controle negativo, as microesferas carregadas foram incubadas com PBS.

A captura de IgG do soro hiperimune pelos anticorpos anti-coelho produzidos em cabras incorporados às microesferas mostrou-se eficiente visto que houve alta absorvância apresentada pelo reconhecimento do anti-IgG aos anticorpos acoplado, se comparado ao controle (reconhecimento do anticorpo anti-ovino irrelevante). Além disso, a baixa absorvância do controle mostra a eficiência do bloqueio, garantindo uma boa seleção de peptídeos da biblioteca.

Como parte da metodologia do *biopanning*, a escolha de uma plataforma para favorecer o contato entre os fagos da biblioteca e os ligantes seletivos é muito importante, visto que há

que se garantir concentrações ideais dos reagentes, bem como a eficiência das lavagens e recuperação dos fagos selecionados. As microesferas magnéticas escolhidas são caracterizadas como um suporte sólido com ampla variedade de separação e de manipulação biomagnética. A superfície hidrofílica garante excelentes habilidades de dispersão e baixas interações não-específicas. Apresentam um pequeno tamanho (2,8 μm) e uma ampla área de superfície (2-5 m^2/g), tornando-as particularmente adequadas para isolamento de proteínas de uma amostra, para os bioensaios e para a seleção de ligantes de afinidade (INVITROGEN, 2008). A reação entre o grupamento epóxi e os ligantes de afinidade em geral, como proteínas, ácidos nucleicos e várias pequenas moléculas, tem sido aplicado com sucesso e ocorre pela via de adição nucleofílica de amino primário ou secundário e de grupamento sulfidril no anel do grupamento epóxi (Wheatley e Schmidt Jr, 1999).

Ademais, o uso de microesferas em *biopannings* com bibliotecas de Phage Display, conforme o preconizado por Fujimura (2010), apresenta a vantagem de se utilizar soros hiperimunes diretamente na reação, sem necessidade de prévia purificação de IgG. Os testes posteriores (*bead-ELISA*) comprovam a separação de grande quantidade de moléculas dessa categoria de imunoglobulinas, as quais já se encontram na plataforma necessária para a realização dos ensaios de seleção biológica. A metodologia clássica de *biopanning*, tanto para peptídeos randômicos de bibliotecas quanto para seleção de scFv, emprega a adsorção de moléculas de anticorpos em placas carregadas de microtitulação, tal qual o feito em ensaios de ELISA (Santos, 2010b).

As etapas de subtração de inespecíficos, com soro pré-imune de coelhos, seguidas de seleção positiva com proteína sonicada de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 - P3 também substituíram a metodologia clássica de eluição ácida, com glicina. Enquanto nesta técnica, em que tampão ácido de 0,2M de glicina-HCl, pH 2,2, é adicionado à plataforma do *biopanning* para desprendimento de todos os fagos selecionados (Santos, 2010b), o contato prévio com soro pré-imune promove dissociação dos fagos que se ligaram a IgG não específicas acopladas às microesferas, por competição. Também por competição, na etapa seguinte, proteínas sonicadas adicionadas à suspensão de microesferas favorecem o desprendimento dos fagos ligados especificamente às IgG. O sobrenadante da suspensão, após essa etapa, contém fagos específicos selecionados, em cada ciclo. A subtração de inespecíficos já tem sido desenvolvida em pesquisas de carcinoma hepatocelular metastático (Jia, 2006) e de câncer de próstata (Mintz et al., 2003).

Os primeiros resultados de amplificação e titulação dos eluatos não-amplificados, após o 1º ciclo do 1º *biopanning* mostraram o número de Unidades Formadora de Colônias (UFC) por microlitro muito baixa, quando o esperado era o enriquecimento dos clones selecionados (tabela 2). Foi sugerido, em princípio, que a subtração de inespecíficos tivesse ocasionado a perda de muitos clones, uma vez que a especificidade esperada dos peptídeos dos fagos aos ligantes, no 1º ciclo de seleção é mais baixa, se comparado ao 3º ciclo. Foi por esse motivo que se optou pela ampliação do ensaio, dando-se continuidade ao 1º *biopanning*, porém eliminando a etapa de seleção negativa dos dois ciclos restantes, e iniciando-se um 2º *biopanning*, realizado sem a etapa de subtração de inespecíficos nos dois primeiros ciclos.

Os títulos de entrada e de saída em UFC/ μL , ou seja, a quantidade de partículas virais empregadas no início de um ciclo de seleção dos dois *biopannings* e após a dissociação final e obtenção do eluato não-amplificado estão representados na tabela 2. Em ambos *biopannings*, a titulação dos eluatos não-amplificados e amplificados indicaram o enriquecimento esperado dos fagos ao longo dos ciclos. Os títulos de entrada dos fagos no *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos contra *C. fetus* subsp. *venerealis* ficam ligados as microesferas por interação peptídeo-anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade são removido durante as lavagens. Nas ampliações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

Neste trabalho foram identificados peptídeos considerados miméticos antigênicos de epitopos das proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 a partir da biblioteca conformacional de peptídeos de sete aminoácidos (*New England Biolabs*, Ph.D.-C7CTM). Essa biblioteca foi escolhida porque se supõe que o reconhecimento das IgGs do soro hiperimune de coelhos por peptídeos conformacionais seria melhor que por peptídeos lineares. Peptídeos que incorporam características conformacionais têm implicações importantes no desenvolvimento de vacinas e no reconhecimento dos anticorpos (Sundaram et al., 2004; Dakappagari et al., 2005).

Tabela 2 – Titulação dos fagos (UFC/ μL) no processo de seleção a partir da biblioteca, apresentando as concentrações de entrada e de saída em cada ciclo de seleção.

<i>Biopanning</i>	Ciclo de seleção	Título de entrada UFC/ μL	Título de saída UFC/ μL
1° <i>biopanning</i>	1°	1×10^{11} (biblioteca)	$1,5 \times 10^2$
(dissociação negativa apenas no 1° ciclo)	2°	$6,0 \times 10^9$	$6,5 \times 10^3$
	3°	$7,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^4$
2° <i>biopanning</i>	1°	1×10^{11} (biblioteca)	$1,2 \times 10^3$
(dissociação negativa apenas no 3° ciclo)	2°	$1,2 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^3$
	3°	$2,2 \times 10^9$	$4,0 \times 10^2$

Após amplificação, purificação e extração do DNA dos fagos selecionados, o sequenciamento do DNA identificou 48 peptídeos diferentes expressos nos fagos, presentes em 88 dos 196 poços disponíveis. As sequências de aminoácidos e suas frequências de repetição, bem como a origem, com relação ao *biopanning* e ciclos encontram-se na tabela 3.

Apenas oito dentre os 47 fagos selecionados apresentaram repetições de clones: LFSPLSA (3), LSYLFPP (12), PAPASSF (2), PAPFHVR (2), PFASFLS (17), PSPASSF (4), SLSPVNS (7), SSAHSYF (2).

Considerar o ciclo de origem de cada clone isolado também foi uma estratégia para verificar o enriquecimento dos peptídeos mais reativos às IgG de coelho hiperimunizados contra *C. fetus* subsp. *venerealis*, além da titulação dos eluatos. Conforme mostrado na tabela 3, 39 das 47 sequências peptídicas, deduzidas a partir do sequenciamento do DNA, não se repetiram, e têm suas origens distribuídas de forma heterogênea entre os três ciclos de seleção dos dois *biopannings*. Os quatro clones que apresentaram maior frequência (3/88, 7/88, 12/88 e 17/88) vieram predominantemente de colônias isoladas no 1° *biopanning*. Os peptídeos LFSPLSA e LSYLFPP, que não foram encontrados no 2° *biopanning*, apresentaram um enriquecimento sugestivo de peptídeos que apresentaram alta especificidade desde o 1° ciclo, pois não foram eliminados pela seleção negativa com soro pré-imune. Os peptídeos PFASFLS e SLSPVNS também foram isolados, minoritariamente, do 2° *biopanning*.

Tabela 3 – Relação dos peptídeos deduzidos a partir do sequenciamento do DNA, frequência e origem do clone isolado quanto ao ciclo de seleção e *biopanning*.

Fago	Frequência	Sequência de aminoácidos do peptídeo expresso pelo fago	<i>Biopanning</i>	Ciclo de seleção
1	1/88	ALASLPL	1°	3°
2	1/88	GLPPISS	2°	2°
3	1/88	HVPGALF	2°	3°
4	1/88	IGGPLAA	1°	1°
5	1/88	KPHPALT	1°	2°
6	3/88	LFSPLSA	1°	2°
			1°	3°
			1°	3°
7	1/88	LPLPHRY	2°	2°
8	1/88	LQFLSRA	2°	1°
9	1/88	LRWADHQ	1°	2°
10	1/88	LSLPRSH	2°	2°
11	1/88	LSPFHDL	2°	1°
12	12/88	LSYLFPP	1°	2°
			1°	2°
			1°	2°
			1°	3°
			1°	2°
			1°	3°
			1°	3°
13	1/88	LTSPAFH	1°	1°
14	1/88	LYPSSTM	1°	1°
15	1/88	MSPSLSA	1°	2°
16	1/88	NLLHSLH	2°	2°
17	1/88	NLSSSWI	1°	1°
18	1/88	NPASLPV	2°	2°
19	1/88	NSGMFVR	1°	2°
20	1/88	NSPSVTL	1°	2°

(continua)

(continuação)

Fago	Frequência	Sequência de aminoácidos do peptídeo expresso pelo fago	<i>Biopanning</i>	Ciclo de seleção
21	2/88	PAPASSF	1°	1°
			1°	2°
22	2/88	PAPFHVR	1°	1°
			2°	3°
23	1/88	PDSKAPL	2°	1°
			1°	3°
			1°	3°
			1°	3°
			1°	2°
			1°	3°
			1°	3°
			1°	3°
			1°	3°
24	17/88	PFASFLS	1°	2°
			1°	2°
			1°	1°
			1°	1°
			1°	3°
			1°	2°
			1°	3°
			1°	3°
			1°	3°
			2°	3°
25	1/88	PFGVASS	2°	2°
26	1/88	PFSAALS	2°	2°
27	1/88	PLSSLPH	1°	1°
28	1/88	PSAGPLR	1°	1°
29	4/88	PSPASSF	1°	3°
			1°	3°
			1°	2°
30	1/88	PVAGSFH	2°	1°
			1°	2°
31	1/88	QTLSRPS	2°	3°
32	1/88	QVLSGPN	1°	2°
33	1/88	RDISPLA	2°	2°
34	1/88	SDPKPER	2°	1°
35	1/88	SLGLMPR	1°	1°

(continua)

(continuação)

Fago	Frequência	Sequência de aminoácidos do peptídeo expresso pelo fago	<i>Biopanning</i>	Ciclo de seleção
36	1/88	SLPFPLP	1°	2°
			1°	1°
			1°	3°
			1°	1°
37	7/88	SLSPVNS	1°	3°
			1°	3°
			2°	2°
			2°	3°
38	1/88	SLWSAFA	2°	1°
39	1/88	SPWSSLA	2°	2°
40	2/88	SSAHSYF	2°	3°
			2°	1°
41	1/88	SSHNSFS	2°	1°
42	1/88	SSRPPSV	1°	1°
43	1/88	TLPYPTQ	2°	3°
44	1/88	TPLLSPF	2°	3°
45	1/88	VTRGSAW	1°	2°
46	1/88	VTTAPFT	1°	3°
47	1/88	WATPAYL	1°	1°

Devido à ocorrência de repetições de sequências de DNA, os testes ELISA foram feitos após o conhecimento da sequência de aminoácidos dos clones, deduzidas a partir do sequenciamento do DNA, pois, de 192 colônias isoladas, apenas 88 apresentaram sequenciamento eficaz, e dos quais foram conhecidas as 47 diferentes sequências peptídicas. O ELISA de captura é um teste que favorece a padronização da quantidade de fagos envolvidos nos ensaios, pois se fixa a concentração de anticorpos anti-fago que sensibilizam a placa, que por sua vez capturam as partículas virais e as disponibiliza para a reação com soros. Assim sendo, neste ensaio podem ser dispensadas purificações e quantificações de fagos, que nesta etapa inicial de triagem são numerosos, bem como purificação de imunoglobulinas dos soros a serem testados, já antes também dispensáveis em função do uso das microesferas seletivas para IgG de coelho nos *biopannings*.

Os 47 testes de ELISA de captura foram divididos em seis ensaios com sete ou oito fagos em cada placa, além do emprego do fago selvagem e controles das reações realizadas com soros pré e hiperimune de coelhos. As médias de absorbâncias das triplicatas de cada teste foram comparadas com a leitura do fago selvagem correspondente, para definição dos fagos mais reativos. Os resultados estão apresentados na figura 4.

Cinco peptídeos foram escolhidos como os mais reativos, todos eles, oriundos do terceiro ciclo de seleção e apenas um sem repetições, conforme resumido na tabela 4.

Tabela 4 – Peptídeos mais reativos aos testes ELISA de captura e dados de origem com relação aos *biopannings*

Fago	Frequência	Sequência de aminoácidos do peptídeo expresso pelo fago	<i>Biopanning</i>	Ciclo de seleção
1	1/88	ALASLPL	1°	3°
2	3/88	LFSPLSA	1°	2°
3	12/88	LSYLFPP	1°	1°, 2° e 3°
4	17/88	PFASFLS	1° e 2°	1°, 2° e 3°
5	7/88	SLSPVNS	1° e 2°	1°, 2° e 3°

Os ELISA realizados com todos os peptídeos se deram pela reação dos fagos com soros hiperimunes (positivos) e pré-imunes (negativos), sendo comparadas as absorbâncias obtidas com as do fago selvagem. Dos cinco peptídeos mais reativos, quatro são exatamente os mais frequentes selecionados nos *biopannings*. O peptídeo ALASLPL foi isolado de apenas um clone, oriundo do 3° ciclo de seleção do 1° *biopanning*. A maior reatividade desses peptídeos é condizente com suas situações no escore de frequências e de origem de isolamento no 3° ciclo de seleção, pois isso demonstra que foram selecionados devido à alta especificidade.

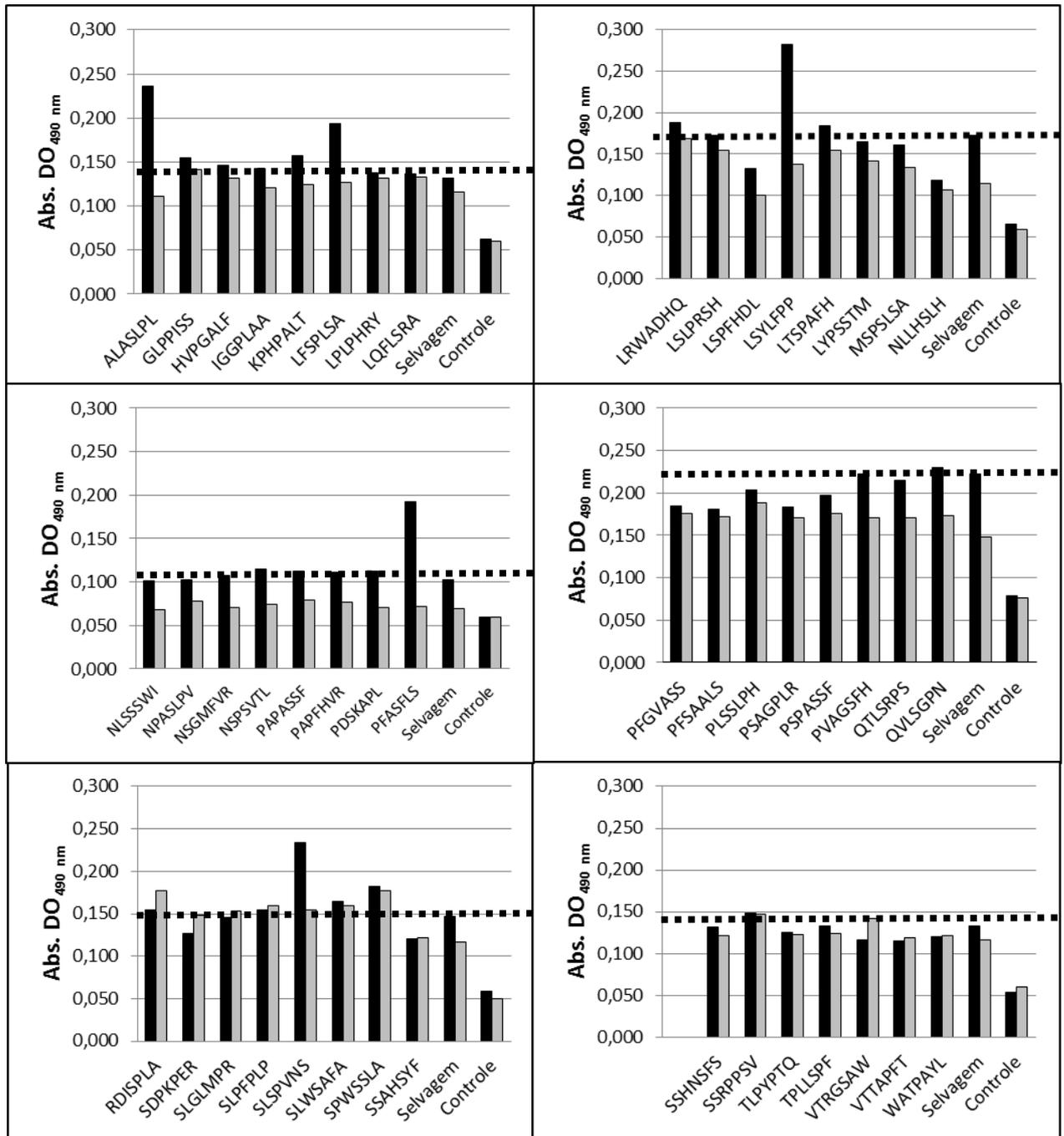


Figura 4 – Gráficos das reações em ELISA de captura dos 47 peptídeos selecionados, com valores médios das triplicatas, para determinação dos fagos mais reativos ao soro hiperimune de coelhos, com base na absorbância do fago selvagem e na reatividade ao soro pré-imune de coelhos. Os controles da reação foram feitos mediante a omissão das etapas de incubação com fagos. A linha pontilhada destaca o valor da absorbância equivalente à reatividade do fago selvagem frente ao soro hiperimune, para comparação com os peptídeos de cada placa.

Em *Phage Display*, as sequências randômicas dos peptídeos selecionados são comparadas com as sequências dos aminoácidos do ligante natural, e geralmente, vários ligantes selecionados não revelam similaridade com o ligante natural. Estes peptídeos que se ligam especificamente ao local de ligação do receptor-alvo, mimetizando o epitopo do ligante natural sem apresentar similaridade de sequência de aminoácidos, são conhecidos como mimetopos (Geysen et al., 1986).

As tabelas 5 e 6 mostram o cálculo das frequências totais de cada aminoácidos dos 47 peptídeos sequenciados e dos 12 peptídeos originários dos terceiros ciclos de seleção dos dois biopannings, respectivamente, bem como suas posições na sequência heptapeptídica. As maiores frequências de aminoácidos, nas duas verificações foram de Leucina, Prolina, Serina e Alanina.

Além de serem avaliados pela reatividade nos ELISA, os peptídeos tiveram suas sequências de aminoácidos organizadas em alinhamento, pelo programa Clustal W, a fim de se verificar as sequências mais frequentes, para ajudar a inferir quais seriam os mimetopos a *C. fetus* subsp. *venerealis* (figuras 5 e 6). As sequências mais comuns dentre os 47 peptídeos agrupados e alinhados foram ASSF, ASLP, SSLx, SLSx, LSPF, LFXP, LSP, LPL, SLP, PLP e PLA. O alinhamento dentre os 12 peptídeos exclusivamente originários dos 3^os ciclos apresentou destaque para LFXP, novamente, e também APF. Conforme apresentado nas tabelas 5 e 6, as sequências mais repetidas estão muito relacionadas aos aminoácidos mais frequentes nos peptídeos.

O genoma completo de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 foi sequenciado e caracterizado por Stynen et al. (2011) e, disponível no GenBank (DDBJ/EMBL/GenBank). Foi uma ferramenta importante para as aferições de alinhamentos múltiplos de sequências (BLAST) e também neste tipo de análise identificou-se participação daqueles aminoácidos nos alinhamentos do Clustal W.

Os alinhamentos feitos entre as sequências de aminoácidos dos cinco peptídeos identificados como mais reativos identificaram proteínas de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 depositadas no GenBank com sequências de aminoácidos similares. A tabela 7 apresenta as cinco proteínas identificadas pelo alinhamento com maiores similaridades para cada heptapeptídeo sintético.

Tabela 5 – Frequência dos aminoácidos presentes nos 47 peptídeos selecionados nos dois *biopannings*, de acordo com a posição dentro da sequência heptapeptídica.

Aminoácidos	Posição dos aminoácidos							Total	Frequência obtida (%)	Frequência esperada (%)
	1	2	3	4	5	6	7			
A (Alanina)	1	3	6	5	8	2	7	32	9,73	6,2
C (Cisteína)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0
D (Aspartato)	0	3	0	0	1	1	0	5	1,52	3,1
E (Glutamato)	0	0	0	0	0	1	0	1	0,30	3,1
F (Fenilalanina)	0	4	1	3	3	5	5	21	6,38	3,1
G (Glicina)	1	1	4	4	1	0	0	11	3,34	6,2
H (Histidina)	1	0	2	2	3	1	5	14	4,26	3,1
I (Isoleucina)	1	0	1	0	1	0	1	4	1,22	3,1
K (Lisina)	1	0	0	2	0	0	0	3	0,91	3,1
L (Leucina)	9	10	6	4	6	9	5	49	14,89	9,4
M (Metionina)	1	0	0	1	1	0	1	4	1,22	3,1
N (Asparagina)	5	0	0	1	0	1	1	8	2,43	3,1
P (Prolina)	10	5	12	10	7	9	2	55	16,72	6,2
Q (Glutamina)	2	1	0	0	0	0	2	5	1,52	6,2
R (Arginina)	1	1	2	0	2	2	5	13	3,95	9,4
S (Serina)	9	11	7	13	12	8	7	67	20,36	9,4
T (Treonina)	2	4	2	0	0	3	2	13	3,95	6,2
V (Valina)	2	4	0	2	2	2	2	14	4,26	6,2
W (Triptofano)	1	0	3	0	0	1	1	6	1,82	3,1
Y (Tirosina)	0	0	1	0	0	2	1	4	1,22	3,1
Consenso	P	S	P	S	P	L/P	A/S	329		

Tabela 6 – Frequência dos aminoácidos presentes nos 12 peptídeos selecionados nos terceiros ciclos de seleção dos dois *biopannings*, de acordo com a posição dentro da sequência heptapeptídica.

Aminoácidos	Posição dos aminoácidos							Total	Frequência obtida (%)	Frequência esperada (%)
	1	2	3	4	5	6	7			
A (Alanina)	1	1	3	1	1	0	1	8	9,52	6,2
C (Cisteína)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0
D (Aspartato)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	3,1
E (Glutamato)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	3,1
F (Fenilalanina)	0	2	0	1	2	1	3	9	10,71	3,1
G (Glicina)	0	0	0	1	0	0	0	1	1,19	6,2
H (Histidina)	1	0	0	1	1	0	0	3	3,57	3,1
I (Isoleucina)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	3,1
K (Lisina)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	3,1
L (Leucina)	2	3	2	2	2	2	1	14	16,67	9,4
M (Metionina)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	3,1
N (Asparagina)	0	0	0	0	0	1	0	1	1,19	3,1
P (Prolina)	2	1	3	2	2	4	1	15	17,86	6,2
Q (Glutamina)	1	0	0	0	0	0	1	2	2,38	6,2
R (Arginina)	0	0	0	0	1	0	1	2	2,38	9,4
S (Serina)	2	2	2	3	2	1	3	15	17,86	9,4
T (Treonina)	2	2	1	0	0	1	1	7	8,33	6,2
V (Valina)	1	1	0	0	1	1	0	4	4,76	6,2
W (Triptofano)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	3,1
Y (Tirosina)	0	0	1	1	0	1	0	3	3,57	3,1
Consenso	4	L	A/P	S	4	P	F/S	84		

Tabela 7 - Relação de proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 anotadas no banco de dados do GenBank que apresentaram maior similaridade de sequências de aminoácidos com os cinco peptídeos selecionados por Phage Display, conforme alinhamento feito pelo programa BLAST, e números de acesso.

Peptídeo	Antígeno Potencial	Acesso
ALASLPL	hypothetical protein CFV354_1486	ZP18246224
	Serine protease	ZP18244938
	50S ribosomal protein L22	ZP18245002
	rD protein	ZP18245671
	Proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase, chain n, putative	ZP18245124
LFSPLSA	Glycosyl transferase, group 1	ZP18245449
	Hypothetical protein CFV354_1578	ZP18246304
	high affinity branched-chain amino acid ABC transporter, ATP-binding protein	ZP18245336
	Putative type IV secretion protein	ZP18246576
	permease YjgP/YjgQ	ZP18245214
LSYLFPP	nickel-dependent hydrogenases B-type cytochrome subunit family protein	ZP18245384
	putative inner membrane protein YfcA	ZP18245664
	ABC transporter, permease protein, putative	ZP18245204
	thiazole synthase	ZP18245041
	sodium-dependent transporter	ZP18245283
PFASFLS	putative permease	ZP18245639
	Asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	ZP18246449
	phospholipase A	ZP18245148
	RND efflux system, outer membrane lipoprotein CmeC	ZP18245080
	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	ZP18245505
SLSPVNS	hypothetical protein CFV354_1212	ZP18245985
	cell cycle protein FtsW	ZP18245728
	Serine/threonine transporter SstT	ZP18245616
	glutamate synthase, large subunit	ZP18246348
	Polyribonucleotide phosphorylase/polyadenylase	ZP18246118

3	-	-	H	V	P	G	A	L	F	-	-	7
46	-	-	-	V	T	G	A	P	F	-	-	7
25	-	-	-	P	F	G	V	A	S	-	-	7
26	-	-	-	P	F	S	A	A	L	S	-	7
24	-	-	-	P	F	A	S	F	L	S	-	7
2	-	-	-	G	L	P	P	I	S	S	-	7
35	-	-	-	S	L	G	L	M	P	R	-	7
37	-	-	-	S	L	S	P	V	N	S	-	7
15	M	S	P	S	L	S	A	-	-	-	-	7
40	-	-	-	S	S	A	H	S	Y	F	-	7
41	-	-	-	S	S	H	N	S	F	S	-	7
21	-	-	-	P	A	P	A	S	S	F	-	7
29	-	-	-	P	A	S	P	A	S	S	-	7
5	-	-	K	P	H	P	A	L	T	-	-	7
27	-	-	-	P	L	S	S	L	P	H	-	7
39	-	-	S	P	W	S	S	L	A	-	-	7
6	-	-	-	L	F	S	P	L	S	A	-	7
12	L	S	Y	L	F	P	P	-	-	-	-	7
13	-	-	-	L	T	S	P	A	F	H	-	7
11	-	-	-	L	L	S	P	F	-	D	L	7
44	-	T	P	L	L	S	P	F	-	-	-	7
38	-	-	S	L	W	S	A	F	A	-	-	7
1	-	-	-	L	A	L	A	S	L	P	-	7
18	-	-	-	N	P	A	S	L	P	V	-	7
10	-	-	-	-	-	L	S	L	P	R	S	7
16	-	-	N	L	L	H	S	L	H	-	-	7
8	-	-	L	Q	F	L	S	R	A	-	-	7
31	-	-	-	Q	T	L	S	R	P	S	-	7
32	-	-	-	Q	V	L	S	G	P	N	-	7
14	-	-	-	L	Y	P	S	S	T	M	-	7
20	-	-	-	N	S	R	P	S	V	T	-	7
42	-	-	S	S	R	P	P	S	V	-	-	7
4	-	-	-	I	G	G	P	L	A	A	-	7
33	-	R	D	I	S	-	P	L	A	-	-	7
23	-	P	D	S	K	A	P	L	-	-	-	7
28	-	P	-	S	A	G	P	L	R	-	-	7
7	-	-	-	L	P	L	P	H	R	Y	-	7
34	-	-	S	D	P	K	P	E	R	-	-	7
36	-	-	S	L	P	F	P	L	P	-	-	7
43	-	-	T	L	P	Y	P	T	Q	-	-	7
17	-	-	-	N	L	S	S	S	W	I	-	7
30	-	-	-	P	V	A	G	S	F	H	-	7
45	-	-	-	V	T	R	G	S	A	W	-	7
22	-	-	-	-	P	A	P	S	H	V	R	7
19	-	-	-	N	S	A	M	F	V	R	-	7
47	-	-	-	W	A	T	P	A	Y	L	-	7
9	-	-	L	R	W	A	D	H	Q	-	-	7

Figura 5 - Alinhamento de 47 peptídeos selecionados a partir da biblioteca Ph.D – C7CTM realizado pelo programa Clustal W.

8	-	Q	T	L	S	R	P	S	-	-	-	7
36	-	-	T	L	P	Y	P	T	Q	-	-	7
40	-	-	-	L	F	S	P	L	S	A	-	7
6	L	S	Y	L	F	P	P	-	-	-	-	7
37	-	S	-	-	L	S	P	V	N	S	-	7
11	-	T	P	L	L	S	P	F	-	-	-	7
3	-	H	V	P	G	A	L	F	-	-	-	7
24	-	-	-	P	F	A	S	F	L	S	-	7
46	-	-	-	P	-	A	P	F	H	V	R	7
47	-	V	T	T	-	A	P	F	T	-	-	7
39	-	A	L	A	S	L	P	L	-	-	-	7
15	-	S	S	A	H	S	Y	F	-	-	-	7

Figura 6 - Alinhamento de 12 peptídeos oriundos dos terceiros ciclos de seleção selecionados a partir da biblioteca Ph.D – C7CTM realizado pelo programa Clustal W. Nos destaques sombreados, as sequências de aminoácidos alinhadas mais frequentes.

Em cada alinhamento foram identificados pelo BLAST pontos de similaridade dos cinco peptídeos com as proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 citadas na tabela 7, conforme mostrado a seguir.

- Peptídeo ALASLPL

-Proteína hypothetical protein CFV354_1486

20 24 27

Proteína GLAASLPL

Peptídeo ALA-SLPL

- Proteína Serine protease

221 226 232
 Proteína TLASLPHYDQDL
 Peptídeo ALASLP-----L

- Proteína 50S ribosomal protein L22

1 31 37
 Proteína MSRAIIKFIRLSPTKARLIADEVQGMNAELALASLSF
 Peptídeo -----ALASLPL

- Proteína rD protein

145 151
 Proteína ALGSLPF
 Peptídeo ALASLPL

- Proteína Proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase, chain n, putative

104 109 113
 Proteína ALASLAGFGL
 Peptídeo ALASLP---L

- Peptídeo LFSPLSA

- Proteína Glycosyl transferase, group 1

326 332
 Proteína VAEFFSPLNAKEL
 Peptídeo ---LFSPLSA---

- Proteína Hypothetical protein CFV354_1578

3 9
 Proteína MSIFSPLPALQRWVWDFAYFRERFITHAIFFFCTDI
 Peptídeo --LFSPLSA-----

- Proteína high affinity branched-chain amino acid ABC transporter, ATP-binding protein

88 94
 Proteína FQNIRLFSLSVLDNV
 Peptídeo -----LFSPLSA-----

- Proteína Putative type IV secretion protein

189 192 242
 Proteína QLFSPF¹⁸⁹SWDNTLFFNPF¹⁹²DYSIVKDMEYIRIKKLADQIANTIFVAEKEKENDHWVLSAK²⁴²
 Peptídeo -LFSP-----LSA-

- Proteína permease YjgP/YjgQ

276 282
 Proteína IFFP²⁷⁶LFAP²⁸²LMVLILYY
 Peptídeo ----LFSPLSA-----

- Peptídeo LSYLFPP

- Proteína nickel-dependent hydrogenases B-type cytochrome subunit family protein

24 79 92
 LSYLF²⁴IETETSLYYHAVFGIVFGVAIAFRVIWGF⁷⁹IGTKYSKFSDFKFKGIMEYLLPTYSQKKHYTG⁹²HNP
 LSYLF-----P-----P

- Proteína putative inner membrane protein YfcA

102 121
 Proteína LSYLIPIFLILIFLYTIFSP
 Peptídeo LSYLFP-----P

- Proteína ABC transporter, permease protein, putative

247 251 255
 Proteína LSF²⁴⁷I²⁵¹Y²⁵⁵LFPA
 Peptídeo LS--YLFPP

- Proteína thiazole synthase

82 102 126
 Proteína LSRELGCGNFIKVEVIRDSKY¹⁰²LFPPDNYETIKATEKLANEGFIVLP
 Peptídeo LS-----YLFPP-----P

- Proteína sodium-dependent transporter

302 306
 Proteína LVYWL³⁰²LFPP
 Peptídeo LSY-LFPP

- Peptídeo PFASFLS

- Proteína putative permease

1 8 14
 Proteína MNKVNKY⁸LFASFLS¹⁴TFASLFA
 Peptídeo -----PFASFLS-----

- Proteína Asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)

249 255
 Proteína ISDVEFSS**SFLS**GGGL
 Peptídeo ----PFAS**SFLS**----

- Proteína phospholipase A

4 10
 Proteína MLTIL**ASFLS**LN
 Peptídeo ---PF**ASFLS**---

- Proteína RND efflux system, outer membrane lipoprotein CmeC

337 341 357 361
 Proteína IMMPLLD**FGRTKNRVELANLEQN**AS**SFLS**YDK
 Peptídeo ---P---F-----**ASFLS**---

- Proteína Bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide
 formyltransferase/IMP cyclohydrolase

214 223 228
 Proteína YGENPHQKGAA**YEFDSFLS**LNF
 Peptídeo ----P-----F**ASFLS**----

- Peptídeo SLSPVNS

- Proteína hypothetical protein CFV354_1212

```

          188   194
Proteína YIQVASLSKVNSENDFP
Peptídeo -----SLSPVNS-----

```

- Proteína cell cycle protein FtsW

```

          116   121           134
Proteína GISLSPVEFFKIGFVFFLAWSF
Peptídeo --SLSPVN-----S-

          98           121           134
Proteína SLVPV-----EFFKIGFVFFLAWSF
Peptídeo SLSPV-----N-----S-

```

- Proteína Serine/threonine transporter SstT

```

          317   323
Proteína AVTIAVLSLSAVNTLNIQVGFLDAL
Peptídeo -----SLSPVNS-----

```

- Proteína glutamate synthase, large subunit

```

          1157           1168   1173
Proteína MGYKSLDDIIGRNELLSPVESKFDM
Peptídeo ----S-----LSPVNS----

          889           899  901  905
Proteína SGEGGEANQRLKSPANSQIKQIAS
Peptídeo S-----L-SPVNS-----

```

- Proteína Polyribonucleotide phosphorylase/polyadenylase

```

          125          135  139
Proteína VVSLNAASVALYLSDI PVNS PVCG
Peptídeo --S-----LS-- PVNS-----

```

As sequências de aminoácidos de proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, alinhadas com as sequências heptapeptídicas realçaram sequências de até seis aminoácidos, mostrando boa similaridade. As sequências SFL, SLS, FLS e LFP foram as mais prevalentes, e, novamente, reforçam a importância de aminoácidos como Serina, Prolina e Leucina na formação desses prováveis mimetopos da bactéria.

Os cinco peptídeos avaliados até então foram, definitivamente, escolhidos para serem sintetizados. Sem a reatividade da partícula viral do fago, foram empregados em novos ensaios para predição da reatividade, como o ELISA Indireto. Por estarem acoplados a BSA, os peptídeos foram capazes de induzir a resposta imunológica esperada para a produção de soro hiperimunes em camundongos, que também puderam ser empregados nos imunoenaios.

A figura 7 apresenta os gráficos da evolução da soroconversão dos camundongos imunizados com os cinco peptídeos sintéticos selecionados por *Phage Display*. Aos 45 dias foram testadas todas as amostras coletadas desde o período pré-imune frente a cinco diluições. O grupo BSA serviu como controle, uma vez que os peptídeos foram sintetizados acoplados a BSA, por serem muito pequenos, e sem o qual não teriam antigenicidade para necessária para se produzir um soro hiperimune.

Os peptídeos sintéticos, selecionados a partir dos resultados dos *biopannings*, foram testados quanto à reatividade frente ao soro de coelhos hiperimunizados contra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, o mesmo usado para a seleção biológica da biblioteca de fagos. A figura 8 apresenta os valores encontrados em ELISA indireto.

O ensaio de ELISA que verificou a reatividade dos soros hiperimunes produzidos em camundongos a partir dos peptídeos selecionados por *Phage Display* frente a proteínas bacterianas de *C. fetus* subsp. *venerealis* tem seus resultados mostrados na figura 9

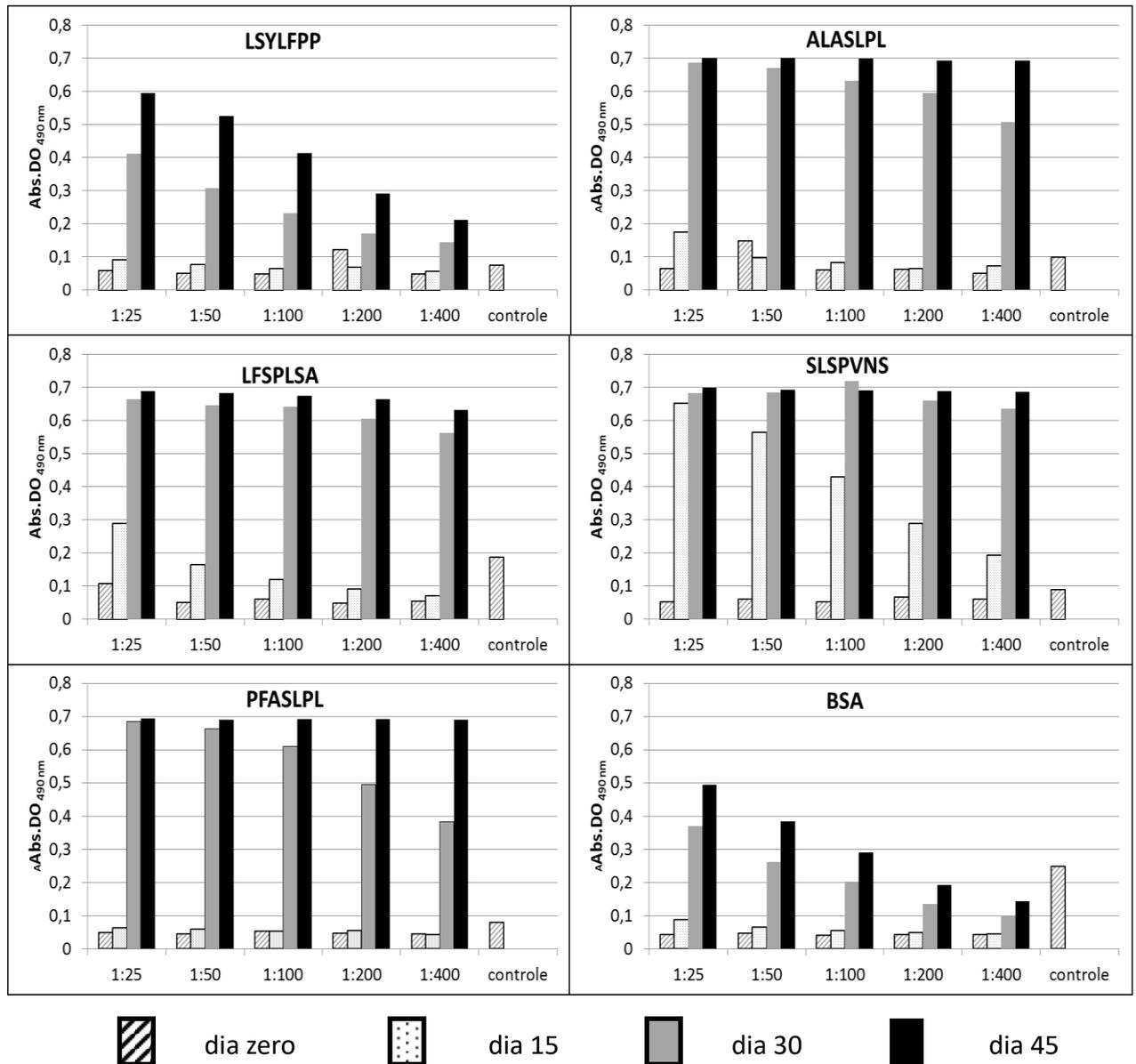


Figura 7 – Gráficos dos grupos de camundongos representando a evolução da produção de anticorpos contra os cinco peptídeos e BSA de zero a 45 dias por ELISA. Valores médios de absorvâncias (DO_{490 nm}) de duplicatas de poços sensibilizados com 1 µg de peptídeo ou BSA; *pool* de soros dos quatro camundongos de cada grupo em cinco diluições. No controle, *pool* de soros de camundongos (1:25) do grupo Controle, os quais receberam placebo por via intraperitoneal.

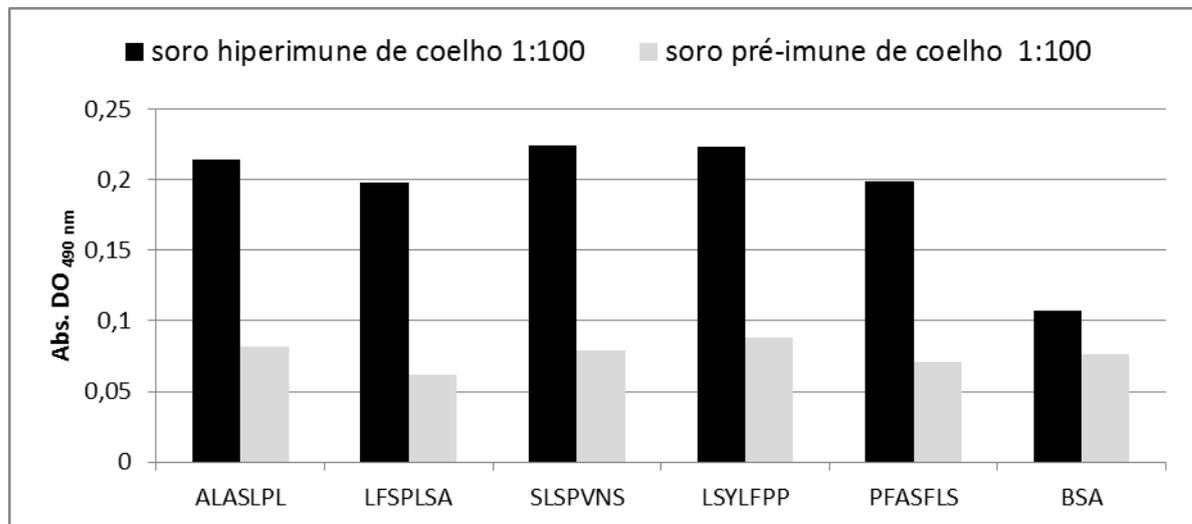


Figura 8 – Gráfico representativo das médias das absorvâncias (DO 490 nm) encontradas por ELISA Indireto nas reações entre soro de coelhos hiperimune (1:100), produzidos contra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, e os cinco peptídeos selecionados por *Phage Display* e BSA (1 µg/poço). No controle de cada reação, soro de coelho pré-imune (1:100).

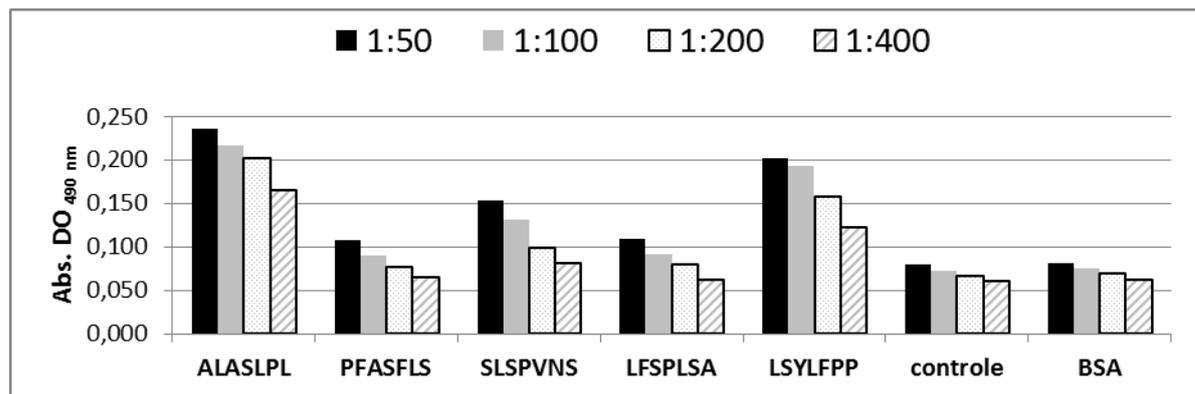
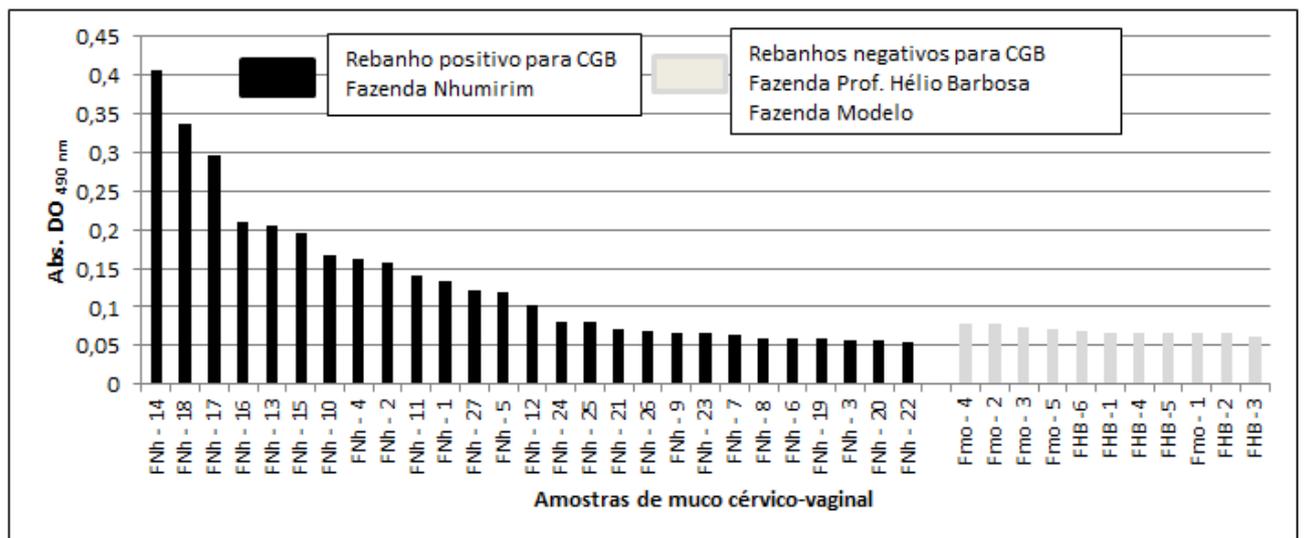


Figura 9 – Gráfico representativo das médias das absorvâncias (DO 490 nm) encontradas por ELISA Indireto dos pools de soros de camundongos de cada grupo, sendo cinco respectivos aos peptídeos sintéticos e dois controles, reativos contra 1 µg por poço de proteínas extraídas por sonicação de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3.

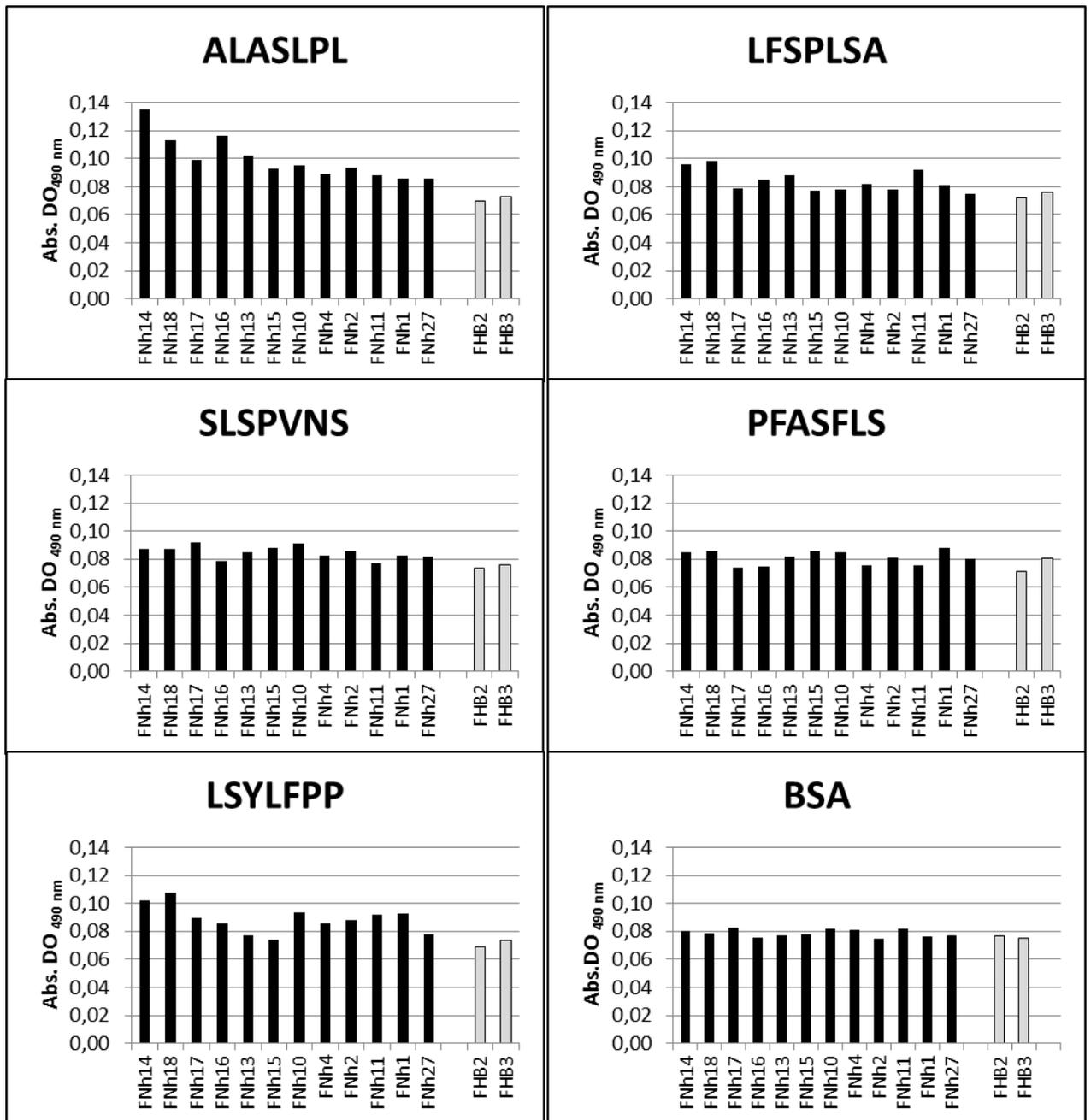
As amostras de muco cérvico-vaginal de novilhas disponíveis foram, previamente, testadas em ELISA para identificação das mais reativas contra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3. O gráfico da figura 10 apresenta os resultados, em que se comparam os resultados obtidos dentre as 27 amostras oriundas de um rebanho positivo para a CGB e 11 amostras de novilhas de dois rebanhos livres.



FNh: Fazenda Nhumirim, Corumbá, MS
FHB: Fazenda Prof. Hélio Barbosa, Igarapé, MG
Fmo: Fazenda Modelo, Pedro Leopoldo, MG

Figura 10 - Gráfico representativo das reações de ELISA envolvendo amostras de muco cérvico-vaginal e proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3 (250 ng/poço) obtidas por sonicação. À esquerda do gráfico, as 27 amostras oriundas da Fazenda Nhumirim, cujo rebanho tem histórico de CGB. À direita, 11 amostras de novilhas oriundas de duas fazendas livres para a doença.

A partir dos resultados, 12 amostras de muco foram selecionadas por serem mais reativas e foram empregadas em ELISA para verificar a reatividade das IgA do muco frente aos peptídeos sintéticos selecionados por Phage Display. As duas amostras menos reativas do grupo de novilhas de rebanho livre de CGB foram utilizadas para controle negativo. Os resultados da reatividade de cada peptídeo estão mostrados na figura 11.



FNh: Fazenda Nhumirim, Corumbá, MS
 FHB: Fazenda Prof. Hélio Barbosa, Igarapé, MG
 FMO: Fazenda Modelo, Pedro Leopoldo, MG

Figura 11 - Gráfico representativo das reações de ELISA envolvendo 12 amostras de muco cérvico-vaginal selecionadas por serem reativas contra proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3 e os cinco peptídeos sintéticos selecionados por *Phage Display* e BSA. No controle negativo, duas amostras negativas, oriundas de rebanhos livres para a CGB.

Os resultados mostraram que os peptídeos sintéticos foram reconhecidos pelo soro hiperimune de coelhos (tabela 9), e com menor reatividade frente ao soro pré-imune. O soro de coelho empregado neste ensaio foi o mesmo usado nos *biopanning*, assim como o soro negativo, a partir do que foram selecionados os peptídeos, com todos os controles necessários das reações. O mesmo soro também foi usado nos ELISA *pré-screening*, pelo que a diluição do soro escolhida foi a mesma (1:100). É sugestivo que os clones de anticorpos IgG que reagiram fortemente com os fagos da biblioteca C7C, novamente tenham encontrado esta interação, frente aos peptídeos sintéticos, os quais possuem as mesmas sequências heptapeptídicas ligadas a pIII dos fagos. Os peptídeos sintéticos são mais reativos que aqueles apresentados em fagos, se comparados os valores de absorbância, e estão livres da reatividade entre os soros e o fago selvagem, observada nos ELISA de captura. Esse fato reforça o potencial desses heptapeptídeos como candidatos a antígenos vacinais de *C. fetus* subsp. *venerealis*, uma vez que além desses resultados, foram também caracterizados pelas ferramentas de bioinformática.

A comparação da reatividade entre os soros hiperimunes de camundongos frente à bactéria *C. fetus* subsp. *venerealis*, no entanto, não mostrou reatividade semelhante entre os cinco peptídeos. Anticorpos IgG de camundongos anti-ALASLPL e anti-LSYLFPP reagem mais contra antígenos de *C. fetus* subsp. *venerealis*, se comparados com os anticorpos dos soros hiperimunes produzidos contra SLSPVNS, LFSPLSA e PFASFLS e com os controles negativos, mesmo na maior diluição feita do pool de soros, a 1:400 (figura 9). O soro anti-SLSPVNS apresentou reatividade intermediária. O resultado, por si só, não permite fazer inferências sobre o potencial antigênico e de mimeticidade dos três peptídeos pouco reativos, porém chama atenção para os dois reativos, tornando-os mais importantes e possíveis mimetopos de *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Em *Phage Display*, a pré-validação dos fagos mais reativos geralmente é seguida de uma validação mais criteriosa, a partir de soros de campo ou de pacientes (Arap et al., 1998). Em se tratando de CGB, uma doença que cuja infecção ocorre no trato genital, amostras de muco cérvico-vaginal seriam os principais insumos a serem aplicados em ensaios imunológicos que visassem inferir a reatividade dos peptídeos selecionados. Outra opção seria hiperimunizar vacas por meio de vacinação, uma vez que soros e lavados genitais de animais naturalmente infectados tenderiam a apresentar limitações nas reações antígenos-anticorpos desejáveis

analiticamente (Pellegrin, 2001). Van Aert et al. (1977) descreveram que a imunização sistêmica em touros contra *C. fetus* subsp. *venerealis* tem um efeito preventivo e curativo e testes de aglutinação do soro e de secreções prepuciais de touros vacinados demonstraram a produção crescente de IgG, IgM e IgA, esta última apenas na mucosa genital. Quando da infecção, IgA é encontrada na vagina três a cinco semanas após, logo em seguida ao aparecimento de IgM. É a imunoglobulina que apresenta título mais alto e persistente por mais de 40 semanas. É a principal classe de anticorpo responsável por impedir o início da infecção, prevenindo a bactéria de ascender ao útero, apesar de não ser opsonizante. Dessa forma, a colonização da vagina pode persistir de 6 a 24 meses. O constante estímulo ao sistema imune local promove níveis elevados de anticorpos, o que permite o retorno da fertilidade do animal em torno de três cios após a infecção (Corbeil *et al.*, 1980).

As amostras de mucos que apresentaram maior reatividade com antígenos de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 (figura 10) não foram copiosamente reativas frente aos peptídeos sintéticos (figura 11). As maiores reações, observando-se a diferença de absorbância com controle negativo, foram apresentadas pelas amostras FNh 14, FNh 16 e FNh18, frente ao peptídeo ALASLPL (0,065; 0,046 e 0,043, respectivamente), sendo assim mesmo considerados valores muito baixos.

Os peptídeos selecionados por *Phage Display*, após todos os testes apresentados, apresentaram similaridade com proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, em que são reconhecidos como antígenos potencialmente miméticos à bactéria. A avaliação frente a amostras de campo, e a predição da mimeticidade, dada pela reatividade dos soros hiperimunes de camundongos anti-peptídeos contra a bactéria, conferem aos heptapeptídeos ALASLPL e LSYLFPP a condição antígenos mais promissores para o desenvolvimento de imunógenos contra a CGB.

5.2 - Biopanning de scFv

Os anseios iniciais deste trabalho, em suas duas etapas, muito têm a ver com as metodologias de diagnóstico da CGB. Os testes sorológicos de aglutinação e de ELISA (Hewson et al., 1985, Hum et al., 1994) têm sido usados para detecção de anticorpos contra *C. fetus* em amostra de muco vaginal. O ELISA direto para detecção do *C. fetus* em lavado prepucial e muco vaginal foi testado por Brooks et al. (2004), utilizando anticorpos monoclonais contra o lipopolissacarídeo (LPS) de *C. fetus*. Os resultados alcançados em ELISA descrito por Brooks et al. (2004) não possuem um bom limite de detecção (sensibilidade analítica), que é muito baixo sendo de 10^4 a 10^6 UFC/mL, apesar de estar utilizando anticorpos monoclonais para tentar aumentar a sensibilidade e especificidade, sendo que a imunofluorescência direta possui uma sensibilidade analítica muito melhor (detecção de 10^2 UFC/mL) (Figueiredo et al, 2002).

As principais características dos anticorpos monoclonais são a alta afinidade e especificidade para com o antígeno que induziu a sua formação, tornando-se poderosas ferramentas em diversos campos da biologia celular, fisiologia, biologia molecular, imunologia, microbiologia e doenças infecciosas, dentre outras. Podem ser utilizados para a localização de moléculas específicas em células ou tecidos, quantificações de antígeno, identificação de molécula em imunoenaios, cromatografia e precipitação por afinidade. (Alves, 2006).

Alves et al. (2012) produziram e caracterizaram anticorpos monoclonais contra *C. fetus* subsp. *venerealis* pela técnica de hibridoma de células de mieloma com esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados, os quais eram específicos para uma proteína de uma banda dominante, de alto peso molecular, a qual também é imunodominante e presente na membrana externa da bactéria. A produção de anticorpos monoclonais é muito laboriosa, tornando o sistema de produção desses anticorpos monoclonais muito complexos.

A técnica de exposição de biomoléculas nos fagos também é utilizada para a construção, seleção e amplificação de fragmentos proteicos com funções de anticorpos. Fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) representam a porção variável de uma imunoglobulina formada pelas cadeias leves e pesadas. A biblioteca é construída a partir de ácido nucleico isolado de células B ativadas por um determinado antígeno e as cadeias, aleatoriamente unidas, formam um único peptídeo, cujo arranjo forma um paratopo e mimetiza o anticorpo natural (Azzazzy e Highsmith Jr., 2002).

Neste estudo, partiu-se de uma biblioteca já estabelecida, produzida a partir de RNA total de leucócitos de pacientes com carcinoma bem diferenciado de tireoide (Santos et al., 2010a). O rearranjo das cadeias leves e pesadas obtidas neste tipo de molécula recombinante formada por esta técnica permite a variação aleatória de paratopos, tornando uma biblioteca de scFv ferramenta útil para seleção de ligantes contra qualquer tipo de antígeno (Azzazy e Highsmith Jr., 2002).

A utilização de células bacterianas inteiras partiu do princípio que diversos *biopannings* são realizados para a seleção de anticorpos scFv que reconhecem células tumorais, pelo anseio de serem usados como marcadores da presença de certos cânceres em pacientes (Giordano et al., 2001; Santos, 2010a). Assim sendo, anticorpos scFv que reconhecem especificamente *C. fetus* subsp. *venerealis* poderiam ser usados como ferramentas de diagnóstico de infecções, com a vantagem de serem produzidos por uma técnica alternativa à de anticorpos monoclonais por hibridomas.

Procurando maximizar a seleção de anticorpos scFv e ampliar a caracterização proteômica posterior, neste estudo foi usado também a amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3. Stynen (2009) relatou, a partir de análise proteômica, o aumento de expressão de certas proteínas na amostra (*Purine Binding Chemotaxis*, *Flagellar Hook associated*, *Possible Lipoprotein* e *Methyl accepting chemotaxis*) todas relacionadas com a adesão e a motilidade da bactéria. O aumento da expressão poderia condicionar uma maior seletividade de anticorpos aleatórios no *biopanning* que seleciona scFv.

Foram realizados oito ensaios a fim de se obter a titulação ideal de fago auxiliar, em Unidades Formadoras de Placas (PFU) para aplicação seguinte no *biopanning*. Em nenhuma das tentativas foi conseguida a amplificação até a concentração de partículas inicial da amostra padrão de fago auxiliar (1×10^{11} PFU/ μL , Barbas et al., 2001). Os maiores títulos conseguidos foram 1×10^9 , 2×10^9 , 6×10^9 , 4×10^{10} e 5×10^{10} PFU/ μL .

Apesar de não ter sido alcançado o título ideal, o emprego dos sobrenadantes produzidos, com títulos na ordem de 10^9 e 10^{10} , na etapa de amplificação da biblioteca e do eluato incubado dos ciclos de seleção foram eficazes, uma vez que a metodologia original foi adaptada, por meio da adição de 10 mL de suspensão de fago auxiliar, cinco vezes mais que o preconizado (Giordano et al., 2001).

A metodologia clássica de *biopanning* de scFv, assim como para biblioteca de peptídeos, também é procedida a partir da adsorção das moléculas alvo em poços de microplacas carregadas. O ensaio em questão, no entanto, foi feito em microtubo, fazendo-se do sedimento das bactérias em suspensão a própria plataforma para a reação antígeno-scFv. A quantidade de lavagens e centrifugações, durante o primeiro ciclo do *biopanning* foi definidas em um experimento prévio (resultados não divulgados), em que foi realizado todo o procedimento descrito, exceto pela etapa de subtração de inespecíficos. Esta etapa, feita em todos os ciclos, antes da seleção com *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3, foi idealizada a fim de se diminuir as reações cruzadas, muito evidentes no experimento previamente realizado. Escolheram-se três bactérias, uma Gram-negativo (*E. coli*), uma Gram-positivo (*S. aureus*) e uma amostra apenas da família *Campylobacteriaceae* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*). Evitou-se muita variabilidade de bactérias, sobretudo aquelas muito semelhantes ao microrganismo alvo, para preservar a biblioteca de scFv de uma adsorção massiva durante a seleção negativa. Também buscando o aumento da especificidade e enriquecimento de clones, minimizando as reações cruzadas, foi preconizada a utilização de quatro ciclos de seleção, em vez de apenas dois, como anteriormente praticado.

Foram determinados os títulos de entrada, a partir da titulação da biblioteca amplificada no início de cada ciclo, e de saída, a partir das alíquotas de meio de cultivo retiradas após o período de 1h de incubação dos fagos com as bactérias crescidas. A tabela 8 apresenta esses valores.

Os títulos de entrada e de saída observados nos quatro ciclos de seleção dos dois *biopannings* demonstram o êxito da seleção biológica, no que tange a passagem das partículas virais da biblioteca de um ciclo para o outro e sua amplificação. Os altos títulos de entrada observados (entre 10^{10} e 10^{12}) indicam que a quantidade de partículas virais de fago auxiliar empregadas nas ampliações da biblioteca e do eluato incubado do 1º ciclo foram suficientes. Os títulos de saída apresentaram aumento entre os dois ciclos de seleção de cada *biopanning*, demonstrando o enriquecimento dos fagos selecionados.

Tabela 8 - Titulação dos fagos (UFC/ μ L) no processo de seleção apresentando as concentrações de entrada e de saída em cada ciclo de seleção.

Ciclo de seleção	Título de entrada UFC/ μ L	Título de saída UFC/ μ L
1º	$7,6 \times 10^{12}$	$7,6 \times 10^4$
2º	$2,4 \times 10^{12}$	$2,0 \times 10^5$
3º	$6,3 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^6$
4º	2×10^{10}	2×10^6

A transformação de *E. coli* Top 10 a partir do DNA extraído da cultura bacteriana do 4º ciclo de seleção do *biopanning* foi bem sucedida, a partir do que foi conseguida quantidade suficiente de colônias nas placas de meio ágar LB suplementado com carbenicilina. A linhagem de *E. coli* Top 10 não-supressora reconhece o códon de parada (TAG) presente no vetor pCOMB3XSS utilizado para a construção da biblioteca de scFv que foi empregada neste trabalho, que pela sua posição, impede a síntese das proteínas do capsídeo viral, produzindo as moléculas de scFv livres da fusão à proteína pIII do fago (Barbas et al., 2001).

Em experimentos prévios, antes da seleção de 540 colônias, não houve êxito na obtenção de moléculas de scFv no sobrenadante do meio SB, conforme o preconizado pela metodologia (Barbas et al., 2001). Fez-se necessário buscar uma adaptação para investigar a presença das moléculas de anticorpos dentro das células bacterianas, em vez de serem secretadas no meio. O resultado da lise do sedimento de bactérias *E. coli* Top 10, induzidas com IPTG, mostrou eficácia na disponibilização destas moléculas.

Os sobrenadantes obtidos após a lise dos sedimentos de *E. coli* Top 10 dos 540 clones foram submetidos ao ELISA, sendo que as placas dos ensaios foram sensibilizadas com proteínas extraídas por sonicação de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3. Neste *pré-screening*, visou-se identificar dentre tantos clones os mais reativos. A figura 12, a seguir, apresenta um gráfico que reúne todos os 540 resultados, organizados da maior à menor absorbância. Concentraram-se as mais reativas moléculas de scFv num seleto grupo de clones, com cerca de 5% das reações (34 clones) apresentando valor de absorbância maior que 0,200, enquanto o maior valor alcançado foi de 1,084.

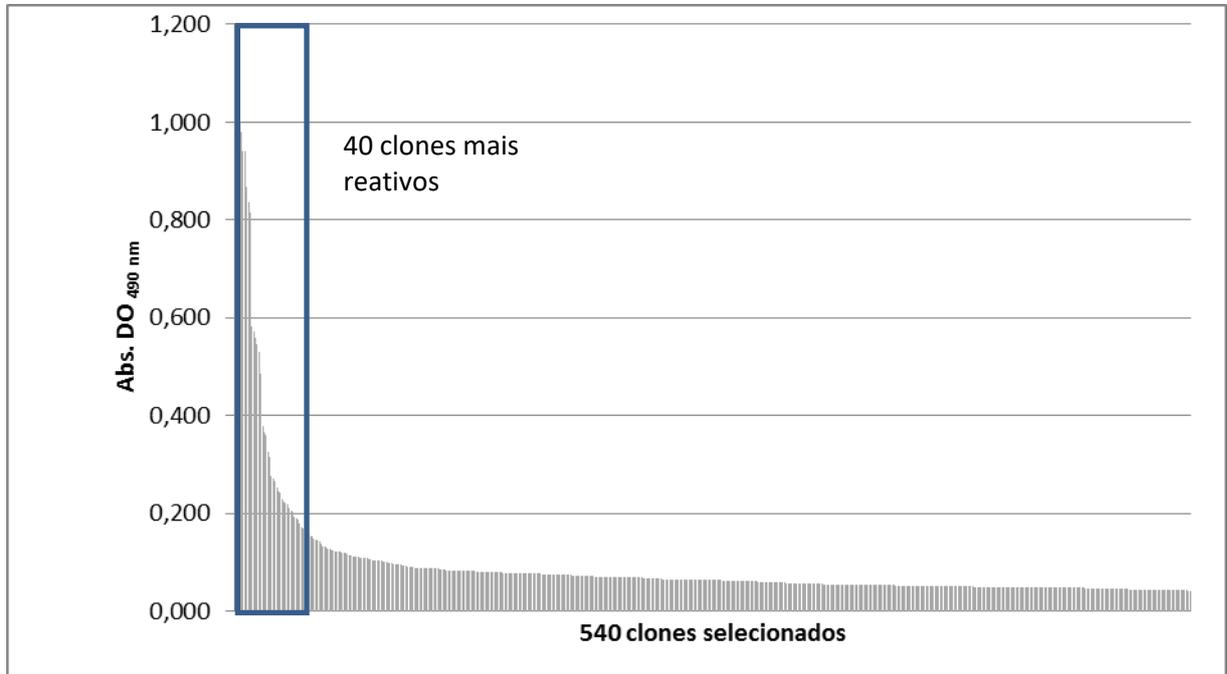
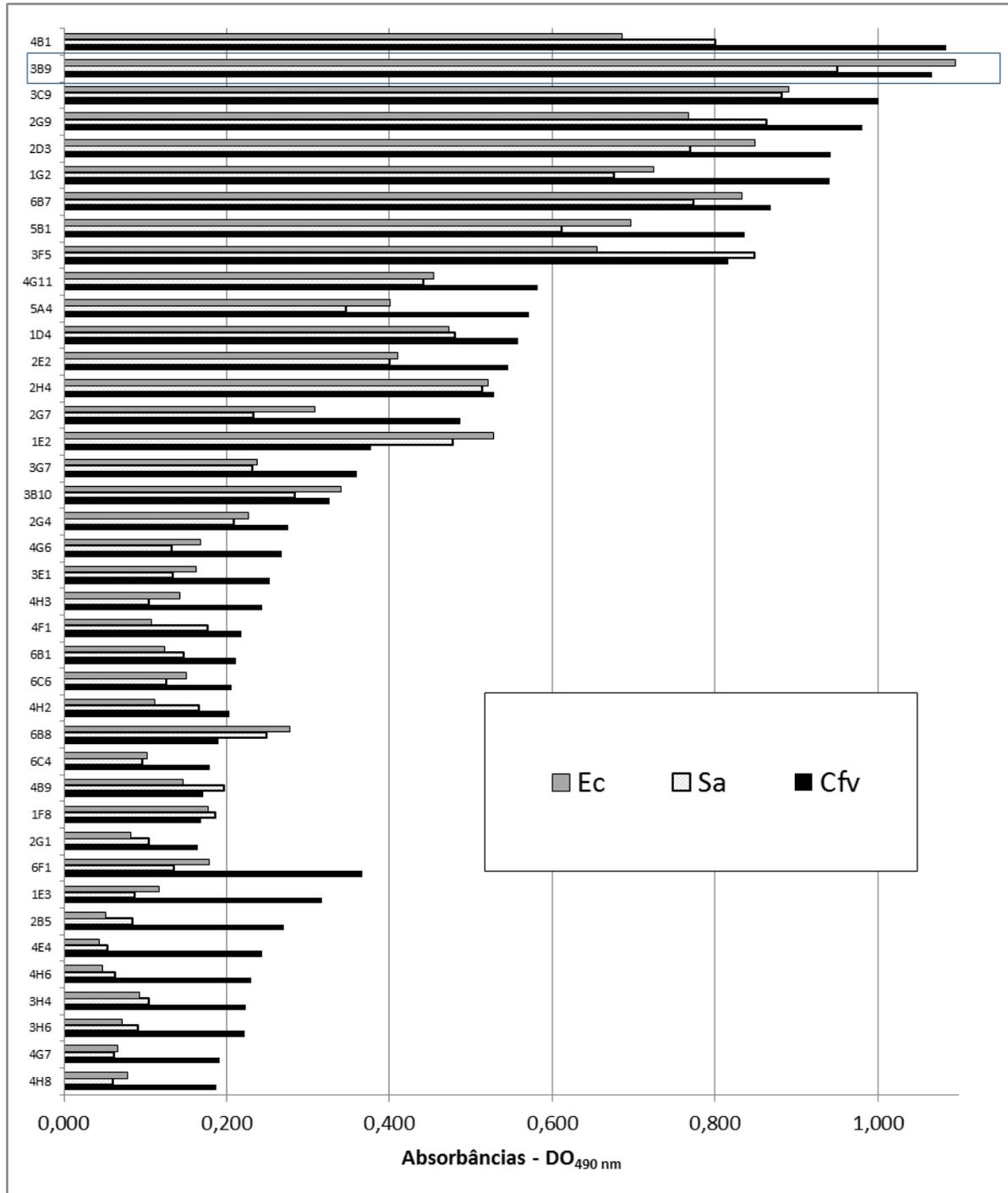


Figura 12 – Valores em ordem decrescente das absorvâncias (DO 490 nm) obtidas nas reações dos 540 clones selecionados no ELISA *pré-screening*, no qual 1 µg de antígenos de *C. fetus* subsp. *venerealis* foram empregados para o teste, em reação com sobrenadante do lisado de bactérias *E. coli* Top 10.

Os 40 clones de maiores valores de absorvância foram selecionados e usados em novo ensaio. Mantidas as mesmas condições de sensibilização, lavagem e diluição dos anticorpos, procedeu-se o teste frente a outras duas bactérias: *E. coli* XL1 Blue e *S.aureus* ATCC 25923, que foram usadas na etapa de subtração de inespecíficos do *biopanning*. A figura 13 expõe graficamente os valores de absorvância obtidos.



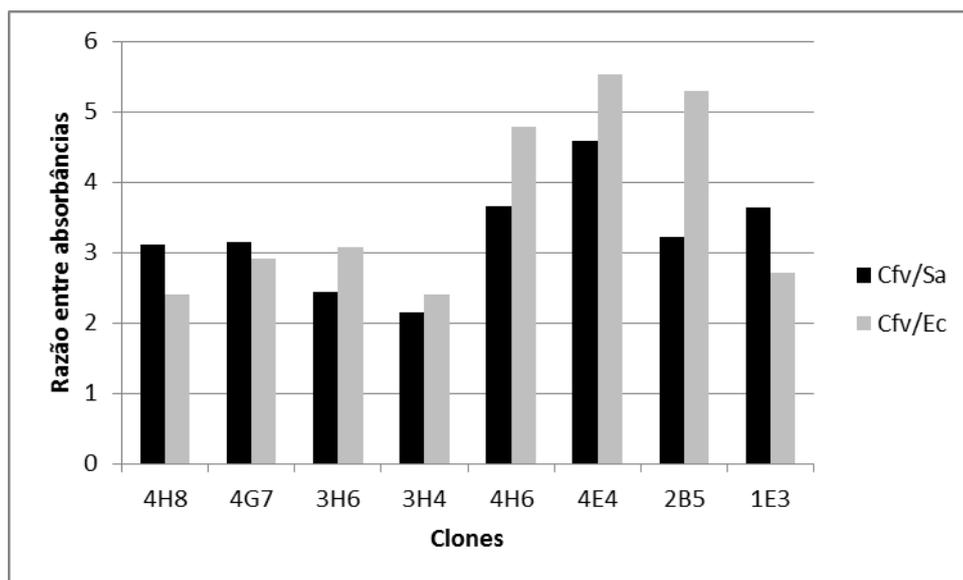
Cfv – *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3

Sa – *S. aureus* ATTC 25923

Ec – *E. coli* XL1 Blue

Figura 13 – Gráfico representativo das reações de ELISA de 40 clones de scFv contra 1 µg de proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis*, *E. coli* XL1 Blue e *S. aureus* 25923. Destaque para o clone 3B9, escolhido para ser controle positivo do ELISA nos demais ensaios, como altamente reativo.

A escolha dos clones mais promissores para a continuidade da triagem (os mais reativos possíveis contra *C. fetus* subsp. *venerealis* e, concomitantemente, menos reativos contra *E. coli* e *S. aureus*) procedeu-se pelo cálculo da razão entre as absorvâncias obtidas nos ELISA. A figura 14 apresenta os oito clones cujas razões entre a absorvância do teste com *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 e dos testes com as outras duas bactérias foi de no mínimo dois (2).



Cfv – *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – P3
 Sa – *S. aureus* ATTC 25923
 Ec – *E. coli* XL1 Blue

Figura 14 – Gráfico representativo dos valores das razões calculadas, para cada clone de scFv, entre a absorvância (DO_{490 nm}) do ensaio ELISA frente a proteínas de *C. fetus* subsp. *venerealis* e as absorvâncias dos ELISA contra *S. aureus* e *E. coli*. Compõem o gráfico os oito clones cujas razões calculadas tiveram valor mínimo de 2,0.

Os ensaios ELISA realizados com todos os 540 clones de scFv demonstraram que a reatividade dos isolados aos antígenos bacterianos é reduzida a um número limitado de clones. As absorvâncias dos clones mais reativos, detectadas em espectrofotômetro, são até 20 vezes maior que a dos pouco reativos. Dado o número elevado de amostras, foi possível observar, dentre os mais reativos, diversos padrões de reatividade, ao se fazer novo ELISA, empregando, agora, *E. coli* e *S. aureus*.

Como forma de comprovar a eficiência do processo na seleção de clones que expressam moléculas de scFv, foi verificada a presença do inserto de DNA, equivalente às cadeias VH e

VL da molécula de anticorpo monoclonal recombinante, por meio e PCR. A figura 15 apresenta gel de eletroforese 1,5% contendo o fragmento de DNA scFv amplificado, demonstrando que todos os oito clones escolhidos a partir dos resultados de ELISA possuem o vetor pCOMB3Xss contendo o inserto, conforme consta na biblioteca de fagos contruída por Santos (2010).

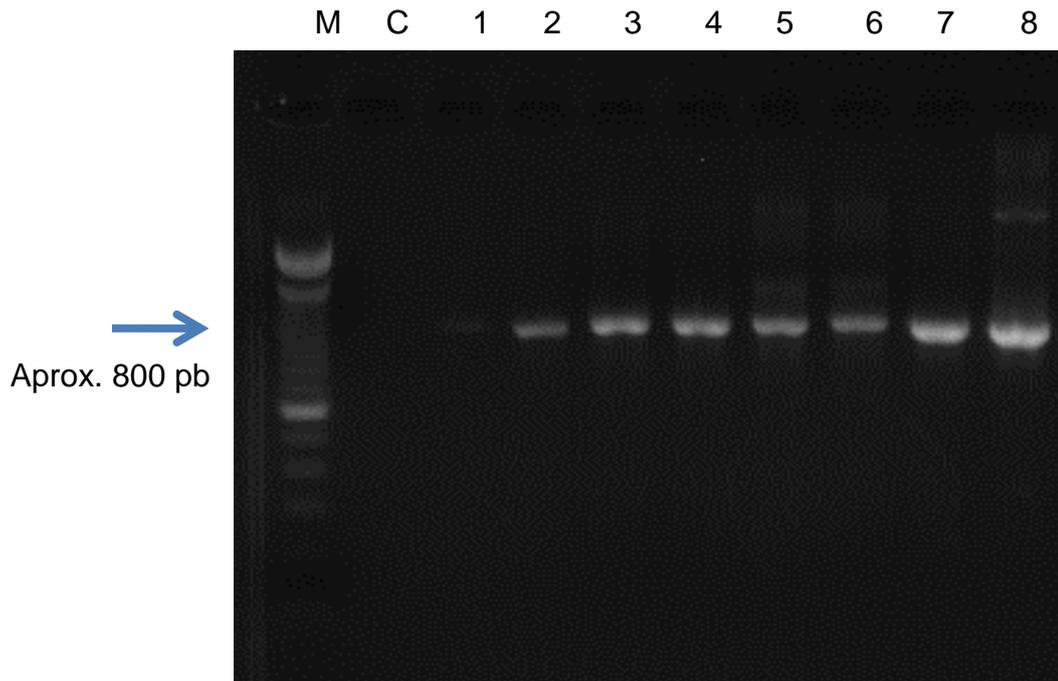


Figura 15 – Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, indicando os fragmentos de DNA de cadeias pesada e leve de scFv amplificados pela reação de PCR, a partir do DNA plasmidial (vetor pCOMB3Xss) dos oito clones selecionados após os testes de ELISA.

M – marcador de 100 pb (Invitrogen, EUA); C – controle negativo; 1 – clone 3H6; 2 – 4E4; 3 – 3H4; 4 – 1E3; 5 – 2B5; 6 – 4H8; 7 – 4G7; 8 – 4H6

Foram realizados os processos de crescimento e indução da expressão, em volume de 200 mL de meio SB, para os oito clones selecionados na etapa anterior, para o clone 3B9 e para a amostra de *E. coli* Top 10 do controle negativo, a que contém o vetor pCOMB3xSS, porém sem inserto de genes de cadeias pesadas e leves de scFv. A purificação em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a liofilização, seguida de ressuspensão do produto liofilizado em água MilliQ, resultou em amostras de 500 µL de volume, com concentrações que variaram de 0,4 mg/mL a 1,7 mg/mL.

Para a etapa posterior, em que os clones de scFv precisam ser triados contra um painel de várias bactérias, foi possível padronizar, a partir das amostras de scFv purificadas, a concentração de anticorpos usada nos ELISA seguintes. Em experimentos prévios, o clone

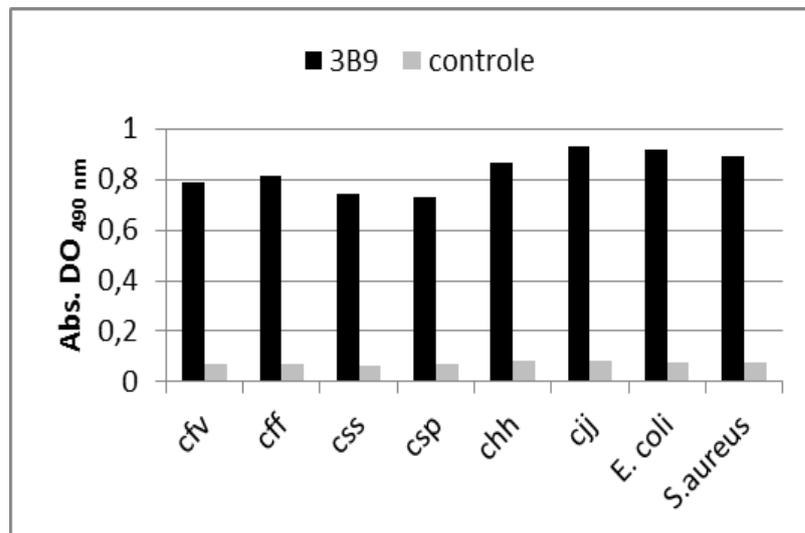
3B9, o mais reativo contra as bactérias testadas, foi usado em diversas concentrações, a fim de se determinar com qual delas seriam obtidos valores de absorvância tal qual foram obtidos nas etapas anteriores quando se usou o extrato centrifugado após a lise do sedimento de bactérias.

Para a verificação da reatividade dos clones de scFv frente a outras bactérias, foram escolhidas amostras de referência em função de suas prevalências e habitats (tabela 1). *C. sputorum* biovar *sputorum* é comensal do prepúcio do touro podendo ser encontrado nos lavados prepúciais e até ser confundido com *C. fetus* subsp. *venerealis* (Vandamme, 2000). *C. fetus* subsp. *fetus* é habitante do trato gastrointestinal de bovinos, mas também pode ser encontrado no prepúcio de touros e como agente de aborto em bovinos (Thompson e Blaser, 2000). *C. fetus* subsp. *fetus* é genética e antigenicamente mais próxima de *C. fetus* subsp. *venerealis*; (Stoessel, 1982; Vandamme, 2000), porém, a amostra utilizada (*C. fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374) é do sorotipo B, diferente de todas as amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis*, que são do sorotipo A. *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, que também é uma bactéria intestinal, é a espécie mais próxima geneticamente de *C. fetus* (Wesley et al., 1991). *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* e *C. jejuni* subsp. *jejuni* completam a lista de bactérias da mesma família taxonômica. *E. coli* e *S. aureus* reaparecem na abordagem, após terem sido usadas nas fases de triagem.

Partindo das soluções de scFv purificadas, foram usados 2 µg de scFv por poço, diluídos nos 50 µl de solução de bloqueio (etapa de reação de anticorpos primários), para as reações em duplicatas, contra todas as amostras bacterianas do experimento, constantes na tabela 1. A figura 16 traz os valores obtidos pelo clone 3B9, e a comparação com os valores do controle negativo, indicando valores altos de absorvância. A figura 17 reúne todos os demais clones, em gráficos que expõem o desempenho de cada scFv diante de cada bactéria, também comparando ao valor do controle negativo. Os resultados mostraram que, a exemplo do que ocorreu no processo de escolha destes clones, a reatividade frente a *E. coli* e *S. aureus* foi mais baixa comparando-se às demais. No entanto, os valores de absorvância para bactérias do gênero *Campylobacter* testadas nestes ensaios foram muito variáveis, por vezes tão altos quanto os encontrados para *C. fetus* subsp. *venerealis*, revelando, assim, grande ocorrência de reações cruzadas.

Os resultados dos ELISAS mostraram que a reatividade cruzada foi muito alta e variada entre as bactérias da família *Campylobacteriaceae*. Os clones de scFv foram escolhidos por serem

menos reativos, relativamente, contra *E. coli* e *S. aureus*, na etapa anterior de triagem. Porém, esse padrão não se repetiu para o clone 4E4, diante de *S. aureus*, e para os clones 2B5, 3H4 e 4H8 em relação a *E. coli*. Houve clones que reagiram mais com *C. fetus* subsp. *fetus* se comparado à espécie principal, como foi o caso de 4H6 e 3H6.



cfv – *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* P3
 cff – *C. fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374
 css – *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6647
 csp – *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* LCDC 6939
 chh – *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* LCDC 17398
 cjj – *C. jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11351

Figura 16 – Reatividade da amostra de scFv purificada 3B9 e do controle negativo em ELISA contra seis bactérias do gênero *Campylobacter*, *E. coli* XL1 Blue e *S. aureus* ATCC 25923.

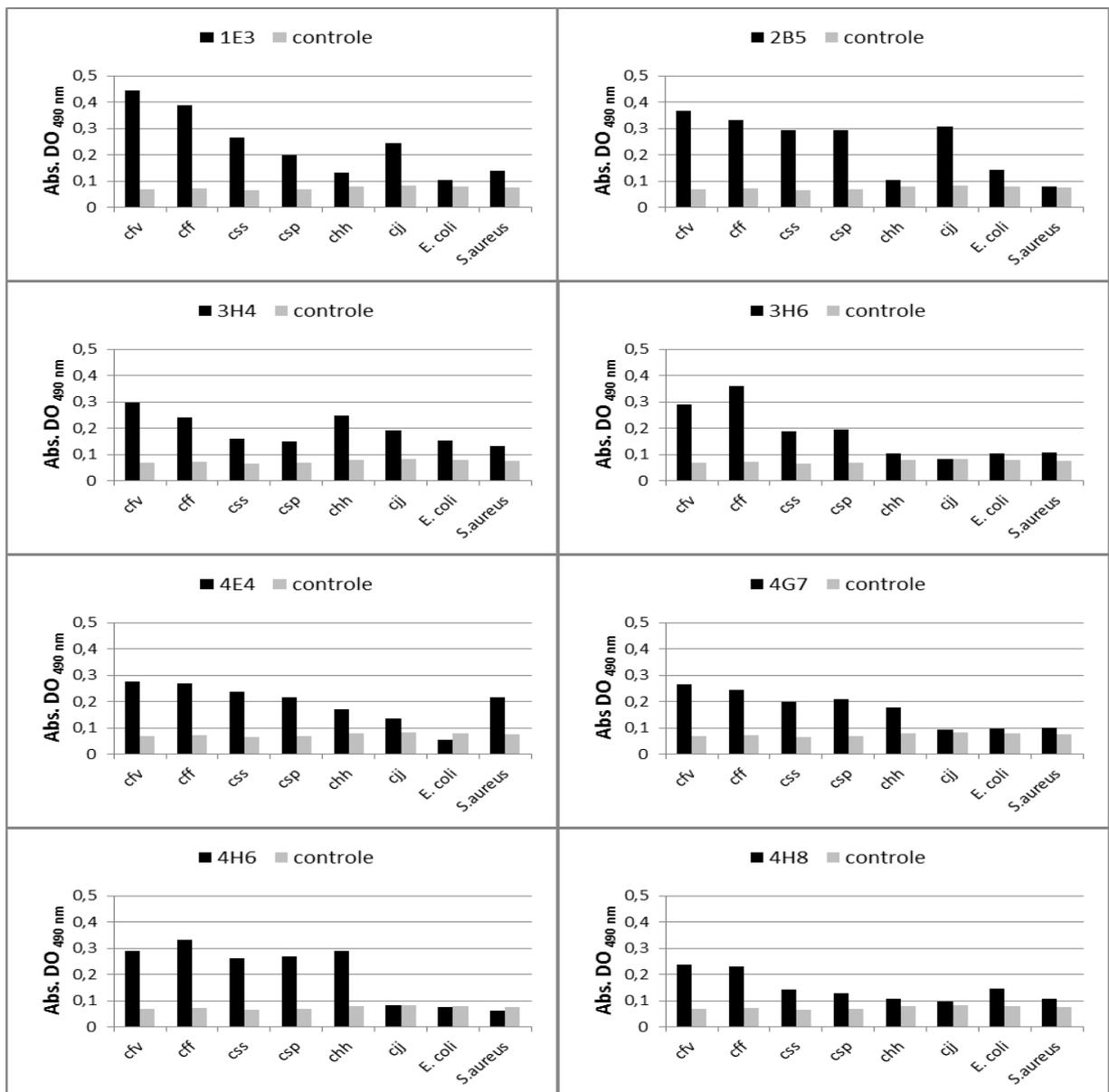
Para fins de avaliação dos resultados obtidos, foram calculadas a razão e a diferença entre as absorbâncias encontradas nos ELISA, em relação ao controle negativo, para cada uma das oito amostras de scFv testadas nessa etapa do trabalho, conforme mostrado nas figuras 18 e 19. Valores mais altos tanto na razão quanto na subtração entre a absorbância da amostra e do controle negativo indicam maior diferença nos resultados, o que foi alcançado por todos os

clones nas reações contra *C. fetus* subsp. *venerealis*. Os clones 3H6 e 4H6 foram mais reativos contra *C. fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374, dentre todas as bactérias usadas no ensaio.

Dentre as bactérias usadas na etapa de subtração de inspecíficos do *biopanning*, houve reatividade mais alta por parte dos clones 1E3 e 2B5 contra *C. jejuni* subsp. *jejuni*, e do clone 4E4 contra *S. aureus* ATCC 25923. Pode-se considerar atípicos estes resultados, frente aos demais, em que se observou, em geral, reatividade baixa contra *C. jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11351, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* XL1 Blue.

Os clones 3H4 e 4H6 foram os únicos que apresentaram reatividade notável contra *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* LCDC 17398. Reatividades contra *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6647 e *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* LCDC 6939 foram todas consideradas altas (acima de duas vezes o valor de absorbância do controle negativo) sendo comparáveis às encontradas contra as duas subespécies de *C. fetus* por parte dos clones 2B5, 4E4, 4G7 e 4H6.

Enfim, apesar das reações cruzadas, foi possível observar alguns clones que podem ser considerados promissores. O clone 3H6, se comparado aos demais, apresentou a menor reatividade contra as bactérias diferentes de *C. fetus*. Desempenho semelhante foi obtido pelos clones 4G7 e 4E4, a despeito da reatividade relativamente mais alta contra os biovares de *C. sputorum*. 4G7, 4H6, 3H6 e 4H8 pareceram ser os mais interessantes para fins de se obter baixos índices de reações cruzadas entre *C. fetus* e *E. coli* e *S. aureus*, podendo-se inferir, assim, que possam ser clones específicos para bactérias do gênero *Campylobacter*.



cfv – *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* P3
 cffB – *C. fetus* subsp. *Fetus* ATCC 27374
 css - *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6647
 csp - *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* LCDC 6939
 chh - *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* LCDC 17398
 cjj - *C. jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11351

Figura 17 – Reatividade das oito amostras de scFv purificada e do controle negativo em ELISA contra seis bactérias do gênero *Campylobacter*, *E. coli* XL1 Blue e *S. aureus* ATCC 25923.

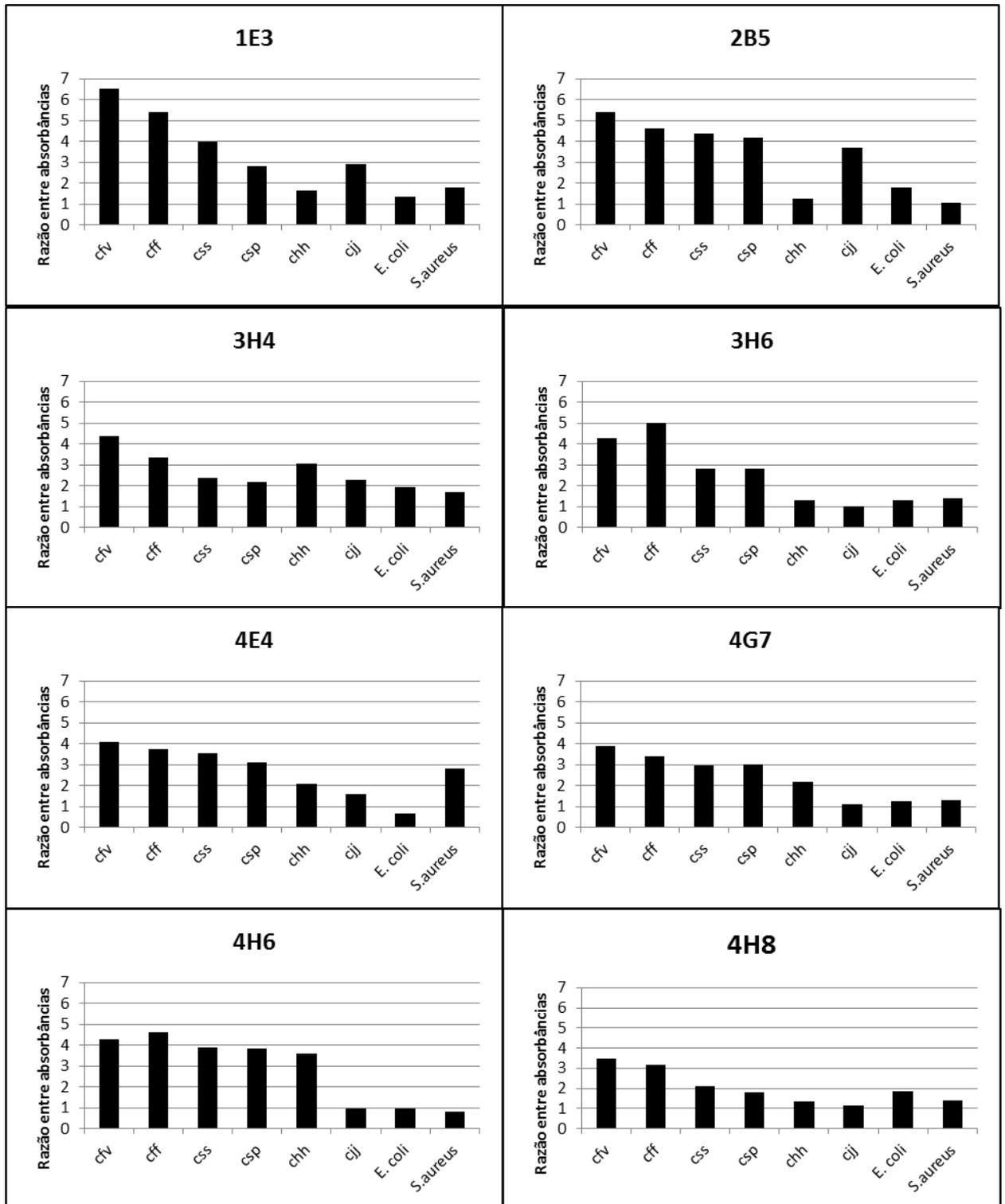


Figura 18 - Gráfico representativo dos valores das razões entre as absorvâncias ($DO_{490\text{ nm}}$) obtidas pelas oito amostras de scFv purificadas e o controle negativo em ELISA contra seis bactérias do gênero *Campylobacter*, *E. coli* XL1 Blue e *S. aureus* ATCC 25923.

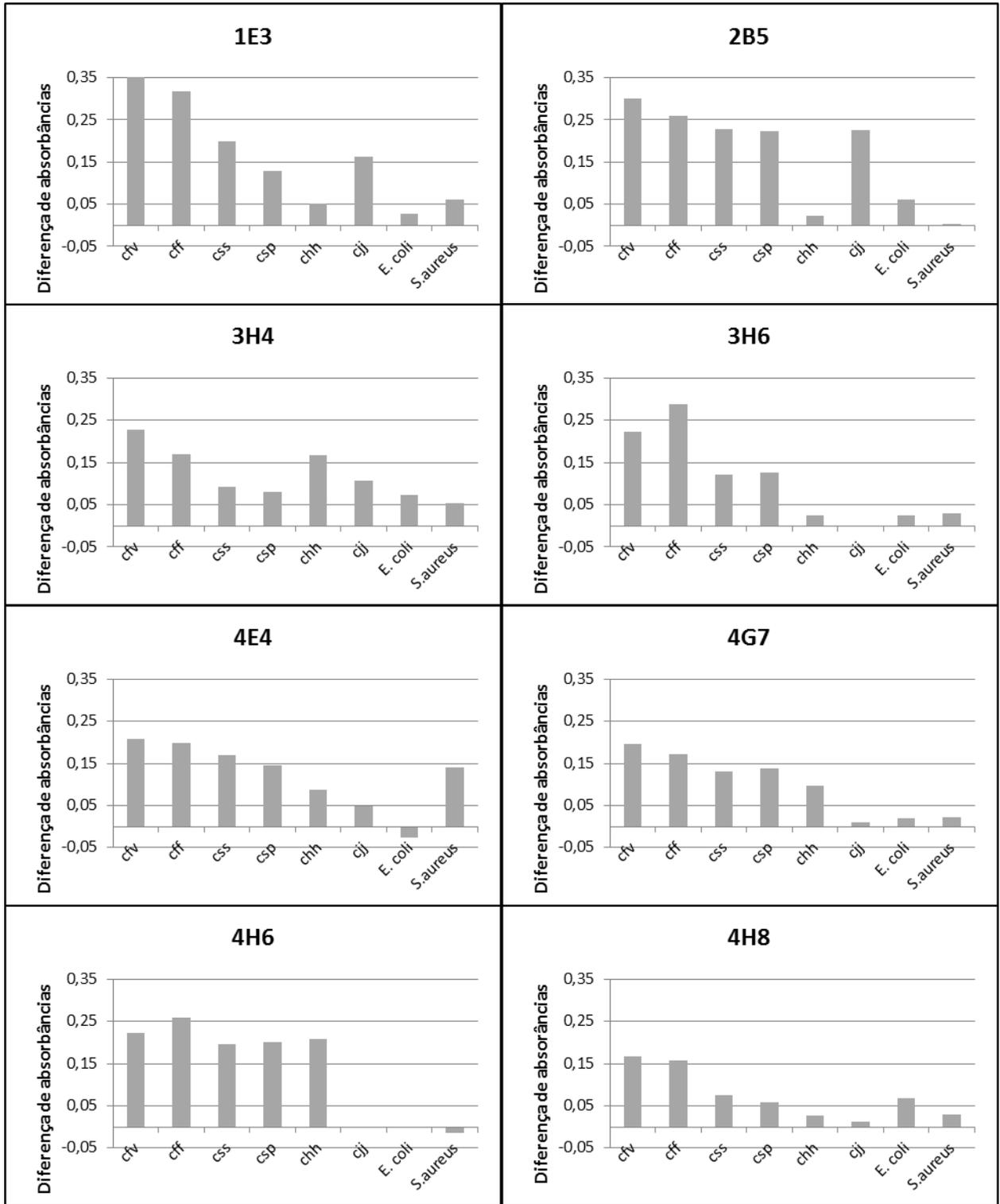


Figura 19 - Gráfico representativo dos valores das diferenças entre as absorvâncias (DO 490 nm) obtidas pelas oito amostras de scFv purificadas e o controle negativo em ELISA contra seis bactérias do gênero *Campylobacter*, *E. coli* XL1 Blue e *S. aureus* ATCC 25923.

6. CONCLUSÕES

- As metodologias aplicadas para a seleção biológica de fagos na biblioteca C7C foram eficazes para seleção e enriquecimento de clones miméticos a proteínas de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354.
- Os peptídeos selecionados por *Phage Display* apresentaram similaridade com sequências de proteínas conhecidas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 e são capazes de induzir resposta antigênica em camundongos.
- Os peptídeos ALASLPL e LSYLFPP foram considerados os mais promissores como antígenos miméticos de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354.
- As metodologias aplicadas para a seleção biológica de fagos na biblioteca de scFv, construída contra células tumorais, foram eficazes para seleção e enriquecimento de anticorpos reativos contra *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354.
- Os clones de scFv selecionados a partir da biblioteca escolhida são reativos contra *C. fetus* subsp. *venerealis*, porém apresentam reações cruzadas com outras bactérias do gênero *Campylobacter*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. F.; SOUZA, G. R. L.; CAPPARELLI, F. E.; et al. Selection of recombinant peptides for canine leishmaniasis detection by phage display. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128, p. 298, 2009.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W.; et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, p.403-410, 1990.

ALVES, T. M. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra *Campylobacter fetus subsp. venerealis*. 2006. 34p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.

ALVES, T.M. Participação dos receptores semelhantes ao *Toll* na indução de expressão de mRNA para CXCL8 (IL-8) na infecção *in vitro* de células epiteliais por *Campylobacter fetus subsp. venerealis* e *Tritrichomonas foetus*. 2010. 63f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.

ALVES, T.M; HENEINE, L.G.D; ARAÚJO, B.S.; et.al. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Campylobacter fetus subsp. Venerealis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, p. 640 – 644, 2012.

ARAP, W.; PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in mouse model. *Science*, v.279, n.5349, p.377-380, 1998.

AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; et al. Técnicas básicas em biologia molecular. Universidade de Brasília (Ed.). p. 129-141, 2003.

AZZAZZY, M. E.; HIGHSMITH JR., W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, v. 35, p. 425-445. 2002.

BARBAS, C.F.III; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; et al. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Plain View, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotchnol. Adv*, v.19, p.1-33, 2001.

BLASER, M.J; WANG, E.; TUMMURU, M.K.; et al. High-frequency S-Layer protein variation in *Campylobacter fetus* revealed by *sapA* mutagenesis. *Mol. Microbiol.* v. 14, n.3, p. 453-462, 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976..

BRAGANZA, A.; WALLACEA, K.; PELL, L.; et al. Generation and validation of canine single chain variable fragment phage display libraries. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.139, p. 27-40, 2011.

BRISSETE, R.; PRENDERGAST, J.K.; GOLDSTEIN, N.I. Identification of cancer targets and therapeutics using phage display. *Curr. Opin. Drug Discov.*, v.9, n.3, p.363-369, 2006.

BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.26, 2002

BROOKS, B.W.; DEVENISH, J.; LUTZEWALLACE, C.L. *et al.* Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Vet. Microbiol.*, v. 103, n. 1-2, p. 77-84, 2004.

CLARK, B.L. Review of bovine vibriosis. *Aust.Vet. J.*, v. 47, n. 3, p. 103-107, 1971

CLARK, B.L.; PARSONSON, I.M.; WHITE, B.L. Control of trichomoniasis in a large herd of beef cattle. *Aus. Vet. J.* v. 50, p. 424-426, 1974.

CLAVERO, M. R. S.; MONK, J. D.; BEUCHAT, L. R.; et al. Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonellae*, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n.6, p. 2069-2075, 1994.

COBEA Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Manual

para técnicos em bioterismo. São Paulo. Cobeia, 1996. 259 p.

CORBEIL, L.B., DUNCAN, J.R., SCHURING, G.G.D., et al. Bovine venereal vibriosis: variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. *Infect. Immun.*, v. 10, p. 1084 – 1090, 1974

COTTORELLO, A.C.P. *Relação parasita – hospedeiro na infecção de células epiteliais in vitro por Campylobacter fetus subsp. venerealis.* Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2006. 76p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).

CZINN, S. J.; CAI, A.; NEDRUD, J. G. Protection of germ-free mice from infection by *Helicobacter felis* after active oral or passive IgA immunization. *Vaccine*, v.11, p. 637–642, 1993

DAKAPPAGARI, N. K.; LUTE, K. D.; RAWALE, S.; et al. Conformational HER-2/neu B-cell epitope peptide vaccine designed to incorporate two native disulfide bonds enhances tumor cell binding and antitumor. *Activities J. Biol. Chem*, v. 280, n. 1, p. 54-63, 2005.

DEKEYSER, J. Bovine genital Campylobacteriosis. In: BUTZLER, J.P. *Campylobacter infection in man and animal*. Boca Raton: CRC, 1984. p. 181-191.

DE VARGAS A.C.; COSTA M.M.; VAINSTEIN, M.H.; et al. *Campylobacter fetus* subspecies venerealis surface array protein from bovine isolates in Brazil. *Curr. Microbiol.* V. 45, n.2, p. 111 – 114, 2002.

DUNN, B.E.; BLASER, M.J.; SNYDER, E.L. Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter* outer membrane proteins. *Infect. Immun.*, v. 55, n. 7, p. 1564-1572, 1987.

DYBWAD, A.; LAMBIN, P.; SIOUD, M. et al. Probing the specificity of human myeloma proteins with a random peptide phage library. *Scand. J. Immunol.*, v.57, n.6, p.583-590, 2003.

EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M.; HAWKINS, C.F.; et al. Vaccination studies for the control of Campylobacteriosis in Jamaican cattle. *Vet. Record*. v. 119, p. 299-301, 1986.

ENRIQUEZ, F.; RIGGS, M. Role of immunoglobulin A monoclonal antibodies against P23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.*, v.66, p. 4469–4473, 1998.

FIGUEIREDO, J.F.; PELLEGRIN, A.O.; FÓSCOLO, C. B. Evaluation of direct fluorescent antibody test for the diagnosis of Bovine Genital Campylobacteriosis. *Rev. Latinoam. Microbiol.* v.44, p. 118-123. 2002.

FOLGORI, A.; TAFI, R.; MEOLA, A.; et al. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.*, v.13, n.9, p.2236-2243, 1994.

FÓSCOLO, C. B. Uso terapêutico da vacinação contra a campilobacteriose genital bovina em touros. 2001. 34p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.

FRANK, A.H., SHALKOP, W.T. BRYNER, J.H. Cellular changes in the endometrium of *Vibrio fetus* – infected and non - infected heifers. *Am. J. Vet. Res.*, v. 23, p. 1213 – 1216, 1962.

FUJIMURA, P. T. Seleção e caracterização de peptídeos miméticos a proteínas tumorais no estadiamento clínico-patológico do câncer de próstata. 2010. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: INGEB, UFU).

GARCIA, M.M., BROOKS, B.W. Campylobacter. In: PRESCOTT, J.F., ZUERMER, R.L., GYLES, C.L., THOEN C, C.D. (Ed.). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2^a ed., Iowa States University Press, p. 262 – 272, 1993.

GARCIA, M.M., LUTZE-WALLACE, C.L., DENES, A.S., et al. Protein shifty and antigenic variation in the S layer of *C. fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of sap A homologs. *J. Bacterol.*, v. 177, n. 8, p. 1976 – 1980, 1995.

GEYSEN, H.M.; RODDA., S.J.; MASON, T.J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic-determinant. *Mol. Immunol.*, v.23, n.7, p.709-715, 1986.

GIORDANO, R. J.; CARDÓ-VILA, M. LAHDENRANTA, J.; et al. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat. Med.*, v. 7, n. 11, p. 1249-1253, 2001.

GRIFFITHS, A. D. Production of human antibodies using bacteriophage. *Current Opinion in Immunology*, v. 5, p. 263–267, 1993

GROVES, M.; LANE, S.; DOUTHWAITE, J.; et al. Affinity maturation of phage display antibody populations using ribosome display. *J. Immunol. Methods*, v. 313, n.1-2, p. 129-139, 2006.

HAJITOU, A.; TREPEL, M.; LILLEY, C.E.; et al. A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging. *Cell*, v.125, n.2, p.385-398, 2006.

HEWSON, P. I.; LANDER, K. P.; GILL, K. P. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Campylobacter fetus* in bovine vaginal mucus. *Res. Vet. Sci.*, v. 38, n. 1, p. 41-45, 1985.

HOOGENBOOM, H.R.; BRUINE, A.P.; HUFTON, S.E.; et al. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, v. 4, p.1–20, 1998.

HUANG, J.; WANG, L.; FIRTH, S. Rotavirus VP7 epitope mapping using fragments of VP7 displayed on phages. *Vaccine*, v.18, p. 2257-2265, 2000.

HUM, S.; QUINN, C.; KENNEDY, D. Diagnostic of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. *Aust. Vet. J.*, v. 71, n. 6, p. 140-143, 1994.

INVITROGEN *Dynabeads*® *Protein* *G*. Disponível:
<[http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/100.03D04D_Dynabeads_Protein_G_\(rev004\).pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/100.03D04D_Dynabeads_Protein_G_(rev004).pdf)>. Acesso em 20 de Junho de 2011.

\

JIA, W. D.; SUN, H. C.; ZHANG, J. B.; et al. A novel peptide that selectively binds highly metastatic hepatocellular carcinoma cell surface is related to invasion and metastasis. *Cancer Lett.*, v. 247, n. 2, p. 234-242, 2006.

KARLSTROM, A.; JACOBSSON, K.; FLOCK, M.; et al. Identification of a novel collagen-like protein, ScIC, in *Streptococcus equi* using signal sequence phage display. *Veterinary Microbiology*, v. 104, p. 179–188, 2004

LAGE, A.P. Epidemiologia e controle da campilobacteriose genital bovina. In: *Anais do V Simpósio Pfizer sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos*. Brasil – 2001. p. 17 – 25, 2001.

LAGE, A.P., LEITE, R.C. Campilobacteriose Genital Bovina (Vibriose). *Pecuária de Corte*, n. 10, p. 50 – 54, 2000.

LANE, D.P.; STEPHEN, C.W. Epitope mapping using bacteriophage peptide libraries. *Curr. Opin. Immunol.*, v.5, n.2, p.268-271, 1993.

LEITE, R.C. *Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo/benefício do controle da campilobacteriose bovina*. 1977. 38p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.

LIU, B.; HUANG, L.; SJHLBOM, C.; et al. Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display. *J. Mol. Biol.*, v.315, n.5, p.1063-1073, 2002.

LUNDER, M.; BRATKOVIC, T.; ORLEB, U. et al. Ultrasound in phage display: a new approach to nonspecific elution. *Biotechniques*, v.44, n.7, p.893-900, 2008.

MAGNANI, D. M.; HARMS, J. S.; DURWARD, A.; et al. Nondividing but metabolically active gamma-irradiated *Brucella melitensis* is protective against Virulent *B. melitensis* challenge in mice. *Infection and Immunity*, v.77, n. 11, p. 5181-5189, 2009

MARVIN, D.A.; HALE, R.D.; NAVE, C. et al. Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages Ff (fd, f1, M13), If1 and Ike. *J. Mol. Biol.* v. 235, n.1, p. 260-286, 1994

MEAD, D.A.; KEMPER, B.; RODRIGUEZ, R.L.; et al. Chimeric single-stranded DNA phage-plasmid cloning vectors, in *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Boston: Eds Butterworths, p. 85-102, 1988.

- MINTZ, P.J.; KIM, J.; DO, K.A.; et al. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnology*, v. 21, n.1, p. 57-63, 2003.
- NASEEM, S.; MEENS, J.; JORES, J.; et al. Phage display-based identification and potential diagnostic application of novel antigens from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Veterinary Microbiology*, v. 142, p. 285–292, 2010.
- NERI, D.; PETRUL, H.; RONCUCCI, G. Engineering recombinant antibodies for immunotherapy. *Cell Biophysics*, v. 27, p. 47-61, 1995.
- New England Biolabs (NEB) – Disponível em (<http://www.neb.com/nebecomm/tech>). Acesso em 16 de setembro de 2011.
- NOREN, K.A.; NOREN, C.J. Construction of high-complexity combinatorial phage display libraries. *Methods*, v.23, n.2, p.169-178, 2001.
- OGRA, P.L. Mucosal immunoprophylaxis: an introduction. p. 3-14. In: KIYONO, H., OGRA, P.L., MACGHEE, J.R. (Ed.). *Mucosal Vaccines*. San Diego: Academic Press. 1996. 479p.
- PELLEGRIN, A.O. A campilobacteriose e tricomonose são doenças reemergentes? *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 23, n. 4, p. 479 – 566, 1999.
- PELLEGRIN, A. O. Campilobacteriose Genital Bovina na sub-região da Nhecolândia do Pantanal sul-matogrossense e proposição de novas técnicas de diagnóstico. 2001. 80p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.
- PELLEGRIN, A.O.; SERENO, J.R.B.; LEITE, R.C. et al. Campilobacteriose genital bovina em touros do mato grosso do sul. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21, n. 1, p. 43–46, 1998.
- PHIZICKY, E.M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol.*, v.59, n.1, p.94-123, 1995
- PLESSIS, D. H. D; ROMITO, M. JORDAAN, F. Identification of an antigenic peptide specific for bluetongue virus using phage display expression of NS1 sequences. *Immunotechnology*, v.1, p. 221-230, 1995.

PRUDÊNCIO, C. R.; RODRIGUES, A. A. R.; SOUZA, G. R. L.; et al. Identification of *Boophilus microplus* phagotopes from phage displayed peptide libraries. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, p. 221, 2009.

PRUDENCIO, C. R. ; NASCIMENTO, R. ; MACHIORI M. ; et al. In silico analysis for identification of tick phagotopes selected by phage-displayed libraries. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, p. 168-174, 2009.

PRUDENCIO, C. R. ; Rodrigues, A. A. R. ; CARDOSO, R. ; Szabo, M. P. J. ; Goulart, L. R. . Antigen Fingerprinting of Polyclonal Antibodies Raised in Immunized Chickens with Tick Total Proteins: A Reservoir for the Discovery of Novel Antigens. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 16, p. 1027-1036, 2011.

RAJIK, M.; JAHANSHIRI, F.; OMAR, A.R. et al. Identification and characterization of a novel anti-viral peptide against avian influenza virus H9N2. *Virology Journal*, v.74, n.6, p.1-12, 2009

ROBERTS, J. S. *Veterinary obstetrics and genital disease*. 2^a Ed, Ithaca, New York, 1971.

ROMANOV, V.I.; DURAND, D.B.; PETRENKO, V.A. Phage Display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. *The Prostate*, v.47, n.4, p.239-251, 2001.

SAMOYLOVA, T.I.; MORRISON, N.E.; GLOBA, L.P. et al. Peptide phage display: opportunities for development of personalized anti-cancer strategies. *Anticancer Agents Med. Chem.*, v.6, n.1, p.9-17, 2006

SANTOS, A. P. C. Construção e seleção de uma biblioteca de anticorpos monoclonais scFv contra células tumorais de tireóide. 2010a. 107p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica). Campinas:Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

SANTOS, E. M. Seleção de peptídeos miméticos aos antígenos imunogênicos do vírus da anemia infecciosa equina e do vírus da leucose bovina a partir de bibliotecas de *Phage Display*. 2010b. 96p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.

SERGEEVA, A.; KOLONIN, M.G.; MOLLDREM, J.J. et al. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.58, n.15, p.1622-1654, 2006.

SILVA Jr., A.; KAWAZOE, U.; FREITAS, F. F. T.; et al. Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 120, p. 53–60, 2002.

SIOUD, M.; FORRE, O.; DYBWAD, A. Selection of ligands for polyclonal antibodies from random peptide libraries: potential identification of (auto) antigens that may trigger B and T cell responses in autoimmune diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v.79, n.2, p.105-114, 1996.

SMITH, G.P.; PETRENKO, V.A. Phage Display. *Chem. Rev.*, v.97, n.2, p.391-410, 1997.

SIDHU, S.S. Phage Display in pharmaceutical biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.11, n.6, p.610-616, 2000

SOUZA, G. R. L.; PRUDÊNCIO, C. R.; CARDOSO, R.; et al. Construction of an antibodies library (scFv) for selection and characterization of *Boophilus microplus* antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, p. 122, 2009.

STOESSEL, F. *Las enfermedades venereas de los bovinos: trichomoniasis y vibriosis genital*. Zaragoza Acribia, 1982. 163p.

STYNEN, A.P.R. *Expressão diferencial de proteínas de amostras de Campylobacter fetus subsp venerealis após passagens sucessivas em novilhas*. 2009. 52p. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.

STYNEN, A.P.R.; LAGE, A.P. Detection of *Campylobacter fetus* in preputial washing of bulls by PCR, 2000, Stockolmo. *Clinical Microbiol and Infection*, 2000. v. 1. p. 170-170.

STYNEN, A. P. R.; LAGE, A. P.; MOORE, R. J.; et al. Complete Genome Sequence of Type Strain *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 20, p. 5871-5872, 2011

SUNDARAM, R.; LYNCH, M .P.; RAWALE, S. V.; et al. De Novo design of peptide immunogens that mimic the coiled coil region of human T-cell leukemia virus type-1 glycoprotein 21 transmembrane subunit for induction of native protein reactive neutralizing antibodies. *J. Biol. Chem.*, v. 279. n. 23. p. 24141-24151. 2004.

THOMPSON, S.A; BLASER, M.J. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. *Campylobacter*. 2. ed. Washington: ASM, 2000. p.321-347.

VAN AERT, A.; DEKEYSER, P.; FLORENT, A. F.; et al. Nature of *Campylobacter fetus* agglutinins in vaginal mucus from experimental infected heifers. *Br. Vet. J.*, v. 133, p. 88-94, 1977.

VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae In NACHAMKIN, N.; BLASER, M.J. (eds.) *Campylobacter* 2 ed. Washington: American Society for Microbiology, 2000. p. 3-20.

WANG, H.; GAO, Y.; GONG, Y.; et al. Identification and immunogenicity of an immunodominant mimotope of *Avibacterium paragallinarum* from a phage display peptide library. *Veterinary Microbiology*, v. 119, p. 231–239, 2007.

WHEATLEY, J. B.; JR SCHMIDT , D. E. Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide activated supports. *J Chromatography A*, v. 849. n.1. p. 1–12, 1999.

WIELAND, W.H.; ORZÁEZ, D.; LAMMERS, A.; et al. A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochemical Journal*, v. 380, p. 669-676, 2004.

WIELAND, W. H.; ORZÁEZ, D.; LAMMERS, A.; et al. Display and selection of chicken IgA Fab fragments. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 110, p. 129–140, 2006.

WINTER, G.; GRIFFITHS, A.D.; HAWKINS, R.E.; et al. Making antibodies by phage display technology. *Annual Review of Immunology*, v. 12, p.433–455, 1994.