

**Elizangela Maira dos Santos**

**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***

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do  
grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Co-orientadores: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann  
Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2010

S237s Santos, Elizangela Maira dos, 1978

Seleção de peptídeos miméticos aos antígenos imunogênicos do vírus da anemia infecciosa eqüina e do vírus da leucose bovina, a partir de bibliotecas de *phage display* / Elizangela Maira dos Santos. – 2010

96 p. II:

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Co-orientadores: Marcos Bryan Heinemann, Rômulo Cerqueira

Leite

Inclui bibliografia

1. Equino – Doenças – Teses. 2. Bovino – Doenças – Teses. 3. Anemia infecciosa eqüina – Diagnóstico – Teses. 4. Leucose Bovina – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Heinemann, Marcos Bryan. III. Leite, Rômulo Cerqueira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.108 96

Tese defendida e aprovada em 27 de abril de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



---

Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis  
Orientador



---

Dr. Rone Cardoso



---

Dr. Carlos Ueira Vieira



---

Dr. Marcelo Fernandes Camargos



---

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço,

ao meu orientador Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis e aos meus co-orientadores Dr. Rômulo Cerqueira Leite e Dr. Marcos Bryan Heinemann pelas oportunidades e todos ensinamentos;

aos professores Dr. Carlos Ueira, Dr. Luis Goulart e aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia: Ana Paula Carneiro, Carolina Reis, Carolina Siquierolli, Patrícia, Fausto, Juliana, Rafael, Sandra, Taíse, Yara, Washington, Carlos Prudêncio e Guilherme Lino;

ao amigo Rone Cardoso (Universidade Federal de Uberlândia) por toda ajuda;

a todos os funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, em especial a Doracy, Eduardo e Nádia;

as minhas companheiras e amigas do Laboratório de Retrovírus (RetroLab-UFMG): Andreza Pain, Daniela Rajão, Fabiana Alves, Fernanda Gonçalves, Gissandra Braz, Helen, Juliana Quintanilha, Roberta Tavares;

a minha querida família pelo amor, apoio, incentivo e por tudo o que sou;

meu querido companheiro Igor por todo carinho e ajuda;

as minhas amigas do coração;

a Deus, obrigada por ter colocado tudo e todos no meu caminho...

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS</b> .....	<b>12</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 Anemia Infecciosa Equina .....	14
1.2 Leucose Enzoótica Bovina.....	15
1.3 Diagnóstico Laboratorial da AIE e da LEB .....	16
1.4 <i>Phage Display</i> .....	17
1.5 Vetores.....	19
1.6 Tipos de sistemas e bibliotecas <i>phage display</i> .....	21
1.7 Seleção por afinidade .....	22
1.8 Aplicações para o <i>Phage Display</i> .....	23
<b>2. METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
2.1 Seleção com a biblioteca Ph.D.-C7C™ (Biopanning AIE).....	25
2.1.1 Purificação das IgGs positivas e negativas dos soros de equídeos.....	25
2.1.2 Seleção Biológica IgG AIE (Biopanning) .....	26
2.1.3 Titulação dos fagos.....	28
2.1.4 Caracterização dos clones ligantes .....	28
2.1.5 Precipitação das amostras de fagos selecionadas para os imunoenaios .....	30
2.1.6 Fago selvagem .....	30
2.1.7 Análises da reatividade dos clones selecionados em imunoenaios com as IgGs purificadas.....	30
2.1.8 Análises da reatividade dos clones selecionados no biopanning e nos imunoenaios, com as amostras dos soros de equídeos naturalmente infectados e não infectados com VAIE .....	35
2.1.9 Análises por bioinformática.....	37
2.1.10 Síntese do peptídeo sintético contendo epítopos miméticos do vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE).....	38
2.1.11 Testes da reatividade do peptídeo sintético VAIE-E12 .....	38
2.2 Seleção com a biblioteca Ph.D.-12™ (Biopanning LEB).....	39
2.2.1 Purificação das IgGs provenientes dos soros de bovinos.....	39
2.2.2 Seleção Biológica (Biopanning).....	39
2.2.3 Análises da reatividade dos clones selecionados em imunoenaios com as IgGs positivas e negativas (VLB) purificadas .....	41
2.2.4 Análises da reatividade dos clones selecionados no biopanning e nos imunoenaios, com as amostras dos soros de bovinos naturalmente infectados e não infectados com VLB .....	43
2.2.5 Análises por bioinformática.....	46

2.2.6	Síntese do peptídeo sintético contendo epítomos miméticos do vírus da Leucose Bovina (VLB) .....	46
2.2.7	Testes da reatividade do peptídeo sintético VLB-Ph.....	46
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
3.1	Resultados da seleção com a biblioteca Ph.D.-C7C <sup>TM</sup> .....	47
3.1.1	Purificação das IgGs positivas e negativas dos soros de equídeos.....	47
3.1.2	Titulação dos fagos .....	48
3.1.3	Extração do DNA dos fagos selecionados .....	49
3.1.4	Reação de Sequenciamento .....	49
3.1.5	Tradução e análise das sequências .....	49
3.1.6	Resultados da seleção dos fagos nos imunoenaios com IgGs purificadas.....	52
3.1.7	Resultados das análises de reatividade dos clones com as amostras dos soros de equídeos naturalmente infectados e não infectados com VAIE .....	58
3.1.8	Resultados das análises por bioinformática .....	62
3.1.9	Síntese do peptídeo sintético contendo epítomos miméticos do vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE).....	63
3.1.10	Resultados da reatividade do peptídeo sintético VAIE-E12 no ELISA com as amostras de soros (animais naturalmente infectados).....	63
3.2	Resultados da seleção com a biblioteca Ph.D.-12 <sup>TM</sup> .....	64
3.2.1	Purificação das IgGs positivas e negativas do pool dos soros positivos e negativos VLB .....	64
3.2.2	Titulação dos fagos.....	65
3.2.3	Extração do DNA dos fagos selecionados .....	65
3.2.4	Reação de Sequenciamento .....	66
3.2.5	Tradução e análise das sequências .....	66
3.2.6	Resultados da seleção inicial dos fagos nos imunoenaios com IgGs purificadas.....	70
3.2.7	Resultados das análises da reatividade dos fagos com as amostras dos soros de bovinos naturalmente infectados e não infectados com VLB.....	74
3.2.8	Resultados das análises por bioinformática .....	75
3.2.9	Síntese do peptídeo sintético contendo epítomos miméticos do vírus da Leucose Bovina (VLB) .....	79
3.2.10	Resultados da reatividade do peptídeo sintético VLB-Ph no ELISA com as amostras de soros (animais naturalmente infectados).....	80
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Título obtido (ufc/ $\mu$ L) no processo de seleção dos fagos da biblioteca Ph.D.-C7C <sup>TM</sup> ligantes às IgGs provenientes do pool de soros positivos para AIE .....	<b>48</b>
<b>Tabela 2</b>	Frequência das sequências válidas geradas pelo programa DNA2PRO após o sequenciamento dos clones selecionados da biblioteca Ph.D.C7C <sup>TM</sup> .....	<b>50</b>
<b>Tabela 3</b>	Frequência dos aminoácidos selecionados gerada pelo programa AAFREQ, para a biblioteca Ph.D.- C7C <sup>TM</sup> .....	<b>51</b>
<b>Tabela 4</b>	Similaridade da sequência protéica do peptídeo selecionado (E12) com proteínas anotadas no banco de dados do GeneBank pelo Blast, e os números de acesso.....	<b>62</b>
<b>Tabela 5</b>	Ponto de máxima similaridade (ATSH) entre E12 e proteína env (gp45) do VAIE (AAK21113.1) .....	<b>62</b>
<b>Tabela 6</b>	Título obtido (ufc/ $\mu$ L) no processo de seleção dos fagos da biblioteca Ph.D.-12 <sup>TM</sup> ligantes às IgGs totais provenientes do pool de soros positivos para VLB .	<b>65</b>
<b>Tabela 7</b>	Frequência das sequências válidas geradas pelo programa DNA2PRO após o sequenciamento dos clones obtidos na seleção com a biblioteca Ph.D.-12 <sup>TM</sup> ....	<b>67</b>
<b>Tabela 8</b>	Frequência dos aminoácidos selecionados gerada pelo programa AAFREQ, para a biblioteca Ph.D.12 <sup>TM</sup> .....	<b>68</b>
<b>Tabela 9</b>	Similaridade das sequências protéicas dos peptídeos selecionados com proteínas anotadas no banco de dados do GeneBank pelo Blast, e os números de acesso.....	<b>77</b>
<b>Tabela 10</b>	Pontos de máxima similaridade entre os peptídeos selecionados e as proteína gag (ACR15157.1) e env (ACR15160.1) do VLB.....	<b>78</b>
<b>Tabela 11</b>	Índices de antigenicidade preditas para os peptídeos selecionados (PROTEAN 4.0) .....	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema representativo do processo de Biopanning .....	<b>19</b>
<b>Figura 2</b>	Fago filamentosos .....	<b>20</b>
<b>Figura 3</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (16%) das amostras de IgGs totais positivas e negativas purificadas e do pool de soros de equídeos positivos e negativos para Anemia Infecciosa Equina .....	<b>48</b>
<b>Figura 4</b>	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.....	<b>49</b>
<b>Figura 5</b>	Alinhamento dos peptídeos selecionados a partir da biblioteca Ph.D.- C7C <sup>TM</sup> gerado pelo programa Clustal W 18.1 .....	<b>52</b>
<b>Figura 6</b>	Phage ELISA: reatividade dos clones de fagos com IgG proveniente do pool de soros positivos para AIE .....	<b>53</b>
<b>Figura 7</b>	Teste da reatividade da rgp90 com as imunoglobulinas purificadas do pool de soros positivos e negativos para AIE.....	<b>53</b>
<b>Figura 8</b>	ELISA Competição A: fagos ( $1 \times 10^{11}$ ) em solução com rgp90 (em variadas concentrações) competindo para ligação à IgG purificada positiva .....	<b>54</b>
<b>Figura 9</b>	ELISA Competição B: fagos em variadas concentrações ( $1 \times 10^{12}$ , $1 \times 10^{11}$ , $1 \times 10^{10}$ e $1 \times 10^9$ ) e rgp90 adsorvida, competindo para ligação com IgG positiva .....	<b>55</b>
<b>Figura 10</b>	Ensaio de WB: reatividade da proteína pIII dos clones de fagos selecionados com as IgGs positivas.....	<b>56</b>
<b>Figura 11</b>	Western blot competição: fagos imobilizados competindo com a rgp90 em solução, para ligação às IgGs positivas AIE.....	<b>57</b>
<b>Figura 12</b>	Reatividade dos fagos selecionados com IgGs AIE positivas e negativas .....	<b>57</b>
<b>Figura 13</b>	Dot Blot competição: fagos adsorvidos competindo com rgp90 (80 $\mu$ g) em solução, para ligação às IgGs positivas AIE.....	<b>58</b>



<b>Figura 14</b>	Dot Blot competição: fagos adsorvidos competindo com rgp90 (120µg) em solução, para ligação às IgGs positivas AIE .....	<b>58</b>
<b>Figura 15</b>	Reatividade dos fagos com trinta amostras de soros positivos e trinta soros negativos para AIE (valores médios das leituras DO).....	<b>59</b>
<b>Figura 16</b>	Ensaio de Dot Blot para avaliação da reatividade dos fagos com dez amostras dos soros positivos para AIE, e com dez soros negativos para AIE ....	<b>60</b>
<b>Figura 17</b>	ELISA competição C: competição entre fago E12 (em solução) e rgp90 (adsorvida) para ligação aos anticorpos presentes nas amostras dos soros positivos AIE .....	<b>60</b>
<b>Figura 18</b>	Dot Blot competição: fago E12 adsorvido em membranas competindo com a rgp90 em solução, para reação com soros positivos AIE .....	<b>61</b>
<b>Figura 19</b>	Ensaio de Western Blot para teste da reatividade do fago E12, fago selvagem e rgp90 com amostra de soro positivo para AIE.....	<b>62</b>
<b>Figura 20</b>	Análise da reatividade de trinta soros positivos e trinta soros negativos para AIE com o peptídeo sintético VAIE-E12 no ELISA (teste-t: $p < 0,0001$ ) (Prisma 5.0, GraphPad) .....	<b>63</b>
<b>Figura 21</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (16%) das amostras de IgGs totais positivas e negativas purificadas e do pool de soros de bovinos positivos e negativos para Leucose Enzoótica Bovina.....	<b>64</b>
<b>Figura 22</b>	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.....	<b>65</b>
<b>Figura 23</b>	Alinhamento dos peptídeos selecionados a partir da biblioteca Ph.D.-12 <sup>TM</sup> gerado pelo programa Clustal W 18.1 .....	<b>69</b>
<b>Figura 24</b>	Phage ELISA- Índice de reatividade dos fagos VLB com as IgGs positivas e negativas.....	<b>70</b>
<b>Figura 25</b>	Reatividade dos fagos com IgGs purificadas positivas para LEB em Western Blot.....	<b>71</b>
<b>Figura 26</b>	Teste da reatividade dos fagos com IgGs positivas e negativas em Dot Blot.....	<b>72</b>
<b>Figura 27</b>	Ensaio Dot Blot competição.....	<b>72</b>
<b>Figura 28</b>	Fagos selecionados no ELISA a partir da análise de reatividade com vinte amostras dos soros de bovinos positivos e vinte soros negativos para LEB.....	<b>73</b>
<b>Figura 29</b>	Teste da reatividade dos fagos selecionados com as amostras dos soros de bovinos positivos e negativos para LEB em Dot Blot.....	<b>74</b>
<b>Figura 30</b>	Ensaio de Western Blot para teste da reatividade dos fagos com soros de campo positivo e negativo para LEB .....	<b>75</b>
<b>Figura 31</b>	Ensaio de Dot Blot competição: amostras dos soros positivos VLB em solução com gp51 .....	<b>75</b>
<b>Figura 32</b>	Alinhamentos das sequências peptídicas selecionadas nos imunoenaios obtidos no programa Clustal W 18.1 .....	<b>76</b>
<b>Figura 33</b>	Análise da reatividade de trinta soros positivos e trinta soros negativos para LEB com o peptídeo VLB-Ph no ELISA (Prisma 5.0).....	<b>80</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AIE	Anemia Infecciosa Equina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BSA	albumina sérica bovina
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
°C	Graus Celsius
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	densidade ótica
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoadsorção ligado à Enzima)
ER2738	linhagem de <i>Escherichia coli</i>
FLK	Fetal lamb kidney
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDGA	Imunodifusão em Gel de Ágar
IE	Índice ELISA
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil $\alpha$ -D-tiogalactosise
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LEB	Leucose Enzoótica Bovina
mL	Mililitros
mRNA	RNA mensageiro
M13	Bacteriófago filamentosos
NBT	nitroblue tetrazolium
nm	Nanômetro
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Solução tampão Salina-Fosfato de sódio
PBST	Solução tampão Salina-Fosfato de sódio com Tween 20
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PEG	Polietileno glycol
Ph.D.-C7C <sup>TM</sup>	Biblioteca com peptídeos randômicos e conformacionais de sete aminoácidos
Ph.D.-12 <sup>TM</sup>	Biblioteca com peptídeos randômicos e lineares de doze aminoácidos
pH	Potencial Hidrogeniônico
pIII	Proteína III do capsídio de bacteriófagos filamentosos
rgp90	proteína gp90 recombinante
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
ssDNA	DNA fita simples
TBS	Solução trifosfato de sódio
TBST	Solução trifosfato de sódio com Tween 20
ufc	unidades formadoras de colônias

UV	Ultravioleta
VAIE	Vírus da Anemia Infecciosa Equina
VLB	Vírus da Leucose Bovina
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- $\alpha$ -D-galactosideo
Xg	Força g
WB	Western Blot
$\mu$ g	Microgramas

## LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

<b>A</b>	<b>Alanina</b>
<b>C</b>	<b>Cisteína</b>
<b>D</b>	<b>Ácido aspártico</b>
<b>E</b>	<b>Ácido glutâmico</b>
<b>F</b>	<b>Fenilalanina</b>
<b>G</b>	<b>Glicina</b>
<b>H</b>	<b>Histidina</b>
<b>I</b>	<b>Isoleucina</b>
<b>K</b>	<b>Lisina</b>
<b>L</b>	<b>Leucina</b>
<b>M</b>	<b>Metionina</b>
<b>N</b>	<b>Asparagina</b>
<b>P</b>	<b>Prolina</b>
<b>Q</b>	<b>Glutamina</b>
<b>R</b>	<b>Arginina</b>
<b>S</b>	<b>Serina</b>
<b>T</b>	<b>Treonina</b>
<b>V</b>	<b>Valina</b>
<b>W</b>	<b>Triptofano</b>
<b>Y</b>	<b>Tirosina</b>

## RESUMO

Peptídeos apresentados em fagos foram selecionados através da tecnologia *phage display* e de imunoenaios, para a descoberta de miméticos antigênicos de epítomos imunodominantes das proteínas do vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE) e do vírus da Leucose Enzoótica Bovina (VLB). O uso dos miméticos antigênicos pode gerar melhorias na sensibilidade e especificidade do diagnóstico sorológico para Anemia Infecciosa Equina (AIE) e Leucose Enzoótica Bovina (LEB), contribuindo diretamente para medidas de controle das doenças. As seleções permitiram a escolha de clones apresentando sequências peptídicas com potencial para aplicações no diagnóstico. A sequência apresentada pelo fago E12 apresenta potencial para uso como antígeno em ensaios de diagnóstico para AIE, e outras nove sequências foram selecionadas para uso como antígenos em ensaios de diagnóstico para LEB. Os peptídeos sintéticos produzidos a partir das sequências selecionadas podem ser considerados candidatos potenciais para uso como antígenos em testes sorológicos para diagnóstico da AIE e da LEB.

Palavras-chave: diagnóstico; antígenos; AIE; LEB; *phage display*

## ABSTRACT

Peptides displayed on phages were selected using *phage display* technology and immunoassays, for discovering antigenic mimetics of corresponding natural epitopes on immunogenic proteins of Equine Infectious Anemia virus and Bovine Leukemia virus. The use of antigenic mimetics can improve the sensitivity and specificity of serological diagnosis for Equine Infectious Anemia (EIA) and Enzootic Bovine Leukosis (EBL), contributing directly to measures of diseases control. The selections allowed the choice of clones showing peptides sequences with potential applications in diagnosis. The sequence displayed by phage E12 has potential for use as antigen in diagnostic tests for EIA, and other nine sequences were selected for use as antigens in tests for EBL. Synthetic peptides produced from selected sequences can be considered potential candidates for use as antigens in serological tests for diagnosis of EIA and EBL.

Key-words: diagnosis; antigens; EIA; EBL; *phage display*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1- Anemia Infecçiosa Equina

O vírus da Anemia Infecçiosa Equina (VAIE) é integrante da família *Retroviridae*, e dentre as características compartilhadas entre os membros dessa família, apresenta os genes estruturais-funcionais *gag*, *pol*, *env* que expressam proteínas imunodominantes durante as infecções, induz infecção persistente que pode gerar o aparecimento de sinais clínicos, sendo os hospedeiros infectados considerados fontes de infecção.

A Anemia Infecçiosa Equina (AIE) é uma enfermidade causada pelo VAIE que acomete somente animais da família *Equidae*. A doença é mais prevalente em áreas geográficas de clima quente e úmido, com distribuição cosmopolita (Issel e Coggins, 1979).

O VAIE pertence ao gênero *Lentivirus*, e como todos os membros deste gênero, apresenta alta capacidade de mutação que gera o surgimento de variantes virais distintas (Montelaro et al., 1984; Leroux et al., 2001; Howe et al., 2002), e as células da linhagem monócito/macrófago são os alvos primários para replicação “*in vivo*” durante as fases clínica e subclínica da infecção (Oaks et al., 1998).

Os equídeos contaminados são a principal fonte de infecção para os animais susceptíveis (Issel e Foil, 1984), e os principais mecanismos de transmissão do VAIE são através de vetores tabanídeos durante o repasto sanguíneo, fômites contaminados durante procedimentos de manejo nas propriedades, através da placenta em éguas com viremia que infectam o feto durante o nascimento, sendo também apontada a importância do sêmen de garanhões infectados em fases virêmicas da doença (Hawkins et al., 1976; Williams et al., 1981; Issel et al., 1988; Issel et al., 1990).

Na infecção de equídeos pelo VAIE ocorre uma fase inicial aguda com episódios febris associados à viremia, que é seguida por ciclos recorrentes da doença e finalmente um período assintomático prolongado (Montelaro et al. 1993; Cook et al., 1996). A fase crônica da AIE é caracterizada por ciclos recorrentes de viremia associados aos sinais clínicos que incluem febre, anorexia, edema, leucopenia, anemia, trombocitopenia, hemorragias, diarreia, glomerulonefrite e letargia. Alguns animais podem morrer durante as fases aguda ou crônica da doença. Se o animal sobrevive, os episódios febris progressivamente diminuem em frequência e intensidade em torno de um ano. Após esse período o animal evolui para o estágio de portador inaparente ou assintomático. Os animais nesta fase constituem as principais fontes de infecção para indivíduos sadios, refletindo a importância dos diagnósticos de triagem para evitar a disseminação da enfermidade entre os equídeos (Sellon et al., 1994; Cook et al., 1996).

Vários estudos relatam que os ciclos recorrentes da doença, durante os picos de viremia, estão associados ao surgimento de variantes virais que escapam dos anticorpos neutralizantes no controle imunológico do hospedeiro (Montelaro et al., 1984; Leroux et al., 1997; Leroux et al., 2001; Sponseller et al., 2007). Frequentes variações genômicas estão localizadas na sequência *env* que codifica as glicoproteínas gp90 (superfície) e gp45 (transmembrana) (Montelaro et al., 1984; Sallinovich et al., 1986; Payne et al., 1987), o mesmo tem sido demonstrado para Maedi-Visna vírus e para o HIV (Clements et al., 1982; Wong-Staal et al., 1985). A gp90 apresenta os principais epítomos alvos do sistema imune, e as mutações ocorridas comprometem a eliminação dos estratos circulantes que surgem a cada episódio de viremia, sendo os anticorpos produzidos ao final de cada ciclo incapazes de neutralizar estratos virais que surgem em episódios subsequentes, contribuindo para a persistência da infecção viral (Montelaro et al., 1984; Salinovich et al., 1986; Sellon et al., 1994).

O gene *pol* do VAIE codifica as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase, e o gene *gag* codifica a proteína p26, que é considerada a principal e mais abundante proteína do core viral. Animais infectados pelo VAIE desenvolvem forte resposta imune contra as glicoproteínas gp90, gp45 e contra a proteína p26 (Leroux et al., 2004), sendo estas frequentemente utilizadas como antígenos nos testes de diagnóstico sorológicos para detecção da AIE.

A AIE não tem tratamento nem vacina eficaz, portanto o seu controle é feito através do diagnóstico laboratorial com a identificação, isolamento ou eutanásia dos animais soropositivos (Issel e Coggins, 1979), e de acordo com as normas para prevenção e o controle da AIE da Instrução Normativa de 2004, a doença pode ser considerada um dos grandes obstáculos para o desenvolvimento da equideocultura brasileira devido à inviabilização do trânsito e comércio nacional e internacional dos animais.

## 1.2- Leucose Enzoótica Bovina

O vírus da Leucose Bovina (VLB) é membro do gênero *Deltaretrovirus* e o agente etiológico da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) que é uma doença linfoproliferativa neoplásica crônica. A LEB apresenta distribuição mundial com maior frequência em rebanhos leiteiros (Modena et al., 1984; Castro et al., 1992; Camargos et al., 2002a).

O VLB é um retrovírus exógeno (Miller et al., 1969) que tem como células alvo primárias a linhagem de linfócitos B, estabelecendo infecção persistente por integração do DNA proviral na célula hospedeira (Kettmann et al., 1979). O sangue é a principal via de transmissão, mas outras secreções como saliva, secreção nasal e uterina podem conter o vírus (Johnson e Kaneene, 1991). O VLB é disseminado entre os animais de forma horizontal devido às práticas de manejo que envolvem instrumentos contaminados (Johnson e Kaneene, 1991; Choi et al., 2002). A transmissão transplacentária e através do leite durante amamentação, também são apontadas

como importantes na epidemiologia do VLB (DiGiacomo, 1992; Choi et al., 2002), e o contato entre os animais permite a transmissão do vírus por insetos tabanídeos em regiões tropicais (Hopkins e DiGiacomo, 1997).

Os bovinos infectados podem permanecer clinicamente assintomáticos durante a vida, alguns evoluem para o quadro de linfocitose persistente mas menos de 10% dos animais desenvolvem linfossarcoma (Ferrer, 1979; Burny et al., 1980; Schwartz e Levy, 1994). As manifestações clínicas caracterizam-se pela formação de tumores com origem linfóide, apresentando linfossarcomas ou linfomas malignos em diversos órgãos. Os indivíduos assintomáticos são a principal fonte de infecção para os animais sadios na natureza, sendo identificados através de exames laboratoriais (Ferrer, 1979).

O impacto econômico da infecção pelo VLB está associado às restrições na comercialização de animais e produtos, como sêmen e embriões, entre países (Burny et al., 1980; Gutiérrez et al., 2009), como também a morte de bovinos devido ao surgimento de linfossarcomas, rejeições de carcaça ao abate e queda no desempenho produtivo e reprodutivo dos animais infectados (Camargos, 2005). Infecções pelo VLB foram associadas à diminuição na produção de leite e outras perdas para os produtores (Da et al., 1993).

A sequência completa de nucleotídeos do VLB foi descrita por alguns autores (Sagata et al., 1985; Coulston et al., 1990; Dube et al., 2000), e apontado o gene *env* como responsável por codificar uma proteína precursora que é clivada em duas subunidades glicoproteicas: gp51 (externa) e gp30 (transmembrana) que são essenciais para infectividade viral (Willems et al., 1995; Reichert et al., 2001). Similar aos outros retrovírus, o VLB possui a glicoproteína do envelope (*env*) como proteína imunodominante “*in vivo*”. A gp51 é importante na estimulação de anticorpos neutralizantes, desempenha função no ciclo de replicação viral e tropismo celular (Portetelle et al., 1989; Callebaut et al., 1993;

Gatei et al., 1993; Willems et al., 1995; Doménech et al., 1997).

A proteína p24 do VLB é codificada pelo gene *gag* e é considerada a principal proteína do core viral (Miller et al., 1981), apresentando importância na estimulação da produção de anticorpos durante a infecção viral no hospedeiro. Vários estudos têm demonstrado que os bovinos infectados com VLB desenvolvem primeiramente resposta de anticorpos específicos voltados contra a glicoproteína de envelope gp51 e contra a proteína do core viral p24 (Devare e Stephenson, 1977; Deshayes et al., 1980; Portetelle et al., 1980; Walker et al., 1987).

Como não existem vacinas eficientes, o controle e a erradicação da Leucose Enzoótica Bovina são baseados no diagnóstico e segregação ou eutanásia dos bovinos portadores. Por isso, a sensibilidade da técnica de diagnóstico utilizada é considerada um fator crítico para evitar a disseminação da doença nos rebanhos (Trono et al., 2001).

### **1.3- Diagnóstico Laboratorial da AIE e da LEB**

Na maioria dos testes de diagnóstico desenvolvidos para detecção de anticorpos específicos para os vírus VAIE e VLB, as glicoproteínas do envelope viral e as principais proteínas do core viral são utilizadas como antígenos. Para diagnóstico da AIE são comumente utilizados os antígenos gp90, gp45 e a p26 (Leroux et al., 2004; Bailat et al., 2008), e para LEB são geralmente utilizados gp51 e a p24 (Miller et al., 1981; Kittelberger et al., 1999).

Embora a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) seja ainda estabelecida pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como teste oficial para o diagnóstico da AIE e LEB, atualmente existem várias metodologias para o diagnóstico das duas enfermidades. Apesar de ser usada em larga escala, a IDGA apresenta algumas limitações, dentre elas a incapacidade de detectar anticorpos específicos nos estágios iniciais da infecção, a interpretação dos

resultados muitas vezes é subjetiva e dependente da experiência técnica do laboratorista, gera resultados não quantitativos e não permite a automatização do teste. Além destes fatores, os resultados são demorados e não existe padronização entre os diferentes kits de IDGA utilizados, comprometendo as medidas de controle e erradicação das doenças (Monke et al., 1992; Nguyen e Maes, 1993; Reis et al., 1994; Reis, 1997; Reichel et al., 1998; Simard et al., 2000a; Simard et al., 2000b; Trono et al., 2001, Leroux et al., 2004).

Os testes mais utilizados para o diagnóstico da AIE e da LEB são a IDGA e o ELISA em vários formatos, e embora sejam considerados boas ferramentas, vários fatores podem contribuir para resultados conflitantes que necessitam serem confirmados utilizando outras técnicas mais sensíveis e específicas (Miller e Van Der Maaten, 1977; Portetelle et al., 1989; Reichel et al., 1998; Soutullo et al., 2001; Trono et al., 2001; De Giuseppe et al., 2004; Leroux et al., 2004; Paré e Simard, 2004; Alvarez et al., 2007a; Lim et al., 2009). Técnicas como o Western blot e a reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction- PCR) tem sido desenvolvidas, avaliadas e utilizadas como diagnóstico complementar ou confirmatório para AIE e LEB, assim como para outras retrovíroses (Payne et al., 1989; Kim e Casey, 1992; Langemeier et al., 1996; Johnson et al., 1998; Reichel et al., 1998; Kittelberger et al., 1999; Llames et al., 2000; Trono et al., 2001; Choi et al., 2002; Alvarez et al., 2007a; More et al., 2008).

Um teste de diagnóstico com baixa sensibilidade e ou especificidade pode gerar falsos resultados, prolongando os esforços para controle e erradicação das doenças (Trono et al., 2001). E as metodologias desenvolvidas para produção de antígenos podem gerar melhorias na sensibilidade das técnicas e conseqüente aprimoramento e eficácia dos programas de controle e erradicação para as enfermidades.

Várias metodologias para produção de antígenos, que podem ser utilizados como reagentes nas técnicas de diagnóstico



sorológicos tem sido descritas. De acordo com as recomendações da OIE, o antígeno utilizado na IDGA para diagnóstico da AIE pode ser preparado a partir de cultura de células do baço provenientes de equinos infectados com VAIE em fase aguda da doença, ou pode ser obtido de culturas de células persistentemente infectadas, e a partir de um sistema de expressão recombinante (Nakajima e Ushimi, 1971; Coggins et al., 1972; Alvarez et al., 2007a). Mas a clássica preparação de antígenos do VAIE derivados do baço ou da cultura de células de derme equina apresenta uma grande desvantagem, pois pode ser contaminada com proteínas derivadas da cultura de células ou do próprio hospedeiro, podendo gerar resultados inespecíficos com anticorpos direcionados contra antígenos não relacionados ao VAIE. Além disso, o cultivo do VAIE requer muito tempo e altos custos para a produção de antígenos em larga escala (Alvarez et al., 2007a).

Embora muitos ensaios tenham sido feitos para melhorar a produção de antígenos em linhagens celulares expressando o VLB, ou para gerar novas linhagens celulares correspondentes, a tradicional produção em células da linhagem FLK/VLB (células do rim fetal de ovelhas persistentemente infectadas com VLB) é ainda a mais utilizada na produção de antígenos para os kits de diagnóstico comerciais (Van der Maaten et al., 1974; Beier et al., 2004; Lim et al., 2009). As linhagens de células FLK/VLB utilizadas para produção de antígeno VLB são conhecidas por serem também infectadas com o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) (Bolin et al., 1994; Dees et al., 1994; Beier et al., 2004; Lim et al., 2009) e esta contaminação pode resultar em problemas adicionais no diagnóstico relativos à especificidade das reações (Beier et al., 2004). Outro problema observado nas técnicas de produção de antígenos utilizando culturas celulares é que geralmente os protocolos para crescimento celular incluem adição de soro fetal bovino para promover crescimento. Este soro contribui para adição de componentes que podem ser fontes de reações inespecíficas. Além desses fatores, a presença de proteínas celulares que não são eliminadas

ou co-purificadas durante a obtenção das proteínas do VLB, podem interferir com as proteínas virais (Llames et al., 2000) gerando resultados errôneos no diagnóstico da LEB.

Vários fatores devem ser considerados na seleção das preparações antigênicas, incluindo o tempo gasto, a quantidade de materiais envolvidos na preparação, a complexidade e a pureza das proteínas virais, os equipamentos disponíveis e os custos para a obtenção do produto antigênico final (Llames et al., 2000).

Recentemente, as técnicas de DNA recombinante têm possibilitado a produção de antígenos com alta especificidade e baixa reatividade cruzada, de forma rápida e simples apresentando alto rendimento. Os antígenos recombinantes são atualmente potenciais para utilização em técnicas de diagnóstico com amostras de campo (Montelaro et al., 1993; Sentsui et al., 2001; Alvarez et al., 2007a; Alvarez et al., 2007a; Lim et al., 2009).

Avanços no desenvolvimento de vacinas e nos testes de diagnóstico requerem melhor compreensão sobre a estrutura antigênica das proteínas imunogênicas dos patógenos. E os peptídeos sintéticos tem sido utilizados para mapear locais antigênicos em vários sistemas virais (Neurath et al., 1990; Callebaut et al., 1991; Ball et al., 1992), apresentando também grande potencial para utilização como antígenos em técnicas de diagnóstico, e como componentes de vacinas eficientes para induzir memória imunológica (Ball et al., 1992; Kabeya et al., 1996; Soutullo et al., 2001; Soutullo et al., 2005).

#### **1.4- Phage Display**

Em 1985, Smith, Scott e colaboradores estabeleceram um método para exibir polipeptídeos na superfície do bacteriófago filamentoso M13 (Smith, 1985). Esta metodologia, denominada *phage display*, foi originalmente desenvolvida para mapear locais de ligação dos anticorpos aos antígenos por seleção de peptídeos a partir

de bibliotecas randômicas, expressos em bacteriófagos, utilizando imunoglobulinas imobilizadas. Desde então, o *phage display* tem sido usado como poderoso método para demonstrar a ligação de polipeptídeos, com diversas bases biológicas, em aplicações técnicas e médicas (Scott e Smith, 1990; Barbas et al., 2001).

O *phage display* consiste em um conjunto de técnicas que utilizam um vetor de expressão onde um DNA externo ou recombinante é expresso como uma proteína. O fago programa a maquinaria da célula hospedeira, geralmente *Escherichia coli*, para sintetizar o peptídeo recombinante cuja sequência de aminoácidos é determinada pela sequência de nucleotídeos do inserto. A sequência do gene de interesse é unida em sobreposição ao gene que codifica uma das proteínas do capsídeo do fago, então, a sequência recombinante de aminoácidos é geneticamente fusionada aos aminoácidos endógenos das proteínas do capsídeo formando uma proteína de fusão híbrida. A proteína do capsídeo híbrida é incorporada nas partículas do fago assim que eles são liberados da célula, então o peptídeo ou a proteína recombinante são apresentados na superfície externa (Smith e Petrenko, 1997).

As bibliotecas do *phage display* são uma mistura heterogênea de clones de fagos cada um carreando um diferente inserto de DNA recombinante, e exibindo um peptídeo diferente na sua superfície. Cada peptídeo na biblioteca pode ser replicado desde que o fago no qual ele está acoplado infecte uma célula bacteriana hospedeira, onde o fago se multiplica, produzindo um amplo grupo de uma progênie idêntica de fagos exibindo o mesmo peptídeo (Smith e Petrenko, 1997).

O material genético codificante para cada peptídeo está localizado no genoma viral do fago filamentosos (Azzazy e Highsmith, 2002), sendo possível correlacionar cada sequência de aminoácidos do peptídeo ou proteína variante e a sua respectiva sequência do DNA (Smith e Petrenko, 1997; Adda et al., 2002).

O biopanning ou seleção biológica, com bibliotecas de *phage display* é uma metodologia que permite selecionar peptídeos ou outras biomoléculas com diversas finalidades. A técnica consiste em sucessivos ciclos de seleção, lavagem, eluição e amplificação de fagos filamentosos, que expressam sequências randômicas de peptídeos ligantes específicos a uma molécula alvo (anticorpos monoclonais ou policlonais, enzimas, receptores de superfície celular e outras biomoléculas) (Smith, 1985; Parmley e Smith, 1988). A seleção é realizada por incubação da biblioteca de peptídeos apresentados em fagos com o alvo imobilizado em uma placa de microtitulação (podem ser utilizados “beads”, resinas ou membranas).

Os fagos contendo peptídeos com afinidade pelo alvo são capturados e permanecem ligados, e os fagos não ligados são eliminados por sucessivas lavagens. Os ligantes ao alvo são eluídos e amplificados em *Escherichia coli*. Os fagos resultantes deste processo são titulados e submetidos a um novo ciclo (ligação ao alvo, eluição e amplificação) para selecionar mais sequências específicas (Fig.1). Após três ou quatro ciclos, os clones individuais são sequenciados e as sequências de aminoácidos traduzidas. Posteriormente, são realizados testes imunológicos para demonstrar a reatividade dos clones selecionados contra o alvo de interesse (Barbas et al., 2001).

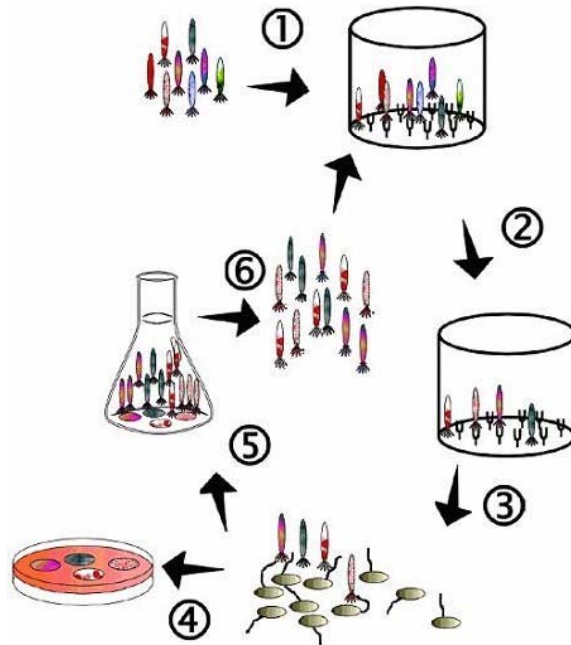


Figura 1- Esquema representativo do processo de Biopanning. 1) Incubação da biblioteca de fagos com o alvo immobilizado; 2) Retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas; 3) Eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli*; 4) Titulação dos fagos eluídos; 5) Amplificação dos fagos eluídos; 6) População de fagos com maior afinidade pelo alvo (adaptado de Smothers et al., 2002).

### 1.5- Vetores

Os fagos filamentosos M13, f1, fd e outros, geralmente utilizados como vetores, pertencem à família *Inoviridae* e possuem como material genético um DNA fita simples (ssDNA) (Marvin, et al., 1994; Brigido e Maranhão, 2002).

As partículas dos fagos filamentosos são apresentadas como bastões flexíveis com aproximadamente 1 $\mu$ m de comprimento e 6nm de diâmetro, compostos principalmente

por moléculas da principal proteína do capsídeo pVIII arranjadas em forma de hélice (Marvin, et al., 1994). Existem aproximadamente 2700 cópias da pVIII nos vírions selvagens codificadas pelo gene VIII, e dentro desta estrutura está uma fita simples do DNA viral (ssDNA). Em uma extremidade da partícula existem cinco cópias de cada das proteínas pIII e pVI (codificadas pelos genes III e VI), e as proteínas pVII e pIX na outra extremidade do capsídeo (genes VII e IX). Os peptídeos recombinantes podem ser fusionados à pIII, pVIII e pVI (Smith e Petrenko, 1997) (Fig. 2).

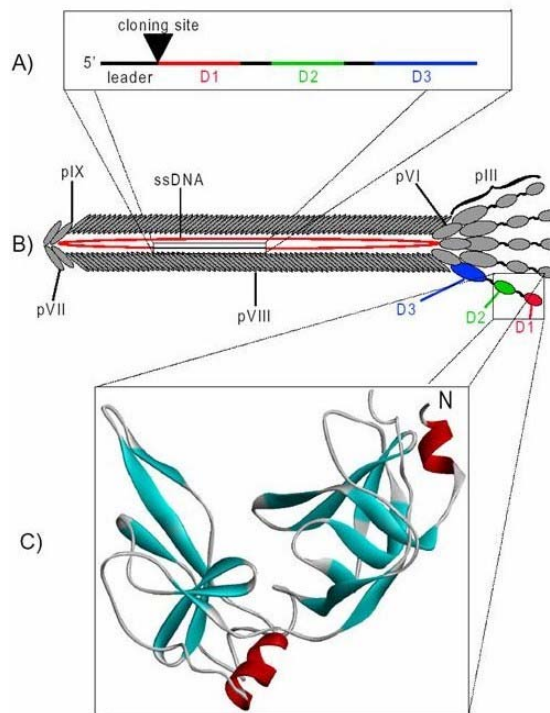


Figura 2- Fago filamentoso. A) Composição do gene III, mostrando o sítio de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e PIX; C) Cristalografia dos domínio D1 e D2 da proteína III (97), as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas  $\beta$  em ciano (Holliger e Williams, 1999).

Os fagos infectam estratos de *E. coli* que exibem um apêndice filiforme denominados pilus F. A infecção é iniciada pela ligação do domínio N-terminal da pIII à extremidade do pilus F, sendo esta a parte do fago que entra primeiramente na célula bacteriana. Enquanto o processo continua, as proteínas do capsídeo se dissolvem na superfície do envelope da célula. O ssDNA descoberto chega ao citoplasma onde uma fita de DNA complementar é sintetizada pela maquinaria da célula hospedeira, resultando em uma forma replicativa do DNA de fita dupla (RF). O DNA fita dupla replica para gerar uma progênie de DNA fita dupla que serve de molde para transcrição dos genes do fago e síntese da progênie de ssDNA. Esta progênie de ssDNA é expelida através do envelope da célula adquirindo as proteínas do capsídeo, oriundas da membrana, e emergindo como vírions completos. A progênie de vírions é secretada continuamente sem lisar a célula hospedeira,

e as células infectadas continuam a se dividir embora em taxas inferiores quando comparadas às células não infectadas (Smith e Petrenko, 1997).

O fago M13KE, derivado do vetor m13mp19 possui uma rápida propagação e não necessita de seleção por antibiótico ou superinfecção por fago auxiliar (*helper*). Além disto, o gene *lacZ*, presente neste vetor, facilita a seleção entre colônias bacterianas infectadas com fagos de bibliotecas (colônias azuis) e colônias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (colônias brancas) (Messing *et al.*, 1977; Messing, 1983).

Geralmente, o peptídeo é expresso na extremidade N-terminal da pIII ou da pVIII. Em sistemas nos quais as proteínas pIII ou pVIII são utilizadas, o tamanho do peptídeo inserido no vetor é limitado, pois peptídeos grandes interferem nas funções das

proteínas do capsídeo, tornando o fago pouco infectivo. Este sistema foi criado para a exposição de bibliotecas de pequenos peptídeos, ou seja, no máximo 30 aminoácidos (Phizicky e Fields, 1995).

A pIII apresenta três domínios (D1, D2 e D3) separados por resíduos de glicina, e massa molecular aproximada de 42 KDa. Esta proteína é sintetizada sob a forma de um precursor contendo peptídeo sinal que é clivado durante a passagem através da membrana. Sua porção N-terminal é requerida para a infectividade viral e sua porção C-terminal desempenha papel na morfogênese das partículas (Crissman e Smith, 1984). Devido a baixa representatividade da pIII (bibliotecas monovalentes) em relação a pVIII (bibliotecas multi ou polivalentes), as bibliotecas de peptídeos recombinantes fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas com as bibliotecas de peptídeos recombinantes fusionados na pVIII (Brígido e Maranhão, 2002).

Tem sido mais frequente a utilização do fago M13 para a infecção de *E. coli* (Sidhu, 2000), embora existam vetores virais como o fago lambda (Sternberg e Hoess, 1995), bacteriófagos T4 e P4 (Lindqvist e Naderi, 1995), além dos vírus de eucariotos, tais como baculovírus, que também podem ser utilizados neste processo (Boublik *et al.*, 1995).

Sistemas de expressão “*in vitro*” com o uso de ribossomo display e mRNA display tem sido também explorados com algumas vantagens (Sergeeva *et al.*, 2006). Sistemas alternativos de expressão de polipeptídeos na superfície de bactérias e fungos tem mostrado vantagens em aplicações especiais, mas o *phage display* com M13 permanece atualmente como a tecnologia dominante (Sidhu, 2000).

### **1.6- Tipos de sistemas e bibliotecas *phage display***

Os sistemas *phage display* podem ser classificados de acordo com o arranjo dos

genes das proteínas do capsídeo. Por exemplo, no sistema *phage display* tipo 3 o peptídeo recombinante codificado pelo inserto é exibido pelas cinco moléculas da pIII no vírion, e no sistema *phage display* tipo 8 os peptídeos recombinantes são exibidos em cada cópia de pVIII. No sistema tipo 8+8 o genoma do fago possui dois genes 8, cada um codificando dois diferentes tipos de proteínas pVIII, uma delas exibe o peptídeo recombinantes e a outra é selvagem (Smith, 1993; McConnell *et al.*, 1994).

O sistema tipo 8+8 é caracterizado pela presença de dois genes VIII em genomas separados um deles não possui o inserto estrangeiro (fago selvagem ou helper) e o outro é o recombinante. São considerados fagos helper ou selvagens aqueles que não possuem inserto do DNA do peptídeo recombinante (Mead *et al.*, 1988).

O sucesso da seleção por *phage display* depende do tipo de alvo utilizado para seleção, do tipo de eluição realizada, do número de ciclos para seleção, e 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).

Bibliotecas de peptídeos randômicos são as mais comumente utilizadas, e são construídas pela inserção de misturas de oligonuclotídeos degenerados sintetizados quimicamente a uma cadeia nucleotídica em crescimento (Smith e Petrenko, 1997). As bibliotecas randômicas compreendem um vasto número de peptídeos de um dado tamanho. Por exemplo, na sequência degenerada NNKNNKNNKNNK, cada N é uma equação molar de A, G, C, e T; cada K é uma mistura equivalente de G e T; cada NNK é uma mistura de 32 trincas que incluem códons para todos os vinte aminoácidos naturais, e uma sequência completa de 12 bases é uma mistura equivalente a mais de milhões ( $32^4$ ) de diferentes moléculas codificando todas as 160000 ( $20^4$ ) possíveis sequências peptídicas (Smith e Petrenko, 1997).

Os peptídeos podem ser expressos em forma linear ou conformacional, e são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítomos contínuos ou descontínuos (Romanov *et al*, 2001; Azzazy e Highsmith, 2002; Dybwad *et al*, 2003).

Várias bibliotecas com diferentes complexidades podem ser adquiridas comercialmente. As bibliotecas de peptídeos comerciais de 7 e 12 aminoácidos apresentam uma complexidade de 2 bilhões de clones independentes. As bibliotecas 7-mer e C7C-mer apresentam aproximadamente  $1,28 \times 10^9$  possíveis sequências heptapeptídicas, e as bibliotecas 12-mer apresentam aproximadamente  $4,1 \times 10^{11}$  sequências (NEB, 2009).

Além das bibliotecas de peptídeos, existem atualmente vários tipos de bibliotecas utilizadas com diferentes propósitos. As bibliotecas de anticorpos tem sido utilizadas para estudos de mapeamento das respostas imunológicas, produção de anticorpos terapêuticos e outras aplicações (Groves *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2002). 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).

### 1.7- Seleção por afinidade

O objetivo do processo de seleção consiste em formar uma subpopulação 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 incubada sobre o receptor imobilizado. Os fagos que exibem peptídeos ligantes ao receptor são capturados e os fagos não ligados são eliminados nas lavagens. A adequada stringência dos tampões de lavagem durante os ciclos de seleção é necessária

para o sucesso na seleção dos clones com alta afinidade (Lunder *et al.*, 2008).

Finalmente, os fagos ligados são eluídos com uma solução que destrói ou enfraquece as ligações peptídeo-alvo, produzindo um eluato enriquecido com clones de alta afinidade pelo receptor-alvo (Smith e Petrenko, 1997).

O procedimento de eluição dos fagos ligados aos alvos imobilizados representa um ponto chave no processo de seleção, e várias metodologias tem sido avaliadas. Alterações bruscas no pH da solução de eluição no ciclo final de seleção (D'Melo *et al.*, 2001), a eluição competitiva com a molécula alvo em solução (Gaskin *et al.*, 2001), eluição com lisozima associada com baixos valores de pH (Yu *et al.*, 2004), eluição com uso de ultrassom (Lunder *et al.*, 2008), e outras estratégias, tem sido utilizadas com sucesso para a seleção de clones com alta afinidade pelo receptor-alvo.

O eluato com fagos é infectivo e são propagados por infecção de células bacterianas hospedeiras gerando um amplificado que pode ser submetido a outro ciclo para seleção por afinidade (Smith e Petrenko, 1997). Os clones de fagos do eluato após 2-3 ciclos de seleção, com aumentada afinidade para o receptor-alvo, são propagados e caracterizados individualmente. A afinidade dos fagos para o receptor-alvo pode ser avaliada quantitativamente por ELISA (Lane e Stephen, 1993). As sequências de aminoácidos dos peptídeos ligantes aos receptores-alvo são determinadas pelas sequências do DNA viral codificadoras (Smith e Petrenko, 1997).

Devido ao fato de os fagos serem clonados e caracterizados um por um, 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. Este contexto serve como base para a descoberta de epítomos que é uma estratégia para identificar peptídeos com

pontencial para diagnóstico e vacinas (Folgori et al., 1994; Sioud et al., 1996).

Um epítopo é um pequeno determinante na superfície de um ligante, com o qual o receptor faz íntimo e específico contato químico e geométrico. Se um ligante é uma proteína o epítopo pode ser contínuo, compreendendo aminoácidos adjacentes na sequência primária, ou descontínuos e conformacionais (dependentes de conformação) (Smith e Petrenko, 1997).

No *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 epítopo do ligante natural sem apresentar similaridade de sequência de aminoácidos, são conhecidos como mimetopos (Geysen et al., 1986a; 1986b). Quando o receptor usado para a seleção por afinidade é um anticorpo, os peptídeos que ele seleciona provenientes de uma biblioteca randômica de peptídeos são chamados de miméticos antigênicos do epítopo natural correspondente (Smith e Petrenko, 1997).

A maioria dos trabalhos que descrevem o uso de anticorpos com base na seleção por afinidade, tem usado anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais apresentam algumas características desejáveis que os fazem serem escolhidos usualmente em experimentos para a seleção de mimetopos ou epítopos, ao invés do uso de anticorpos policlonais. Dentre as características estão a homogeneidade que resulta na habilidade de identificar um único epítopo especificamente, e por possuírem padrão químico definido (Read et al., 2009).

A homogeneidade e a precisa especificidade dos monoclonais para seleção de peptídeos usando o *phage display* geram resultados que não são confundidos pela inclusão de peptídeos que mimetizam mais de um epítopo, e identificam precisamente peptídeos que

mimetizam epítopos conformacionais e lineares (Cwirla et al., 1990; Birkenmeier et al., 1997). Apesar dessas características, os anticorpos monoclonais apresentam várias limitações, pois são mais caros e mais trabalhosos para serem produzidos e mantidos quando comparados aos anticorpos policlonais (Toth et al., 1999), e podem apenas ser utilizados como alvo para seleção se existem evidências de que são capazes de reconhecer um epítopo (Read et al., 2009).

Outra limitação ao uso de anticorpos monoclonais é que eles representam apenas uma fração da resposta de anticorpos totais ao antígeno. Por outro lado, os anticorpos policlonais são alvos para múltiplos epítopos e contém especificidades que cobrem o alcance completo de epítopos em antígenos que são apresentados ao sistema imune, por representarem o repertório completo de anticorpos do soro, aumentando as chances de serem selecionados mimetopos úteis (Casey et al., 2009; Read et al., 2009).

Os anticorpos monoclonais não são acessíveis para todos os agentes de uma doença infecciosa, necessitando do uso dos policlonais que reagem com todos os epítopos imunodominantes associados com infecções (Casey et al., 2009). Os anticorpos policlonais possuem ainda maior avidéz para ligação ao antígeno e são mais tolerantes às variações antigênicas dos que os monoclonais (Van Regenmortel, 1998).

## 1.8- Aplicações para o *Phage Display*

Várias aplicações e pesquisas têm sido feitas com emprego das bibliotecas de *phage display*.

Muitos grupos de pesquisa têm utilizado esta técnica 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 tem 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).

Técnicas de seleção com uso do *phage display in vivo* foram utilizadas para identificação de ligantes específicos para alvos vasculares e seus padrões moleculares, capacitando a identificação de marcadores das doenças associadas. A seleção de bibliotecas de peptídeos “*in vivo*” diretamente em pacientes proporciona o desenvolvimento de drogas que tem como alvos as proteínas expressas no sistema vascular associadas com tumores humanos e outras doenças (Folkman, 2002; Narasimhan, 2002).

O *phage display* tem sido também utilizado para identificar moléculas de adesão expressas por patógenos microbianos mediadores de infecções (Mullen et al., 2006). Também pode ser usado como agente anti-bacteriano e como veículo para tratamento de doenças infecciosas, assim como para identificar motivos que facilitam o transporte através da mucosa gastrointestinal e através da derme, contribuindo para diversos tipos de terapias (Duerr et al., 2004; Chen et al., 2006).

A integração com real-time PCR facilitou a identificação de peptídeos específicos para tecidos e células, e a quantificação do número de clones da biblioteca que se ligam em células de interesse, contribuindo para o desenvolvimento da biotecnologia (Sergeeva et al., 2006).

Os resultados de vários tipos de seleções de bibliotecas indicam que os motivos peptídicos selecionados tem como alvos alguns receptores, mimetizando os ligantes biológicos para estes receptores (Giordano, et al., 2001; Kolonin et al., 2002; Smothers et al., 2002; Hartley, 2002). Esta tecnologia pode ser usada como instrumento na identificação, validação e precedência de ligantes aos alvos moleculares expressos na superfície celular, e para o desenvolvimento de drogas peptídicas direcionadas para estes alvos (Sergeeva 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 epítomos naturais podem ser utilizados para imunizar animais sadios. Alguns deles são capazes de induzir novos anticorpos que reagem cruzadamente com o epítomo natural, sendo considerados miméticos imunogênicos (Cardoso et al., 2009). A mimeticidade antigênica e imunogênica são as bases para a descoberta de epítomos 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 (Smith e Petrenko, 1997; Prudencio et al., 2010).

Diferentes tipos de bibliotecas de fagos são úteis para a investigação de interações protéicas intracelulares e podem servir como reagentes para detecção de



moléculas inibidoras, agindo inclusive como inibidores enzimáticos (Sidhu, 2000).

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 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).

Pequenas moléculas de peptídeos tem sido utilizadas para o desenvolvimento de vacinas para melanoma (Thomson et al., 2004), inibidores contra o HIV (Kaushik-Basu et al., 2008), para o vírus da Dengue e vírus do Oeste do Nilo (Hrobowski et al., 2005), e vacinas anti-angiogênicas no tratamento de doenças relacionadas com a angiogênese (Sulochana e Ge, 2007).

As moléculas naturalmente envolvidas no reconhecimento imune têm sido amplamente exploradas nas tecnologias de exibição. A diversidade de anticorpos e de receptores de células T (TCRs) os torna adequados para a construção de bibliotecas de exibição e como fontes específicas e funcionais para moléculas de antígenos-alvo (Sergeeva et al., 2006), contribuindo para os estudos de mapeamento das respostas imunes durante as infecções (Liu et al., 2002; Groves et al., 2006). A construção de bibliotecas de exibição com o MHC tem sido iniciada para facilitar a detecção do reconhecimento imune mediado por TCRs (Sergeeva et al., 2006).

As bibliotecas de cDNA podem ser usadas para identificação de interações protéicas e mapeamento da energia das interações, como também para identificar ligantes naturais (Sidhu, 2000).

As diferentes tecnologias display estão diretamente relacionadas com avanços na biotecnologia, e possuem diversas aplicações, que contribuirão para o desenvolvimento de variadas aplicações biomédicas futuras.

No presente trabalho, foram selecionados peptídeos apresentados em fagos provenientes de bibliotecas através da tecnologia *phage display*, e de imunoenaios. Estes peptídeos foram considerados miméticos antigênicos de epítomos das proteínas imunogênicas dos vírus VAIE e VLB, potenciais para uso como antígenos, e para a construção de peptídeos sintéticos com possíveis aplicações no desenvolvimento de plataformas de diagnóstico para as doenças AIE e LEB.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1- Seleção com a biblioteca Ph.D.-C7C™ (Biopanning AIE)

#### 2.1.1- Purificação das IgGs positivas e negativas dos soros de equídeos

As amostras dos soros de equídeos provenientes de uma soroteca do laboratório de Retrovírus no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, foram testadas para diagnóstico da AIE no ELISA com a proteína gp90 recombinante (rgp90), segundo protocolo de Reis (1997), e na IDGA segundo protocolo descrito por Coggins e Norcross (1972) e adaptações de Nakajima e Ushimi (1971).

Pool de vinte soros provenientes de animais naturalmente infectados com VAIE, e o pool de vinte soros provenientes de animais negativos para a infecção, foram utilizados para purificação das amostras de IgG totais positivas e negativas em colunas de cromatografia por afinidade do tipo Hitrap Protein G HP, no sistema ÄKTA conforme recomendações do fabricante (GE Healthcare®).

As frações de IgGs obtidas foram neutralizadas após eluição da coluna com tampão de neutralização (1M Tris-HCl pH 8.0), liofilizadas e ressuspendidas em água esterilizada/ deionizada. As concentrações das IgGs purificadas foram estimadas por espectrofotometria no comprimento de onda

de 280 nm, e pelo método de Bradford (1976).

Para testar a purificação da classe das imunoglobulinas, positivas e negativas, foi realizado teste das amostras em Dot Blot. O ensaio de Dot Blot foi realizado com adsorção de 1µg de cada amostra de IgG em membrana de nitrocelulose, e BSA (albumina sérica bovina) como controle, que foi posteriormente bloqueada por uma hora na solução de TBS (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl) com 5% de leite em pó desnatado à temperatura ambiente, sob agitação.

Após uma lavagem com TBST (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,05% de Tween 20 v/v), a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de equino conjugado com peroxidase (*Sigma*), diluído em solução de bloqueio na concentração de 1:5000, durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi lavada cinco vezes, a reação revelada com Diaminobenzidina (DAB- *Sigma*) e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

Para averiguar a qualidade das amostras de IgGs purificadas foi utilizada eletroforese em gel de poli(acrilamida) SDS-PAGE (16%). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (1% SDS, 1% Tris pH 6,8, bromophenol blue a 0,02% e 20% glicerol). A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente com tampão superior 0,1M Tris base, 0,1M Glicina e SDS 0,1%, e com tampão inferior 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9, na voltagem de 100V. Após a corrida eletroforética, o gel de poli(acrilamida) foi colocado em solução corante de proteínas Coomassie-blue R-250, para a visualização da banda correspondente a IgG. O marcador de peso molecular Bench Mark Protein Ladder (*Invitrogen*) foi aplicado no gel para comparação com as IgGs obtidas.

### **2.1.2- Seleção Biológica IgG AIE (Biopanning)**

A seleção de sequências peptídicas ligantes as IgGs purificadas do soro de animais positivos e negativos para o VAIE, foi

realizada de acordo com protocolo descrito por Barbas e colaboradores (2001). Foi utilizada a biblioteca Ph.D.-C7C™ New England BioLabs® que contém peptídeos randômicos de sete aminoácidos flanqueados por um par de resíduos de cisteínas, apresentados na superfície de fagos filamentosos. As cisteínas formam uma ligação dissulfeto durante o processo de montagem do fago, sendo os peptídeos apresentados ao alvo de interesse na forma de *loops* (biblioteca constrita ou de peptídeos cíclicos). Os heptapeptídeos randômicos desta biblioteca são precedidos por resíduos de Ala-Cys e possuem uma curta sequência composta por Gly-Gly-Gly-Ser que é fusionada à região N-terminal da proteína capsídica menor (Proteína III) expressas nos fagos M13 filamentosos. Esta biblioteca apresenta  $1,28 \times 10^9$  possíveis sequências heptapeptídicas.

Primeiramente foram adicionados 150µl de IgG total negativa para o VAIE (alvo) na concentração de 100µg/mL em 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6 para adsorção, em um orifício da placa de microtitulação de 96 poços (*MaxiSorp™ - Nunc*). Em outro orifício da mesma placa foram adicionados 150µl de IgG total positiva para o VAIE na mesma concentração. A placa foi incubada por 18 horas, a 4°C sob leve agitação em um recipiente contendo papel toalha umidificado.

No dia seguinte as soluções de adsorção com os alvos (IgG negativa e positiva) foram desprezadas e os orifícios adsorvidos da placa foram bloqueados durante uma hora a 4°C com 250 µl do tampão de bloqueio (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6, 5 mg/ml BSA, 0,02% NaN<sub>3</sub>). A solução de bloqueio foi então desprezada e os orifícios adsorvidos da placa foram lavados seis vezes com a solução de TBST (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,1% de Tween 20 v/v).

Fagos na concentração  $4,0 \times 10^{10}$  da biblioteca original foram diluídos em 100µl da solução de TBST e adicionados no orifício adsorvido com o alvo IgG total negativa, com período de incubação de uma hora sob leve agitação a 4°C. Após este período de incubação, o sobrenadante de fagos não ligados no alvo IgG negativa foi

transferido para o orifício contendo o alvo IgG positiva adsorvida e incubado novamente durante uma hora sob leve agitação a 4°C, garantindo que apenas os fagos ligantes no alvo IgG positiva fossem selecionados.

Após incubação com IgG positiva, os fagos não ligados foram desprezados e o orifício foi lavado dez vezes com a solução TBST. Os fagos ligados neste alvo foram eluídos com o tampão 0,2 M glicina-HCl, pH 2,2, contendo 1 mg/ml BSA durante 10 minutos sob agitação a 4°C. O eluato foi transferido para microtubos e neutralizado com 2µl do tampão 1M Tris-HCl, pH 9,1.

Alíquotas dos fagos eluídos foram utilizadas para a determinação da titulação. O eluato remanescente contendo fagos foi utilizado para a amplificação pela infecção em *E. coli* ER2738. Foram realizados quatro ciclos de seleção para o enriquecimento dos fagos contendo os peptídeos ligantes.

Um volume de 80µl do eluato foi utilizado para a primeira amplificação em 20,0 mL de cultura de *E. coli* (ER2738) em fase inicial de crescimento ( $DO_{600nm} \leq 0,3$ ), contendo tetraciclina, incubando-se a cultura por 4-5 horas em agitador com temperatura de 37°C, para posterior procedimento de precipitação e titulação dos fagos amplificados.

A cultura foi transferida para um tubo *Oak Ridge*<sup>TM</sup> (*Hitachi*) e centrifugada durante 10 minutos a 11300 Xg, 4°C. As células residuais foram descartadas e o sobrenadante transferido para um tubo limpo e centrifugado novamente. Oitenta por cento do sobrenadante foi transferido para um outro tubo esterilizado e acrescentado 1/6 do volume com PEG/NaCl (20% peso/volume de Polietileno glicol-8000, 2,5M NaCl em água) para precipitação dos fagos amplificados. Esta mistura permaneceu em repouso por 12 horas a 4°C.

No dia seguinte, a suspensão foi centrifugada durante 15 minutos a 11300 Xg, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi centrifugado brevemente, para que o sobrenadante residual pudesse ser removido. O precipitado foi ressuscitado

em 1,0 mL de TBS, transferido para um microtubo e centrifugado por 5 minutos a 11300 Xg, 4°C para sedimentar os resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para nova precipitação por adição de PEG/NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada em gelo por 1 hora e então centrifugada durante 10 minutos a 11300 Xg, 4°C. O sobrenadante foi descartado, e a centrifugação foi repetida para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi ressuscitado em 200µL de TBS (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl) obtendo-se então o eluato contendo fagos amplificados do primeiro ciclo.

Os fagos amplificados no primeiro ciclo de seleção foram selecionados no segundo ciclo, com a mesma concentração de IgG positiva para VAIE previamente adsorvida em orifício da placa de microtitulação conforme descrito anteriormente. A partir do segundo ciclo, a estringência do tampão de lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5% de Tween-20 em todas as lavagens.

Os fagos amplificados no segundo ciclo foram selecionados no terceiro ciclo nas mesmas condições descritas, e os fagos amplificados no terceiro ciclo foram selecionados no quarto ciclo do biopanning. Após incubação com o alvo no quarto ciclo, foram realizadas 15 lavagens com a solução TBST. O eluato do quarto ciclo não foi amplificado.

As colônias isoladas obtidas da placa de titulação do eluato não amplificado do quarto ciclo, após contagem, foram coletadas com palitos de madeira esterilizados e reamplificadas separadamente em placas do tipo *Deepwell* para o armazenamento dos clones selecionados. Para isso, cada colônia isolada obtida foi dispensada em um poço da placa *Deepwell* contendo 1,2 mL de meio de cultura LB e tetraciclina com *E. coli* em fase de crescimento inicial. A placa foi incubada por 12 horas a 37°C, sob agitação. A placa *Deepwell* foi centrifugada por 10 minutos a 1.55 Xg, para a retirada do sobrenadante que foi transferido para uma outra placa *Deepwell* e então adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de polietileno

glicol-8000, NaCl 2,5 M) seguido por incubação de 12 horas a 4°C. Após centrifugação e retirada do sobrenadante da placa que foi incubada para crescimento dos clones de fagos com *E. coli*, foi acrescentado 100µL de glicerol 80% para estoque a -20°C (placa backup).

Após incubação da placa com sobrenadante e PEG/NaCl, foi realizada centrifugação por 30 minutos a 1550 Xg, o sobrenadante descartado, e o precipitado ressuscitado em 200,0 µL de TBS com 0.02% NaN<sub>3</sub> e armazenado a 4°C.

Os fagos precipitados foram diluídos na concentração 1:100 e tiveram as concentrações estimadas por espectrofotometria em absorbância de UV nos comprimentos de onda de 269 e 320 nm. O cálculo da concentração viral (número de fagos/ µL) foi baseado na fórmula: número de fagos/ µL = (Abs 269 – Abs 320) x 6 x 10<sup>16</sup>/ 7,222 x 10<sup>3</sup> (número de nucleotídeos no genoma do fago) x 0,1 (fator de diluição).

### 2.1.3- Titulação dos fagos

O número de entrada e saída das partículas virais durante os ciclos de seleção foram determinados pela titulação (Barbas et al., 2001).

Para as titulações dos eluatos não amplificados dos quatro ciclos de seleção, foram realizadas cinco diluições seriadas que variaram de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-5</sup> utilizando 1,0 µL dos fagos (eluato) diluídos em 9,0 µL de meio de cultura LB com tetraciclina. Em cada diluição foram acrescentados 200 µL *E. coli* ER2738 crescida em meio LB e um volume de 3 mL Agarose TOP (10g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1g de MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O, 7g Agarose/L) que foram colocadas na superfície de placas de Petri com meio LB sólido contendo X-gal (40 µg/ml) e IPTG (0.5 mM).

Todos os eluatos amplificados foram titulados seguindo o mesmo protocolo descrito para a titulação dos eluatos não

amplificados. Apenas diferem as diluições para titulação dos fagos amplificados, que variam de 10<sup>-8</sup> até 10<sup>-11</sup> utilizando 1,0µL dos fagos (amplificados) diluídos em 9,0 µL de meio de cultura LB com tetraciclina.

Após a incubação por 18 horas em estufa a 37°C, as colônias azuis foram contadas para a obtenção dos títulos de entrada e saída para todas as diluições (número de colônias azuis x fator de diluição). Os resultados foram expressos por ufc/µL (unidades formadoras de colônias por µL). As colônias que apresentaram coloração azul demonstram a hidrólise do substrato X-Gal pela β-galactosidase dos fagos, expressa pelas bactérias ER2738.

### 2.1.4- Caracterização dos clones ligantes

#### Extração do DNA dos fagos

Para a extração do DNA dos fagos, uma colônia de *E. coli* foi inoculada em 20 mL de meio LB com tetraciclina e incubada sob agitação a 37°C por 14 horas. O volume de 1,2 mL dessa cultura foi diluído em 120 mL de meio LB (autoclavado e com tetraciclina), e 1,2 mL da mistura distribuída em cada poço da placa *Deepwell* esterilizada.

Palitos de madeira esterilizados foram utilizados para coleta das colônias azuis de bactérias infectadas com fagos do quarto ciclo de seleção não amplificado, e transferidas para os poços da placa *Deepwell* contendo cultura diluída. Incubação por 24 horas, sob agitação a 37°C.

Após incubação, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1550 Xg, 20°C e 800 µL de cada sobrenadante foi transferido para uma nova placa *Deepwell*, com adição de 350 µL de PEG/NaCl seguido por incubação de 10 minutos à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 22100 Xg, durante 40 minutos a 20°C, para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 100 µL de

tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI). A placa foi agitada, e foram adicionados 250 µL de etanol em cada poço, seguido por incubação de 10 minutos à temperatura ambiente. A placa foi centrifugada por 40 minutos a 22100 Xg, 20°C, os sobrenadantes foram descartados, e aos precipitados foram adicionados 150 µL de etanol 70% com posterior centrifugação de 10 minutos a 22100 Xg.

Os sobrenadantes foram novamente descartados e as amostras do DNA dos fagos foram ressuspensas em 20 µL de água deionizada esterilizada.

A qualidade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com solução de brometo de etídeo, na presença do marcador de tamanho molecular e do padrão DNA do fago M13 para comparação com o DNA das amostras dos fagos selecionados.

As concentrações das amostras do DNA extraídas foram estimadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm para DNA e 280 nm para proteínas.

## Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foram utilizados em cada poço da placa 500 ng de DNA molde (DNA de cada fago), 5 pmol do *primer* -96 gIII (5'-OH CCC TCATAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit*. – *Amersham Biosciences*). A reação foi realizada em termociclador de placas (*MasterCycler* – Eppendorf) utilizando programa de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento do *primer* à 58°C por 15 segundos, e extensão à 60°C por 1 minuto.

O DNA sequenciado foi precipitado com 1 mL de acetato de amônio e 27,5 mL de álcool etílico. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 1550 Xg e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 150 mL de etanol 70% ao DNA precipitado que foi

centrifugado por 15 minutos a 1550 Xg. A solução de etanol foi descartada por pulso invertido. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10 mL do tampão de diluição (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit*. – *Amersham Biosciences*).

A leitura do sequenciamento foi realizada em um sequenciador automático do tipo *MegaBace 1000* (*Amersham Biosciences*) no Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU). A análise das sequências de DNA provenientes do sequenciador automático foi processada em software do próprio equipamento (*Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15*). Logo após esta pré-análise, as sequências dos vetores foram retiradas e somente aqueles insertos com sequências completas foram traduzidos.

## Tradução e análise das sequências

Com as sequências do DNA foram realizadas análises de dedução *in silico* para as sequências peptídicas pelo programa DNA2PRO, disponível no site <https://relic.bio.anl.gov/programs.aspx>. Este programa é designado para tradução de sequências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs* (*Ph.D.-12<sup>TM</sup>* ou *Ph.D.-C7C<sup>TM</sup>*) 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.

Foi utilizado o programa AAFREQ (<https://relic.bio.anl.gov/aafreqs.aspx>) para o cálculo da frequência e da diversidade de aminoácidos dentro da população de peptídeos selecionados.

A procura por similaridade entre as sequências peptídicas selecionadas foi realizada com o programa *Clustal W* (versão 18.1 [www.ebi.ac.uk/clustalW/](http://www.ebi.ac.uk/clustalW/)), através de alinhamentos múltiplos.

### **2.1.5- Precipitação das amostras de fagos selecionadas para os imunoenaios**

Para o protocolo de precipitação dos fagos que foram submetidos aos imunoenaios realizados, uma colônia de *E. coli* foi inoculada em 20 mL de meio LB com tetraciclina e incubada sob agitação a 37°C por 14 horas. A cultura foi diluída em meio LB (autoclavado e com tetraciclina) na proporção de 1:100 e um volume de 10 mL distribuído em tubos esterilizados. O volume de 50µl das amostras backup com glicerol dos fagos selecionados e do fago selvagem foi adicionado em cada tubo contendo meio de cultura, e incubados a 37°C sob agitação por 18 horas.

No dia seguinte os fagos em crescimento foram centrifugados a 3000 Xg durante 40 minutos e os sobrenadantes transferidos para outros tubos, onde foi acrescentado 1/6 do volume de PEG/NaCl. Esta mistura de amostras do sobrenadante com PEG/NaCl foi mantida em repouso por 18 horas, a 4°C.

Após o período de incubação os tubos foram centrifugados durante 30 minutos na rotação de 5000 Xg, os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados ressuspensos em 500µl de solução TBS (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl). Aos precipitados ressuspensos foi acrescentado 1/6 do volume de PEG/NaCl seguido por incubação a 4°C em repouso durante uma hora. As amostras foram centrifugadas durante 30 minutos na rotação 5000 Xg e o precipitado ressuspensado em 200µl de TBS com 0,02% Na<sub>3</sub>. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 5000 Xg para retirada das bactérias residuais, os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos, e estocados a 4°C.

Os fagos precipitados foram diluídos na concentração 1:100 e tiveram as concentrações estimadas por espectrofotometria em absorbância de UV nos comprimentos de onda de 269 e 320 nm. O cálculo da concentração viral

(número de fagos/ µL) foi baseado na fórmula: número de fagos/ µL = (Abs 269 – Abs 320) x 6 x 10<sup>16</sup>/ 7,222 x 10<sup>3</sup> (número de nucleotídeos no genoma do fago) x 0,1 (fator de diluição).

### **2.1.6- Fago selvagem**

O fago M13KE New England BioLabs® foi utilizado nos imunoenaios como controle negativo das reações. Este fago não apresenta peptídeo fusionado na proteína III do capsídeo viral. Conforme indicações do fabricante, este clone pode ser útil como controle ou para titulação dos estoques de fagos. Os procedimentos de amplificação, precipitação e dosagens para o fago selvagem foram os mesmos utilizados para os fagos selecionados com as bibliotecas.

### **2.1.7- Análises da reatividade dos clones selecionados em imunoenaios com as IgGs purificadas**

A primeira etapa de avaliação da reatividade dos clones de fagos selecionados no biopanning, foi realizada por meio de imunoenaios do tipo ELISA, Western Blot, e Dot Blot, com as IgGs purificadas positivas e negativas obtidas dos soros de animais infectados e não infectados com VAIE.

### **Phage-ELISA**

Com o objetivo de selecionar apenas os fagos reativos com as IgGs provenientes dos soros de animais positivos para o VAIE, e não reativos com as IgGs provenientes dos soros dos animais negativos, foram realizados testes de ELISA.

Placas de alta afinidade (*MaxiSorp™ - Nunc*) de 96 poços foram divididas para adsorção das IgGs positivas e negativas purificadas. Em todas as placas utilizadas foram testadas as reatividades das amostras dos fagos selecionados em duplicata.

Quarenta e quatro poços da placa de ELISA foram adsorvidos com 1µg de IgG purificada positiva diluída em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6), e outros quarenta e

quatro poços da mesma placa foram adsorvidos com 1µg de IgG purificada negativa diluída no mesmo tampão de adsorção. Quatro poços de cada metade da placa foram utilizados como controles da reação sem adsorção com as IgGs.

As placas com as soluções de adsorção (100µl/poço) foram mantidas por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente e logo após este processo as soluções foram desprezadas para posterior bloqueio de 18 horas sob agitação a 4°C com 300µl/poço da solução de PBS (0,13 M NaCl, 0,002 M KCl, 0,008 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O, 0,014 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) com 5% de BSA (albumina do soro de bovinos). Depois do bloqueio as placas foram lavadas três vezes com a solução PBST 0,1% (solução PBS com 0,1% de Tween 20).

As amostras dos fagos precipitadas por PEG/NaCl e com as concentrações estimadas por espectrofotometria em absorbância de UV nos comprimentos de onda de 269 e 320 nm, foram diluídas para a concentração de 1 x 10<sup>11</sup> fagos na solução de PBS com 3% BSA e 0,5% Tween 20. Foram acrescentadas, em duplicata, 100µl/poço das diluições de cada amostra de fago sobre as IgGs positivas e negativas adsorvidas previamente, seguido por período de incubação de 2 horas em repouso a 37°C.

Amostras de fagos selvagens (controle negativo) foram diluídas nas mesmas condições e acrescentadas sobre os poços adsorvidos e não adsorvidos com as IgGs segundo layout pré-estabelecido das placas.

Após esta etapa, as placas foram lavadas oito vezes com solução PBST 0,1% e incubadas por 1 hora a 37°C com anti-M13 conjugado com peroxidase (1:5000, *Sigma*), 100µl/poço diluído em solução de PBS com 3% BSA e 0,5% Tween 20.

Ao final da incubação, as placas foram novamente lavadas oito vezes com PBST 0,1% e a revelação ocorreu pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0. A reação foi interrompida pela adição

de ácido sulfúrico (2N) e a densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

O valor do ponto de corte (*cut off*) foi calculado baseado nos valores da DO obtidos com o fago selvagem (*cut off* = média fago selvagem + 2X desvio padrão fago selvagem). O índice ELISA foi calculado considerando-se a média da DO das duplicatas dividido pelo valor do *cut off*. Valores acima de 1 foram considerados positivos.

Para verificar a diferença entre os índices ELISA obtidos da reatividade dos clones com as IgGs positivas e negativas, foi realizado o teste-t pareado no programa STATA 10.0.

### **ELISA – Teste da reatividade da proteína recombinante rgp90 com as amostras de Igs positivas e negativas purificadas**

Com o objetivo de avaliar se a proteína recombinante gp90 apresentava diferença de reatividade com as amostras de IgGs positivas e negativas purificadas, e se poderia ser utilizada como controle nas reações, foram realizados testes de ELISA variando as concentrações da proteína adsorvida em placas.

A concentração da proteína rgp90 foi estimada por espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm, e pelo método de Bradford, (1976). A corrida eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (16%) permitiu averiguar a qualidade da rgp90.

Diluições da proteína nas concentrações de 0,25µg, 0,5µg, 1µg e 2µg/poço em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6) foram realizadas para adsorção em placa de ELISA (*MaxiSorp<sup>TM</sup>* - *Nunc*) de 96 poços (100µl/poço de cada diluição). Seguido por adsorção durante 18 horas a 4°C, a placa foi lavada duas vezes com solução PBST 0,05% (solução PBS com 0,05% de Tween

20) e bloqueada com solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado durante uma hora em repouso à temperatura ambiente. Amostras de IgGs positivas e negativas foram diluídas na concentração de 1µg/µl em solução de PBS com 1% leite em pó desnatado (100µl/poço) e incubadas com a proteína adsorvida em todas as concentrações durante uma hora à temperatura ambiente. Os poços sem as IgGs foram considerados Branco (B) para a reação. Após incubação, foram realizadas três lavagens com solução PBST 0,05% seguido por adição de anticorpo secundário anti-equino conjugado com peroxidase (*Sigma*) testado nas concentrações 1:10000, 1:7500, 1:5000 e 1:2500 (100µl/poço) sobre todas as diluições da rgp90. A placa foi incubada durante uma hora em repouso à temperatura ambiente, após esta etapa foram realizadas três lavagens com PBST 0,05% e a revelação da reação ocorreu pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (2N) e a densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

O ponto de corte foi calculado com valor médio da DO obtida com IgG negativa mais 2x desvio padrão da IgG negativa. Os resultados obtidos acima do valor do ponto de corte foram considerados positivos.

O teste-t foi realizado no programa STATA 10.0 para verificar a diferença da reatividade da proteína com as IgGs positivas e negativas.

### **ELISA- Competição A**

O ensaio de competição em ELISA foi realizado para verificar se os fagos selecionados no biopanning e reativos apenas com as amostras de IgG positiva, eram capazes de competir com a proteína rgp90 para a ligação à IgG positiva adsorvida em placa.

As IgGs positivas purificadas foram diluídas em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6) e adsorvidas em placa de ELISA (*MaxiSorp*<sup>TM</sup> - *Nunc*) de 96 poços na concentração de 1µg/poço, durante 18 horas sob agitação a 4°C. Após duas lavagens com solução PBST 0,05%, as placas foram bloqueadas com solução de PBS + 5% de leite em pó desnatado durante uma hora à temperatura ambiente em repouso. Após o bloqueio, as placas passaram por três lavagens com PBST 0,05%.

As amostras dos fagos selecionados e do fago selvagem foram diluídas na concentração de 1 x 10<sup>11</sup>, e a proteína rgp90 foi diluída nas concentrações de 0µg, 4µg, 8µg e 16µg/µl em solução de PBS com 1% leite em pó desnatado. Todas as amostras de fagos foram misturadas com cada concentração da rgp90, em duplicatas.

Foi feita uma mistura de 100µl de fago 1 x 10<sup>11</sup> com 100µl de cada diluição da rgp90, e adicionadas nos poços, seguido por incubação durante uma hora sob agitação à temperatura ambiente. Para controle da reação dos fagos, em dois poços de cada coluna foram adicionadas as amostras de fagos 1 x 10<sup>11</sup> sem proteína. Os poços sem adição de amostras foram considerados Branco da reação. Após incubação das amostras, as placas foram lavadas seis vezes com PBST 0,05% e foi acrescentado anticorpo secundário anti-M13 conjugado com peroxidase na concentração de 1:5000 (*Sigma*) diluído em PBS com 1% leite em pó desnatado (100µl/poço). As placas foram novamente incubadas durante uma hora à temperatura ambiente em repouso, e lavadas seis vezes com PBST 0,05%.

A reação foi revelada com adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0, e interrompida pela adição de ácido sulfúrico (2N). A densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm.



O valor do ponto de corte (*cut off*) foi calculado baseado nos valores da DO obtidos com o fago selvagem (*cut off* = média fago selvagem mais 2X desvio padrão fago selvagem). O índice ELISA foi calculado considerando-se a média DO das duplicatas de cada amostra dividido pelo valor do *cut off*.

O programa STATA 10.0 foi utilizado para o cálculo do coeficiente de variação para cada fago no experimento.

### **ELISA- Competição B**

Outro formato do ensaio de competição em ELISA foi realizado para verificar se os fagos selecionados eram capazes de competir com a proteína rgp90, adsorvida em placa, na ligação à IgG positiva em solução.

Amostra da proteína rgp90 foi diluída em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6) e adsorvidas em placa de ELISA (*MaxiSorp<sup>TM</sup>* - *Nunc*) de 96 poços na concentração de 1µg/poço, durante 18 horas sob agitação a 4°C.

Após duas lavagens com solução PBST 0,05%, as placas foram bloqueadas com solução de PBS mais 5% de leite em pó desnatado durante uma hora à temperatura ambiente em repouso, seguido por três lavagens com PBST 0,05%.

As amostras dos fagos selecionados e o fago selvagem (controle negativo) foram diluídas em PBS com 1% leite em pó desnatado, nas concentrações de  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{10}$  e  $1 \times 10^9$ . A IgG positiva purificada foi diluída na concentração de 1µg/poço. As placas foram divididas em colunas, sendo testada uma amostra de fago por coluna. As concentrações dos fagos foram testadas em duplicata. Foram adicionados nos poços adsorvidos com a gp90, a mistura de 100µl de cada diluição dos fagos testada com 100µl da IgG na concentração de 1µg/poço. A mistura foi incubada por uma hora sob agitação à temperatura ambiente seguido por seis lavagens com PBST 0,05%. Poços

incubados apenas com a solução de IgGs (sem os fagos) foram controles da reação. Anticorpo secundário anti-equino conjugado com peroxidase (1:5000, 100µl/poço, *Sigma*) diluído em PBS com 1% leite em pó, foi incubado durante uma hora em repouso à temperatura ambiente. Foram realizadas seis lavagens após esta incubação.

A reação foi revelada com adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0, e interrompida pela adição de ácido sulfúrico (2N). A densidade óptica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

O valor do ponto de corte (*cut off*) foi calculado baseado nos valores da DO obtidos com o fago selvagem (*cut off* = média fago selvagem mais 2X desvio padrão fago selvagem). O índice ELISA calculado considerando-se a média DO das duplicatas de cada amostra dividido pelo valor de *cut off*.

### **Dot Blot**

O ensaio de Dot Blot foi realizado para verificar reatividade dos fagos com as IgGs positiva e negativa purificadas.

A membrana de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) com poro de 0,2 µm foi sensibilizada com cada amostra dos fagos na ordem de  $10^{11}$ . O fago selvagem e 1µg da proteína rgp90 foram também sensibilizados como controles negativo e positivo respectivamente. Após sensibilização, as membranas foram bloqueadas com solução de TBS com 5% de leite em pó desnatado durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação e lavadas uma vez com TBST 0,05%.

As IgGs purificadas positivas e negativas foram utilizadas como anticorpos primários na concentração de 400µg, diluídas em solução de bloqueio, e incubadas com as membranas durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. As

membranas foram lavadas cinco vezes com TBST 0,05%, e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de equino conjugado com fosfatase alcalina (1:5000, *Sigma*) diluído em solução de bloqueio, durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. Após cinco lavagens com TBST 0,05%, a reação foi revelada com NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (*Sigma*), e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### Dot Blot competição

As amostras dos fagos selecionadas foram submetidas à competição com a rgp90 para a ligação à IgG positiva purificada, em solução, no protocolo de Dot Blot.

A membrana de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) com poro de 0,2 µm foi sensibilizada com cada amostra dos fagos na ordem de 10<sup>11</sup>. O fago selvagem e 1µg da proteína rgp90 foram também sensibilizados como controles negativo e positivo respectivamente. O bloqueio e as lavagens foram realizadas conforme descrito anteriormente.

Foi utilizada a IgG positiva como anticorpo primário na concentração de 400µg diluída em solução de bloqueio, e em solução com a proteína rgp90, nas concentrações de 80µg e 120µg.

Todas as amostras dos fagos selecionados, fago selvagem, e da proteína rgp90 sensibilizadas nas membranas, foram submetidas à incubação com IgG positiva pura, e em solução com as concentrações da rgp90 testadas para verificar presença de competição. Seguido de um período de incubação de 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de equino nas mesmas condições anteriormente descritas. Após cinco lavagens com TBST 0,05%, a reação foi revelada com NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (*Sigma*), e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### Western Blot

Para verificar se os peptídeos fusionados na proteína III dos fagos selecionados são especificamente reconhecidos pelas IgGs totais purificadas foram realizados testes em Western Blot (WB).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (16%), sob condições desnaturantes, foi realizada com os clones precipitados na concentração de 1 x 10<sup>12</sup> de cada fago selecionado, 1 x 10<sup>12</sup> fago selvagem (controle negativo), e 10µg da proteína rgp90 (controle positivo). As amostras foram eletrotransferidas durante 2 horas, na amperagem de 280 mA a 4°C, para membranas de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) com poro de 0,2 µm, e bloqueadas em solução de TBS com 5% de leite em pó desnatado durante uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes com solução de TBST 0,05% (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20).

Foram utilizados 400µg de cada das IgGs purificadas (positiva e negativa) como anticorpos primários, que foram incubados com as amostras nas membranas durante uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente, seguido por três lavagens com TBST 0,05%. Anticorpo secundário anti-IgG de equino conjugado com peroxidase (1:5000, *Sigma*) em solução de bloqueio, foi adicionado sobre cada membrana. Elas foram incubadas durante uma hora, sob agitação à temperatura ambiente e posteriormente lavadas três vezes com solução TBST 0,05%. A reação foi revelada por adição do substrato DAB (Diaminobenzidina, *Sigma*) e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### Western Blot competição

O protocolo de WB foi utilizado para verificar se as amostras dos fagos selecionados e imobilizados na membrana de nitrocelulose, competem com a rgp90 em solução, para ligação às IgGs purificadas positivas.

Amostras dos clones selecionados na concentração de 1 x 10<sup>12</sup> e 10µg da proteína

rgp90, foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose que foram cortadas em tiras. Após o término do bloqueio em solução de TBS com 5% de leite em pó desnatado, foram lavadas uma vez com TBST 0,05%. A proteína rgp90 foi adicionada em solução com 400µg da IgG positiva (anticorpo primário). As concentrações de 20µg, 40µg, 80µg e 160µg da rgp90 foram misturadas à IgG positiva diluída em solução de bloqueio, sobre cada amostra de fago selecionado imobilizado nas tiras. Cada amostra de fago foi também testada com 400µg da IgG positiva pura (controle positivo). O período de incubação foi de 2 horas à temperatura ambiente sob agitação, seguida por três lavagens com TBST 0,05%.

O anticorpo secundário anti-IgG de equino conjugado com peroxidase (1:5000, *Sigma*) foi diluído em solução de bloqueio e incubado com cada membrana durante 2 horas sob agitação, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes, a reação revelada com DAB (Diaminobenzidina, *Sigma*) e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### **2.1.8- Análises da reatividade dos clones selecionados no biopanning e nos imunoenaios, com as amostras dos soros de equídeos naturalmente infectados e não infectados com VAIE**

A segunda etapa de avaliação da reatividade dos clones de fagos foi realizada por meio de imunoenaios do tipo ELISA, Western Blot, e Dot Blot com amostras dos soros de equídeos.

Os clones não reagentes com a IgG negativa e reativos apenas com as IgGs positivas purificadas foram selecionados nos imunoenaios ELISA, ELISA competição, Western Blot, Western Blot competição, Dot Blot, e Dot Blot competição, acima descritos.

As amostras dos soros de equídeos foram previamente testadas em ELISA rgp90, segundo Reis (1997) e na Imunodifusão em Gel de Ágar segundo protocolo descrito por

Coggins e Norcross (1970) e adaptações de Nakajima e Ushimi (1971).

### **Phage-ELISA**

Testes de ELISA foram realizados para verificar a reatividade dos clones selecionados com trinta amostras dos soros de animais positivos e trinta soros negativos para infecção pelo VAIE.

As amostras dos fagos selecionados e selvagem na concentração de  $1 \times 10^{11}$  e 1µg da proteína rgp90, em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6), foram adsorvidas em poços das placas de ELISA (*MaxiSorp™* - *Nunc*) de 96 poços. Após período de adsorção por 18 horas a 4°C, as soluções foram descartadas e as placas foram lavadas duas vezes com solução PBST 0,05% e bloqueadas com solução PBS com 5% leite em pó durante uma hora. Foram realizadas três lavagens para retirada da solução de bloqueio. Amostras dos soros foram testadas em várias diluições para verificar as condições ideais do teste.

Amostras foram diluídas nas concentrações de 1:50, 1:100, 1:500, 1:750 e 1:1000 em solução PBS com 1% leite em pó desnatado, adicionadas em duplicata e incubadas na placa durante uma hora à temperatura ambiente. Poços adsorvidos que não receberam amostras de soros foram considerados Branco da reação.

Seguido de seis lavagens, o anticorpo secundário anti-equino conjugado com peroxidase (1:5000, *Sigma*) foi diluído em PBS com 1% leite em pó desnatado e incubado nos poços por uma hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada seis vezes, a reação revelada com adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0, e interrompida pela adição de ácido sulfúrico (2N). A densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

Para o cálculo do ponto de corte (*cut off*) de cada uma das diluições dos soros testadas, foi utilizada a proteína rgp90 com os soros negativos como fator de comparação. Foi calculada a média da absorbância da rgp90

#### **Cálculo IE negativo:**

Média da absorbância de cada soro negativo – média do fago selvagem com soros negativos  
*Cut off*

#### **Cálculo IE positivo:**

Média da absorbância de cada soro positivo – média do fago selvagem com soros positivos  
*Cut off*

### **ELISA competição C**

O ensaio ELISA formato competição foi realizado para verificar a capacidade dos fagos selecionados em competir com a proteína rgp90 para ligação aos anticorpos das amostras dos soros de animais positivos para AIE.

Foram adsorvidos os poços das placas de ELISA (*MaxiSorp<sup>TM</sup> - Nunc*) com a proteína rgp90 na concentração de 1µg diluída em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6), durante 18 horas a 4°C, em repouso. Após esta etapa, as placas foram lavadas duas vezes com PBST 0,05% e bloqueadas com solução de PBS com 5% leite em pó durante uma hora, em repouso.

Após três lavagens, as amostras dos soros positivos e negativos foram diluídas em solução de PBS com 1% de leite em pó desnatado na concentração de 1:500 e colocadas sobre os poços em duplicata. Foram feitas diluições dos soros positivos 1:500 que foram misturadas com fagos (E12 e selvagem) na concentração de 1x10<sup>11</sup> (competição) que também foram colocadas nos poços das placas em duplicata. Os poços sem amostra dos soros foram Branco da reação. Após período de incubação de 2 horas sob agitação, à temperatura ambiente as placas foram lavadas seis vezes e foi adicionado anticorpo secundário anti-equino conjugado com peroxidase (1:5000, *Sigma*). Após incubação por hora em repouso foram feitas seis lavagens, e a reação revelada com adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão

com os soros negativos mais 2x desvio padrão. Os índices ELISA (IE) foram calculados separadamente para os soros positivos e negativos:

Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0, e interrompida pela adição de ácido sulfúrico (2N).

A densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

A análise estatística dos resultados foi realizada com auxílio do programa Prisma 5.0 para ANOVA com pós teste de Bonferroni para comparação das médias das duplicatas dos valores das densidades óticas obtidas no ELISA.

### **Western Blot**

Para verificar se os peptídeos expressos na proteína III dos clones selecionados diferenciavam os soros dos animais positivos dos negativos, foram realizados testes em Western Blot (WB).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (16%) foi realizada com os clones precipitados na concentração de 1 x 10<sup>12</sup> de cada fago selecionado, 1 x 10<sup>12</sup> fago selvagem (controle negativo), e 10µg da proteína rgp90 (controle positivo). As amostras foram eletrotransferidas durante 2 horas, na amperagem de 280 mA a 4°C, para membranas de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) com poro de 0,2 µm, e bloqueadas em solução de TBS com 5% de leite em pó desnatado durante uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes com solução de TBST 0,05% (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20).

Os soros positivos e negativos foram testados nas diluições de 1:500 e 1:1000 em solução de bloqueio, e incubados com as membranas sensibilizadas durante uma hora sob agitação à temperatura ambiente.

As membranas foram lavadas três vezes e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de equino conjugado com fosfatase alcalina (1:5000, *Sigma*) em solução de bloqueio, durante uma hora sob agitação, à temperatura ambiente. Após três lavagens a reação foi revelada com NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (*Sigma*), e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### Dot Blot

O ensaio de Dot Blot foi realizado para verificar se os clones de fagos eram capazes de diferenciar trinta amostras dos soros de campo positivos e trinta negativos.

A membrana de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) com poro de 0,2 µm foi sensibilizada com cada amostra dos fagos na ordem de 10<sup>11</sup>. O fago selvagem e 1µg da proteína rgp90 foram também sensibilizados como controles negativo e positivo respectivamente. Após sensibilização, as membranas foram bloqueadas com solução de TBS com 5% de leite em pó desnatado durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação e lavadas uma vez com TBST 0,05%.

As amostras dos soros foram testadas nas diluições 1:500, 1:1000 e 1:1250 em solução de bloqueio e incubadas durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram lavadas cinco vezes com TBST 0,05% e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de equino conjugado com fosfatase alcalina (1:5000, *Sigma*) em solução de bloqueio, durante uma hora sob agitação, à temperatura ambiente. Após cinco lavagens a reação foi revelada com NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (*Sigma*), e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### Dot Blot competição (soros)

As amostras dos clones de fagos que diferenciaram soros de campo positivos e negativos foram submetidas ao teste de competição em Dot Blot. Os fagos sensibilizados nas membranas foram testados quanto à capacidade de competir com a proteína rgp90, em solução, para ligação aos anticorpos das amostras de soros positivas para infecção com VAIE.

Membranas de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) com poro de 0,2 µm foram cortadas em tiras e sensibilizadas com amostra do fago E12 na ordem de 10<sup>11</sup>. O fago selvagem e 1µg da proteína rgp90 foram também sensibilizados (controles negativo e positivo). Após sensibilização, as membranas foram bloqueadas com solução de TBS com 5% de leite em pó desnatado durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação e lavadas uma vez com TBST 0,05%. Amostras dos soros positivos e negativos foram diluídas 1:1250 em solução de bloqueio. As membranas foram incubadas com soro positivo, soro negativo, e soro positivo suplementado com 80µg da proteína rgp90 (competição). O período de incubação foi de 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Após cinco lavagens com TBST 0,05%, as tiras foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de equino conjugado com fosfatase alcalina (1:5000, *Sigma*) em solução de bloqueio, durante uma hora sob agitação, à temperatura ambiente. Seguido de cinco lavagens, a reação foi revelada com NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (*Sigma*), e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### 2.1.9- Análises por bioinformática

Os peptídeos selecionados nos imunoenaios realizados com as amostras dos soros dos animais positivos e negativos para infecção causada pelo VAIE foram analisados por ferramentas de bioinformática.

A procura por similaridade entre as seqüências peptídicas selecionadas foi

realizada pelo programa Clustal W versão 18.1 ([www.ebi.ac.uk/clustalW/](http://www.ebi.ac.uk/clustalW/)), através de alinhamentos múltiplos.

As sequências dos peptídeos selecionadas foram analisadas quanto à similaridade com sequências de proteínas do VAIE depositadas no “GENEBANK” através do programa BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Para encontrar o ponto máximo de similaridade entre todos os peptídeos selecionados nos imunoenaios, com as proteínas do VAIE de interesse encontradas no Blast, foi utilizado o programa MATCH disponível no site <http://relic.bio.anl.gov/match.aspx/>. Este programa executa o cálculo da similaridade entre uma sequência protéica e uma população de peptídeos utilizando as sequências em formato de texto, quando não existem arquivos derivados do PDB (*Protein Data Bank*). O PDB contém arquivos de representação padrão de dados da estrutura macromolecular, derivada de estudos de difração por raio-X das proteínas.

#### **2.1.10- Síntese do peptídeo sintético contendo epítomos miméticos do vírus da Anemia Infeciosa Equina (VAIE)**

Nesta etapa, foi utilizado o sistema de múltiplos peptídeos miméticos (MAPs “Multiple Antigens Peptides”) a partir dos clones de fagos selecionados e caracterizados por *phage display* e nos imunoenaios. O peptídeo sintético foi esquematizado com cinco repetições, em tandem, tendo o mesmo espaçador (GGGS) e com amidação C-terminal para estabilização da estrutura peptídica. O peptídeo foi sintetizado pela empresa Genscript ([www.genscript.com](http://www.genscript.com)).

#### **2.1.11- Testes da reatividade do peptídeo sintético VAIE-E12**

O peptídeo sintético denominado VAIE-E12 construído a partir da sequência selecionada por *phage display* apresenta cinquenta e um resíduos de aminoácidos, peso molecular de 4840,2, ponto isoelétrico

(PI) de 8,2, e a carga positiva em pH 7,0 de + 0,5.

O peptídeo foi diluído em água deionizada estéril, e sua concentração estimada por espectrofotometria no comprimento de onda de 280nm, e pelo método de Bradford (1976). Para verificar a reatividade do peptídeo VAIE-E12 com as amostras dos soros de equídeos foram realizados testes em ELISA.

#### **ELISA VAIE-E12**

As placas de alta afinidade (*MaxiSorp™* - *Nunc*) de 96 poços foram adsorvidas com 1µg, 0,5µg e 0,25µg do peptídeo diluído em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,6) e incubadas por 18 horas a 4°C, em repouso.

Após o período de adsorção, os poços foram lavados duas vezes com PBST 0,05% e bloqueados com a solução de PBS com 5% leite em pó desnatado, durante uma hora à temperatura ambiente, em repouso. Depois do bloqueio as placas foram lavadas duas vezes.

Trinta amostras dos soros de equídeos positivos e trinta amostras negativas para infecção pelo VAIE foram previamente testadas no ELISA com o antígeno rgp90, segundo Reis (1997) e na Imunodifusão em Gel de Ágar segundo protocolo descrito por Coggins e Norcross (1970) e adaptações de Nakajima e Ushimi (1971).

Soros foram testados nas diluições 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:80, 1:100, 1:160, 1:200 e 1:400 em solução PBS com 1% leite em pó desnatado, e 100µl de cada diluição foram adicionados nos poços, em duplicata, de acordo com layout da placa.

Os poços adsorvidos que não receberam amostras de soros foram considerados Branco da reação. Seguido do período de incubação de uma hora à temperatura ambiente, foram realizadas seis lavagens com PBST 0,05%.

O anticorpo secundário anti-equino conjugado com peroxidase (*Sigma*) foi testado nas diluições 1:5000 e 1:7500 em solução PBS com 1% leite em pó desnatado, adicionado o volume de 100µl em cada poço, e incubado por uma hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada seis vezes, a reação revelada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilendiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0 e interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N. A densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

### **Análise Estatística dos Resultados do ELISA VAIE-E12**

O programa Prisma 5.0 (GraphPad) foi utilizado para realizar o teste-t que calcula a diferença entre as médias dos valores das densidades óticas obtidas no ELISA.

## **2.2- Seleção com a biblioteca Ph.D.-12<sup>TM</sup> (Biopanning LEB)**

### **2.2.1- Purificação das IgGs provenientes dos soros de bovinos**

Amostras dos soros de bovinos foram testadas na Imunodifusão em Gel de Ágar segundo protocolo descrito por Miller e Van der Maaten 1977, utilizando o antígeno gp51 produzido em células FLK, no laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária da UFMG.

Para obtenção das IgGs totais provenientes do pool de vinte soros positivos e do pool de vinte soros negativos para infecção com VLB, foi utilizada a coluna de cromatografia por afinidade do tipo Hitrap Protein G HP, em sistema ÄKTA conforme recomendações do fabricante (GE Healthcare®). As frações de IgGs totais obtidas, foram neutralizadas após eluição da coluna com tampão de neutralização (1M Tris-HCl pH 8,0), liofilizadas e ressuspensas em água estéril deionizada.

As concentrações das IgGs purificadas e da proteína gp51 foram estimadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm, e pelo método de Bradford (1976).

Para testar a reatividade das IgGs purificadas positivas e negativas, foi realizado teste das amostras em Dot Blot. O ensaio de Dot Blot foi realizado com adsorção de 1µg de cada amostra de IgG e BSA (albumina sérica bovina) como controle, em membrana de nitrocelulose que foi posteriormente bloqueada por uma hora na solução de TBS com 5% de leite em pó desnatado à temperatura ambiente, sob agitação. Após uma lavagem com TBST 0,05%, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de bovino conjugado com peroxidase (1:5000, *Sigma*) em solução de bloqueio, por uma hora à temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi lavada cinco vezes e a reação revelada com DAB (Diaminobenzidina, *Sigma*) e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

Para averiguar a qualidade das amostras de IgGs purificadas e da proteína gp51, foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (16%). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (1% SDS, 1% Tris pH 6,8, bromophenol blue a 0,02% e 20% glicerol). A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente com tampão superior (0,1M Tris base, 0,1M Glicina e SDS 0,1%), e com tampão inferior (0,2 M Tris-HCl, pH 8,9), na voltagem de 100V. Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi corado solução de Coomassie-blue R-250 para a visualização da banda correspondente a IgG do bovino com aproximadamente 190 kDa. O marcador de peso molecular Bench Mark Protein Ladder (*Invitrogen*) foi aplicado no gel para comparação com as amostras.

### **2.2.2- Seleção Biológica (Biopanning)**

Para a seleção das sequências peptídicas ligantes às IgGs totais purificadas do soro de animais positivos para infecção com VLB, foi utilizada a biblioteca Ph.D.-12<sup>TM</sup> New England BioLabs® que contém peptídeos

randômicos e lineares de doze aminoácidos. Os peptídeos randômicos desta biblioteca possuem uma sequência composta por Gly-Gly-Gly-Ser que é fusionada à região N-terminal da proteína capsídica menor (proteína III) expressas nos fagos M13 filamentosos. Esta biblioteca apresenta aproximadamente  $2,7 \times 10^9$  possíveis seqüências.

As IgGs totais positivas purificadas foram utilizadas como alvo para seleção dos peptídeos. Os poços da placa de microtitulação (*MaxiSorp<sup>TM</sup>* - *Nunc*) foram adsorvidos com 150µl da IgG total positiva para o VLB na concentração de 100µg/mL em solução 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C, sob agitação em um recipiente contendo papel toalha umidificado.

No dia seguinte, as soluções de adsorção foram desprezadas e os poços bloqueados durante uma hora a 4°C com 250 µl do tampão de bloqueio (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6, 5 mg/ml BSA, 0.02% NaN<sub>3</sub>). A solução de bloqueio foi então desprezada e os poços adsorvidos da placa foram lavados seis vezes com a solução de TBST (TBS + 0.1% de Tween 20 v/v).

Foram diluídos 10µl ( $4 \times 10^{10}$ ) dos fagos da biblioteca original em 90µl da solução de TBST e adicionados nos poços adsorvidos com os alvos (IgGs totais positivas), seguido do período de incubação de uma hora sob leve agitação a 4°C. Após incubação com as IgGs, os fagos não ligados foram desprezados e os poços foram lavados dez vezes com a solução TBST. Os fagos ligados aos alvos foram eluídos com o tampão 0,2 M glicina-HCl, pH 2,2, contendo 1 mg/ml BSA durante 10 minutos sob agitação a 4°C. Os eluatos foram transferidos para microtubos e neutralizados com 2µl do tampão 1M Tris-HCl, pH 9,1.

Alíquotas dos fagos eluídos foram utilizadas para a determinação da titulação. O eluato remanescente contendo fagos foi utilizado para a amplificação pela infecção em *E. coli* ER2738. Foram realizados três ciclos de seleção para o enriquecimento dos fagos contendo os peptídeos ligantes. Um volume

de 80µl do eluato foi utilizado para a primeira amplificação em 20,0 mL de cultura de *E. coli* (ER2537) em fase inicial de crescimento ( $DO_{600nm} \leq 0,3$ ), contendo tetraciclina, incubando-se a cultura por 4-5 horas em agitador com temperatura de 37°C, para posterior procedimento de precipitação e titulação dos fagos amplificados.

A cultura foi transferida para um tubo *Oakridge* (*Hitachi*, 50 mL) e centrifugada durante 10 minutos a 11300 Xg, 4°C. As células residuais foram descartadas e o sobrenadante transferido para um tubo esterilizado e centrifugado novamente. Oitenta por cento do sobrenadante foi transferido para outro tubo e acrescentado 1/6 do volume com PEG/NaCl (20% peso/volume de Polietileno glicol-8000, 2,5M NaCl em água) para precipitação dos fagos amplificados. Esta mistura permaneceu em repouso por 12 horas a 4°C.

No dia seguinte, a suspensão foi centrifugada durante 15 minutos a 11300 Xg, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi centrifugado brevemente, para que o sobrenadante residual pudesse ser removido. O precipitado foi ressuspenso em 1,0 mL de TBS, transferido para um microtubo e centrifugado por 5 minutos a 11300 Xg, 4°C para sedimentar os resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para nova precipitação por adição de PEG/NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada em gelo por 1 hora e então centrifugada durante 10 minutos a 11300 Xg, 4°C. O sobrenadante foi descartado e a centrifugação foi repetida para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi ressuspenso em 200µL de TBS, obtendo-se então o eluato contendo fagos amplificados.

Os fagos amplificados no primeiro ciclo de seleção foram selecionados no segundo ciclo, com a mesma concentração das IgGs totais positivas para VLB, previamente adsorvidas nos poços da placa de microtitulação conforme descrito anteriormente. Os fagos amplificados no segundo ciclo foram selecionados no terceiro ciclo nas mesmas condições descritas. O eluato do terceiro ciclo não foi



amplificado. A partir do segundo ciclo, a estringência do tampão de lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5% de Tween-20 em todas as lavagens. No terceiro ciclo foram realizadas quinze lavagens após a retirada dos fagos.

Os procedimentos de titulação, armazenamento dos clones, precipitação, extração do DNA, sequenciamento, e de tradução e análises das sequências obtidas por bioinformática, foram realizados seguindo o mesmo protocolo previamente descrito para os clones obtidos com a biblioteca Ph.D.-C7C™ New England BioLabs® utilizada para seleção dos clones ligantes às IgGs AIE.

### **2.2.3- Análises da reatividade dos clones selecionados em imunoenaios com as IgGs positivas e negativas (VLB) purificadas**

#### **Phage-ELISA clones VLB**

Com o objetivo de selecionar os fagos reativos com as IgGs provenientes dos soros de animais positivos para infecção pelo VLB, e não reativos com as IgGs provenientes dos soros dos animais negativos para a infecção, foram realizados testes de ELISA.

Placas de alta afinidade (*MaxiSorp™ - Nunc*) de 96 poços foram divididas para adsorção das IgGs positivas e negativas purificadas. Em todas as placas utilizadas foram testadas as reatividades das amostras dos fagos selecionados em duplicata.

Quarenta e quatro poços da placa de ELISA foram adsorvidos com 1µg de IgG purificada positiva diluída em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,6), e outros quarenta e quatro poços da mesma placa foram adsorvidos com 1µg de IgG purificada negativa diluída no mesmo tampão de adsorção. Quatro poços de cada metade da placa foram utilizados como controles da reação sem adsorção com as IgGs.

As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C, sob agitação, lavadas duas vezes com

PBST 0,05% e bloqueadas com a solução de PBS com 5% leite em pó desnatado, durante uma hora à temperatura ambiente, em repouso. Depois do bloqueio as placas foram lavadas três vezes.

As amostras dos fagos precipitadas por PEG/NaCl e com as concentrações estimadas por espectrofotometria em absorbância de UV nos comprimentos de onda de 269 e 320 nm, foram diluídas para a concentração de  $1 \times 10^{11}$  fagos na solução de PBS com 1% de leite em pó. Foram acrescentadas, em duplicata, cada amostra de fago sobre as IgGs positivas e negativas adsorvidas previamente, seguido por período de incubação de uma hora em repouso a 37°C.

Amostras de fagos selvagens (controle negativo) foram diluídas nas mesmas condições e acrescentadas sobre os poços adsorvidos e não adsorvidos com as IgGs segundo layout pré-estabelecido das placas.

Após esta etapa, as placas foram lavadas seis vezes com PBST 0,05%, e incubadas por 1 hora a 37°C com anti-M13 conjugado com peroxidase (1:5000, *Sigma*) em solução PBS com 1% de leite em pó. Ao final da incubação, as placas foram novamente lavadas seis vezes e reveladas pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N e a densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

O valor do ponto de corte (*cut off*) foi calculado baseado nos valores da DO obtidos com o fago selvagem (*cut off* = média fago selvagem mais 2x desvio padrão fago selvagem). O índice ELISA foi calculado considerando-se a média DO de cada amostra dividido pelo valor de *cut off*. Valores acima de 1 foram considerados positivos.

Para verificar a diferença entre os índices ELISA obtidos da reatividade dos clones com as IgGs positivas e negativas, foi

realizado o teste-t pareado no programa STATA 10.0.

### **ELISA -Teste da reatividade da proteína gp51 com as IgGs totais positivas e negativas purificadas**

A imunoreatividade da proteína gp51 (antígeno para IDGA), com as IgGs purificadas utilizadas no biopanning foi avaliada em ensaios de ELISA. Para isso, a gp51 utilizada na IDGA foi adsorvida em placas de ELISA testando diferentes concentrações.

A gp51 foi diluída em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6) nas concentrações de 0,25µg, 0,5µg, 1µg e 2µg/poço e adsorvidas durante 18 horas a 4°C, em repouso. As placas foram lavadas três vezes com PBST 0,1% e bloqueadas durante uma hora com solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado. Os tempos do bloqueio também foram testados, com duração de 2-3 horas.

Após três novas lavagens, as IgGs totais positivas e negativas foram diluídas em PBS com 1% de leite em pó na concentração de 1µg e adicionadas nos poços das placas adsorvidos. Poços que não receberam as amostras das IgGs foram considerados o Branco da reação (B).

Após incubação de 2 horas à temperatura ambiente, em repouso, as placas foram lavadas seis vezes e incubadas com anticorpo anti-IgG de bovino conjugado com peroxidase (*Sigma*) diluído em solução PBS com 1% de leite em pó. As diluições do conjugado 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:7500 e 1:10000 foram testadas, e incubadas durante uma hora à temperatura ambiente, em repouso.

As placas foram lavadas seis vezes e a reação revelada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (2N) e a densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas Titertek Multiskan Plus (Flow

Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm. O valor do ponto de corte (*cut off*) foi calculado com os valores da DO obtidos com as IgGs negativas (*cut off* = média IgGs negativas mais 2x desvio padrão das IgGs negativas).

### **Dot Blot**

O ensaio de Dot Blot foi realizado para verificar reatividade dos fagos com as IgGs positivas e negativas purificadas.

A membrana de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) com poro de 0,2 µm foi sensibilizada com cada amostra dos fagos na ordem de 10<sup>11</sup>. O fago selvagem e 1µg da proteína gp51 foram também sensibilizados. Após sensibilização, as membranas foram bloqueadas com solução de TBS com 5% de leite em pó desnatado durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação e lavadas uma vez com TBST 0,05%.

As IgGs purificadas positivas e negativas foram utilizadas como anticorpos primários na concentração de 400µg, diluídas em solução de bloqueio, e incubadas com as membranas durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram lavadas cinco vezes com TBST 0,05%, e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de bovino conjugado com peroxidase (1:5000, *Sigma*) em solução de bloqueio, durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. Após cinco lavagens com TBST 0,05%, a reação foi revelada com DAB (*Sigma*), e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### **Dot Blot competição (IgGs)**

As amostras dos fagos selecionadas foram submetidas à competição com a gp51 para a ligação à IgG positiva purificada, em solução, no protocolo de Dot Blot.

A membrana de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) com poro de 0,2 µm foi sensibilizada com fago selvagem e com cada amostra dos fagos selecionados na ordem de 10<sup>11</sup>, e com 1µg da proteína gp51.

O bloqueio e as lavagens foram realizadas conforme descrito anteriormente.

Foi testada a competição utilizando a IgG positiva como anticorpo primário na concentração de 400µg diluída em solução de bloqueio, em solução com a proteína gp51, nas concentrações de 120µg, 480µg, 1000µg, 1500µg e 2000µg. Todas as amostras dos fagos selecionados, fago selvagem, e da proteína gp51 sensibilizadas nas membranas, foram submetidas à incubação com 400µg IgG positiva pura. Seguido de um período de incubação de 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-bovino conjugado com peroxidase (Sigma) nas mesmas condições anteriormente descritas. Após cinco lavagens com TBST 0,05%, a reação foi revelada com DAB (Sigma) e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### **Western Blot**

Para confirmar se os peptídeos fusionados na proteína III dos clones selecionados são imunoreativos com as IgGs totais purificadas, e se diferenciam entre as IgGs positivas e negativas, foram realizados testes de Western Blot (WB).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (16%) foi realizada com os clones precipitados na concentração de  $1 \times 10^{12}$  de cada fago selecionado,  $1 \times 10^{12}$  fago selvagem (controle negativo), e 10µg da proteína gp51. As amostras foram eletrotransferidas durante 2 horas, na amperagem de 280 mA a 4°C, para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia) com poro de 0,2 µm, e bloqueadas em solução de TBS com 5% de leite em pó desnatado durante uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes com solução de TBST 0,05% (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20).

Foram utilizados 400µg de cada das IgGs purificadas (positiva e negativa) como anticorpos primários, que foram incubados com as amostras nas membranas durante

uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente, seguido por três lavagens com TBST 0,05%. Anticorpo secundário anti-IgG bovino conjugado com peroxidase (1:5000, Sigma) diluído em solução de bloqueio, foi adicionado sobre cada membrana. Elas foram incubadas durante uma hora, sob agitação à temperatura ambiente e posteriormente lavadas três vezes com solução TBST 0,05%. A reação foi revelada por adição do substrato DAB (Sigma) e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### **2.2.4- Análises da reatividade dos clones selecionados no biopanning e nos imunoenaios, com as amostras dos soros de bovinos naturalmente infectados e não infectados com VLB**

A segunda etapa de avaliação da reatividade dos clones de fagos foi realizada por meio de imunoenaios do tipo ELISA, Western Blot, e Dot Blot, com amostras dos soros de bovinos.

Os clones não reagentes com a IgG negativa e reativos apenas com as IgGs positivas purificadas foram selecionados nos imunoenaios ELISA, Western Blot e Dot Blot acima descritos. As amostras dos soros dos bovinos foram previamente testadas na Imunodifusão em Gel de Ágar segundo protocolo descrito por Miller e Van der Maaten (1977).

### **ELISA – Teste da reatividade da proteína gp51 com as amostras dos soros positivos e negativos para infecção com VLB**

A imunoreatividade da proteína gp51 com os soros dos animais positivos e negativos, foi avaliada em ensaios de ELISA.

A gp51 utilizada na IDGA foi adsorvida em placas de ELISA (MaxiSorp™ - Nunc) em diferentes concentrações.

A proteína foi diluída em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,6) nas concentrações de 0,25µg, 0,5µg, 1µg e 2µg/poço e adsorvida durante 18 horas a 4°C, em repouso. As placas foram lavadas

duas vezes com PBST 0,1% e bloqueadas durante 2 horas com solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado.

Após três lavagens, as amostras dos soros foram diluídas em PBS com 1% de leite em pó nas concentrações de 1:50 e 1:100 em duplicata, e incubadas nas placas adsorvidas por 2 horas à temperatura ambiente, em repouso. Poços que não receberam as amostras de soros foram considerados o Branco da reação. As placas foram lavadas seis vezes e incubadas com anticorpo anti-bovino conjugado com peroxidase (*Sigma*) diluído em solução PBS com 1% de leite em pó. As diluições do conjugado 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:7500 e 1:10000 foram testadas, e incubadas durante uma hora à temperatura ambiente, em repouso.

As placas foram lavadas seis vezes e a reação revelada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (2N) e a densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm. O valor do ponto de corte (*cut off*) foi calculado com os valores da DO obtidos com os soros negativos em cada diluição testada (*cut off* = média amostras negativas mais 2x desvio padrão das amostras negativas).

### Phage-ELISA VLB

Foi testada a imunoreatividade dos clones de fagos selecionados com as amostras dos soros provenientes de animais positivos e negativos para infecção com o VLB.

As amostras dos fagos selecionados e do fago selvagem foram diluídas na concentração de  $1 \times 10^{11}$  em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,6), para adsorção em poços das placas de ELISA (*MaxiSorp<sup>TM</sup>* - *Nunc*). Após adsorção por 18 horas a 4°C, as soluções foram descartadas, as placas foram lavadas duas vezes com solução PBST 0,05% e bloqueadas com

solução PBS com 5% leite em pó durante uma hora. Após três lavagens, vinte amostras de soros positivos e vinte soros negativos foram diluídas 1:50 e 1:100 em solução PBS com 1% leite em pó desnatado, e adicionadas nos poços, em duplicata, de acordo com layout da placa. Poços adsorvidos que não receberam amostras de soros foram considerados Branco da reação.

Seguido de incubação durante uma hora à temperatura ambiente, foram realizadas seis lavagens. O anticorpo secundário anti-bovino conjugado com peroxidase (1:5000, *Sigma*) foi diluído em PBS com 1% leite em pó desnatado e incubado nos poços por uma hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada seis vezes, a reação revelada com adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0 interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N. A densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

O valor do ponto de corte (*cut off*) foi calculado para cada diluição dos soros testada, com o cálculo da média dos valores da DO do fago selvagem com os soros positivos e negativos, e os valores de todos os fagos testados com todos os soros negativos) mais 2x desvio padrão dos mesmos valores. A partir do *cut off*, foram calculados os índices ELISA positivos e negativos para cada amostra de fago testada: i) Índice ELISA positivo para cada fago = valor médio da DO obtida com todos os soros positivos/ *cut off* ; ii) Índice ELISA negativo para cada fago = valor médio da DO obtida com todos os soros negativos/ *cut off*. A razão entre os índices ELISA positivos e negativos (IE+/IE-), para cada amostra, foi calculada. Os fagos que apresentaram os maiores valores da IE+/IE- foram selecionados.

### Dot Blot

O ensaio de Dot Blot foi realizado para verificar imunoreatividade dos fagos com os

soros positivos e negativos para infecção pelo VLB.

A membrana de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) com poro de 0,2  $\mu\text{m}$  foi sensibilizada com 1 $\mu\text{g}$  da proteína gp51, e com os fagos selecionados e selvagem na ordem de  $10^{11}$ . Após sensibilização, as membranas foram bloqueadas com solução de TBS com 5% de leite em pó desnatado durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação e lavadas uma vez com TBST 0,05%.

Vinte amostras dos soros positivos e vinte negativos foram testadas. Para descobrir a condição ideal para a reação, foram realizadas as diluições com os soros 1:100, 1:500, 1:750, 1:1000 e 1:1250 em solução de bloqueio, e incubadas com as membranas durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram lavadas cinco vezes com TBST 0,05%, e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de bovino conjugado com fosfatase alcalina (1:5000, *Sigma*) diluído em solução de bloqueio, durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. Após cinco lavagens com TBST 0,05%, a reação foi revelada com NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (*Sigma*), e interrompida com  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada.

### Western Blot

Foi realizado ensaio de Western Blot para verificar a imunoreatividade dos peptídeos fusionados na proteína III dos clones selecionados, com os soros de animais positivos e negativos para infecção pelo VLB.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (16%) foi realizada com os clones precipitados na concentração de  $1 \times 10^{12}$  de cada fago selecionado,  $1 \times 10^{12}$  fago selvagem (controle negativo), e 10 $\mu\text{g}$  da proteína gp51. As amostras foram eletrotransferidas durante 2 horas, na amperagem de 280 mA a 4°C, para membranas de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) com poro de 0.2  $\mu\text{m}$ , e bloqueadas em solução de TBS com 5%

de leite em pó desnatado durante uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes com solução de TBST 0,05% (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20).

Os soros positivos e negativos foram diluídos 1:500 em solução de bloqueio, e incubados com as membranas durante uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente, seguido por três lavagens com TBST 0,05%. Anticorpo secundário anti-IgG de bovino conjugado com fosfatase alcalina (1:5000, *Sigma*) foi diluído em solução de bloqueio, e adicionado sobre cada membrana. Elas foram incubadas durante uma hora, sob agitação à temperatura ambiente e posteriormente lavadas três vezes com solução TBST 0,05%. A reação foi revelada com NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (*Sigma*), e interrompida com  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada.

### Dot Blot competição (soros)

As amostras dos fagos capazes de diferenciar os soros positivos e negativos em Dot Blot foram selecionadas e submetidas à competição com a gp51, em solução, para a ligação aos anticorpos dos soros positivos.

As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras e sensibilizadas com fago selvagem e com cada amostra dos fagos selecionados na ordem de  $10^{11}$ , e com 1 $\mu\text{g}$  da proteína gp51. O bloqueio e as lavagens foram realizadas conforme descrito anteriormente. As amostras dos soros positivos e negativos (controle) foram diluídas 1:1000 em solução de bloqueio. Cada amostra de soro positivo, diluído 1:1000, foi também testada em solução com 1500 $\mu\text{g}$  da proteína gp51, para verificar a presença de competição.

Todas as amostras dos fagos selecionados, fago selvagem, e da proteína gp51 sensibilizadas nas membranas, foram submetidas à incubação com soros positivos, soros negativos, e com cada soro positivo misturado à gp51 (teste de competição).

Seguido de um período de incubação de 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de bovino conjugado com fosfatase alcalina (1:5000, *Sigma*) nas mesmas condições anteriormente descritas. Após cinco lavagens com TBST 0,05%, a reação foi revelada com NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (*Sigma*), e interrompida com H<sub>2</sub>O deionizada.

### 2.2.5- Análises por bioinformática

Os peptídeos selecionados nos imunoenaios realizados com as amostras dos soros dos animais positivos e negativos para infecção causada pelo VLB foram analisados por ferramentas de bioinformática.

A procura por similaridade entre as sequências peptídicas selecionadas, foi realizada pelo programa Clustal W versão 18.1 ([www.ebi.ac.uk/clustalW/](http://www.ebi.ac.uk/clustalW/)), através de alinhamentos múltiplos entre os peptídeos. As sequências dos peptídeos selecionadas foram analisadas quanto à homologia com sequências de proteínas do VLB depositadas no “GENEBANK” através do programa BLAST — Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Para encontrar o ponto máximo de similaridade entre todos os peptídeos selecionados nos imunoenaios, com as proteínas do VLB de interesse encontradas no Blast, foi utilizado o programa MATCH disponível no site <http://relic.bio.anl.gov/match.aspx/>. O índice de antigenicidade de cada peptídeo selecionado foi estimado pelo programa DNASTAR 4.0 — Lasergene, PROTEAN.

### 2.2.6- Síntese do peptídeo sintético contendo epítopos miméticos do vírus da Leucose Bovina (VLB)

Foi utilizado o sistema de múltiplos peptídeos miméticos (ou MAPs do Inglês “Multiple Antigens Peptides”) a partir dos

clones de fagos selecionados e caracterizados por *phage display* e nos imunoenaios.

O peptídeo sintético foi esquematizado com quatro repetições peptídicas, em tandem, tendo o mesmo espaçador (GGGS), e com amidação C-terminal, para estabilização da estrutura peptídica. O peptídeo foi sintetizado pela empresa Genscript ([www.genscript.com](http://www.genscript.com)).

### 2.2.7- Testes da reatividade do peptídeo sintético VLB-Ph

O peptídeo sintético denominado VLB-Ph construído a partir das sequências obtidas nas seleções, apresenta sessenta resíduos de aminoácidos, peso molecular de 6117,1, ponto isoelétrico (PI) de 12,4, e a carga positiva em pH 7,0 de + 4,4.

O peptídeo foi diluído em água deionizada estéril, e sua concentração estimada por espectrofotometria no comprimento de onda de 280nm, e pelo método de Bradford (1976). Para verificar a reatividade do peptídeo VLB-Ph com as amostras dos soros de bovinos foram realizados testes em ELISA.

### ELISA VLB-Ph

As placas de alta afinidade (*MaxiSorp™* - *Nunc*) de 96 poços foram adsorvidas com 1µg do peptídeo diluído em tampão Bicarbonato (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,6) e incubadas por 18 horas a 4°C, em repouso. Após o período de adsorção, os poços foram lavados duas vezes com PBST 0,05% e bloqueados com a solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado, durante uma hora à temperatura ambiente, em repouso. Depois do bloqueio as placas foram lavadas duas vezes.

Trinta amostras dos soros de bovinos positivos e 30 amostras negativas para infecção pelo VLB (previamente testadas na IDGA segundo protocolo descrito por Miller e Van der Maaten (1977), foram testadas nas diluições 1:50, 1:100, 1:250, 1:300 e 1:400 em solução PBS com 1% leite em pó

desnatado, e 100µl de cada diluição foram adicionados nos poços, em duplicata, de acordo com layout da placa. Os poços adsorvidos que não receberam amostras de soros foram considerados Branco da reação. Seguido do período de incubação de uma hora à temperatura ambiente, foram realizadas seis lavagens com PBST 0,05%.

O anticorpo secundário anti-IgG de bovino conjugado com peroxidase (*Sigma*) foi testado nas diluições 1:5000 e 1:7500 em solução PBS com 1% leite em pó desnatado, adicionado o volume de 100µl em cada poço, e incubado por uma hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada seis vezes, a reação revelada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0 e interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N. A densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro de placas Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

#### **Análises dos Resultados do ELISA VLB-Ph**

O programa Prisma 5.0 (GraphPad) foi utilizado para realizar o teste-t que calcula a diferença entre as médias dos valores das densidades óticas obtidas no ELISA.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1- Resultados da seleção com a biblioteca Ph.D.-C7C™**

##### **3.1.1- Purificação das IgGs positivas e negativas dos soros de equídeos**

As imunoglobulinas foram purificadas do pool de soros (3 mL) de equídeos positivos e negativos para AIE, com uso das colunas de cromatografia por afinidade. O rendimento das IgGs foi de aproximadamente 5µg/µl, e as amostras caracterizadas parcialmente quanto à pureza por SDS-PAGE em condições não redutoras. A figura 3 mostra o padrão eletroforético das preparações de IgGs purificadas comparadas com pool de soros e também com o marcador de peso molecular (M).

As IgGs positivas e negativas purificadas foram testadas em Dot Blot por meio de incubação com anticorpo anti-IgG de equinos conjugado com peroxidase, e apresentaram forte reatividade com o conjugado (dados não mostrados).

O processo de purificação de imunoglobulinas a partir do pool de soros mostrou ser eficiente, sendo verificada a presença de uma banda forte de aproximadamente 150 kDa nas amostras do pool de soros e nas IgGs purificadas, correspondente ao peso molecular das IgGs dos equinos.

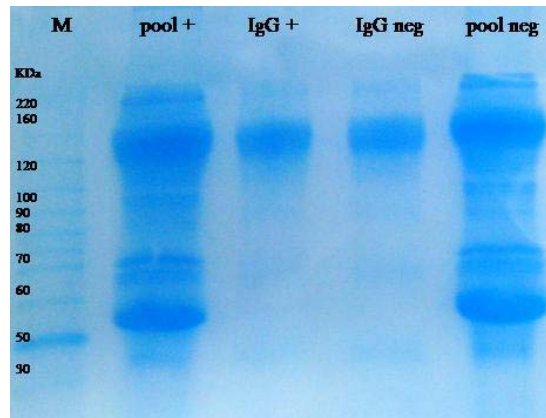


Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (16%) das amostras de IgGs totais positivas e negativas purificadas e do pool de soros de equídeos positivos e negativos para Anemia Infecciosa Equina. M= marcador de peso molecular; pool + = pool de vinte soros provenientes de animais positivos para AIE; pool neg = pool de vinte soros provenientes de animais negativos para AIE; IgG + = imunoglobulinas IgG purificadas do pool de soros positivos; IgG neg = imunoglobulinas IgG purificadas do pool de soros negativos.

### 3.1.2- Titulação dos fagos

Todos os eluatos contendo fagos amplificados e não amplificados foram titulados para estimar a quantidade de fagos selecionados nos quatro ciclos de seleção com a biblioteca Ph.D.-C7C. As colônias de bactérias ER2738 infectadas com fagos presentes nas placas de titulação apresentam coloração azul, indicando a quebra do substrato X-Gal, devido à expressão do gene da  $\beta$ -galactosidase presente nos fagos.

Os títulos de entrada dos fagos nos ciclos de seleção foram maiores que os títulos de saída (tabela 1), pois os fagos com maior afinidade para a IgG positiva ficam ligados e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade são removidos nos processos de lavagem. Foi observado que os títulos de saída apresentaram aumento gradual na quantidade de fagos do primeiro ao quarto ciclo, ocorrendo maturação da afinidade dos clones durante as etapas de seleção, e demonstrando que a seleção dos clones foi direcionada ao alvo.

Tabela 1 - Título obtido (ufc/ $\mu$ L) no processo de seleção dos fagos da biblioteca Ph.D.-C7C<sup>TM</sup> ligantes às IgGs provenientes do pool de soros positivos para AIE

Ciclos de seleção	Título de entrada ufc/ $\mu$ L	Título de saída ufc/ $\mu$ L	Lavagens TBST (%) Tween 20
1º	$4,0 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^3$	0,1% 10 lavagens
2º	$4,0 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^4$	0,5% 10 lavagens
3º	$5,2 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^6$	0,5% 10 lavagens
4º	$3,3 \times 10^{10}$	$4,6 \times 10^7$	0,5% 15 lavagens



### 3.1.3- Extração do DNA dos fagos selecionados

Para verificar a qualidade e estimar a concentração das amostras do DNA dos fagos selecionados no quarto ciclo de seleção, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. As amostras do DNA foram

submetidas à eletroforese no mesmo gel onde foi aplicado o padrão DNA do fago M13 contendo 400ng de DNA para comparação da intensidade das bandas. Foi observada adequada qualidade e quantidade obtidas nas extrações das amostras do DNA dos clones de fagos selecionados (Figura 4).

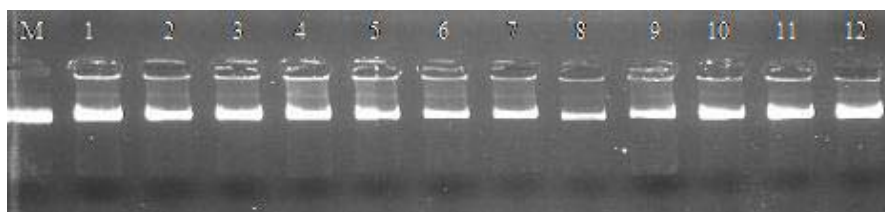


Figura 4 - Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Canaleta M= DNA do fago M13 padrão contendo 400 ng de DNA; canaletas 1-12= Amostras do DNA extraído dos fagos selecionados no quarto ciclo de seleção.

### 3.1.4- Reação de Sequenciamento

A leitura da reação de sequenciamento foi realizada em sequenciador automático do tipo *MegaBace 1000* (*Amersham Biosciences*) no Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU). A análise das sequências de DNA provenientes do sequenciador automático foi processada em software do próprio equipamento. Somente as sequências que não apresentaram erros foram traduzidas.

Foram obtidas trinta e duas sequências a partir da seleção com a biblioteca Ph.D.-C7C que foram posteriormente traduzidas.

### 3.1.5- Tradução e análise das sequências

As sequências do DNA obtidas foram traduzidas, após o sequenciamento com o auxílio do programa DNA2PRO. Dos trinta e dois clones sequenciados, apenas vinte e oito apresentaram sequências válidas (sem erros de sequenciamento ou recombinação), sendo identificadas vinte e três sequências diferentes. Conforme representado na tabela 2, a sequência TATSHLF repetiu quatro vezes (quatro clones iguais) e a sequência GNSWYNS apresentou três repetições.

Tabela 2 - Frequência das sequências válidas geradas pelo programa DNA2PRO após o sequenciamento dos clones selecionados da biblioteca Ph.D.C7C™

Clone	Sequência aa	Frequência
A1	SGIQPLL	1/28
A2	PQKMNEM	1/28
A4	LSDSHLF	1/28
A5	NHWAPRL	1/28
A6	QVSAPNQ	1/28
B2	NPMSHTF	1/28
B4	GELTLKF	1/28
B6, C9, E12, H9	TATSHLF	4/28
C2	HTFWEDET	1/28
C4	SSNSHLF	1/28
C8	LSETHHF	1/28
C12	QENSLRF	1/28
D4	NPLTHSF	1/28
D5	QLQITGT	1/28
D11	PQWSHQF	1/28
E1	SPNSHNF	1/28
E4	SQIQPLL	1/28
E6	SSSTHYF	1/28
E10	PNDSYLS	1/28
F10, G3, H6	GNSWYNS	3/28
G1	SQLSAHS	1/28
G8	NATSHYF	1/28
H1	EMTSHSF	1/28

Na tabela 3 estão apresentados os cálculos das frequências totais de cada aminoácido presente nos peptídeos sequenciados, suas posições nos peptídeos e a diversidade dos aminoácidos, executados pelo programa AAFREQ.

Nessa tabela também são apresentadas as frequências esperadas e observadas de cada aminoácido. Foi observada uma maior frequência dos aminoácidos Histidina, Leucina e Serina.

Tabela 3 - Frequência dos aminoácidos selecionados gerada pelo programa AAFREQ, para a biblioteca Ph.D.- C7C™ (#1 - #7 = posição dos aminoácidos)

Aminoácidos	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	TOTAL	Frequência Obtida (%)	Frequência Esperada (%)
A (Alanina)	0	2	0	2	1	0	0	5	3,11	6,2
C (Cisteína)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D (Aspartato)	0	0	2	0	1	0	0	3	1,86	3,1
E (Glutamato)	1	2	1	0	0	2	0	6	3,73	3,1
F (Fenilalanina)	0	0	1	0	0	0	13	14	8,7	3,1
G (Glicina)	2	1	0	0	0	1	0	4	2,48	6,2
H (Histidina)	1	1	0	0	11	2	0	15	9,32	3,1
I (Isoleucina)	0	0	2	1	0	0	0	3	1,86	3,1
K (Lisina)	0	0	1	0	0	1	0	2	1,24	3,1
L (Leucina)	2	1	3	0	2	6	3	17	10,56	9,4
M (Metionina)	0	1	1	1	0	0	1	4	2,48	3,1
N (Asparagina)	4	2	3	0	1	3	0	13	8,07	3,1
P (Prolina)	3	3	0	0	4	0	0	10	6,21	6,2
Q (Glutamina)	3	4	1	2	0	1	1	12	7,45	6,2
R (Arginina)	0	0	0	0	0	2	0	2	1,24	9,4
S (Serina)	6	4	3	11	0	2	3	29	18,01	9,4
T (Treonina)	1	1	3	4	1	1	2	13	8,07	6,2
V (Valina)	0	1	0	0	0	0	0	1	0,62	6,2
W (Triptofano)	0	0	2	2	0	0	0	4	2,48	3,1
Y (Tirosina)	0	0	0	0	2	2	0	4	2,48	3,1
Consenso	S	Q/S		S	H	L	F	161		

## Alinhamento das seqüências peptídicas

A procura por similaridade entre as vinte e três seqüências peptídicas diferentes foi realizada pelo programa Clustal W versão 18.1 através de alinhamentos múltiplos. Conforme demonstrado na figura 5, foram revelados alguns motivos comuns entre os peptídeos selecionados: SHLF, ATSHxF, SHxF, THxF e IQPLL.

Alinhamentos dos peptídeos	
C8	LSETHHF-7
E6	SSSTHYE-7
A4	LDSHLF-7
C4	SSNSHLF-7
E1	SPNSHNF-7
E12	TATSHLF-7
G8	NATSHYF-7
H1	EMTSHSF-7
D11	PQWSHQF-7
B2	NPMSHTF-7
D4	NPLTHSE-7
C2	HTFWDET-7
B4	GELTLKF-7
C12	QENSLRF-7
G1	SQLSAHS-7
A6	QVSAPNQ-7
E10	PNDSYLS-7
A1	SGIQPLL-7
E4	SQIQPLL-7
A2	PQKMNEM-7
A5	NHWAPRL-7
H6	GNSWYNS-7
D5	QLQITGT-7

Figura 5 - Alinhamento dos peptídeos selecionados a partir da biblioteca Ph.D.-C7C™ gerado pelo programa Clustal W 18.1

## 3.1.6- Resultados da seleção dos fagos nos imunoenaios com IgGs purificadas

### Phage ELISA

Após as análises por bioinformática das seqüências peptídicas obtidas, foi dado início ao processo de seleção dos clones nos imunoenaios.

Primeiramente, foi testada no ELISA a reatividade dos fagos com as IgGs purificadas. Apenas os fagos reativos com as IgGs provenientes do pool de soros positivos para AIE, e não reativos com as IgGs provenientes do pool de soros dos animais negativos foram selecionados. Os índices ELISA maiores que 1 foram considerados positivos (figura 6). Nesta primeira etapa foram selecionados onze clones: C3, C4, C8, C9, D4, D11, E1, E12, G3, H1 e H9.

Para verificar a diferença entre os índices ELISA obtidos da reatividade dos onze clones com as IgGs positivas e negativas, foi realizado o teste-t pareado no programa STATA 10.0. O valor de  $p < 0,001$  indica a diferença significativa na reatividade dos fagos com as IgGs positivas e negativas.

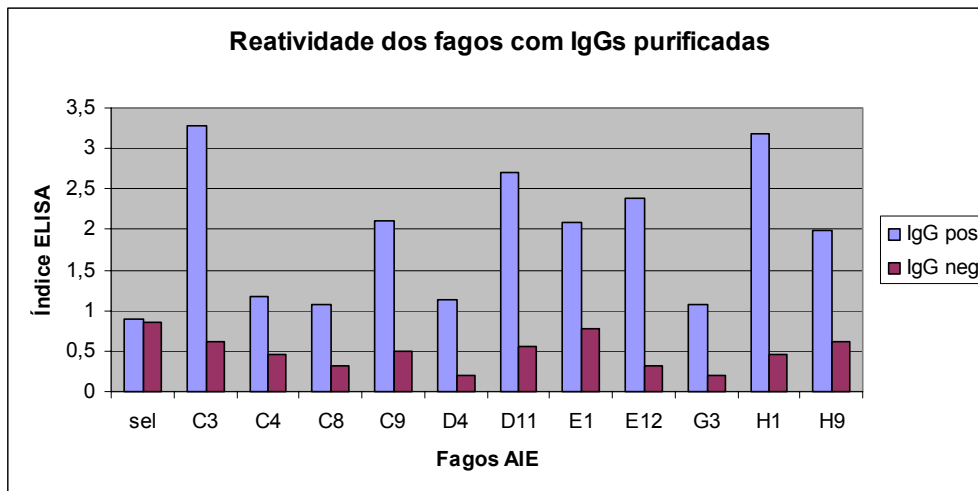


Figura 6 - Phage ELISA: reatividade dos clones de fagos com IgG proveniente do pool de soros positivos para AIE

### Teste da reatividade da proteína rgp90 com as amostras de Igs positivas e negativas purificadas

Foram realizados testes de ELISA variando as concentrações da proteína recombinante gp90, adsorvida em placas, para avaliar se esta proteína apresentava diferença de reatividade com as amostras de IgGs positivas e negativas purificadas, e se poderia ser utilizada como controle nas reações.

A proteína recombinante gp90 apresentou maior reatividade com as IgGs positivas do que com as IgGs negativas em todas as concentrações testadas (figura 7). O teste-t foi realizado no programa STATA 10.0 para verificar a diferença da reatividade da proteína com as IgGs positivas e negativas. O valor de  $p < 0,001$  obtido para todas as concentrações da rgp90 avaliadas no ensaio, indica diferença significativa na reatividade da proteína com as IgGs. Portanto, a rgp90 foi utilizada como controle nos imunoenaios com os fagos.

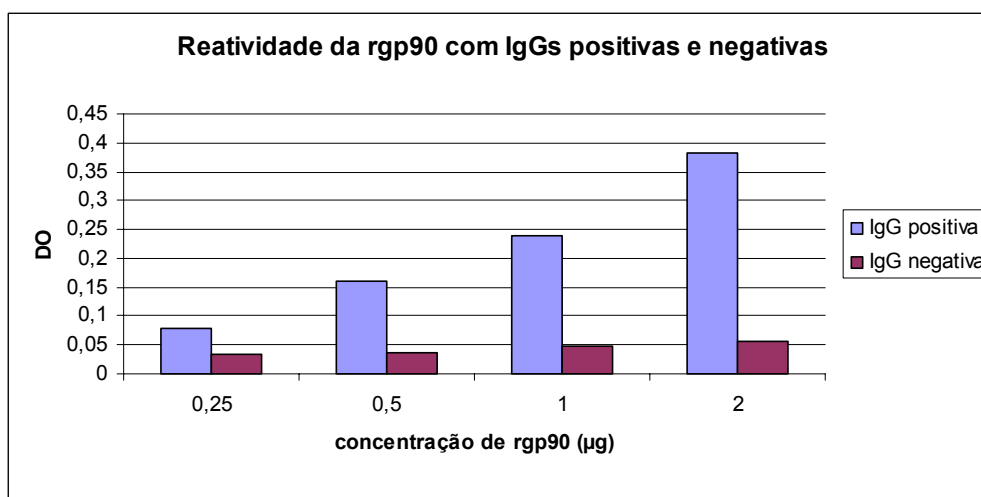


Figura 7 - Teste da reatividade da rgp90 com as imunoglobulinas purificadas do pool de soros positivos e negativos para AIE

## ELISA- Competição A e B

Dois formatos do ensaio de competição em ELISA, denominados competição “A” e “B”, foram realizados para verificar se os fagos selecionados e reativos apenas com as amostras de IgG positiva, eram capazes de competir com a proteína rgp90 para a ligação à IgG positiva.

No ELISA denominado “competição A” os poços das placas foram adsorvidos com as IgGs positivas e acrescentado sobre eles uma mistura de fago ( $1 \times 10^{11}$ ) com rgp90, variando as concentrações da rgp90. Foi observado que aumentando a quantidade de proteína em solução com os fagos, menor foi a reatividade dos fagos com as IgGs adsorvidas em placa, demonstrando que ocorre competição da rgp90 com todos os fagos para ligação às IgGs (figura 8). No programa STATA 10.0 foi calculado o coeficiente de variação para cada fago no experimento: C3 = 26%; C4 = 45%; C8 = 36%; C9 = 33%; D4 = 38%; D11 = 31%; E1 = 42%; E12 = 83%; G3 = 38%; H1 = 46%; H9 = 35%; selvagem = 26%. O fago E12

apresentou a maior queda na leitura da absorbância quando aumentam as concentrações de rgp90, indicando uma maior competição deste fago em relação aos outros clones (figura 8).

No ELISA “competição B” os poços das placas foram adsorvidos com a proteína rgp90. Foram adicionados nos poços adsorvidos as suspensões dos fagos variando nas concentrações de  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{10}$  e  $1 \times 10^9$ , misturados com  $1 \mu\text{g}$  das IgGs positivas purificadas. Poços que foram incubados apenas com as IgGs positivas (sem adição de fagos) foram considerados como controle do teste de competição.

Foi observado neste experimento que nos poços onde não foram acrescentados os fagos, a reatividade da proteína rgp90 foi mais acentuada com as IgGs positivas do que nos poços que continham os fagos, independente da concentração de fagos utilizada. Este resultado novamente demonstrou a competição dos fagos com a rgp90 para ligação às IgGs positivas (figura 9).

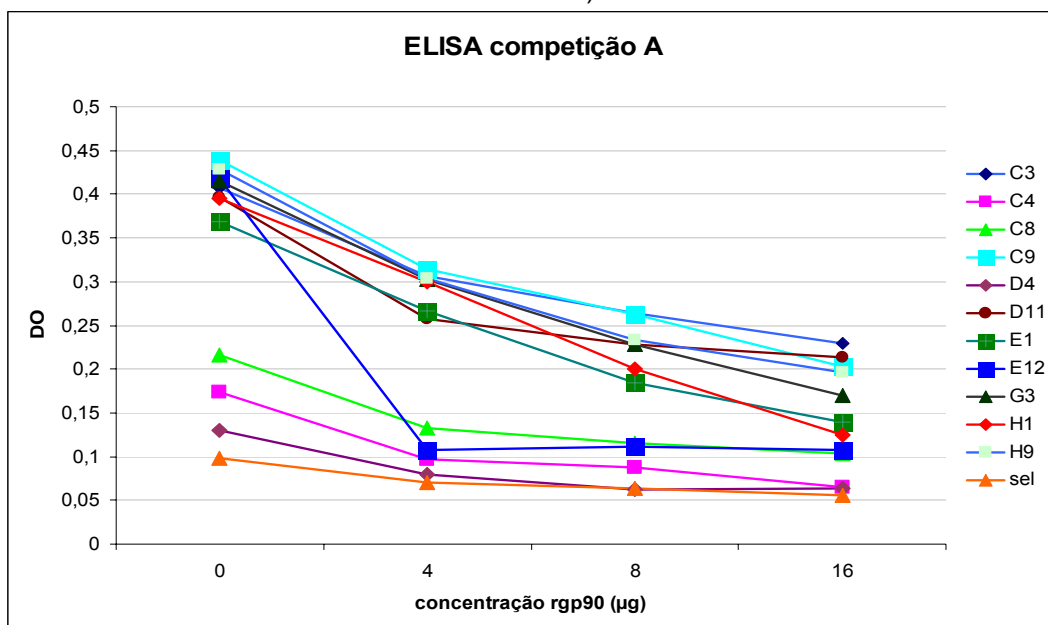


Figura 8 - ELISA Competição A: fagos ( $1 \times 10^{11}$ ) em solução com rgp90 (em variadas concentrações) competindo para ligação à IgG purificada positiva.

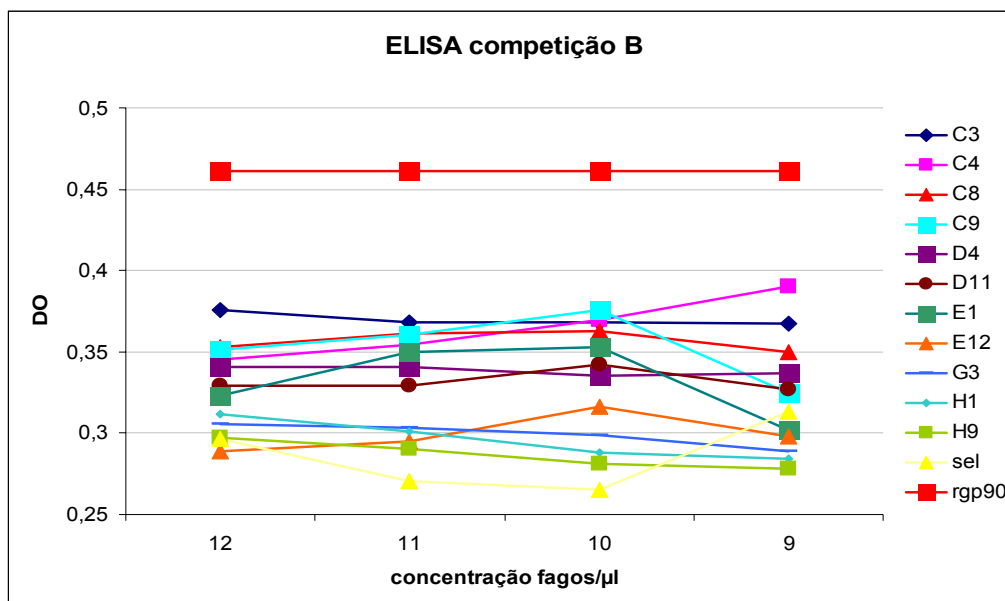


Figura 9 - ELISA Competição B: fagos em variadas concentrações ( $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{10}$  e  $1 \times 10^9$ ) e rgp90 adsorvida, competindo para ligação com IgG positiva.

### Western Blot

Os testes de Western Blot (WB) foram realizados para verificar que apenas os peptídeos fusionados na proteína III dos clones de fagos selecionados são especificamente reconhecidos pelas IgGs totais purificadas, e não outras proteínas componentes da partícula viral do fago.

Foi realizada a eletroforese em gel SDS-Page 16% das proteínas dos fagos precipitados na concentração de  $1 \times 10^{12}$  (para cada fago selecionado),  $1 \times 10^{12}$  do fago selvagem (controle negativo), e  $10 \mu\text{g}$  da proteína rgp90 (controle positivo). Após a eletrotransferência para membranas de

nitrocelulose foi verificada a reação específica das IgGs positivas com a pIII (~42 Kda) de quase todos os clones selecionados no biopanning e nos ensaios de ELISA.

Conforme esperado, o fago selvagem não apresentou reatividade com as IgGs. Este fago é utilizado como controle negativo pois não apresenta peptídeo fusionado à pIII. A proteína rgp90 (controle positivo) reagiu especificamente com as IgGs (figura 10).

Os fagos C3, C8 e H1 não reagiram no ensaio de WB. Apenas os fagos C4, C9, D4, D11, E1, E12, G3 e H9 foram positivos no WB com as IgGs positivas.

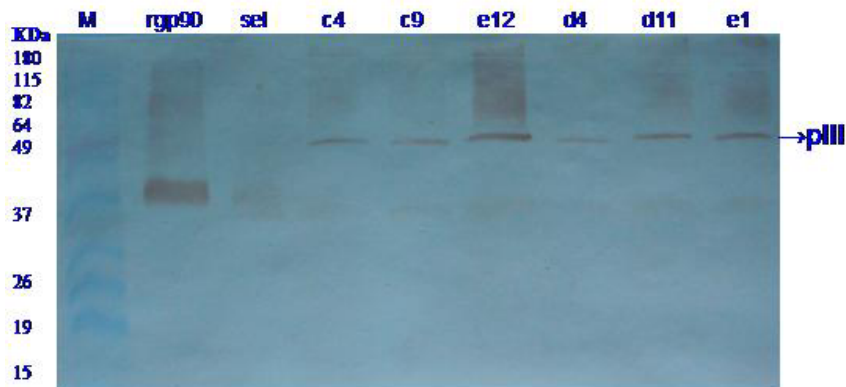


Figura 10 - Ensaio de WB: reatividade da proteína pIII dos clones de fagos selecionados com as IgGs positivas. Canaleta M = marcador de peso molecular; rgp90 = proteína gp90 recombinante; sel = fago selvagem.

### Western Blot Competição

O protocolo de WB foi também utilizado para verificar se as amostras dos fagos selecionados e imobilizados na membrana de nitrocelulose, competiam com a rgp90 em solução para a ligação às IgGs positivas.

Amostras dos clones C4, C9, D4, D11, E1, E12, G3 e H9 na concentração de  $1 \times 10^{12}$  e  $10 \mu\text{g}$  da proteína rgp90, foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. As concentrações de  $20 \mu\text{g}$ ,  $40 \mu\text{g}$ ,  $80 \mu\text{g}$  e  $160 \mu\text{g}$  da rgp90 foram testadas.

Cada concentração da rgp90 foi misturada com  $400 \mu\text{g}$  de IgG positiva, e esta mistura

foi incubada sobre cada amostra de fago selecionado imobilizado nas membranas. As membranas com os fagos imobilizados que foram incubadas apenas com  $400 \mu\text{g}$  de IgG positiva (sem adição de rgp90) foram consideradas como controle do experimento de competição.

Apenas o fago E12 apresentou competição visível com a proteína rgp90 testada na concentração de  $160 \mu\text{g}$ . Os outros fagos não demonstraram competição com a proteína no ensaio (figura 11). Este resultado confirmou resultados anteriormente obtidos no ELISA competição, quando o fago E12 apresentou maior grau de competição com a rgp90 do que os outros fagos.





Figura 11 - Western blot competição: fagos imobilizados competindo com a rgp90 em solução, para ligação às IgGs positivas AIE. M = marcador de peso molecular; D4 -D11 - E12 s/rgp90 = membranas incubadas em solução contendo 400µg de IgG positiva sem adição de rgp90; D4 – D11 – E12 80µg = membranas incubadas em solução contendo 400µg de IgG positiva com adição de 80µg da proteína rgp90 (competição); D4 – D11 – E12 160µg = membranas incubadas em solução contendo 400µg de IgG positiva com adição de 160µg da proteína rgp90 (competição).

### Dot Blot

A reatividade dos fagos com as IgGs purificadas foi também verificada em ensaios de Dot Blot. Neste teste, as partículas dos fagos C3, C4, C8, C9, D4,

D11, E1, E12, G3, H1 e H9 foram adsorvidas em membranas de nitrocelulose e incubadas com as imunoglobulinas positivas e negativas purificadas. Os fagos que melhor diferenciaram as IgGs positivas e negativas foram: C4, C8, C9, E12, H1 e H9 (figura 12).



Figura 12 - Reatividade dos fagos seleccionados com IgGs AIE positivas e negativas (membrana superior incubada com solução de IgGs purificadas positivas; membrana inferior incubada com solução de IgGs purificadas negativas).

### Dot Blot competição

Neste ensaio as amostras dos fagos selecionadas foram submetidas à competição com a rgp90 para a ligação à IgG positiva purificada.

As IgGs foram colocadas em solução com a proteína rgp90 nas concentrações de 80µg e 120µg. Todas as amostras dos fagos selecionados, fago selvagem (controle negativo), e a proteína rgp90 (controle positivo) foram adsorvidas nas membranas e incubadas com IgGs puras, e com IgGs em solução com as concentrações da rgp90 testadas para verificar presença de competição.

O fago E12 apresentou competição significativa com a rgp90 em solução nas duas concentrações testadas, o restante dos fagos não apresentaram resultados similares. O fago selvagem, conforme esperado, não apresentou reatividade com a IgG. A proteína rgp90 adsorvida na membrana também competiu com a rgp90 em solução para a ligação à IgG, apresentando resultados similares aos observados com o fago E12 (figuras 13 e 14).

Os resultados obtidos com o fago E12 no Dot Blot competição confirmaram os resultados anteriormente obtidos nos ensaios de ELISA competição e WB competição.

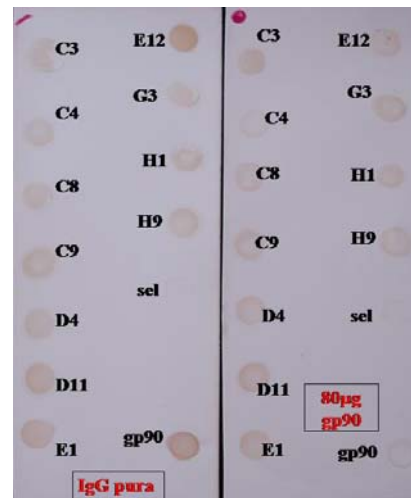


Figura 13 - Dot Blot competição: fagos adsorvidos competindo com rgp90 (80µg) em solução, para ligação às IgGs positivas AIE (membrana do lado esquerdo incubada com solução de IgGs purificadas positivas; membrana do lado direito incubada com IgGs positivas em solução com 80µg da proteína rgp90 = competição).

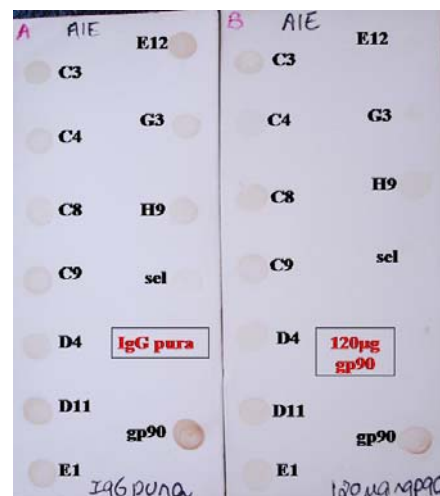


Figura 14 - Dot Blot competição: fagos adsorvidos competindo com rgp90 (120µg) em solução, para ligação às IgGs positivas AIE (membrana do lado esquerdo incubada com solução de IgGs purificadas positivas; membrana do lado direito incubada com IgGs positivas em solução com 120µg da proteína rgp90 = competição).

### 3.1.7- Resultados das análises de reatividade dos clones com as amostras dos soros de equídeos naturalmente infectados e não infectados com VAIE

#### Phage-ELISA

Testes em ELISA foram realizados para verificar a reatividade dos clones selecionados com soros de equídeos positivos e negativos para a infecção pelo VAIE, previamente testados conforme descrito na metodologia.

Os clones de fagos C3, C4, C8, C9, D4, D11, E1, E12, G3, H1, H9, selvagem (controle negativo) e rgp90 foram adsorvidos nos poços das placas de ELISA e incubados com trinta diferentes amostras de animais positivos e trinta amostras negativas. Os resultados obtidos com as amostras dos soros diluídos 1:500 foram satisfatórios. Apenas os fagos C4 e E12, e a rgp90 diferenciaram soros positivos e negativos (figura 15).

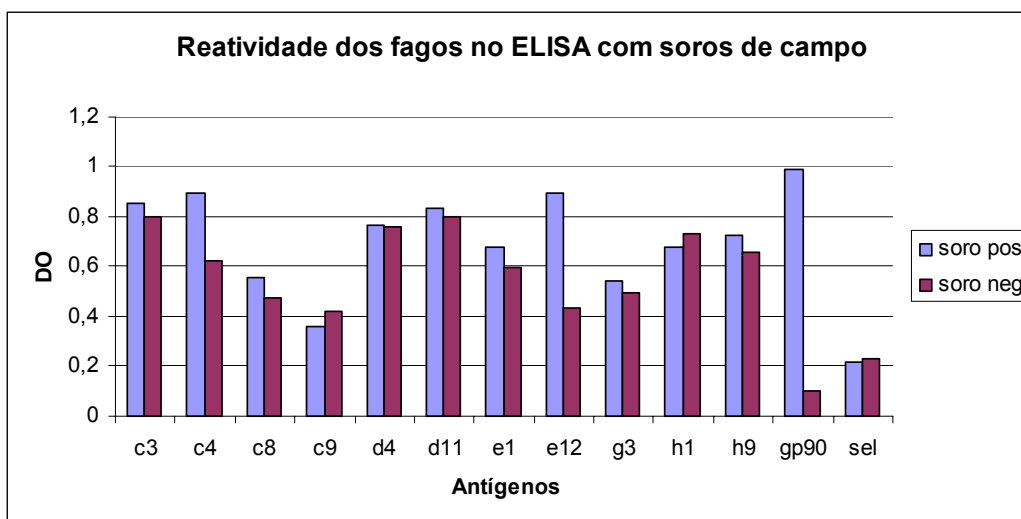


Figura 15 - Reatividade dos fagos com trinta amostras de soros positivos e trinta soros negativos para AIE (valores médios das leituras DO).

#### Dot Blot

Ensaio de Dot Blot foram realizados para testar a reatividade dos fagos C3, C4, C8, C9, D4, D11, E1, E12, G3, H1, H9 e selvagem com as mesmas amostras dos soros positivos e negativos para AIE previamente testados no ELISA. A diluição

dos soros 1:1250 foi a mais adequada para ensaios de Dot Blot com os fagos.

Os resultados com as trinta amostras de soros positivos e trinta negativos demonstraram que apenas o fago E12 diferenciou todos os soros testados (figura 16).

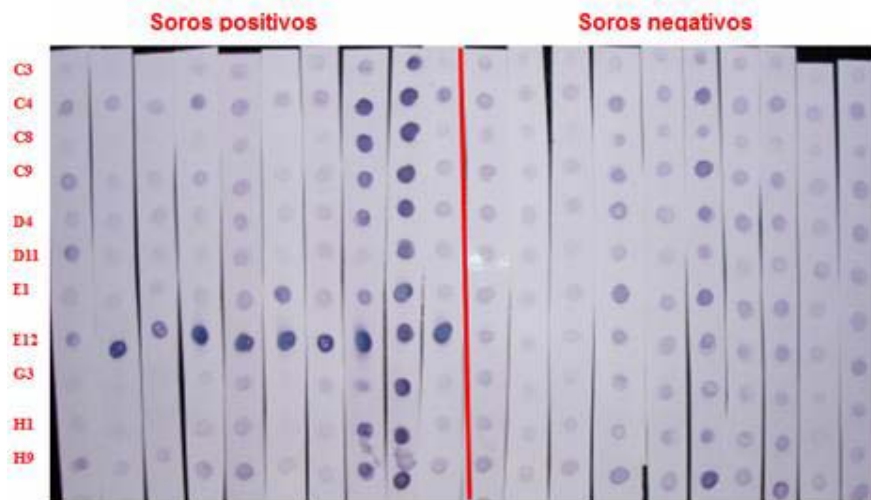


Figura 16 – Ensaio de Dot Blot para avaliação da reatividade dos fagos com dez amostras dos soros positivos para AIE, e com dez soros negativos para AIE (membranas do lado esquerdo da linha vermelha foram incubadas com soros positivos, e do lado direito da linha com os soros negativos).

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de ELISA e Dot Blot com as amostras dos soros dos animais positivos e negativos para AIE, o fago E12 apresentou melhores resultados do que os outros fagos quando utilizado como antígeno nas reações. Por essa razão foram eliminados os outros clones das análises posteriores.

### Ensaio de competição entre o fago E12 e a proteína rgp90 (ELISA e Dot Blot)

Para confirmação dos resultados, o fago E12 foi então testado como antígeno nos ensaios de competição em ELISA e Dot Blot.

No teste ELISA competição (competição C), a rgp90 foi adsorvida nos poços da placa e incubada com amostras de soros positivos (controle positivo), amostras de soros negativos (controle negativo) e com amostras de soros positivos misturadas com fago E12 (competição). Este ensaio possibilitou verificar que o fago E12, em solução com as amostras de soros positivos, compete com a rgp90 adsorvida nos poços para ligação aos anticorpos dos soros positivos para AIE. Este resultado foi verificado pela menor absorvância obtida nos poços que continham o fago, em

comparação com os poços onde foram adicionadas as mesmas amostras de soros positivos sem a presença do fago (figura 17). Após análises utilizando o programa Prisma 5.0 para ANOVA com pós teste de Bonferroni possível averiguar que os níveis de absorvância foram estatisticamente diferentes entre os soros positivos e os soros positivos em solução com fago E12, e entre os soros positivos e os soros negativos ( $p < 0,05$ ).

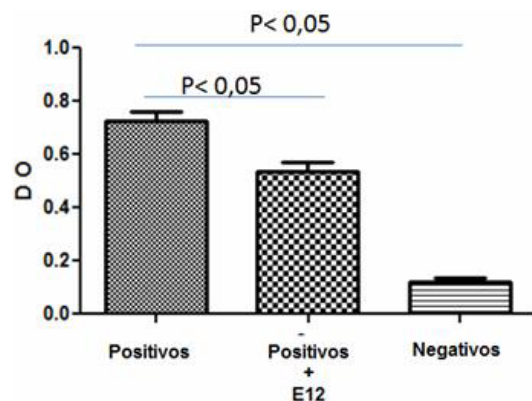


Figura 17 - ELISA competição C: competição entre fago E12 (em solução) e rgp90 (adsorvida) para ligação aos anticorpos presentes nas amostras dos soros positivos AIE.

No ensaio de Dot Blot competição, o fago E12, fago selvagem (controle negativo) e a rgp90 (controle positivo) foram adsorvidos nas membranas de nitrocelulose e incubadas com diferentes amostras de soros positivos, soros negativos (controle), e com os soros positivos em solução com 80µg da rgp90 (competição).

Nas membranas incubadas com os soros positivos em solução com a rgp90 foi

verificada baixa reatividade do fago, comparável à reatividade com os soros negativos. Dessa forma, a rgp90 em solução competiu com o fago E12 (adsorvido) para ligação aos anticorpos das amostras dos soros positivos AIE. A rgp90 adsorvida na membrana também competiu com a rgp90 em solução, de maneira similar ao fago (figura 18). O fago selvagem não apresentou reatividade com as amostras.

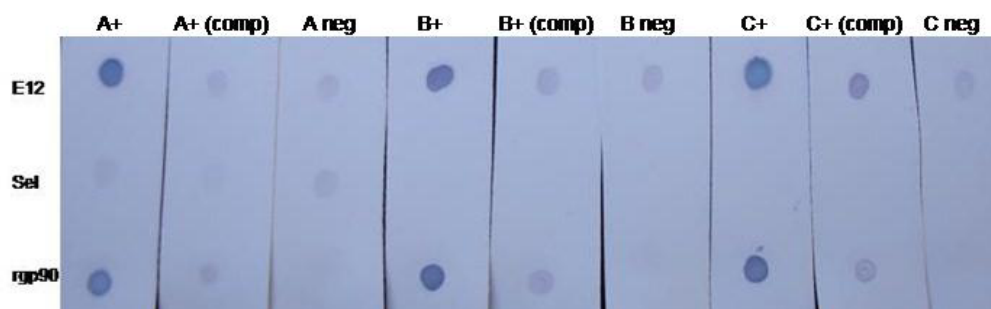


Figura 18 - Dot Blot competição: fago E12 adsorvido em membranas competindo com a rgp90 em solução, para reação com soros positivos AIE (A+, B+, C+ = soros positivos para AIE; A+ (comp), B+ (comp), C+ (comp) = soros positivos em solução com rgp90 (competição); neg A, neg B, neg C = soros negativos para AIE).

### Western Blot - fago E12

Para confirmar se o peptídeo fusionado na proteína III do fago E12, selecionado nos imunoenaios, diferenciava os soros dos animais positivos e negativos para AIE, foram realizados testes em Western Blot (WB).

Foi realizada a separação eletroforética em gel SDS-Page 16% das proteínas dos fagos

E12 e selvagem (controle negativo) na concentração de  $1 \times 10^{12}$ , e da rgp90 (controle positivo). Após a eletrotransferência para membranas de nitrocelulose foi verificada a reação específica dos anticorpos presentes nos soros positivos (1:500) com a pIII (~ 42 KDa) do fago E12 e com a rgp90. Não foi verificada reatividade com fago selvagem (figura 19).

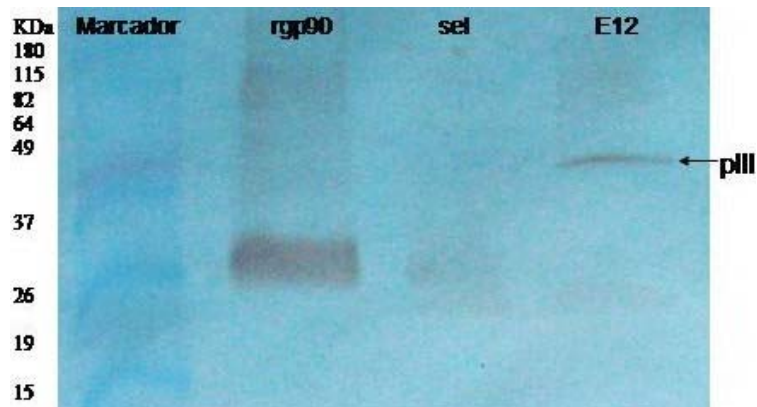


Figura 19 – Ensaio de Western Blot para teste da reatividade do fago E12, fago selvagem e rgp90 com amostra de soro positivo para AIE

### 3.1.8- Resultados das análises por bioinformática

A sequência do peptídeo E12 selecionado foi analisada quanto a similaridade com sequências de proteínas do VAIE depositadas no “GENEBANK” com uso do programa BLAST. Através das análises, foi verificada similaridade do peptídeo com a

glicoproteína transmembrana do VAIE gp45, codificada pelo gene *env* (tabela 4).

Para encontrar o ponto máximo de similaridade entre o peptídeo selecionado, com as sequências da proteína gp45 do VAIE depositadas, foi utilizado o programa MATCH (tabela 5). O programa demonstrou uma região de máxima similaridade representada por *ATSH*.

Tabela 4- Similaridade da sequência protéica do peptídeo selecionado (E12) com proteínas anotadas no banco de dados do GeneBank pelo Blast, e os números de acesso

Peptídeo	Antígeno Potencial	Acesso Banco de Dados
TATSHLF	gp45 ( <i>env</i> )	AAK21107.1
		AF327877.3
		AAK21113.1
		AF327878.1

Tabela 5- Ponto de máxima similaridade (*ATSH*) entre E12 e proteína *env* (gp45) do VAIE (AAK21113.1)

Peptídeo	Região de similaridade	Proteína VAIE	Figura
E12	<b>ATSH</b>	gp45 ( <i>env</i> )	<p>Maximum similarity position= 782        akiimilakglnviittrlrklodyigkmlnparshvtmpqydv 800        TATSHLF</p>

### 3.1.9- Síntese do peptídeo sintético contendo epítomos miméticos do vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE)

De acordo com os resultados dos imunoenaios e das análises de bioinformática, foi selecionada a sequência exibida pelo fago E12 para construção do peptídeo sintético. Foi utilizado o sistema de

VAIE-E12

**TATSHLFGGGSTATSHLFGGGSTATSHLFGGGSTATSHLFGGGSTATSHLF- NH3**

### 3.1.10- Resultados da reatividade do peptídeo sintético VAIE-E12 no ELISA com as amostras de soros (animais naturalmente infectados)

A reatividade do peptídeo sintético VAIE-E12, produzido a partir da seleção com a biblioteca Ph.D.- C7C foi verificada nos ensaios de ELISA.

Os poços das placas foram adsorvidos com 0,5µg do peptídeo e incubados com trinta amostras do soros de equídeos positivos e trinta amostras negativas para infecção pelo VAIE, previamente testadas na IDGA e

múltiplos peptídeos miméticos a partir do clone de fago selecionado e caracterizado por *phage display* e avaliado nos imunoenaios. O peptídeo sintético foi esquematizado com cinco repetições da sequência TATSHLF, em tandem, tendo o mesmo espaçador (GGGS), e com amidação C-terminal para estabilização da estrutura peptídica. O peptídeo foi denominado VAIE-E12 e sintetizado pela empresa Genscrip:

ELISA rgp90. Dentre as diluições dos soros testadas, a diluição 1:20 foi a mais adequada para verificar a diferença da reatividade entre os soros positivos e negativos.

A estatística utilizando o programa Prisma 5.0 para o teste-t com os valores das densidades óticas, evidenciou a diferença entre os resultados das amostras dos soros positivos e negativos no ELISA com o peptídeo VAIE-E12, com resultado de  $p < 0,0001$ . O valor de  $p$  foi menor que 0,05, indicando diferença significativa entre os resultados (figura 20).

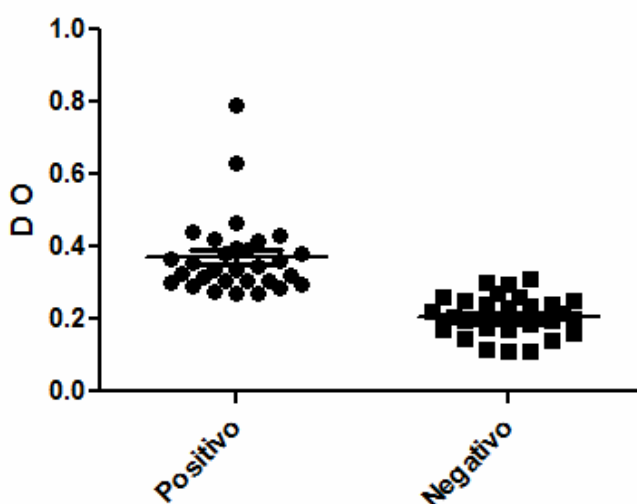


Figura 20 - Análise da reatividade de trinta soros positivos e trinta soros negativos para AIE com o peptídeo sintético VAIE-E12 no ELISA (teste-t:  $p < 0,0001$ ) (Prisma 5.0, GraphPad)

### 3.2- Resultados da seleção com a biblioteca Ph.D.-12™

#### 3.2.1- Purificação das IgGs positivas e negativas do pool dos soros positivos e negativos VLB

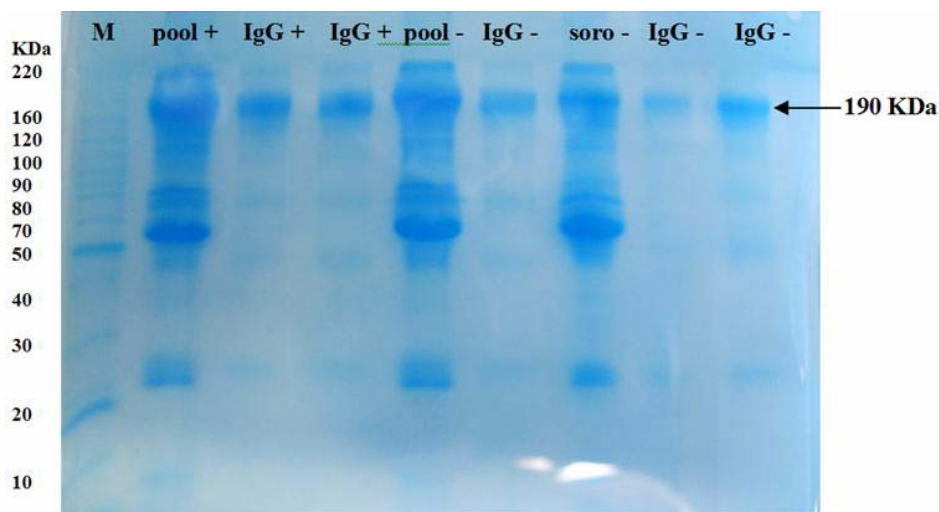
As imunoglobulinas da classe IgG foram purificadas utilizando o volume de 3 mL do pool dos soros dos bovinos positivos e negativos para LEB em colunas de cromatografia por afinidade do tipo Hitrap Protein G HP, e caracterizadas parcialmente quanto à pureza por SDS-PAGE em condições não redutoras.

O processo de purificação das imunoglobulinas a partir do pool de soros dos bovinos mostrou ser eficiente,

apresentando um rendimento final de IgG com concentração aproximada de 7µg/µl. A figura 21 mostra o padrão eletroforético das preparações de IgGs purificadas comparadas com pool de soros e também com o marcador de peso molecular (M).

Foi verificada a presença de uma banda forte de aproximadamente 190 kDa nas amostras do pool de soros e nas IgGs purificadas, correspondente ao peso molecular aproximado das IgGs dos bovinos.

As IgGs positivas e negativas purificadas foram testadas em Dot Blot por meio de incubação com anticorpo anti-bovino conjugado com peroxidase, e apresentaram forte reatividade com o conjugado (dados não mostrados).





Após eletroforese em SDS-PAGE foi possível também averiguar a qualidade da amostra da proteína gp51 utilizada nos testes de IDGA para diagnóstico das amostras dos soros dos bovinos (dados não mostrados). A proteína apresenta massa com valor aproximado de 60 KDa (Llames et al., 2000).

A reatividade da proteína gp51 foi avaliada nos imunoenaios junto com os fagos selecionados, tanto com as IgGs purificadas quanto com as amostras de soro.

### 3.2.2- Titulação dos fagos

Todos os eluatos contendo fagos amplificados e não amplificados foram titulados para estimar a quantidade de fagos selecionados nos três ciclos de seleção com

a biblioteca Ph.D.-12™ (tabela 6). As colônias de bactérias ER2738 infectadas com fagos presentes nas placas de titulação apresentam coloração azul, indicando a quebra do substrato X-Gal, devido à expressão do gene da β-galactosidase presente nos fagos.

Os títulos de entrada dos fagos nos ciclos de seleção foram maiores que os títulos de saída (tabela 6), pois os fagos com maior afinidade para a IgG positiva ficam ligados e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade são removidos nos processos de lavagem. Os títulos de saída apresentaram aumento gradual na quantidade de fagos do primeiro ao terceiro ciclo de seleção, ocorrendo enriquecimento dos clones e demonstrando que a seleção foi direcionada ao alvo (IgG total positiva).

Tabela 6 - Título obtido (ufc/μL) no processo de seleção dos fagos da biblioteca Ph.D.-12™ ligantes às IgGs totais provenientes do pool de soros positivos para VLB

Ciclos de seleção	Título de entrada ufc/μL	Título de saída ufc/μL	Lavagens TBST (%) Tween 20
1º	$4,0 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^4$	0,1% 10 lavagens
2º	$4,0 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^5$	0,5% 10 lavagens
3º	$4,0 \times 10^{10}$	$4,7 \times 10^6$	0,5% 15 lavagens

### 3.2.3- Extração do DNA dos fagos selecionados

Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para verificar a qualidade e estimar a concentração das amostras do DNA dos fagos selecionados no terceiro ciclo de

seleção. As amostras do DNA foram submetidas a eletroforese em mesmo gel onde foi aplicado o padrão DNA do fago M13 contendo 400ng de DNA para comparação da intensidade das bandas. Foram observadas qualidade e quantidade adequadas obtidas nas extrações das amostras do DNA dos clones de fagos selecionados (figura 22).

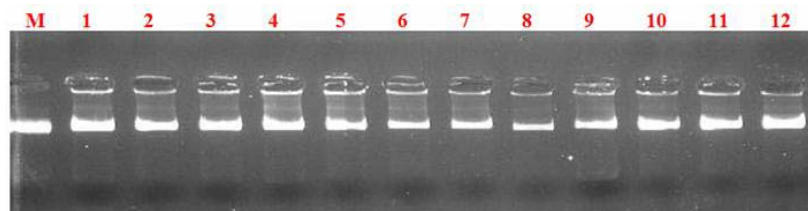


Figura 22 - Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Canaleta M= DNA do fago M13 padrão contendo 400 ng de DNA; canaletas 1-12= Amostras do DNA extraído dos fagos selecionados no terceiro ciclo de seleção.

### **3.2.4- Reação de Sequenciamento**

A leitura da reação de sequenciamento foi realizada em sequenciador automático do tipo *MegaBace 1000 (Amersham Biosciences)* no Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU). A análise das sequências de DNA provenientes do sequenciador automático foi processada em software do próprio equipamento. Somente as sequências que não apresentaram erros foram traduzidas.

Foram obtidas sessenta e três sequências a partir da seleção com a biblioteca Ph.D.-12™ que foram posteriormente traduzidas.

### **3.2.5- Tradução e análise das sequências**

As sequências do DNA obtidas foram traduzidas, após o sequenciamento com o auxílio do programa DNA2PRO.

Dos sessenta e três clones sequenciados, apenas quarenta e quatro apresentaram sequências válidas (sem erros de sequenciamento ou recombinação), sendo todas as sequências diferentes entre si. Segue representado na tabela 7, todas as diferentes sequências válidas obtidas.

Tabela 7 - Frequência das sequências válidas geradas pelo programa DNA2PRO após o sequenciamento dos clones obtidos na seleção com a biblioteca Ph.D.-12™

<b>Clone</b>	<b>Sequência aa</b>	<b>Frequência</b>
A1	ghkwdlwtsprf	1/44
A3	ahkwdiplstsg	1/44
A4	ahkweavqppmt	1/44
A8	gnfqsesyfvph	1/44
A9	ipastidllppl	1/44
B3	whfepytwaptm	1/44
B7	ahkwdnmflpad	1/44
C1	qpgplafnhelh	1/44
C5	lstrfaptntwe	1/44
C7	gwkesmrayhsl	1/44
C8	ahrwipdnltpy	1/44
C12	eptnrwldhvyw	1/44
D4	hkpppqtrlmha	1/44
D5	sglfapytdqvk	1/44
D9	hrnhlmdlsgly	1/44
D10	ghkwspivqpsp	1/44
D11	aldwkqtlfryk	1/44
D12	nqisyfaptys	1/44
E4	gaswggefyrnyk	1/44
E6	ahrwsppgldsl	1/44
E10	wlpsfltehyht	1/44
E11	qgyrpilpshfl	1/44
E12	shrmapppllll	1/44
F1	ghswfpidrpsv	1/44
F3	tmpklhfntnlr	1/44
F5	lprsaidwlapv	1/44
F6	tspqtlstyftky	1/44
F8	ahrwipdnltpy	1/44
F9	tsnqnmtrlppa	1/44
F10	wyppmhifapts	1/44
F12	evpywaslpell	1/44
G5	nmlqiappfpas	1/44
G6	gsndwfdhrfpt	1/44
G7	vrpqettlsvvn	1/44
G9	dsthapnvpra	1/44
G10	snnynnvwtp	1/44
H1	gqqiadvpfl	1/44
H4	lktppsltryth	1/44
H6	sppassidvlgf	1/44
H7	kasnswldiywp	1/44
H8	tgpawiwaptns	1/44
H9	ihtsnalsmyaq	1/44
H10	gaswggefyrnyk	1/44
H11	tvtfapydsss	1/44

Na tabela 8 são apresentados os cálculos das frequências totais de cada aminoácido presente nos peptídeos sequenciados, suas posições nos peptídeos e a diversidade dos aminoácidos, obtidos pelo programa AAFREQ. Nessa tabela também são apresentadas as frequências esperadas e observadas de cada aminoácido.

Foi observada uma maior frequência dos aminoácidos Alanina, Histidina, Prolina, Treonina e Triptofano, sugerindo que sejam os principais participantes nas interações peptídeo-imunoglobulina (IgG positiva VLB) durante os processos da seleção biológica.

Na tabela também estão indicados os aminoácidos mais frequentes em cada posição (consenso).

Tabela 8 - Frequência dos aminoácidos selecionados gerada pelo programa AAFREQ, para a biblioteca Ph.D.12<sup>TM</sup> (#1- #12 = posição dos aminoácidos)

AA*	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	TOTAL	Frequência Obtida (%)	Frequência Esperada (%)
A	6	2	1	2	5	7	0	3	2	1	3	3	35	7,11	6,2
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,1
D	1	0	1	1	3	1	5	4	2	1	0	1	20	4,07	3,1
E	2	0	0	2	2	2	0	1	0	2	0	1	12	2,44	3,1
F	0	0	2	2	3	1	4	3	3	2	0	2	22	4,47	3,1
G	8	2	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	16	3,25	6,2
H	2	11	0	1	1	2	0	0	4	1	2	3	27	5,49	3,1
I	2	0	1	1	2	4	5	0	1	0	0	0	16	3,25	3,1
K	1	2	6	1	1	0	0	0	0	0	1	3	15	3,05	3,1
L	3	2	2	0	3	4	4	5	9	2	5	6	45	9,15	9,4
M	0	2	0	1	1	3	1	0	1	1	1	1	12	2,44	3,1
N	2	2	4	2	3	2	0	4	1	2	1	1	24	4,88	3,1
P	0	5	9	4	3	7	6	2	5	11	7	2	61	12,4	6,2
Q	1	2	1	5	0	2	0	1	1	1	0	1	15	3,05	6,2
R	0	2	4	1	1	0	1	3	3	1	2	1	19	3,86	9,4
S	4	4	4	5	6	2	3	1	4	1	5	6	45	9,15	9,4
T	5	1	5	1	2	1	8	3	1	7	3	4	41	8,33	6,2
V	1	2	0	0	0	0	2	3	2	3	3	1	17	3,46	6,2
W	3	1	0	10	3	2	2	2	1	0	3	1	28	5,69	3,1
Y	0	1	0	2	1	1	0	5	1	4	4	3	22	4,47	3,1
<b>Consenso</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>P</b>	<b>W</b>	<b>S</b>	<b>A/P</b>	<b>T</b>	<b>L/Y</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>L/S</b>	<b>492</b>		

\*AA (aminoácidos)

### Alinhamento das seqüências peptídicas

A procura por similaridade entre as seqüências peptídicas obtidas foi realizada pelo programa Clustal W versão 18.1 através de alinhamentos múltiplos.

Conforme demonstrado na figura 23, foram revelados alguns motivos comuns entre os peptídeos selecionados: AHKW, AhxW, HKW, HxW, FAPT e WAPT.

Alinhamento dos peptídeos	
A3	---AHKWQ-IPLSTSG--- 12
B7	---AHKWQDNMFLPAD--- 12
A4	---AHKWEAVQPPMT--- 12
A1	---GHKWDLWTSPRF--- 12
D10	---GHKWSPIVQSP--- 12
F1	---GHSWFPIIDRPVS--- 12
A8	---GNFQ-SESYFVPH--- 12
F6	---TSPQ-TLSYFTKY--- 12
C1	---QPG-PLAFNHELH--- 12
F3	---TMP-KLHFNTNLR--- 12
C8	AHRWIPD-NLTPY----- 12
E6	AHRWISPP-GLDSL----- 12
E12	SHRMAPP-PLLLL----- 12
D4	-HK-PP-PQTRLMHA--- 12
H4	LKT-PP-SLTRYTH--- 12
A9	---IPASTIDLLPPL--- 12
F5	---LPRSAIDWLAPV--- 12
H6	---SPPASSIDVLG-F--- 12
C12	--EPTNRWLDH-VYW---- 12
H7	--KASNSWLD-IYWP--- 12
G6	---GSNDWFD-RHFPT--- 12
C7	---G-WKESMRAYHSL--- 12
E4	---GASWGEFYRNYK--- 12
F10	---WYPPMHIFAPTS--- 12
H8	---TGPAWIWAPTNS--- 12
B3	---WHFEPYTWAPTM--- 12
D12	---NQISYLFAPTYSS--- 12
D5	-----SGLFAPTYDQVK 12
H11	-----TVTFAPTYDSSS 12
C5	-----LSTRFAPTYNTWE- 12
E10	---WLPSTLTHEYHT--- 12
D11	---ALDWKQTFRLRYK--- 12
G10	---SNNYNNVWWTPT--- 12
F9	---TSNQNMTRLPPA--- 12
H9	---IHTSNALSMYAQ--- 12
G5	---NMLQIAPPFPAS--- 12
G9	---DTSTHAPNVPRA--- 12
F12	---EVPYWAS-LPELL--- 12
H1	---GQQIADIVPFWL--- 12
D9	---HRNHLMDLSGLY--- 12
G7	---VRPQETLSVNV--- 12

Figura 23 - Alinhamento dos peptídeos selecionados a partir da biblioteca Ph.D.-12™ gerado pelo programa Clustal W 18.1

### 3.2.6- Resultados da seleção inicial dos fagos nos imunoenaios com IgGs purificadas

#### Phage ELISA

Após as análises por bioinformática das sequências peptídicas obtidas, foi dado início ao processo de seleção dos clones nos imunoenaios.

A seleção inicial dos fagos nos imunoenaios foi realizada com uso dos testes de ELISA. O objetivo foi primeiramente identificar os fagos reativos apenas com as IgGs totais positivas e não reativos com as IgGs totais negativas.

Dos quarenta e quatro clones de fagos obtidos após análises das sequências,

apenas vinte e três foram reagentes no ELISA com as IgGs positivas e não reagentes com as IgGs negativas. Os fagos reagentes apenas com as IgGs positivas foram: A1, A3, A4, A9, C5, C7, D4, D5, D10, E6, F1, F5, F8, F10, G5, G6, G10, H1, H6, H7, H8, H10 e H11. O índice de reatividade com as IgGs positivas variou muito entre os fagos selecionados (figura 24).

Para verificar a diferença entre os índices ELISA obtidos da reatividade dos vinte e três clones com as IgGs positivas e negativas, foi realizado o teste-t pareado no programa STATA 10.0. O valor de  $p < 0,001$  indica a diferença significativa na reatividade dos fagos com as IgGs positivas e negativas.

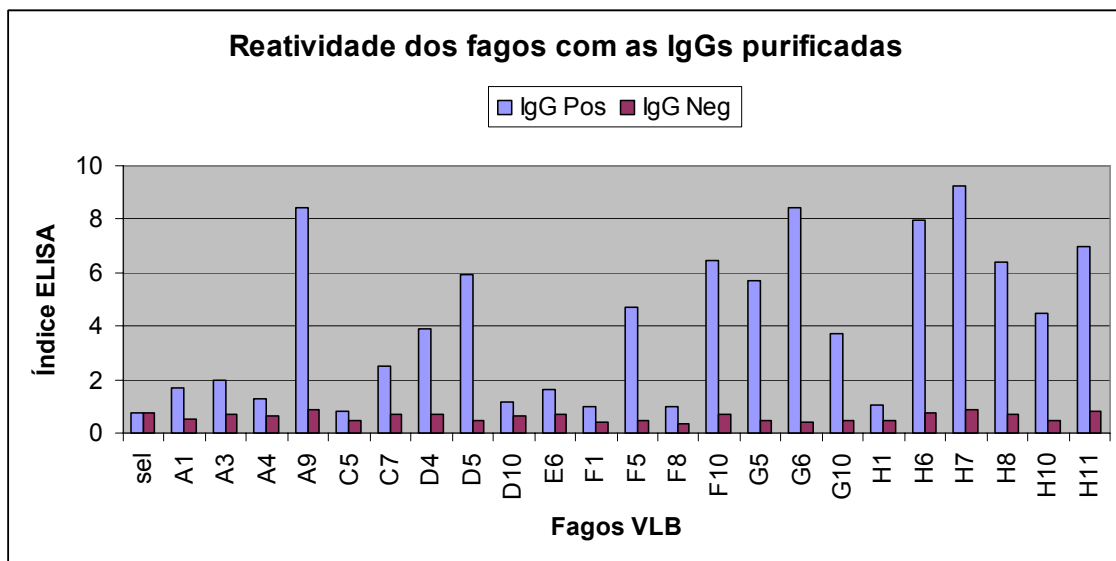


Figura 24 - Phage ELISA- Índice de reatividade dos fagos VLB com as IgGs positivas e negativas

### Teste da reatividade da proteína gp51 com as amostras de IgGs totais positivas e negativas purificadas

A imunoreatividade da proteína gp51 utilizada como antígeno nos testes de IDGA foi avaliada em ensaios de ELISA com as IgGs purificadas positivas e negativas.

Este ensaio foi realizado para verificar se a proteína gp51 apresentava diferença de reatividade com as IgGs positivas e negativas, e se poderia ser utilizada como controle nos testes de ELISA com os fagos. Com este propósito, a gp51 foi adsorvida em placas testando diferentes concentrações, e incubada com as IgGs purificadas. A gp51 não apresentou reatividade com as IgGs positivas ou negativas nos testes de ELISA, em nenhuma das condições testadas.

### Western Blot

Foram realizados testes de Western Blot com o objetivo de assegurar que os peptídeos fusionados na proteína pIII dos fagos selecionados no ELISA, são reagentes nos imunoenaios com as IgGs.

Os fagos A1, A3, A4, A9, C5, C7, D4, D5, D10, E6, F1, F5, F8, F10, G5, G6, G10, H1, H6, H7, H8, H10, H11, selvagem e a proteína gp51 foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose após corrida eletroforética em gel SDS-PAGE (16%). Não foi observada reatividade das amostras de fagos e da proteína gp51 com as IgGs negativas. Apenas os fagos G10, H1 e selvagem (controle negativo) não reagiram com as IgGs positivas, todos as outras amostras de fagos e a proteína gp51 foram reagentes com as IgGs positivas (figura 25).

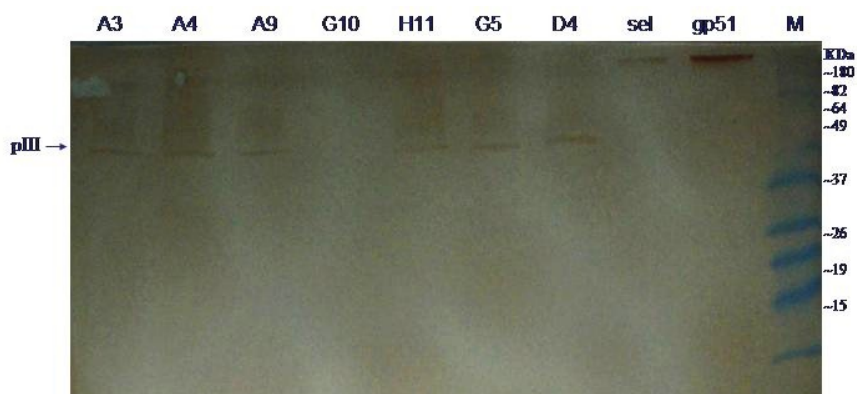


Figura 25 - Reatividade dos fagos com IgGs purificadas positivas para LEB em Western Blot

## Dot Blot

O teste Dot Blot foi realizado para testar a imunoreatividade dos fagos com as IgGs positivas e negativas, e para confirmação dos resultados obtidos no ELISA (figura 26).

As membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com todos os fagos selecionados e o fago selvagem na ordem de  $10^{11}$  e com  $1\mu\text{g}$  da proteína gp51. Todas as amostras foram incubadas com as IgGs positivas e negativas VLB.

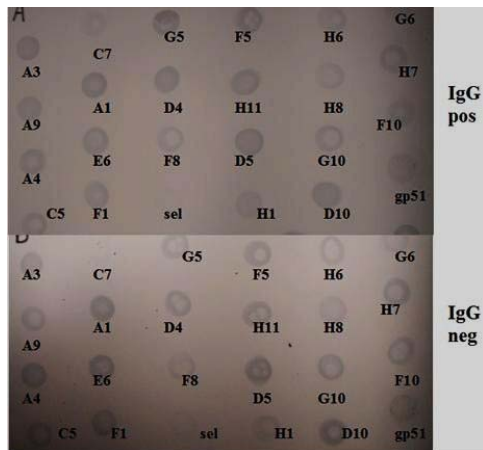


Figura 26 - Teste da reatividade dos fagos com IgGs positivas e negativas em Dot Blot (membrana superior incubada com IgGs purificadas positivas; membrana inferior incubada com IgGs purificadas negativas).

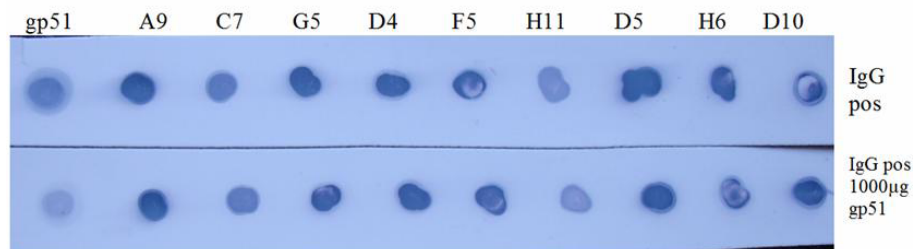


Figura 27 - Ensaio Dot Blot competição (membrana superior incubada com solução de IgGs purificadas positivas; membrana inferior incubada com IgGs purificadas positivas em solução com  $1000\mu\text{g}$  da proteína gp51 = competição).

De acordo com os resultados do Dot Blot (figura 26), os fagos A9, C7, G5, D4, F5, H11, D5, H6, D10 e F10 apresentaram os melhores resultados quanto a diferença de reatividade com as IgGs. O fago selvagem não reagiu no ensaio, e a gp51 não diferenciou as IgGs, mas apresentou reatividade com ambas.

## Dot Blot competição

Devido à presença de reatividade da gp51 em Dot Blot, foi testada a competição dos fagos adsorvidos em membranas com a gp51 em solução, para ligação às IgGs totais positivas.

Não foi verificada competição dos fagos com a gp51 em nenhuma das concentrações testadas, apenas a gp51 adsorvida na membrana competiu com a mesma em solução (figura 27).



### 3.2.7- Resultados das análises da reatividade dos fagos com as amostras dos soros de bovinos naturalmente infectados e não infectados com VLB

Os mesmos fagos testados com as IgGs purificadas foram também avaliados nos imunoenaios com as amostras dos soros de campo positivos e negativos para VLB: A1, A3, A4, A9, C5, C7, D4, D5, D10, E6, F1, F5, F8, F10, G5, G6, G10, H1, H6, H7, H8, H10 e H11.

#### Phage ELISA – amostras dos soros de campo

Foi testada a imunoreatividade dos vinte e três clones de fagos selecionados com vinte amostras dos soros provenientes de animais positivos e vinte amostras de soros negativos para infecção com o VLB.

As amostras dos fagos selecionados, selvagem e gp51 foram adsorvidas nas

placas de ELISA e incubadas com as amostras dos soros.

Os valores dos Índices ELISA positivos (IE +) e negativos (IE -) foram calculados conforme descrito na metodologia, e os maiores valores da razão entre IE+/IE- determinaram as amostras dos fagos (antígenos) mais capazes de diferenciar entre os soros positivos e negativos testados. Os fagos que apresentaram os melhores resultados foram selecionados: A3, A4, A9, D4, D10, F5, F10, G5 e H11 (figura 28).

As amostras dos soros diluídas 1:100 apresentaram melhores resultados no ELISA do que na diluição 1:50, com os fagos do biopanning VLB (dados não mostrados).

A proteína gp51 não apresenta reatividade com as amostras dos soros no ensaio (figura 28).

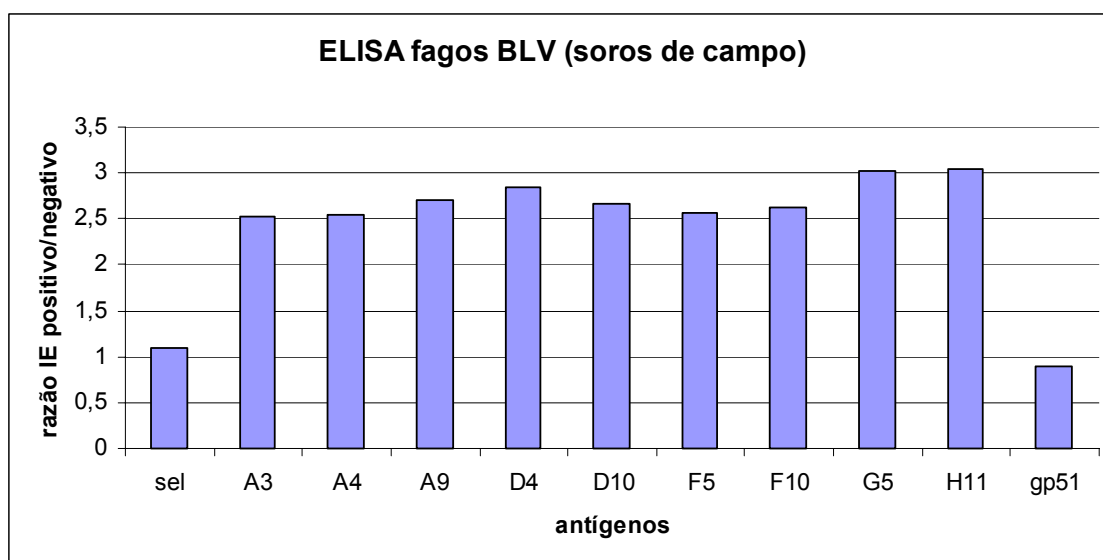


Figura 28 - Fagos selecionados no ELISA a partir da análise de reatividade com vinte amostras dos soros de bovinos positivos e vinte soros negativos para LEB.

### Dot Blot

O ensaio de Dot Blot foi realizado para verificar a imunoreatividade dos fagos com os soros positivos e negativos para infecção pelo VLB, e para comparar com os resultados obtidos no ELISA.

As membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com a proteína gp51, e com os fagos teste e selvagem na ordem de  $10^{11}$  e incubadas com vinte amostras de soros positivos e vinte amostras de soros negativos. A melhor reatividade dos fagos

neste ensaio foi observada com os soros diluídos 1:1000.

Foram testados neste ensaio, os vinte e três fagos testados no ELISA com soros de campo (A1, A3, A4, A9, C5, C7, D4, D5, D10, E6, F1, F5, F8, F10, G5, G6, G10, H1, H6, H7, H8, H10 e H11). De acordo com os resultados obtidos no Dot Blot, os fagos que diferenciaram visivelmente as amostras de soros positivos e negativos foram: A3, A4, A9, D4, D10, F5, F10, G5 e H11 (figura 29), confirmando os resultados do ELISA.

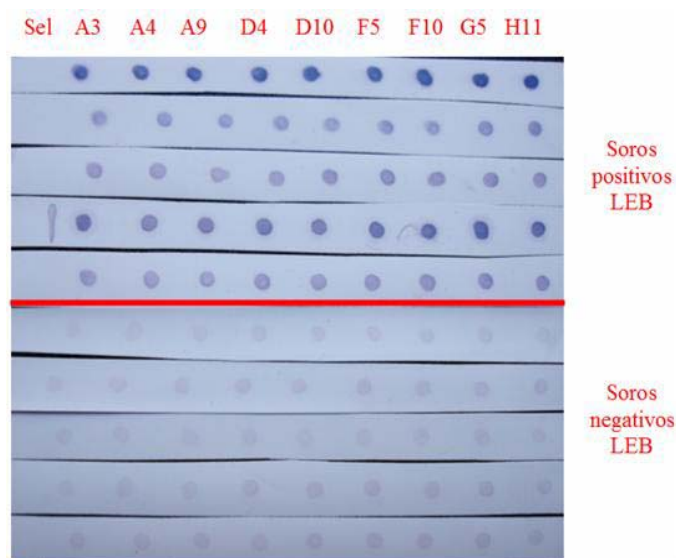


Figura 29 - Teste da reatividade dos fagos selecionados com as amostras dos soros de bovinos positivos e negativos para LEB em Dot Blot (parte superior da linha vermelha: membranas incubadas com soros positivos; parte inferior da linha: membranas incubadas com soros negativos).

### Resultados Western Blot com soros

Foram realizados testes em Western Blot para verificar a imunoreatividade dos peptídeos fusionados na proteína III dos clones selecionados no ELISA, com os soros de animais positivos e negativos para infecção pelo VLB.

A eletroforese em gel SDS 16% foi realizada com a proteína gp51, com os fagos precipitados na concentração de  $1 \times 10^{12}$ .

A3, A4, A9, D4, D10, F5, F10, G5, H11, fago selvagem. Após eletrotransferência das amostras para membranas de nitrocelulose, estas foram incubadas com amostras de soros positivos e negativos para infecção pelo VLB. Todas as amostras dos fagos apresentaram reatividade da pIII com os soros positivos, e ausência de reatividade com os soros negativos (figura 30). O fago selvagem não apresentou reação com os soros, e a gp51 reagiu com soros positivos e negativos.

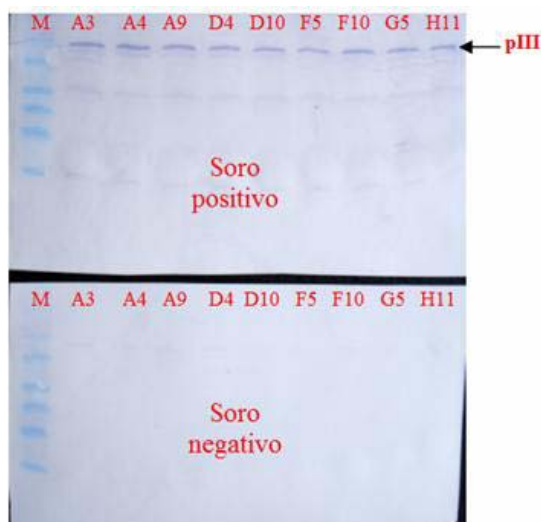


Figura 30 – Ensaio de Western Blot para teste da reatividade dos fagos com soros de campo positivo e negativo para LEB (M = marcador de peso molecular; membrana superior = incubação com soro positivo; membrana inferior = incubação com soro negativo).

### Dot Blot competição

As amostras dos fagos capazes de diferenciar os soros positivos dos negativos no ELISA e no Dot Blot, foram submetidas à competição com a gp51, em solução, para a ligação aos anticorpos dos soros positivos.

As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras e sensibilizadas com fago selvagem, 1µg da proteína gp51, e com as amostras dos fagos na ordem de 10<sup>11</sup>: A3, A4, A9, D4, D10, F5, F10, G5 e H11. Todas as amostras sensibilizadas nas membranas foram submetidas à incubação com soros positivos, soros negativos, e com cada soro positivo em solução com 1500µg da proteína gp51 (teste de competição).

Conforme os resultados apresentados na figura 31, não foi observada competição dos fagos com a proteína em solução para a ligação aos anticorpos dos soros positivos.

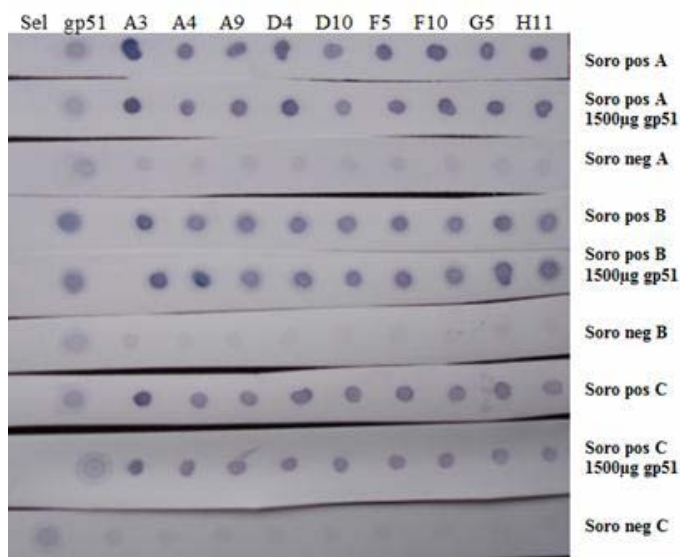


Figura 31 – Ensaio de Dot Blot competição: amostras dos soros positivos VLB em solução com gp51. Soro pos A, B, C = membranas incubadas com soros positivos; Soro pos A, B, C 1500µg gp51 = membranas incubadas com soros positivos em solução com 1500µg da gp51 (competição); Soro neg A, B, C = membranas incubadas com soros negativos.

De acordo com os resultados obtidos nos imunoenaios com as IgGs purificadas e com as amostras de soros de campo, os fagos que apresentaram melhores características antigênicas para diferenciar as amostras positivas e negativas foram: i) A3 ahkwdiplstsg, ii) A4 ahkweavqppmt, iii) A9 ipastidlpl, iv) D4 hkpppqtrimha, v) D10 ghkwspivqpsp, vi) F5 lprsaidwlapv, vii) F10 wyppmhifapts, viii) G5 nmlqiappfpas, ix) H11 tvtfapydsss.

### 3.2.8- Resultados das análises por bioinformática

Após a seleção nos imunoenaios, as sequências peptídicas exibidas pelos fagos foram analisadas por ferramentas de bioinformática.

Inicialmente, foi analisada a similaridade entre as sequências peptídicas selecionadas, através de alinhamentos múltiplos pelo programa Clustal W versão 18.1. Na figura 32 são demonstrados os alinhamentos das sequências peptídicas selecionadas nos imunoenaios. Foram

identificados os motivos AHKW, HKW ou HKx, FAPT e PPM que são compartilhados entre sequências dos peptídeos exibidos pelos fagos.

Alinhamentos das sequências peptídicas	
A9	IPASTIDL—LPPL- 12
F5	LPRSAIDW—LAPV- 12
A4	-AHKWEAV—QPPMT 12
D10	-GHKWSPI—VQPSP 12
F10	---WYPPMHI FAPTS 12
H11	-TVTFAPT—YDSSS 12
A3	-AHKWDIP—LSTSG 12
G5	NMLQIAPP—FPAS- 12
D4	--HKPPPQTRLMHA- 12

Figura 32 - Alinhamentos das sequências peptídicas selecionadas nos imunoenaios obtidos no programa Clustal W 18.1

As sequências dos peptídeos selecionadas foram também analisadas quanto à homologia com sequências de proteínas do VLB depositadas no “GENEBANK” através do programa BLAST, gerando os resultados apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Similaridade das sequências protéicas dos peptídeos selecionados com proteínas anotadas no banco de dados do GeneBank pelo Blast, e os números de acesso

Peptídeo	Antígeno Potencial	Acesso Banco de Dados
A3- ahkwdiplstsg	G4	ABE28439.1
A4- ahkweavqppmt (A4)	transcriptase reversa	AAB63003.1
A9- ipastidllppl	Tax	ACR15161.1
	gp51	CAR64532.1
	p34	AAC82590.1
	gp60	NP777385.2
	p24	AAA42784.1
D4- hkpppqtrlmha	protease	AAB50411.1
	integrase	ACR15158.1
	gp51	CAW30958.1
	gp30, gp51	AAC18396.1
	G4	ABE28471.1
D10- ghkwspivqpsp	tax	ABR13901.1
	protease	1101256 <sup>a</sup>
	Gp60	AAC82588.1
F5- lprsaidwlapv	p24	AAT02652.1
	transcriptase reversa	ACR15158.1
F10- wyppmhifapts	G4	ABI75223.1
G5- nmlqiappfpas	protease	AAC32747.1
	Tax	ABR13890.1
	G4	ABE28471.1
	gp51	ABL86339.1
H11- tvtfaptydsss	gp30	AAP32011.1
	Rex	ABE28494.1
	rex	ABE28498.1
H11- tvtfaptydsss	env	ACR15160.1
	gp30	AAK85430.3
	pol	AAA42785.1

Utilizando o programa MATCH foi encontrado o ponto máximo de similaridade entre alguns dos peptídeos selecionados nos imunoenaios, com as proteínas do VLB de interesse encontradas no Blast.

Os peptídeos exibidos pelos fagos D10, G5 e A9 apresentaram máxima similaridade

com a proteína p24 (principal proteína do capsídeo do VLB) codificada pelo gene *gag*, e o peptídeo exibido pelo fago D4 apresentou máxima similaridade com a glicoproteína gp51 do envelope viral codificada pelo gene *env* (tabela 10).

Tabela 10 - Pontos de máxima similaridade entre os peptídeos selecionados e as proteína *gag* (ACR15157.1) e *env* (ACR15160.1) do VLB

Região de similaridade	Peptídeo	Proteína VLB	Figura
Gene <i>gag</i> <b>vqp, sti, ivq,</b> <b>lqis</b>	D10, G5, A9	p24	<p>↓ Maximum similarity position= 173  qyqnlwlgawknlp... 200  ghkws...  ...  ghkws...</p>
Gene <i>env</i> <b>pppg</b>	D4	gp51	<p>↓ Maximum similarity position= 22  fcaksprytldf... 50  ...  kasswld...</p>

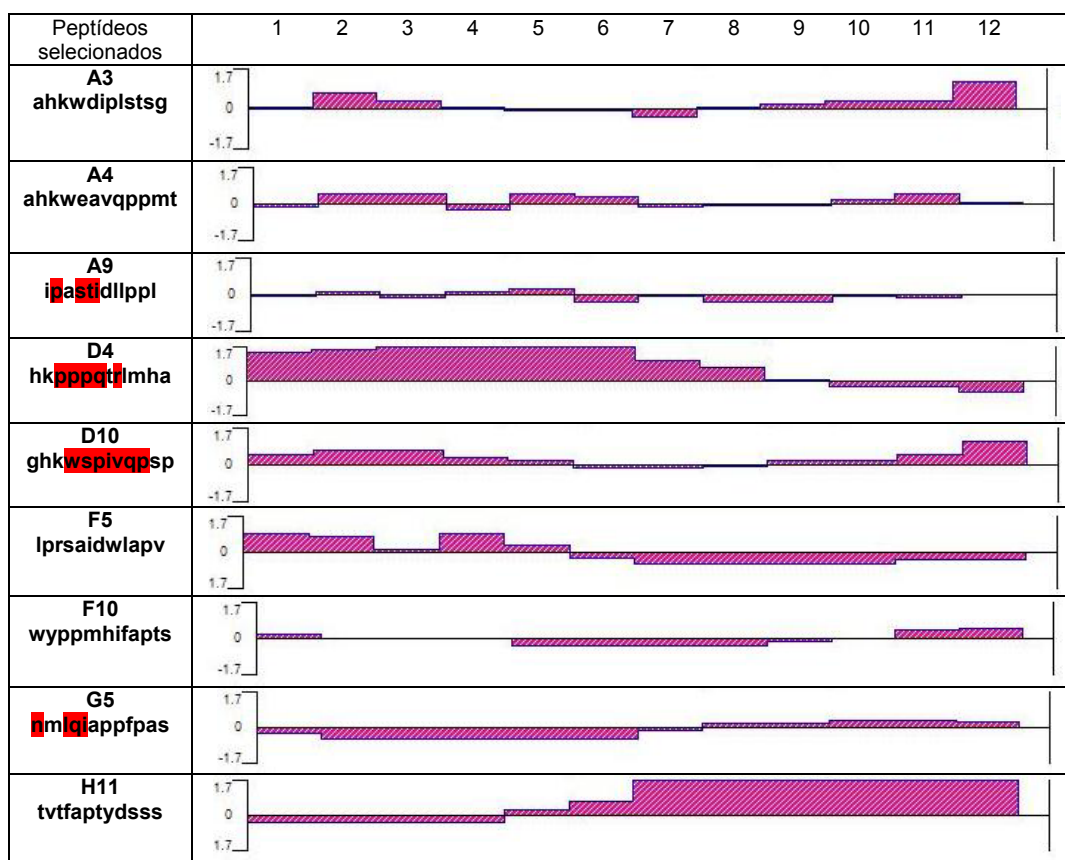
O índice de antigenicidade de cada peptídeo VLB selecionado nos imunoenaios foi estimado pelo programa DNASTAR 4.0 – Lasergene, PROTEAN.

O índice de antigenicidade prediz determinantes antigênicos potenciais, combinando métodos de predição estrutural de proteínas (Jameson e Wolf, 1988). Os resultados são mostrados como picos, que são os determinantes antigênicos potenciais (tabela 11). O algoritmo pode ser utilizado para prever as características topológicas da proteína, diretamente a partir da

sequência primária dos aminoácidos. O programa gera valores para parâmetros de acessibilidade, combina os valores obtidos para regiões flexíveis e prediz a estrutura secundária, criando um perfil linear do contorno da proteína. Os picos antigênicos com valores positivos representam as regiões mais antigênicas nos peptídeos (tabela 11).

Conforme demonstrado na tabela 11, os peptídeos com maiores resultados do índice de antigenicidade (mais antigênicos) foram: A3, D4, D10, F5 e H11.

Tabela 11 - Índices de antigenicidade preditas para os peptídeos selecionados (PROTEAN 4.0)



### 3.2.9- Síntese do peptídeo sintético contendo epítomos miméticos do vírus da Leucose Bovina (VLB)

De acordo com os resultados obtidos nos imunoenaios e nas análises de bioinformática, foram selecionadas as sequências peptídicas exibidas pelos fagos D4 e G5 para construção do peptídeo sintético. Foi utilizado o sistema de múltiplos peptídeos miméticos a partir dos clones de fagos selecionados e caracterizados por *phage display* e avaliados nos imunoenaios.

VLB-Ph

**HKPPPQRLMHAGGGSNMLQIAPPFPASGGGSHKPPPQRLMHAGGGSNMLQIAPPFPAS-NH3**

O peptídeo sintético foi esquematizado com duas repetições de cada sequência intercaladas, tendo o mesmo espaçador (GGGS), e com amidação C-terminal para estabilização da estrutura peptídica. O peptídeo foi sintetizado pela empresa Genscript. Foi construído o peptídeo denominado VLB-Ph contendo as sequências **HKPPPQRLMHA** e **NMLQIAPPFPAS** correspondentes às sequências dos fagos D4 e G5, respectivamente:

### 3.2.10- Resultados da reatividade do peptídeo sintético VLB-Ph no ELISA com as amostras de soros (animais naturalmente infectados)

A reatividade do peptídeo sintético VLB-Ph, produzido a partir da seleção com a biblioteca Ph.D.-12™ foi verificada nos ensaios de ELISA.

Os poços das placas foram adsorvidos com 1µg do peptídeo e incubados com trinta amostras do soros de bovinos positivos e trinta amostras negativas para infecção pelo

VLB, previamente testadas na IDGA. Dentre as diluições dos soros testadas, a diluição 1:400 foi a mais adequada para verificar a diferença da reatividade entre os soros positivos e negativos.

A estatística utilizando o programa Prisma 5.0 para o teste-t com os valores das densidades óticas, evidenciou a diferença entre os resultados das amostras dos soros positivos e negativos no ELISA com o peptídeo VLB-Ph, com resultado de  $p = 0,0114$ . O valor de  $p$  foi menor que 0,05, indicando diferença significativa entre os resultados (figura 33).

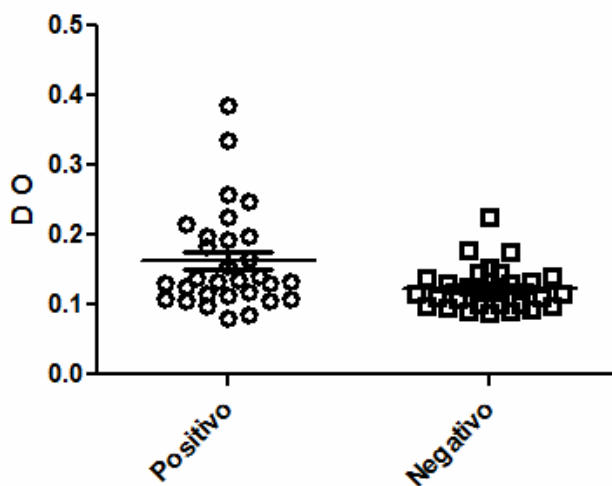


Figura 33 - Análise da reatividade de trinta soros positivos e trinta soros negativos para LEB com o peptídeo VLB-Ph no ELISA (Prisma 5.0)



#### 4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas, visando o aprimoramento das medidas de controle e erradicação das doenças, tem sido foco de muitas pesquisas.

No caso da Anemia Infecciosa Equina (AIE) e da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) causadas pelos retrovírus VAIE e VLB, respectivamente, os animais tornam-se persistentemente infectados e muitas vezes portadores assintomáticos do vírus, sendo considerados fontes de infecção para os indivíduos sadios na natureza.

Como ainda não existem vacinas disponíveis para a AIE e LEB, um método de diagnóstico confiável e capaz de identificar animais infectados principalmente nas fases iniciais das doenças é de extrema importância para evitar disseminação dos vírus entre os rebanhos (Sellon et al., 1994; Cook et al., 1996; Trono et al., 2001).

A Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), ensaios de ELISA em vários formatos, a reação em cadeia da polimerase (PCR), ensaios de Imunoblotting e outras técnicas, são atualmente desenvolvidas e utilizadas para detecção da AIE e da LEB (Payne et al., 1989; Kim e Casey, 1992; Langemeier et al., 1996; Johnson et al., 1998; Reichel et al., 1998; Kittelberger et al., 1999; Llamas et al., 2000; Trono et al., 2001; Choi et al., 2002; Alvarez et al., 2007a; More et al., 2008). Além do desenvolvimento das técnicas, vários estudos têm sido focalizados no aprimoramento das metodologias para produção de antígenos mais puros, visando um aumento na sensibilidade do diagnóstico das doenças (Montelaro et al., 1993; Sentsui et al., 2001; Alvarez et al., 2007a; Alvarez et al., 2007a; Lim et al., 2009).

Técnicas de *phage display* têm sido utilizadas para a elucidação de diversas questões de origem biológica (Smith e Petrenko, 1997), inclusive para a descoberta de epítomos com importância

para o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico e vacinas (Ziegler et al., 1998; Casey et al., 2009). Esta metodologia possibilita a identificação de novos antígenos sem informação prévia a respeito da especificidade dos anticorpos, evitando o processo de obtenção de anticorpos monoclonais para a caracterização (Parmley e Smith, 1988; Parmley e Smith, 1989).

No presente trabalho, foram identificados peptídeos considerados miméticos antigênicos de epítomos das proteínas do vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE) e do vírus da Leucose Bovina (VLB). Os peptídeos foram obtidos pela imunoseleção de duas diferentes bibliotecas randômicas de peptídeos apresentados em fagos, contra imunoglobulinas totais purificadas do pool de soros de animais naturalmente infectados com VAIE e com o VLB. Para obtenção dos peptídeos miméticos do VAIE foi utilizada a biblioteca comercial Ph.D.-C7C™, e para obtenção dos peptídeos miméticos do VLB foi utilizada a biblioteca Ph.D.-12™.

O isolamento dos peptídeos que apresentam similaridades com as proteínas dos vírus VAIE e VLB foi obtido por repetidos ciclos de seleção dos peptídeos por imunoafinidade ao alvo biológico (IgGs totais positivas). Assim, os ciclos de seleção e amplificação tendem a gerar peptídeos específicos reconhecidos pelos anticorpos com maiores títulos, gerando subpopulações específicas de clones de fagos ligantes às IgGs totais positivas (Parmley e Smith, 1988; Parmley e Smith, 1989).

Após as seleções biológicas (biopanning), os clones de fagos foram caracterizados e validados através da adoção de critérios específicos. Inicialmente, através da titulação dos fagos na entrada e na saída dos ciclos de seleção, foi constatado enriquecimento dos eluatos durante o processo seletivo, sendo os títulos de entrada maiores do que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade para as IgGs totais positivas ficam ligados, e o

restante dos fagos com baixa ou sem afinidade são removidos nos processos de lavagem.

Os títulos de saída apresentaram aumento gradual na quantidade de fagos do primeiro ao quarto ciclo de seleção, no caso da biblioteca Ph.D.-C7C™, e aumento gradual do primeiro ao terceiro ciclo de seleção, no caso da biblioteca Ph.D.-12™, demonstrando que ocorreu enriquecimento dos clones e que as seleções foram direcionadas ao alvo (IgGs totais positivas) (Ziegler et al., 1998; Kirsch et al., 2008; Leong et al., 2008).

De acordo com os resultados obtidos da seleção com a biblioteca Ph.D.-C7C™, foi possível identificar vinte e três sequências distintas dentre as vinte e oito sequências completas obtidas no sequenciamento do DNA dos clones selecionados. Conforme representado na tabela 2, a sequência TATSHLF repetiu quatro vezes (quatro clones iguais), e a sequência GNSWYNS apresentou três repetições.

Foi observada uma maior frequência dos aminoácidos Histidina, Leucina e Serina, sugerindo que sejam os principais participantes nas interações peptídeo-imunoglobulina durante os processos da seleção biológica (biopanning). A análise da frequência de aminoácidos ao longo das sequências peptídicas evidenciou a presença de aminoácidos críticos nas sequências peptídicas e importantes no processo de seleção, fornecendo indícios de especificidade no processo de reconhecimento dos ligantes.

Nas análises da similaridade entre as sequências peptídicas selecionadas, através de alinhamentos múltiplos, foram identificados alguns motivos comuns entre os peptídeos selecionados: SHLF, ATSHxF, SHxF, THxF e IQPLL.

A presença dos motivos protéicos comuns entre os peptídeos pode estar relacionada com a seleção a favor do ligante, pela indicação de que estes aminoácidos poderiam ser cruciais para o reconhecimento dos peptídeos pelas IgGs

(Cortese et al., 1995). Pelas análises de alinhamentos protéicos foi possível demonstrar que os peptídeos isolados contêm resíduos críticos que apresentam identidade e conservação e que poderiam mimetizar a estrutura e função dos epítomos originais existentes nas proteínas do VAIE.

Após as análises preliminares por bioinformática das sequências peptídicas obtidas, a reatividade dos vinte e oito clones foi testada no ELISA com as IgGs purificadas positivas e negativas.

Dentre os vinte e oito clones sequenciados, apenas onze clones foram reagentes com as IgGs provenientes do pool de soros positivos para AIE, e não reativos com as IgGs provenientes do pool de soros dos animais negativos no ELISA. Foram selecionados os clones: C3, C4, C8, C9, D4, D11, E1, E12, G3, H1 e H9, sendo os outros clones descartados das análises nos ensaios posteriores.

A proteína gp90 recombinante (rgp90) foi considerada como controle em todos os ensaios posteriormente realizados, pois apresentou significativa diferença na reatividade entre as IgGs totais purificadas positivas e negativas, e entre as amostras de soros positivos e negativos no ELISA, Western blot e Dot Blot. A rgp90 é utilizada no teste ELISA indireto segundo Reis (1997) no laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária da UFMG.

O fago selvagem foi utilizado como controle negativo nos ensaios pois não possui peptídeo fusionado na proteína III (Mead et al., 1988). Em nenhum dos testes realizados foi verificada reatividade do fago selvagem, e os resultados obtidos no Western Blot comprovaram que apenas os peptídeos fusionados na proteína III dos clones selecionados são especificamente reconhecidos pelas IgGs totais purificadas e pelos anticorpos das amostras dos soros positivos, e não outras sequências componentes da partícula viral do fago, quando comparados ao fago selvagem (M13) na região correspondente ao inserto.

A existência de competição dos fagos com a rgp90 para ligação às IgGs totais positivas purificadas do pool de soros de animais positivos para AIE, verificada através dos ensaios de competição em ELISA, Western Blot e Dot Blot, permite considerar que a seleção biológica realizada com a biblioteca Ph.D.-C7C isolou uma população de clones de fagos exibindo peptídeos que podem ser considerados miméticos antigênicos aos epítomos presentes na gp90 ou aos epítomos de alguma outra proteína imunodominante do VAIE.

Durante o procedimento de seleção dos clones com as IgGs purificadas, o fago E12 apresentou maior capacidade de competir com a rgp90 para ligação às IgGs do que os outros clones, além de diferenciar as IgGs positivas e negativas em todos os ensaios.

Todos os clones testados com as IgGs purificadas foram também avaliados nos imunoenaios com as amostras dos soros de campo de equídeos naturalmente infectados e não infectados com VAIE.

Nos testes com as amostras de soros apenas o fago E12 foi selecionado, pois foi o único clone capaz de diferenciar todas as amostras dos soros de animais positivos e negativos nos testes de ELISA e Dot Blot. Este fago também competiu com a rgp90 para ligação aos anticorpos dos soros dos animais positivos para o VAIE nos ensaios de ELISA e Dot Blot, confirmando os resultados previamente obtidos no processo inicial de seleção dos clones com as IgGs purificadas.

Devido às suas características como amostra antigênica nos imunoenaios, o fago E12 demonstrou apresentar capacidade de ser um antígeno potencial para uso em ensaios de diagnóstico para detecção da infecção causada pelo VAIE com amostras de soro individuais de equídeos de campo.

Através das análises da sequência do peptídeo E12 quanto à similaridade com sequências de proteínas do VAIE disponíveis em bancos de genomas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), foi

verificada homologia do peptídeo com a glicoproteína transmembrana do VAIE gp45, codificada pelo gene *env*. A região de máxima similaridade representada por *ATSH* parece ser integrante na interação do peptídeo com as IgGs purificadas e com os anticorpos dos soros nos ensaios.

Animais infectados pelo VAIE desenvolvem forte resposta imune contra as glicoproteínas gp90 e gp45 (Leroux et al., 2004, Shen et al., 2005), sendo estas frequentemente utilizadas como antígenos nos testes de diagnóstico sorológicos para detecção da AIE. Embora seja amplamente utilizada como antígeno para diagnóstico, a gp90 é considerada ser o principal alvo de variações antigênicas durante o curso da infecção (Hussain et al., 1987; Craigo et al., 2002; Mealey et al., 2004; Howe et al., 2005; Shen et al., 2005), podendo comprometer o diagnóstico quando o antígeno baseado no estrato do VAIE de uma determinada localidade geográfica é utilizado para detectar anticorpos nos soros de animais infectados com o VAIE variante em localidades distintas.

Em estudos bioquímicos e imunológicos da população viral predominante recuperada durante a infecção pelo VAIE, mostram que epítomos conservados são notáveis na gp45 (McGuire et al., 2000; Belshan et al., 2001), e que a gp45 tem um domínio imunodominante principal que constitui um epítomo altamente conservado na maioria dos retrovírus (Chong et al., 1991), sugerindo que por se tratar de uma proteína mais conservada, o uso da gp45 como antígeno para diagnóstico é uma alternativa aos problemas gerados em decorrência das variações observadas na gp90.

Apesar da similaridade existente entre o peptídeo E12 e a gp45, este clone competiu com a rgp90 para ligação aos anticorpos nos imunoenaios. A competição pode ser devido à presença de epítomos semelhantes existentes nas diferentes proteínas virais que reagem cruzadamente com os anticorpos. Apesar de não terem sido encontradas similaridades entre a sequência selecionada e as sequências da proteína gp90 do VAIE disponíveis no banco

de genomas, podem existir similaridades com sequências brasileiras do vírus. Até o momento não existem sequências brasileiras da proteína gp90 disponíveis no banco de genomas, portanto, deverão ser conduzidos estudos moleculares detalhados com os isolados VAIE brasileiros, para análise comparativa entre estas sequências, e verificação desta hipótese.

No presente estudo, de acordo com as características antigênicas observadas do peptídeo nos imunoenaios com as amostras de soros e com as IgGs, pode ser sugerido o uso do peptídeo E12 como antígeno para diagnóstico da AIE.

O uso de peptídeos miméticos como antígeno, obtidos a partir da seleção de bibliotecas de *phage display*, no diagnóstico tem sido sugerido por outros autores como alternativa para o uso de antígenos virais brutos. O uso desses peptídeos pode eliminar a alta proporção de epítomos não desejáveis que estão presentes nas preparações do antígeno bruto, gerando um diagnóstico mais eficiente e específico (Casey et al., 2009).

Além desses fatores, tem sido sugerido o uso de peptídeos selecionados de bibliotecas como controles em imunoenaios de diagnóstico ao invés dos antígenos nativos. Os peptídeos miméticos podem servir também como controle positivo precisamente definido e conveniente para uso em testes de diagnóstico, em alternativa quando o patógeno original é difícil de ser obtido ou apresenta instabilidade, e nos casos de vírus com distribuição errática (Ziegler et al., 1998).

Os resultados obtidos no ELISA com o peptídeo sintético VAIE-E12 construído a partir da sequência do peptídeo exibido pelo fago E12, demonstraram que a seleção por *phage display* foi eficiente para gerar um novo antígeno para diagnóstico da AIE. Este peptídeo sintético apresentou diferença significativa na reatividade entre as trinta amostras dos soros positivos e trinta amostras dos soros negativos, podendo ser também considerado potencial para uso no

diagnóstico. Um número maior de amostras deverá ser avaliado para a padronização do uso deste peptídeo em testes sorológicos como o ELISA.

Conforme já discutido anteriormente, durante a seleção com a biblioteca Ph.D.-12<sup>TM</sup> ocorreu enriquecimento dos clones do primeiro ao terceiro ciclo de seleção, com fagos de maior afinidade para as IgGs totais positivas provenientes do pool de soros de bovinos infectados com o VLB.

De acordo com os resultados da seleção com a biblioteca Ph.D.-12<sup>TM</sup>, foram obtidas quarenta e quatro sequências diferentes com maior frequência dos aminoácidos Alanina, Histidina, Prolina, Treonina e Triptofano, sugerindo que sejam os principais participantes nas interações com as IgGs alvo para seleção.

A seleção inicial dos fagos nos imunoenaios foi realizada com o objetivo de identificar os fagos reativos apenas com as IgGs totais positivas e não reativos com as IgGs totais negativas. Das quarenta e quatro sequências peptídicas exibidas pelos fagos, selecionadas da biblioteca, apenas vinte e três foram selecionadas por comparação entre os resultados obtidos no ELISA, Dot Blot e Western Blot com as IgGs purificadas.

No ELISA, os maiores valores da razão entre os Índices ELISA positivos e negativos (IE+/IE-) determinaram as amostras dos fagos (antígenos) capazes de diferenciar entre os soros positivos e negativos testados, e junto com os resultados obtidos no Dot Blot foram selecionados nove fagos exibindo peptídeos com potencial para diferenciar as amostras de soros negativas e positivas.

Estes nove peptídeos selecionados com os resultados da reação com os soros, não competiram com a proteína gp51 para ligação às IgGs purificadas ou aos anticorpos dos soros positivos, talvez por serem miméticos antigênicos de outras proteínas do VLB, ou até mesmo miméticos de epítomos não imunodominantes da gp51. De acordo com as análises de similaridade

entre os peptídeos e as proteínas do VLB, foram observadas similaridades com a proteína p24 e as glicoproteínas gp51 e gp30 que contém epítomos imunodominantes, e com proteínas importantes como tax, rex e G4 que são envolvidas na regulação da expressão viral e no desenvolvimento de tumores durante o curso da infecção (Burny et al., 1980; Miller et al., 1981; Walker et al., 1987; Willems et al., 1993; Willems et al., 1995).

A imunoreatividade da proteína antigênica gp51 produzida em células FLK, foi avaliada nos imunoenaios com as IgGs purificadas e com as amostras de soro. Nos ensaios de ELISA a proteína gp51 não apresentou reatividade com as IgGs positivas ou negativas, e apresentou reatividade quase insignificante com as amostras dos soros. Por isso não foi possível utilizá-la como controle, ou para os ensaios de competição com os fagos no ELISA. No Western Blot e Dot Blot a gp51 apresentou reatividade, mas não diferenciou as IgGs purificadas positivas e negativas, e não diferenciou todas as amostras de soros positivos e negativos. A falta de reatividade da gp51 pode estar relacionada com a falta de padronização deste tipo de preparação antigênica para as técnicas utilizadas, visto que este antígeno é preparado para uso na IDGA.

Os resultados do fago selvagem nos ensaios (controle negativo), e os resultados obtidos no Western Blot comprovaram que apenas os peptídeos fusionados na proteína III dos clones selecionados foram especificamente reconhecidos pelas IgGs totais purificadas e pelos anticorpos das amostras dos soros.

Nas análises por bioinformática das nove sequências selecionadas nos imunoenaios, foram encontrados motivos comuns entre os peptídeos selecionados AHKW, HKW ou HKx, FAPT e PPM que podem indicar a importância de alguns aminoácidos para o reconhecimento dos peptídeos pelas IgGs (Cortese et al., 1995), mimetizando epítomos existentes nas proteínas do VLB.

As sequências dos nove peptídeos selecionados apresentam similaridades com

várias proteínas do VLB com importantes funções regulatórias, estruturais e imunodominantes durante a infecção. E de acordo com os resultados do trabalho, a seleção dos peptídeos através da técnica *phage display* pode ser considerada uma ferramenta importante para a obtenção de um banco de epítomos selecionados pela interação imune com anticorpos reconhecedores de proteínas do VLB, prontos para serem testados em diferentes estratégias.

Os peptídeos exibidos pelos fagos D10, G5 e A9 apresentaram máxima similaridade com a proteína p24, considerada a principal proteína do capsídeo do VLB (Miller et al., 1981), e o peptídeo exibido pelo fago D4 apresentou máxima similaridade com a glicoproteína gp51 do envelope viral. Estas duas proteínas são consideradas as mais imunogênicas durante a infecção pelo VLB, e vários autores tem demonstrado que os bovinos infectados desenvolvem resposta primária de anticorpos específicos voltados para a glicoproteína de envelope gp51 e para a proteína do core viral p24 (Devare e Stephenson, 1977; Deshayes et al., 1980; Portetelle et al., 1980; Walker et al., 1987).

A similaridade observada entre as sequências peptídicas obtidas da seleção com a biblioteca Ph.D.-12<sup>TM</sup> e as proteínas imunodominantes do VLB, e os resultados nos imunoenaios, permitem considerar que os procedimentos de seleção dos fagos geraram uma população de nove peptídeos que podem ser considerados miméticos antigênicos de epítomos imunodominantes do vírus.

Os miméticos antigênicos podem servir como sondas específicas para anticorpos no diagnóstico para doenças, assim como proteínas virais são usadas para testes de muitas doenças causadas pelos retrovírus. Além disso, possibilitam a focalização de uma especificidade particular, excluindo sinais que podem indicar determinantes não relacionados com o diagnóstico, evitando as reações cruzadas (Smith et al., 1997).

Mediante os resultados, e tendo em vista a baixa capacidade de diferenciação da gp51

nos imunoenaios realizados, pode ser sugerido o uso desses peptídeos como antígenos potenciais para diagnóstico da LEB.

Os resultados dos imunoenaios, da bioinformática, e os maiores índices de antigenicidade, que apontaram os peptídeos mais antigênicos, foram utilizados como critérios para seleção das sequências peptídicas componentes do peptídeo sintético VLB-Ph.

Os testes realizados no ELISA com este peptídeo sintético geraram resultados com as amostras dos soros positivos e negativos que apresentaram diferenças significativas. Como no caso da AIE, um número maior de amostras deverá ser avaliado para a padronização do uso deste peptídeo em testes sorológicos.

Em estudos com o VAIE e com o VLB tem sido relatado o uso dos peptídeos sintéticos como antígenos no diagnóstico, e como indutores de memória imunológica com aplicações para o desenvolvimento de vacinas (Callebaut et al., 1991; Kabeya et al., 1996; Soutullo et al., 2001; Soutullo et al., 2005).

De acordo com os resultados obtidos, os peptídeos sintéticos VAIE-E12 e VLB-Ph produzidos no presente trabalho apresentam potencial para serem utilizados como antígenos no ELISA para o diagnóstico da AIE e da LEB, respectivamente.

O uso de anticorpos monoclonais para mapear epítomos que induzem, ou que sejam reconhecidos pela resposta humoral durante as infecções, é de grande importância nas pesquisas para descoberta de epítomos (Hussain et al., 1987; Sergeeva et al., 2006). Em contrapartida, foi demonstrado no presente trabalho que a seleção de epítomos miméticos antigênicos de proteínas do VAIE e do VLB a partir de bibliotecas de *phage display*, pode representar uma importante ferramenta para definir epítomos que são reconhecidos por anticorpos durante as infecções causadas pelos vírus, evitando a necessidade do

desenvolvimento de monoclonais que normalmente requer altos custos e alta complexidade para produção.

Estes miméticos apresentam potencial para serem utilizados como antígenos em plataformas de diagnóstico para as doenças AIE e LEB, para estudos do desenvolvimento de vacinas, e como base para a produção de peptídeos sintéticos.

Este trabalho gerou alternativas para o desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico das doenças AIE e LEB com a produção de novos antígenos que podem ser utilizados rotineiramente e em larga escala, contribuindo diretamente para o controle e prevenção das doenças em estudo.

## 5. CONCLUSÕES

A tecnologia do *phage display* foi eficiente para a descoberta de um peptídeo mimético antigênico que apresenta potencial para ser utilizado como antígeno no diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina, e como base para a construção de peptídeo sintético a partir de sua sequência.

Os procedimentos de seleção dos fagos a partir da biblioteca comercial permitiram a descoberta de epítomos que podem ser considerados miméticos antigênicos de epítomos das proteínas imunodominantes do VLB.

Os peptídeos sintéticos VAIE-E12 e VLB-Ph produzidos no presente trabalho apresentam potencial para serem utilizados como antígenos no ELISA para o diagnóstico da AIE e da LEB, respectivamente.

A seleção de epítomos miméticos antigênicos de proteínas do VAIE e do VLB a partir de bibliotecas de *phage display*, foi uma importante ferramenta para definir epítomos que são reconhecidos por anticorpos específicos durante as infecções causadas por estes retrovírus.

## 6. PERSPECTIVAS

Os peptídeos sintéticos produzidos neste trabalho deverão ser avaliados com um número maior de amostras de soros para a padronização de testes sorológicos seguindo as recomendações da OIE.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuirão de forma direta para novas pesquisas que visem o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico e vacinas para prevenção e controle da Anemia Infecciosa Equina e da Leucose Enzoótica Bovina.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adda, C.G.; Anders, R.F.; Tilley, L. et al. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, v.5, n.1, p.1-14, 2002.
- Alvarez, I.; Gutierrez, G.; Ostlund, E. et al. Western Blot assay using recombinant p26 antigen for detection of Equine Infectious Anemia Virus-specific antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.14, n.12, p.1646-1648, 2007b.
- Alvarez, I.; Gutierrez, G.; Vissani, A. et al. Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. *Vet. Microbiol.*, v.121, p.344-351, 2007a.
- 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.
- Azzazy, H.M.; Highsmith, W.E.Jr. *Phage display* technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem.*, v.35, n.6, p.425-445, 2002.
- Bailat, A.S.; Soutullo, A.R.; García, M.I. et al. Effect of two synthetic peptides mimicking conserved regions of equine infectious anemia virus proteins gp90 and gp45 upon cytokine mRNA expression. *Arch. Virol.*, v.153, n.10, p.1909-1915, 2008.
- Ball, J.M.; Rushlow, K.E.; Issel, C.J. et al. Detailed Mapping of the Surface Unit Glycoprotein of Equine Infectious Anemia Virus by Using Synthetic Peptide Strategies. *J. Virol.*, v.66, n.2, p.732-742, 1992.
- Barbas, C.; Burton, D.; Silverman, G. et al. *Phage Display: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001, p.1.1-23.1.
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Disponível em: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Acesso em: 25 de abril de 2009.
- Beier, D.; Riebe, R.; Blankenstein, P. et al. Establishment of a new bovine leukosis virus producing cell line. *J. Virol. Methods*, v.121, n.2, p.239-246, 2004.
- Belshan, M.; Baccam, P.; Oaks, J.L. et al. Genetic and biological variation in equine infectious anemia virus rev correlates with variable stages of clinical disease in an experimentally infected pony. *Virology*, v.279, n.1, p.185-200, 2001.
- Birkenmeier, G.; Osman, A.A.; Kopperschlager, G. et al. Epitope mapping by screening of *phage display* libraries of a monoclonal antibody directed against the receptor binding domain of human alpha2-macroglobulin. *FEBS Lett.*, v.416, n.2, p.193-196, 1997.
- Bolin, S.R.; Ridpath, J.F.; Black, J. et al. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for Bovine Viral Diarrhea Virus. *J. Virol. Methods*, v.48, n.2-3, p.211-221, 1994.
- Boublik, Y.; Di Bonito, P.; Jones, I.M. Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnology*, v.13, n.10, p.1079-1084, 1995.

- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, n.7, p.248-254, 1976.
- Brígido, M.M.; Maranhão, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.26, 2002.
- Brissette, R.; Prendergast, J.K.; Goldstein, N.I. Identification of cancer targets and therapeutics using *phage display*. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.*, v.9, n.3, p.363-369, 2006.
- Burny, A.; Bruck, C.; Chantrenne, H. et al. Bovine leukemia virus: molecular biology and epidemiology. In: Klein, G. (Ed.), *Viral Oncology*. New York, Raven Press, 1980, pp.231-289.
- Callebaut, I.; Burny, A.; Krchnák, V. et al. Use of Synthetic Peptides to Map Sequential Epitopes Recognized by Monoclonal Antibodies on the Bovine Leukemia Virus External Glycoprotein. *Virology*, v.185, n.1, p.48-55, 1991.
- Callebaut, I.; Vonèche, V.; Mager, A. et al. Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *J. Virol.*, v.67, n.9, p.5321-5327, 1993.
- Camargos, M.F.; Melo, C.B.; Leite, R.C. Frequência de soropositividade para a Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos de Minas Gerais. *Ciênc.Vet. Trop.*, v.5, n.1, p.20-26, 2002.
- Camargos, M.F. *Vírus da Leucemia Bovina: Epidemiologia Molecular e Diagnóstico*. 2005. 95f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Cardoso, R.; Homsí-Brandeburgo, M.I.; Rodrigues, V.M. et al. Peptide mimicking antigenic and immunogenic epitope of neuwiedase from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Toxicon*, v.53, n.2, p.254-261, 2009.
- Casey, J.L.; Coley, A.M.; Parisi, K. et al. Peptide mimics selected from immune sera using *phage display* technology can replace native antigens in the diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Protein Engineering Design and Selection*, v.22, n.2, p.85-91, 2009.
- Castro, R.S.; Leite, R.C.; Abreu, J.J. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v.24, n.3, p.173-176, 1992.
- Chen, Y.; Shen, Y.; Guo, X. et al. Transdermal protein delivery by a coadministered peptide identified via *phage display*. *Nat. Biotechnol.*, v.24, n.4, p.455-460, 2006.
- Choi, K.Y.; Liu, R.B.; Buehring, G.C. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *J. Virol. Methods*, v.104, n.1, p.33-39, 2002.
- Chong, Y.H.; Ball, J.M.; Issel, C.J. et al. Analysis of equine humoral immune responses to the transmembrane envelope glycoprotein (gp45) of equine infectious anemia virus. *J. Virol.*, v.65, n.2, p.1013-1018, 1991.
- Clements, J.E.; D'Antonio, N.; Narayan, O. Genomic changes associated with antigenic variation of visna virus.II. Common nucleotide sequence changes detected in variants from independent isolations. *J. Mol. Biol.*, v. 158, n.3, p. 415-434, 1982.
- Clustal W – European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Versão 18.1. Disponível em: ([www.ebi.ac.uk/clustalW/](http://www.ebi.ac.uk/clustalW/)). Acesso em: 22 de abril de 2009.
- Coggins, L.; Norcross, H.L.; Nusbaum, S.R. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.*, v.33, n.1, p.11-18, 1972.



- Cook, R.F.; Issel, C.J.; Montelaro, R.C. Equine infectious anemia. In: Studdert, M. J. (Ed), Virus Infections of Equines. Amsterdam: Elsevier, 1996, p.297-323.
- Cortese, R.; Monaci, P.; Nicosia, A. et al. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.6, n.1, p.73-80, 1995.
- Coulston, J.; Naif, H.; Brandon, R. et al. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *J. Gen. Virol.*, v.71, n.8, p.1737-1746, 1990.
- Craig, J.K.; Leroux, C.; Howe, L. et al. Transient immune suppression of inapparent carriers infected with a principal neutralizing domain-deficient equine infectious anaemia virus induces neutralizing antibodies and lowers steady-state virus replication. *J. Gen. Virol.*, v.83, n.6, p.1353-1359, 2002.
- Crissman, J.W.; Smith, G.P. Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology*, v.132, n.2, p.445-455, 1984.
- Cwirla, S.E.; Peters, E.A.; Barrett, R.W. et al. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.87, n.16, p.6378-6382, 1990.
- Da, Y.; Shanks, R.D.; Stewart, J.A. et al. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.90, n.14, p.6538-6541, 1993.
- Dees, C.; Godfrey, V.L.; Foster, J.S. et al. Stabilization of the p53 gene product in two bovine leukemia virus infected cell lines. *Cancer Lett.*, v.86, n.1, p.33-40, 1994.
- De Giuseppe, A.; Feliziani, F.; Rutili, D. et al. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.11, n.1, p.147-151, 2004.
- Deshayes, L.; Levy, D.; Parodi, A.L. et al. Spontaneous immune response of bovine leukemia virus infected cattle against five different viral proteins. *Int. J. Cancer*, v.25, n.4, p.503-508, 1980.
- Devare, S.G.; Stephenson, J.R. Biochemical and immunological characterization of the major envelope glycoprotein of bovine leukemia virus. *J. Virol.*, v.23, n.2, p.443-447, 1977.
- DiGiacomo, R. The epidemiology and control of Bovine Leukemia Virus. *Vet. Medic.*, v.87, n.4, p.263-271, 1992.
- D'Melo, F.; Howard, C.R. An improved selection procedure for the screening of *phage display* peptide libraries. *J. Immunol. Methods*, v.247, n.1-2, p.191-203, 2001.
- Doménech, A.; Llamas, L.; Goyache, J. et al. Macrophages infected with bovine leukaemia virus (VLB) induce humoral response in rabbits. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.58, n.3-4, p.309-320, 1997.
- Dube, S.; Dolcini, G.; Abbott, L. et al. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. *Virology*, v.277, n.2, p.379-386, 2000.
- Duerr, D.M.; White, S.J.; Schluesener, H.J. Identification of peptide sequences that induce the transport of phage across the gastrointestinal mucosal barrier. *J. Virol. Methods*, v.116, n.2, p.177-180, 2004.
- 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.

- Ferrer, J.F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.175, n.12, p.1281–1286, 1979.
- 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.
- Folkman, J. Looking for a good endothelial address. *Cancer Cells*, v.1, n.2, p.113-115, 2002.
- Gaskin, D.H.; Starck, K.; Turner, N.A. et al. *Phage display* combinatorial libraries of short peptides: ligand selection for protein purification. *Enzyme Microb. Technol.*, v.28, n.9-10, p.766-772, 2001.
- Gatei, M.H.; Good, M.F.; Daniel, R.C. et al. T-cell responses to highly conserved CD4 and CD8 epitopes on the outer membrane protein of bovine leukemia virus: Relevance to vaccine development. *J. Virol.*, v.67, n.4, p.1796-1802, 1993.
- 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, 1986b.
- Geysen, H.M.; Rodda, S.J.; Mason, T.J. The delineation of peptides able to mimic assembled epitopes. *Ciba Found. Symp.*, v.119, n.1, p.130-149, 1986a.
- 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.
- 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.
- Gutiérrez, G.; Alvarez, I.; Fondevila, N. et al. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet. Microbiol.*, v.137, n.3-4, p.224-234, 2009.
- 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.
- Hartley, O. The use of *phage display* in the study of receptors and their ligands. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, v.22, n.1-4, p.373-392, 2002.
- Hawkins, J. A.; Adams Junior, W. V.; Wilson, B. H. Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.168, n.1, p.63-64, 1976.
- Holliger, P.; Riechmann, L.; Williams, R.L. Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9: Evidence for conformational lability. *J. Mol. Biol.*, v.288, n.4, p.649-657, 1999.
- Hopkins, S.G.; DiGiacomo, R.F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac.*, v.13, n.1, p.107-128, 1997.
- Howe, L.; Leroux, C.; Issel, C. J. et al. Equine infectious anemia virus envelope evolution in vivo during persistent infection progressively increases resistance to in vitro serum antibody neutralization as a dominant phenotype. *J. Virol.*, v.76, n.21, p.10588-10597, 2002.
- Howe, L.; Craigo, J.K.; Issel, C.J. et al. Specificity of serum neutralizing antibodies induced by transient immune suppression of inapparent carrier ponies infected with a neutralization-resistant equine infectious anemia virus envelope strain. *J. Gen. Virol.*, v.86, n.1, p.139-149, 2005.

- Hrobowski, Y.M.; Garry, R.F.; Michael, S.F. Peptide inhibitors of dengue virus and West Nile virus infectivity. *Viol. J.*, v.2, n.49, p.1-10, 2005.
- Hussain, K.A.; Issel, C.J.; Schnorr, K.L. et al. Antigenic analysis of equine infectious anemia virus (VAIE) variants by using monoclonal antibodies: epitopes of glycoprotein gp90 of VAIE stimulate neutralizing antibodies. *J. Virol.*, v.61, n.10, p.2956-2961, 1987.
- Issel, C.J.; Coggins, L. Equine Infectious Anemia: Current Knowledge. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.174, n.7, p.727-733, 1979.
- Issel, C.J.; Foil, L.D. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.184, n.3, p.293, 1984.
- Issel, C.J.; Rushlow, K.E.; Foil, L.D. et al. A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. *Vet. Microbiol.*, v.17, n.3, p.251, 1988.
- Issel, C.J.; Macmanus, J.M.; Hagijs, S.D. et al. Equine infectious anemia: prospects for control. *Develop. Biol. Standart*, v.72, p.49-57, 1990.
- Jameson, B.A.; Wolf, H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Computer Applications in the Biosciences*, v.4, n.1, p.181-186, 1988.
- Johnson, M.; Rommel, F.; Moné, J. Development of a syncytia inhibition assay for the detection of antibodies to bovine leukemia virus in naturally infected cattle; comparison with Western blot and agar gel immunodiffusion. *J. Virol. Methods*, v.70, n.2, p.177-182, 1998.
- Johnson, R.; Kaneene, J.B. Bovine Leukemia Virus: Part II. Risk factors of transmission. *Comp. Cont. Educ. Pract. Food Anim.*, v.13, n.4, p.681-691, 1991.
- Kabeya, H.; Ohashi, K.; Ohishi, K. et al. An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (VLB) infected cells in carrier sheep. *Vaccine*, v.14, n.12, p.1118-1122, 1996.
- Kaushik-Basu, N.; Basu, A.; Harris, D. Peptide inhibition of HIV-1: current status and future potential. *BioDrugs*, v. 22, n.3, p.161-175, 2008.
- Kettmann, R.; Meunier-Rotival, M.; Cortades, J. et al. Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.76, n.10, p.4822-4826, 1979.
- Kim, C.H.; Casey, J.W. Genomic variation and segregation of equine infectious anemia virus during acute infection. *J. Virol.*, v. 66, n.6, p. 3879-3882, 1992.
- Kirsch, M.I.; Hülseweh, B.; Nacke, C. et al. Development of human antibody fragments using antibody *phage display* for the detection and diagnosis of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). *BMC Biotechnology*, v.8, n.66, p.1-15, 2008.
- Kittelberger, R.; Reichel, M.P.; Meynell, R.M. et al. Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing. *J. Virol. Methods*, v.77, n.1, p.109-114, 1999.
- Kolonin, M.G.; Pasqualini, R.; Arap, W. Teratogenicity induced by targeting a placental immunoglobulin transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, n.20, p.13055-13060, 2002.
- Lane, D.P.; Stephen, C.W. Epitope mapping using bacteriophage peptide libraries. *Curr. Opin. Immunol.*, v.5, n.2, p.268-271, 1993.
- Langemeier, J.L.; Cook, S.J.; Cook, R.F. et al. Detection of Equine Infectious Anemia Viral RNA in Plasma Samples from Recently Infected and Long-Term Inapparent Carrier Animals by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, n.6, p.1481-1487, 1996.

- Leroux, C.; Issel, C.J.; Montelaro, R.C. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *J. Virol.*, v.71, n.12, p.9627-9639, 1997.
- Leroux, C.; Craigo, J.K.; Issel, C. J. et al. Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. *J. Virol.*, v.75, n.10, p. 4570-4583, 2001.
- Leroux, C.; Cadoré, J.; Montelaro, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (VAIE): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet. Res.*, v.35, n.4, p.1-19, 2004.
- Lim, S.I.; Jeong, W.; Tark, D.S. et al. Agar gel immunodiffusion analysis using baculovirus-expressed recombinant VLB envelope glycoprotein (gp51/gp30<sub>T</sub>). *J. Vet. Sci.*, v.10, n.4, p.331-336, 2009.
- Lindqvist, B.H.; Naderi, S. Peptide presentation by bacteriophage P4. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.17, n.1-2, p.33-39, 1995.
- Liu, B.; Huang, L.; Sihlbom, C. et al. Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by *phage display*. *J. Mol. Biol.*, v.315, n.5, p.1063-1073, 2002.
- Llames, L.; Gómez-Lucia, E.; Doménech, A. et al. Analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot of nonspecific and specific viral proteins frequently detected in different antigen preparations of bovine leukemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.12, n.4, p.337-344, 2000.
- Leong, Y.H.; Devi, S.; Lin, T.K. Mimotopes of heat shock proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhi identified from phage-displayed peptide library. *J. Infect Developing Countries*, v.2, n.4, p.313-323, 2008.
- Lunder, M.; Bratkovic, T.; Urleb, U. et al. Ultrasound in *phage display*: a new approach to nonspecific elution. *Biotechniques*, v.44, n.7, p.893-900, 2008.
- 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.
- McConnell, S.J.; Kendall, M.L.; Reilly, T.M. et al. Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. *Gene*, v.151, n.1-2, p.115-118, 1994.
- McGuire, T.C.; Leib, S.R.; Lonning, S.M. et al. Equine infectious anaemia virus proteins with epitopes most frequently recognized by cytotoxic T lymphocytes from infected horses. *J. Gen. Virol.*, v.81, n.11, p.735-739, 2000.
- 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.
- Mealey, R.H.; Leib, S.R.; Powder, S.L. et al. Adaptive immunity is the primary force driving selection of equine infectious anemia virus envelope SU variants during acute infection. *J. Virol.*, v.78, n.17, p.9295-9305, 2004.
- Messing, J.; Gronenborn, B.; Muller, H.B. et al. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a HindIII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.74, n.9, p.3642-3646, 1977.
- Messing, J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.*, v.101, n.1, p.20-78, 1983.
- Miller, J.M.; Miller, L.D.; Olsen, C. et al. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.43, n.6, p.1297-1305, 1969.

- Miller, J.M.; Van Der Maaten, M.J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur. J. Cancer*, v.13, n.12, p.1369-1375, 1977.
- Miller, J.M.; Schmerr, M.J.F.; Van Der Maaten, M.J. Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to Bovine Leukemia Virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, n.1, p.5-8, 1981.
- Modena, C.M.; Gouveia, A.M.G.; Azevedo, N.A. Leucose enzoótica bovina: I- Prevalência em rebanhos de alta linhagem no Estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.36, n.1, p.39-45, 1984.
- Monke, D.R.; Rohde, R.F.; Hueston, W.D. et al. Estimation of the sensitivity and specificity of the agar gel immunodiffusion test for bovine leukemia virus: 1,296 cases (1982-1989). *JAVMA Reports of Retrospective Studies*, v.200, n.12, p.2001-2004, 1992.
- Montelaro, R.C.; Parekh, B.; Orrego, A. et al. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *J. Biol. Chem.*, v. 259, n.16, p. 10539-10544, 1984.
- Montelaro, R.C.; Ball, J.M.; Rushlow, K.E. Equine retroviruses. In: *Retroviridae*, v.2., New York: Plenum Press, 1993, p.257-360.
- More, S.J.; Aznar, I.; Bailey, D.C. et al. An outbreak of equine infectious anaemia in Ireland during 2006: Investigation methodology, initial source of infection, diagnosis and clinical presentation, modes of transmission and spread in the Meath cluster. *Equine vet. J.*, v.40, n.7, p. 706-708, 2008.
- Mullen, L.M.; Nair, S.P.; Ward, J.M. et al. *Phage display* in the study of infectious diseases. *Trends Microbiol.*, v.14, n.3, p.141-147, 2006.
- Nakajima, H.; Ushimi, C. Immunodiffusion studies of purified equine infectious anemia virus. *Infect. Immun.*, v.3, n.3, p.373-377, 1971.
- Narasimhan, K. Zip codes: deciphering vascular addresses. *Nat. Med.*, v.8, n.1, p.116, 2002.
- New England Biolabs (NEB). Disponível em: (<http://www.neb.com/nebecomm/tech>). Acesso em: 23 de setembro de 2009.
- Neurath, A.R.; Strick, N.; Lee, E.S.Y. B cell epitope mapping of human immunodeficiency virus envelope glycoproteins with long (19- to 36-residue) synthetic peptides. *J. Gen. Virol.*, v.71, n.1, p.85-95, 1990.
- Nguyen, V.K.; Maes, R.F. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, n.4, p.979-981, 1993.
- Noren, K.A.; Noren, C.J. Construction of high-complexity combinatorial *phage display* peptide libraries. *Methods*, v.23, n.2, p.169-178, 2001.
- Oaks, J.L.; McGuire, T.C.; Ulibarri, C.; Crawford, T.B. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J. Virol.*, v.72, n.9, p.7263-7269, 1998.
- Paré, J.; Simard, C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. *Can. J. Vet. Res.*, v.68, n.4, p.254-258, 2004.
- Parmley, S.F.; Smith, G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, v.73, n.2, p.305-18, 1988.
- Parmley, S.F.; Smith, G.P. Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.251, n.1, p.215-8, 1989.

- Pasqualini, R.; Koivunen, E.; Ruoslahti, E. A peptide isolated from *phage display* libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.*, v.130, n.5, p.1189-1196, 1995.
- Payne, S.L.; Fang, F.D.; Liu, C.P. et al. Antigenic variation and lentivirus persistence: variations in envelope gene sequences during VAIE infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV. *Virology*, v.161, n.2, p.321-331, 1987.
- Payne, S.L.; Rushlow, K.E.; Dhurva, B.D. et al. Localization of conserved and variable antigenic domains of equine infectious anemia virus envelope glycoproteins using recombinant *env*-encoded protein fragments produced in *Escherichia coli*. *Virology*, v.172, n.1, p.609-615, 1989.
- Phizicky, E.M., Fields, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol.*, v.59, n.1, p.94-123, 1995.
- Portetelle, D.; Bruck, C.; Mammerickx, M. et al. In animals infected by bovine leukemia virus (VLB) antibodies to envelope glycoprotein gp51 are directed against the carbohydrate moiety. *Virology*, v.105, n.1, p.223-233, 1980.
- Portetelle, D.; Dandoy, C.; Burny, A. et al. Synthetic peptides approach to identification of epitopes on bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51. *Virology*, v.169, n.1, p.34-41, 1989.
- PRISMA -GraphPad Prism- Versão 5.0 (computer program). California, USA, 2009.
- Prudencio, C.R.; Marra, A.O.; Cardoso, R.; Goulart, L.R. Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *In press: Vet. Parasitol.*, 2010.
- 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.
- Read, A.J.; Gauci, C.G.; Lightowers, M.W. Purification of polyclonal anti-conformational antibodies for use in affinity selection from random peptide *phage display* libraries: A study using the hydatid vaccine EG95. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v.877, n.14, p.1516-1522, 2009.
- Receptor Ligand Contacts (RELIC). Disponível em: (<https://relic.bio.anl.gov/programs.aspx>). Acesso em: 22 de março de 2009.
- Reichel, M.P.; Tham, K.M.; Barnes, S. et al. Evaluation of alternative methods for the detection of bovine leukaemia virus in cattle. *N. Z. Vet. J.*, v.46, n.4, p.140-146, 1998.
- Reichert, M.; Winnicka, A.; Willems, L. et al. Role of the proline-rich motif of bovine leukemia virus transmembrane protein gp30 in viral load and pathogenicity in sheep. *J. Virol.*, v.75, n.17, p.8082-8089, 2001.
- Reis, J.K.P.; Melo, L.M.; Rezende, M.R. et al. Use of an ELISA test in the eradication of an equine infectious anaemia focus. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.26, n.2, p.65-68, 1994.
- Reis, J.K.P. *Produção de antígenos recombinantes gp90 e p26 do vírus da Anemia Infecçiosa Equina para uso em imunodiagnóstico*. 1997. 183f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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.
- Sagata, N.; Yasunaga, T.; Tsuzuku-Kawamura, J. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationships to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.82, n.3, p.677-681, 1985.

- Salinovich, O.; Payne, S.L.; Montelaro, R.C. et al. Rapid Emergence of Novel Antigenic and Genetic Variants of Equine Infectious Anemia Virus during Persistent Infection. *J. Virol.*, v. 57, n.1, p. 71-80, 1986.
- 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.
- STATA -Data Analysis and Statistical Software- Versão 10.0 (computer program). Texas, USA, 2010.
- Schwartz, I.; Levy, D. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet. Res.*, v.25, n.6, p.521-536, 1994.
- Scott, J.K.; Smith, G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, v.249, n.4967, p.386-390, 1990.
- Sellon, D.C.; Fuller, F.J.; McGuire, T.C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. *Virus Res.*, v. 32, n.2, p. 111-138, 1994.
- Sentsui, H.; Inoshima, Y.; Murakami, K. et al. Cross Reaction of Recombinant Equine Infectious Anemia Virus Antigen to Heterologous Strains and Application for Serological Survey among Horses in the Field. *Microbiol. Immunol.*, v.45, n.1, p.45-50, 2001.
- 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.
- Shen, T.; Liang, H.; Tong, X. et al. Amino acid mutations of the infectious clone from Chinese VAIE attenuated vaccine resulted in reversion of virulence. *Vaccine*, v.24, n.6, p.738-749, 2005.
- Sidhu, S.S. *Phage display* in pharmaceutical biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.11, n.6, p.610-616, 2000.
- Simard, C.; Richardson, S.; Dixon, P. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can. J. Vet. Res.*, v.64, n.2, p.101-106, 2000a.
- Simard, C.; Richardson, S.; Dixon, P. et al. Agar gel immunodiffusion test for the detection of bovine leukemia virus antibodies: lack of trans-Atlantic standartization. *Can. J. Vet. Res.*, v.64, n.2, p.96-100, 2000b.
- 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. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v.228, n.4705, p.1315-1317, 1985.
- Smith, G.P. Surface display and peptide libraries. *Gene*, v.128, n.1, p.1-2, 1993.
- Smith, G.P.; Petrenko, V.A. *Phage Display*. *Chem. Rev.*, v.97, n.2, p.391-410, 1997.
- Smothers, J.F.; Henikoff, S.; Carter, P. *Phage display*: affinity selection from biological libraries. *Science*, v.298, n.5593, p.621-622, 2002.
- Soutullo, A.; Verwimp, V.; Riveros, M. et al. Desing and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Vet. Microbiol.*, v.79, n.2, p.111-121, 2001.
- Soutullo, A.; García, M.I.; Bailat, A. et al. Antibodies and PBMC from VAIE infected carrier horses recognize gp45 and p26 synthetic peptides. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.108, n.3, p.335-343, 2005.

- Sponseller, B.A.; Sparks, W.O.; Wannemuehler, I. et al. Immune selection of equine infectious anemia virus *env* variants during the long-term inapparent stage of disease. *Virology*, v.363, n.1, p.156-165, 2007.
- Sternberg, N.; Hoess, R.H. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.92, n.5, p.1609-1613, 1995.
- Sulochana, K.N.; Ge, R. Developing antiangiogenic peptide drugs for angiogenesis-related diseases. *Curr. Pharm. Des.*, v.13, n.20, p.2074-2086, 2007.
- Thomson, L.W.; Garbee, C.I.; Hibbitts, S. et al. Competition among peptides in melanoma vaccines for binding to MHC molecules. *J. Immunother.*, v.27, n.1, p.425-431, 2004.
- Toth, R.L.; Harper, K.; Mayo, M.A. et al. Fusion proteins of single-chain variable fragments derived from *phage display* libraries are effective reagents for routine diagnosis of Potato Leafroll Virus infection in potato. *Virology*, v.89, n.11, p.1015-1021, 1999.
- Trono, K.G.; Perez-Filgueira, D.M.; Duffy, S. et al. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiology*, v.83, n.3, p.235-248, 2001.
- Van der Maaten, M.J.; Miller, J.M.; Boothe, A.D. Replicating C-type virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.52, n.2, p.491-497, 1974.
- Van Regenmortel, M.H. From absolute to exquisite specificity. Reflections on the fuzzy nature of species, specificity and antigenic sites. *J. Immunol. Methods*, v.216, n.1, p.37-48, 1998.
- Walker, P.J.; Molloy, J.B.; Rodwell, B.J. A protein immunoblot test for the detection of bovine leukemia virus p24 antibody in cattle and experimentally infected sheep. *J. Virol. Meth.*, v.15, n.3, p.201-211, 1987.
- Willems, L.; Kettmann, R.; Dequiedt, F. et al. In vivo infection of sheep by bovine leukemia virus mutants. *J. Virol.*, v.67, n.7, p.4078-4085, 1993.
- Willems, L.; Gatot, J.S.; Mammerickx, M. et al. The YXXL signaling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for *in vivo* infection and maintenance of high viral loads. *J. Virol.*, v.69, n.7, p.4137-4141, 1995.
- Williams, D.L.; Issel, C.J.; Steelman, C.D. et al. Studies with equine infectious anemia virus: transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, n.9, p.1469, 1981.
- Wong-Staal, F.; Shaw, G.M.; Hahn, B.H. et al. Genomic diversity of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science*, v. 229, n.4715, p.759-762, 1985.
- Yu, H.; Dong, X.Y.; Sun, Y. An alternating elution strategy for screening high affinity peptides from a *phage display* peptide library. *Biochem. Eng. J.*, v.18, n.1, p.169-175, 2004.
- Ziegler, A.; Mayo, M.A.; Torrance, L. Synthetic antigen from a peptide library can be an effective positive control in immunoassays for the detection and identification of two Geminiviruses. *Virology*, v.88, n.12, p.1302-1305, 1998.