

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS  
RECOMBINANTES MIMÉTICOS A ANTÍGENOS TOTAIS DE  
HERPESVÍRUS BOVINO 1 POR MEIO DE *PHAGE DISPLAY***

Greyciele Rodrigues de Almeida  
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza

GOIÂNIA  
2015

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

### 2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Greyciele Rodrigues de Almeida				
E-mail:	greyzi_almeid@hotmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não					
Vínculo empregatício do autor	-				
Agência de fomento:	-			Sigla:	-
País:	Brasil	UF:	Goiás	CNPJ:	-
Título:	Prospecção e caracterização de peptídeos recombinantes miméticos a antígenos totais de herpesvírus bovino 1 por meio de <i>phage display</i>				
Palavras-chave:	<i>biopanning</i> , BoHV-1, diagnóstico, epitopo descontínuo, glicoproteína B				
Título em outra língua:	Prospecting and characterization of recombinant mimetic peptides to total antigens of herpesvirus type 1 by phage display				
Palavras-chave em outra língua:	<i>biopanning</i> , BoHV-1, diagnosis, discontinuous epitope, glycoprotein B				
Área de concentração:	Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos				
Data defesa: (dd/mm/ano)	24/08/2015				
Programa de Pós-Graduação:	Ciência Animal				
Orientador (a):	Guilherme Rocha Lino de Souza				
E-mail:	grlino@gmail.com				
Co-orientador (a):*	Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito Luiz Artur Mendes Bataus				
E-mail:	bataus@icb.ufg.br				

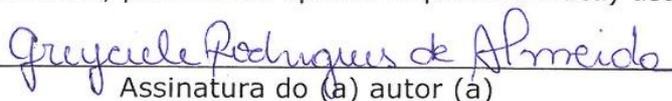
\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

### 3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

  
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 11 / 01 / 2016

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

GREYCIELE RODRIGUES DE ALMEIDA

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS  
RECOMBINANTES MIMÉTICOS A ANTÍGENOS TOTAIS DE  
HERPESVÍRUS BOVINO 1 POR MEIO DE *PHAGE DISPLAY***

Tese apresentada para a obtenção do título de  
Doutor em Ciência Animal junto à Escola de  
Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal  
de Goiás

**Área de Concentração:**

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de  
Alimentos

**Orientador:**

Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza - UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dra. Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito -  
UFG

Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus - UFG

GOIÂNIA  
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Almeida, Greyciele Rodrigues de

Prospecção e caracterização de peptídeos recombinantes miméticos a antígenos totais de herpesvírus bovino 1 por meio de phage display [manuscrito] / Greyciele Rodrigues de Almeida. - 2015.

xiii, 60 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza; co orientadora Dra. Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito; co orientador Dr. Luiz Artur Mendes Bataus.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2015.

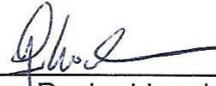
Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. biopanning. 2. BoHV-1. 3. diagnóstico, epitopo descontínuo, glicoproteína B. 4. epitopo descontínuoglicoproteína B. 5. glicoproteína B. I. Souza, Guilherme Rocha Lino de, orient. II. Brito, Wília Marta Elsner Diederichsen de, co-orient. III. Título.

**GREYCIELE RODRIGUES DE ALMEIDA**

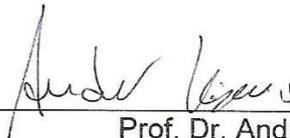
Tese defendida e aprovada em **24/08/2015** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



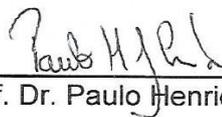
Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza  
(ORIENTADOR (A))



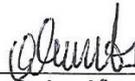
Profa. Dra. Fabiola Souza Fiaccadori



Prof. Dr. André Kipnis



Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha



Prof. Dr. Cairo Henrique Sousa de Oliveira

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me proporcionado inteligência e capacidade para ingressar no curso de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e concluí-lo com a realização de mais um trabalho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza, por ter aceitado orientar-me no meio do percurso, pela paciência e dedicação e por ter me acompanhado nessa trajetória;

À minha querida co-orientadora Prof. Dra. Wilia Marta Elsner Diederichsen de Brito, por ter aceitado orientar-me e permanecido até o fim. Mesmo distante geograficamente, nunca deixou de acompanhar-me na parte experimental;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus, pela colaboração na correção deste trabalho visando uma melhora integral desta tese;

À Prof. Dra. Divina das Dôres de Paula Cardoso, por ceder o laboratório e pela convivência agradável;

A todos os colegas e amigos do curso de pós-graduação, em especial a Greice Japolla, Ana Carla Peixoto Guissoni e Keili Maria Cardoso de Souza. Obrigada por toda a ajuda e paciência, por compartilharmos excelentes momentos, pela amizade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG e CAPES pelo financiamento do projeto e a toda equipe do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da EVZ/UFG.

A todos que direta ou indiretamente também contribuíram para a concretização deste trabalho, todo o meu respeito e agradecimento;

Ao meu amigo namorado Leandro Matheus de Azeredo, por estar presente alegrando-me os dias com muito amor e carinho;

Aos meus pais, Geraldo Alves Rodrigues e Marlene Carmo de Almeida. Obrigada pela vida e por terem me proporcionado todos os meios para meu crescimento pessoal e intelectual.

À Vida. Pelos bons momentos que nos alegram e pelos maus momentos que nos transformam

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	1
REFERÊNCIAS .....	15
CAPÍTULO 2 - PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES MIMÉTICOS A ANTÍGENOS TOTAIS DE HERPESVÍRUS BOVINO 1 POR MEIO DE <i>PHAGE DISPLAY</i> .....	23
1 INTRODUÇÃO .....	25
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2.1 Soroteca bovina.....	26
2.2 Cepa viral e titulação .....	26
2.3 Seleção com a biblioteca de peptídeos .....	27
2.3.1 Purificação das imunoglobulinas provenientes dos soros bovinos.....	27
2.3.2 Avaliação da qualidade das imunoglobulinas purificadas em gel <i>SDS-PAGE</i> .....	27
2.3.3 Seleção Biológica ( <i>Biopanning</i> ) .....	28
2.3.4 Titulação dos fagos .....	29
2.4 Caracterização dos clones (peptídeos).....	30
2.4.1 Extração de DNA dos fagos .....	30
2.4.2 Sequenciamento e análise em bancos de dados protéicos.....	30
2.5 Análises da reatividade dos clones por ensaio imunoenzimático (Phage-ELISA) .....	30
2.5.1 Amplificação dos clones para os imunoenaios .....	30
2.5.2 Fago selvagem.....	31
2.5.3 Phage-ELISA .....	31
2.6 Imunização de coelhos com os peptídeos selecionados .....	33
2.6.1 Análise da reatividade dos soros de coelhos imunizados com os peptídeos selecionados em ensaio imunoenzimático .....	34
2.6.2 Soroneutralização .....	35
3 RESULTADOS .....	36
3.1 Seleção com a biblioteca de peptídeos .....	36
3.2 Caracterização dos clones (peptídeos) reativos - Sequenciamento .....	37
3.3 Análise da reatividade dos clones selecionados por ensaio imunoenzimático (Phage-ELISA).....	38
3.4 Imunização de coelhos com os peptídeos selecionados .....	40

3.4.1 Análise da reatividade dos soros de coelhos imunizados com os peptídeos selecionados em ensaio imunoenzimático .....	40
3.4.2 Soroneutralização .....	42
4 DISCUSSÃO.....	43
5 CONCLUSÕES .....	48
REFERÊNCIAS .....	48
CAPÍTULO 3 - A CONFORMATIONAL EPITOPE MAPPED IN THE BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 ENVELOPE GLYCOPROTEIN B BY PHAGE DISPLAY AND THE HSV-1 3D STRUCTURE .....	52
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57
ANEXO 1 - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFG .....	59

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Ilustração simplificada de uma partícula viral dos herpesvírus com os seus componentes (A, B, C e D). .....	2
FIGURA 2 - Estrutura e organização genômica dos herpesvírus.....	3
FIGURA 3 - Organização genômica do BoHV-1. ....	4
FIGURA 4 - Representação esquemática de um processo de seleção por <i>phage display</i> .....	12
FIGURA 5 - Representação esquemática do bacteriófago M13. ....	13

### CAPÍTULO 2

FIGURA 6 - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (16%) e placa de Petri para titulação dos fagos. ....	36
FIGURA 7 - Reatividade dos clones selecionados com soros bovinos.....	39
FIGURA 8 - Reatividade dos fagos selecionados por <i>phage display</i> com 16 amostras de soros positivos e 16 soros negativos para anticorpos anti-BoHV-1 (valores médios das leituras DO). ....	40
FIGURA 9 - Resultados de ELISA para detecção de anticorpos presentes no soro de coelhos submetidos a imunização em quatro doses de quatro inóculos diferentes. ....	41
FIGURA 10 - Reatividade do soro de coelhos submetidos a imunização com quatro inóculos diferentes. ....	42

**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO 2**

- TABELA 1 - Frequência das sequências de DNA válidas traduzidas em sequência de aminoácidos, geradas após o sequenciamento e análise dos clones selecionados da biblioteca. ....37
- TABELA 2 - Resposta sorológica de coelhos imunizados com diferentes inóculos experimentais frente ao BoHV-1, analisada por soroneutralização. Títulos individuais de anticorpos obtidos após a primeira (0 DIAS), segunda (14 DIAS), terceira (28 DIAS), quarta (42 DIAS), quinta e última (49 DIAS) sorologia. ....43

**LISTA DE QUADROS****CAPÍTULO 2**

QUADRO 1 - Grupos experimentais (letras maiúsculas) para imunização com dois coelhos cada (números após as letras) e seus respectivos inóculos. ....	33
QUADRO 2 - Título (ufp/ $\mu$ L) obtido no processo de seleção dos fagos da biblioteca Ph.D. <sup>-12</sup> ligantes às IgGs provenientes do <i>pool</i> de soros positivos para BoHV-1. ....	37

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

-mer	- monômeros
7-mer	- sete aminoácidos lineares
°C	- graus Celsius
µg	- micrograma
µl	- microlitro
µm	- micrometro
aa	- aminoácidos
Arg	- arginina
Asp	- ácido aspártico
Ala	- alanina
BoHV-1	- herpesvírus bovino 1
BSA	- albumina do soro bovino
BVDV	- vírus da diarreia viral bovina
C7C-mer	- sete aminoácidos flanqueados por cisteínas
CO <sub>2</sub>	- dióxido de carbono
Da	- daltons
DIVA	- <i>differentiation of infected from vaccinated animals</i>
DMEM	- meio mínimo essencial de Eagle modificado
OD	- densidade ótica
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
ECP	- efeito citopático
EIE	- ensaio imunoenzimático
ELISA	- enzyme linked immunosorbent assay
Env	- envelope viral
EVZ	- Escola de Veterinária e Zootecnia
g"X"	- glicoproteína, onde o "X" refere-se à referida glicoproteína (p.ex.: gB)
Gly	- glicina
GenBank	- banco de dados do <i>National Center for Biotechnology Information</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- peróxido de hidrogênio
HCl	- ácido clorídrico
HSV-1	- herpesvírus humano 1
IBR	- rinotraqueíte infecciosa bovina
IFA	- imunofluorescência
Ig	- imunoglobulina
IL-2	- interleucina 2
Ile	- isoleucina
INF-γ	- interferon-gama
IPB	- balanopostite pustular infecciosa
IPTG	- isopropil b-D-tiogalactoside
IPV	- balanopostite pustular infecciosa
IPX	- imunoperoxidase
kbp	- kilobase pares
kDa	- kilodaltons
kg	- kilograma
L	- litro
L.A	- protótipo Los Angeles do BoHV-1
LB	- meio de cultura Luria-Bertani

<i>lacZ</i>	- gene da $\beta$ -galactosidase
Leu	- leucina
LT	- linfócitos T
mAb	- anticorpo monoclonal
MDBK	- células renais de bovino Madin Darby
MEM	- meio mínimo essencial de Eagle
mg	- miligramas
MHC	- complexo principal de histocompatibilidade
mL	- mililitro
M	- molar
mM	- milimolar
MM	- massa molar
M13	- bacteriófago filamentosos
N	- normal
NaCl	- cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	- bicarbonato de sódio
nm	- nanometro
OIE	- Organização Mundial de Saúde Animal
OPD	- orto-fenilenodiamina
pIII	- proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVI	- proteína VI capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVII	- proteína VII capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVIII	- proteína VIII capsídica de bacteriófagos filamentosos
pIX	- proteína IX capsídica de bacteriófagos filamentosos
PBS	- tampão fosfato salina
PEG	- polietilenoglicol
Ph.D	- bibliotecas de <i>Phage Display</i> New England Biolabs
Ph.D <sup>-12</sup>	- biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
Pro	- prolina
rpm	- rotações por minuto
SDS	- dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- análise eletroforética em gel de poliacrilamida
Ser	- serina
SFB	- soro fetal bovino
SN	- soroneutralização
TBS	- tampão Tris-NaCl
Thr	- treonina
Tris	- tris(hidroximetil) aminometano
TBST	- tampão PBS com Tween 20 (20X concentrado)
TCID	- dose capaz de infectar 50% dos cultivos celulares)
TRIS	- tris(hidroximetil) aminometano
Tyr	- tirosina
UFG	- Universidade Federal de Goiás
ufp	- unidade formadora de placa
V	- voltagem
Val	- valina
v/v	- volume por volume
Wt	- bacteriófago <i>Wild-type</i>
xg	- gravidade
X-gal	- b-galactosidase chromogenic substrate

## RESUMO

Membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) tem sido associado a diferentes condições clínicas em bovinos (doenças respiratórias, genitais e falhas reprodutivas). Não existe um procedimento padrão para medidas de controle e profilaxia das infecções causadas por herpesvírus. Nesse sentido, o *phage display* foi utilizado com o objetivo de selecionar novos antígenos mimetopos de glicoproteínas do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e que apresentam potencial para uso em vacinas e diagnóstico. A técnica de *phage display* foi realizada com a utilização de uma biblioteca de peptídeos randômicos e lineares composta de 12 resíduos de aminoácidos fusionada à pIII de fagos M13 (sem peptídeo), contra anticorpos anti-BoHV-1, purificados em coluna de cromatografia por afinidade. Após três ciclos de seleção (*biopanning*) e amplificação, 44 clones foram isolados e as sequências de aminoácidos dos peptídeos foram determinadas pelo sequenciamento gerando 16 sequências diferentes. A reatividade do *pool* de clones foi confirmada por ELISA, demonstrando a eficiência da seleção a partir dos anticorpos específicos. Para avaliação da especificidade individual, realizou-se o ELISA dos clones mais frequentes, tendo como controle negativo o fago M13. Foram selecionados três peptídeos (B, C e E) com afinidade por anticorpos anti-BoHV-1, e um destes, o peptídeo E (pepE), apresentou potencial antigênico na detecção de anticorpos para o diagnóstico sorológico do BoHV-1. Nos testes de imunização em coelhos, os três peptídeos induziram a produção de anticorpos específicos, porém, estes não foram capazes de neutralizar a lise celular ocasionada pelo BoHV-1 em placa. A análise *in silico* do dodecapeptídeo E (<sup>1</sup>DRALYGPTVIDH<sup>12</sup>) possibilitou a identificação de um novo epitopo descontínuo na glicoproteína B de envelope (Env gB) do BoHV-1. Há um curto motivo (<sup>338</sup>YKRD<sup>341</sup>) dentro de uma região do gene Env gB do BoHV-1, com alta similaridade com os motivos compartilhados pelo dodecapeptídeo da região N-terminal (<sup>5</sup>YxARD<sup>1</sup>) da gB e do Herpesvirus Humano 1 (HSV-1) (<sup>326</sup>YARD<sup>329</sup>), em que o resíduo <sup>328</sup>Arg é descrito como um alvo para anticorpos monoclonais neutralizantes (mAb) para a gB do HSV-1. Concluindo, além da caracterização de um sítio de ligação ao anticorpo na Env gB do BoHV-1, o pepE expresso pelo fago tem potencial de utilização como reagente para o diagnóstico virológico por ensaio ELISA-fago, que discrimina amostras de soro positivas e negativas para o BoHV-1.

**Palavras-chave:** *biopanning*, BoHV-1, diagnóstico, epitopo descontínuo, glicoproteína B

## ABSTRACT

Member of the *Herpesviridae* family, subfamily *Alphaherpesvirinae*, gender *Varicellovirus*, the bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) has been associated with different clinical conditions (respiratory and genital/reproductive diseases) in cattle. There is no standard procedure to control or prevent infections caused by herpesviruses. In this sense, phage display was used to select new glycoprotein mimotopes antigen of BoHV-1 that has potential for use in vaccines and diagnostics. The phage display technique was performed using a linear random peptide library consisting of 12 amino acid residues fused to the protein III of M13 phage (no peptide) against BoHV-1 specific IgGs, purified by affinity chromatography. After three cycles of selection (biopanning) and amplification, 44 clones were isolated and their amino acid sequences were determined by sequencing generating 16 different sequences. ELISA, demonstrating the efficiency of selection from the specific antibodies, confirmed the reactivity of pooled clones. Another ELISA evaluated the individual specificity of the most frequent clones, the M13 phage was used as a negative control. We selected three peptides (B, C and E) with affinity for anti-BoHV-1 antibodies, and the E peptide (pepE), showed to have potential as antigen for antibody detection in a serological test for BoHV-1. Immunization of rabbits with the peptides induced specific production of serum antibodies, but they were not able to neutralize BoHV-1 cell lysis. The *in silico* analysis of the dodecapeptide E (<sup>1</sup>DRALYGPTVIDH<sup>12</sup>) enabled the identification of a new discontinuous epitope on the envelope glycoprotein B (gB Env) of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1). There is a short motif (<sup>338</sup>YKRD<sup>341</sup>) within a region of the env gB BoHV-1 with high similarity to motifs shared by dodecapeptide the N-terminal region (<sup>5</sup>YxARD<sup>1</sup>) of gB and HSV-1 (<sup>326</sup>YARD<sup>329</sup>), wherein the <sup>328</sup>Arg residue is described as a target for neutralizing monoclonal antibodies (mAb) for HSV-1 gB. Besides the characterization of an antibody-binding site of the BoHV-1 Env gB, we have demonstrated that the phage-fused peptide has potential use as a reagent for virus diagnosis by phage-ELISA assay, discriminating BoHV-1 positive serum samples from negative ones.

**Keywords:** *biopanning*, BoHV-1, diagnosis, discontinuous epitope, glycoprotein B

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A bovinocultura é uma das mais importantes atividades econômicas do Estado de Goiás, assim como do Brasil. Ela ocupa vasta área do território nacional, sendo aproximadamente 174 milhões de hectares (20% de sua área) ocupados por pastagens, com 209 milhões de bovinos criados a pasto<sup>1</sup>. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)<sup>2</sup>, em 2013 o rebanho bovino brasileiro era formado por aproximadamente 211 milhões de cabeças. A região Centro-Oeste é responsável por 33,6% do rebanho bovino nacional com cerca de 71 milhões de cabeças, das quais aproximadamente 21 milhões são do Estado de Goiás, considerado o terceiro rebanho bovino do país<sup>2</sup>.

Dentro desse cenário nacional e estadual, perdas econômicas são inevitáveis. Em se tratando de perdas produtivas e reprodutivas, o Herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e seus respectivos subtipos (BoHV-1.1; BoHV-1.2a e BoHV-1.2b), destacam-se entre os patógenos de bovino pelo impacto econômico causado. Além das perdas diretas ocasionadas nos rebanhos infectados com BoHV-1, esse patógeno está associado às restrições ao comércio internacional de animais vivos ou seus subprodutos - sêmen, embriões e produtos de biotecnologia - previstos no Código Internacional de Saúde Animal<sup>3-6</sup>.

A ordem *Herpesvirales*, que possui mais de 200 vírus infectando diferentes espécies, é constituída por três famílias: *Alloherpesviridae*, com vírus de peixes e anfíbios; *Malacoherpesviridae*, com o vírus do molusco; e *Herpesviridae*, com vírus de mamíferos, aves e répteis. A Família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias, de acordo com suas propriedades biológicas: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*, sendo os vírus das subfamílias Alpha e Gamma os responsáveis por infecções em ruminantes. Cada subfamília é agrupada em gêneros de acordo com a homologia das sequências de DNA, similaridades na estrutura, organização genômica e relação antigênica<sup>7-10</sup>.

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* são classificados com base em suas características biológicas tais como variedade de hospedeiros, ciclo curto de replicação, rápida destruição celular em cultivo e estabelecimento de infecção latente. Dentre os membros dessa subfamília estão os gêneros, *Varicellovirus*, *Simplexvirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus*, onde fazem parte dentre outros, os Herpesvirus bovinos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5), o Herpesvirus bovino 2, os Herpesvírus da Doença de Marek e o vírus da Laringotraqueíte Infecciosa das Galinhas, respectivamente<sup>7</sup>.

Os vírions dos herpesvírus são esféricos e pleomórficos, possuem diâmetro que varia entre 120 a 200 nanômetros (nm). A partícula viral apresenta-se constituída pelo envelope viral bilipídico, tegumento, capsídeo proteico e “core” ou núcleo (FIGURA 1). O núcleo contém o genoma viral de 137 quilopares de bases (kbp) e DNA de fita dupla linear (FIGURA 1-A), esse material genético é protegido por um nucleocapsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 a 110nm de diâmetro formado por 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros) (FIGURA 1-B)<sup>7,8,11</sup>. O genoma do BoHV-1 é constituído por aproximadamente 136 kbp e apresenta massa molecular (MM) de 95-150 x 10<sup>6</sup> Daltons (Da) e atualmente, junto com o Herpesvirus bovino 5 (BoHV-5), são os únicos herpesvírus de ruminantes que tiveram seu genoma completamente sequenciado<sup>7,12,13</sup>.

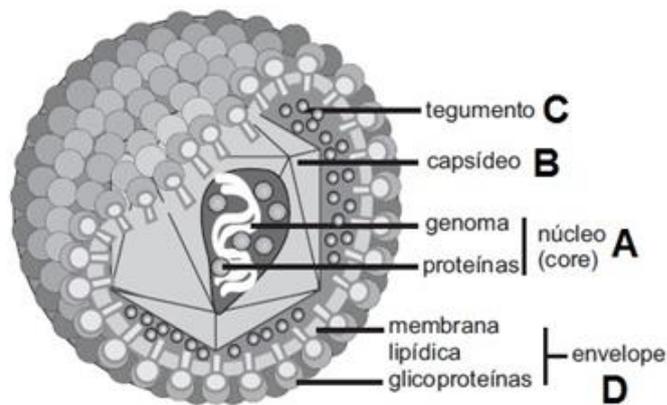


FIGURA 1 - Ilustração simplificada de uma partícula viral dos herpesvírus com os seus componentes (A, B, C e D).

Fonte: adaptada de Dr. Marko Reschke's Group, Marburg por Franco e Roehle<sup>7</sup>.

O tegumento é uma camada proteica amorfa e eletrodensa que recobre o núcleo (FIGURA 1-C), preenchendo o espaço entre o capsídeo e o envelope. Por sua vez, o tegumento é circundado por uma bicamada lipídica, o envelope viral (FIGURA 1-D), que é derivado de membranas celulares alteradas e contém numerosas protrusões de glicoproteínas que possuem diferentes propriedades antigênicas e ação na replicação viral. Além de glicoproteínas, o envelope também contém lipídeos<sup>7,11</sup>.

O genoma dos herpesvírus são classificados em seis grupos designados de A a F de acordo com o conteúdo de guanina e citosina (G+C), a presença, o número e a localização

de regiões repetidas e terminais. O BoHV-1 está no grupo D, com aproximadamente 72% de conteúdo de G+C e duas sequências únicas, a sequência longa (UL – “unique long”), composta por 104.054 pb e a sequência curta (US – “unique short”), composta por 9.548 pb (FIGURA 2)<sup>12,13</sup>.

A US é flanqueada por duas sequências invertidas e repetidas de aproximadamente 24 kpb (IR - “internal repeat” e TR - “terminal repeat”). O segmento UL é predominantemente fixado em somente uma orientação, denominada orientação protótipo em nível de clivagem dos concatâmeros de DNA. Assim, o DNA viral contém quantidades equimolares dos dois isômeros preditos pela inversão do segmento US, que diferem apenas na orientação relativa dos dois componentes (FIGURA 2)<sup>14-18</sup>.

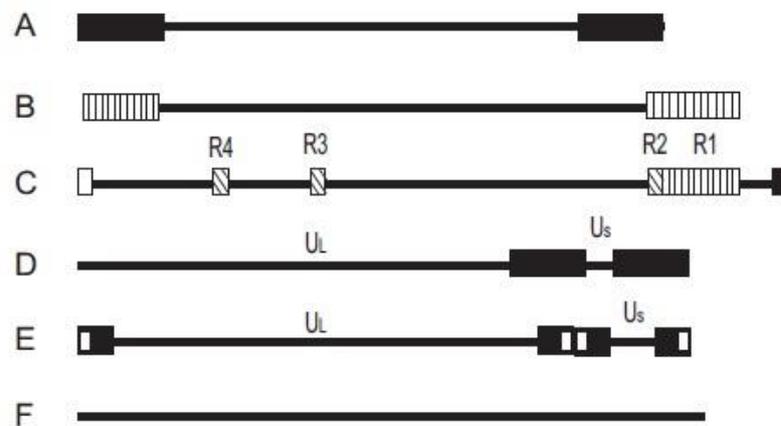


FIGURA 2 - Estrutura e organização genômica dos herpesvírus.

As linhas representam sequências únicas; os blocos representam sequências repetidas. O BoHV-1 possui genoma do tipo D, no qual apenas a região curta (US) é flanqueada pelas regiões repetidas invertidas e a região longa (UL) é fixada em somente uma direção.

Fonte: adaptado de Roizman e Pellet<sup>15</sup> por Delhon<sup>16</sup>.

Todos os herpesvírus possuem genes que codificam um grande número de proteínas que estão envolvidas com o metabolismo dos nucleotídeos, síntese de DNA, transformação de proteínas e morfogênese dos vírions. Pelo menos 33 das proteínas codificadas pelos genes do BoHV-1 são proteínas estruturais. Destas, 13 estão relacionadas com o envelope e dez são glicoproteínas (gK, gC, gB, gH, gM, gL, gG, gI, gD e gE)<sup>15,16</sup>. Dentre os dez genes que codificam glicoproteínas de envelope, seis estão localizados na

região UL e codificam: gK (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10), gL (UL1) e os quatro restantes são encontrados na região US e codificam: gG (UL4), gI (US9), gD (UL6) e gE (US8) (FIGURA 3)<sup>12,15</sup>.

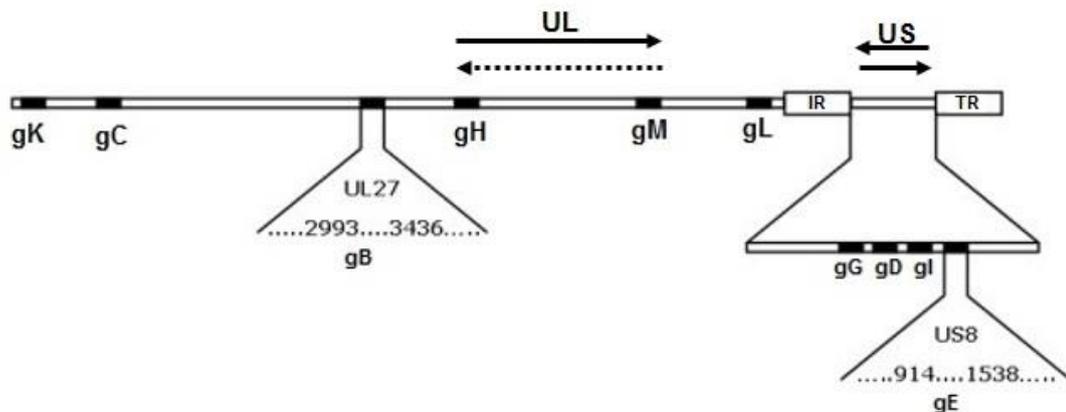


FIGURA 3 - Organização genômica do BoHV-1. O genoma se constitui de uma fita dupla linear de DNA dividida em um único segmento longo (UL) e um curto (US) flanqueado por duas sequências invertidas repetidas: repetição interna (IR) e repetição terminal (TR). O segmento US pode apresentar duas possíveis orientações enquanto que o segmento UL apresenta predominantemente uma orientação (representado pelas flechas, a flecha pontilhada ilustra que a orientação do segmento UL pode variar em torno de 5%). O genoma inclui dez genes que codificam para diferentes glicoproteínas: seis estão localizados no segmento UL e quatro no segmento US e são facilmente identificados na figura pela letra minúscula g (glicoproteína) seguida da letra maiúscula correspondente à glicoproteína (gX).  
Fonte: adaptado de Thiry<sup>17</sup>.

A interação entre as glicoproteínas resulta na formação de dímeros estáveis, tais como gH com gL e gE com gI. Alguns destes complexos são essenciais para a multiplicação viral e/ou funcionam como receptores para imunoglobulinas. Outros se ligam ao fator C3b do sistema complemento, interferindo na modulação da resposta imune pelo hospedeiro. As principais glicoproteínas estruturais ou de envelope são gB, gC e gD, que possuem grande potencial imunogênico por serem responsáveis pela interação com as células. A gB e a gD são as principais proteínas responsáveis pela replicação viral, enquanto que a gC, gD, gE, gG, gL e gH estão envolvidos na virulência<sup>20,18</sup>.

As regiões do genoma viral que codificam para as glicoproteínas despertam um interesse especial em pesquisa, tanto pelas importantes funções das mesmas, quanto como alvo do desenvolvimento de testes diagnósticos e de vacinas, haja vista que essas glicoproteínas localizam-se no envelope viral e superfície (membrana plasmática) da célula infectada<sup>12,15,17</sup>.

O BoHV-1 apresenta dois ciclos replicativos diferentes, a infecção aguda ou produtiva (ciclo lítico) e a infecção latente. O ciclo lítico ocorre em células totalmente permissivas à replicação nos locais de penetração do vírus no hospedeiro (epitélios e tecidos subjacentes) e, provavelmente, também em neurônios, antes do estabelecimento e durante a reativação da infecção latente, resultando na produção de progênie infecciosa<sup>7</sup>. A infecção aguda pelo BoHV-1 pode resultar em doenças do trato respiratório (rinotraqueíte infecciosa bovina; IBR), genital (vulvovaginite pustular infecciosa/ balanopostite pustular infecciosa; IPV/IPB), transtornos reprodutivos (abortamento, retorno ao cio, natimortos), conjuntivite e infecção generalizada em neonatos<sup>7,19-23</sup>.

O BoHV-1 penetra pelas membranas mucosas dos tratos respiratório superior e genital e realiza uma replicação primária nas células epiteliais locais. Essa replicação inicial provoca o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da infecção, tais como congestão local, presença de secreções e lesões vesiculares ou erosivas causadas pelo processo de lise celular decorrente da replicação viral. A fase de replicação produz altos títulos virais que são excretados nas secreções, além disso, há disseminação local e sistêmica por viremia – associada a monócitos e linfócitos, possibilitando a transmissão vertical e podendo ocasionar infecções fetais e abortos. O vírus é excretado em grandes quantidades por até 16 dias em títulos de até  $10^7$  TCID<sub>50</sub> (*Tissue Culture Infectious Dosis 50* - Dose capaz de infectar 50% dos cultivos celulares), durante a infecção aguda através de secreções respiratórias, oculares e genitais<sup>11,18,24</sup>.

A partir de uma infecção primária, o vírus penetra via neurônios sensoriais periféricos sendo transportado, por fluxo axonal retrógrado, aos gânglios trigêmeo ou sacral. Na infecção latente não há produção de partículas virais infecciosas, o genoma do BoHV-1 permanece inativo - sem expressão gênica ou replicação - em células neuronais dos gânglios sensoriais e autonômicos. A latência também pode ocorrer em células linfóides das amígdalas e linfócitos do sangue. O vírus latente apenas produz as proteínas relacionadas com a latência, que protegem as células infectadas da apoptose<sup>7,25,26</sup>.

A reativação viral ocorre após períodos de imunossupressão, causados por situações de estresse (transporte, parição, entre outros) ou administração de glicocorticóides.

Nestas ocasiões o animal portador pode excretar partículas virais no ambiente e transmitir o vírus para outros animais do rebanho. Animais que apresentam anticorpos contra BoHV-1, são considerados fontes potenciais de infecção pois podem atuar como disseminadores virais uma vez que estão latentemente infectados<sup>7,25-27</sup>.

A transmissão do BoHV-1 ocorre por contato direto com secreções nasais, oculares e genitais, sêmen e anexos fetais de animais infectados ou indiretamente por inalação de aerossóis contaminados, sendo o contato direto o mais relevante e comum na epidemiologia da doença, principalmente em rebanhos criados intensivamente. A transmissão transplacentária também ocorre, mas depende do estado imunológico da fêmea no momento da infecção. Um animal com infecção latente, quando da reativação viral, excreta partículas virais em menor quantidade e por um menor período (2 a 7 dias, geralmente). Apesar disso, a excreção viral durante a reativação representa uma importante forma de transmissão e perpetuação do vírus na natureza<sup>7,24,28</sup>.

As infecções respiratórias, causadas pelo BoHV-1.1, podem ocorrer de forma subclínica, leve ou severa. Os sinais clínicos são caracterizados por febre, apatia, anorexia, dispneia, taquicardia, taquipneia, rinite, mucosa nasal avermelhada (*red nose*), tosse e traqueíte com secreção fibrinopurulenta, descargas nasais serosas a mucopurulentas, secreção ocular e conjuntivite uni ou bilateral, apresentando morbidade de até 100% e baixos índices de mortalidade (<5%). Entre animais jovens, sujeitos a situação de estresse, o BoHV-1 é um dos agentes do Complexo Doença Respiratória dos Bovinos. Acomete principalmente novilhos submetidos ao estresse do desmame, transporte (febre dos transportes) e confinamento. O curso clínico é rápido, com recuperação em aproximadamente dez dias se não houver infecções secundárias<sup>7,29</sup>.

O genótipo BoHV-1.2 está associado com doença genital tanto na fêmea (IPV) quanto no macho bovino (IPB). Os sinais clínicos são caracterizados por lesões vesiculares e pústulas que ulceram e são recobertas por material fibrinoso, localizadas na vulva, pênis e prepúcio de bovinos. A resolução das lesões ocorre em torno de 10 dias. Ambos os agentes, BoHV-1.1 e BoHV-1.2, apresentam ampla distribuição no Brasil, com variações de prevalência entre 8 e 82%<sup>7,24</sup>.

O primeiro relato de IBR no Brasil foi feito por Galvão et al<sup>30</sup> no estado da Bahia em 1962. Posteriormente vários estudos comprovaram a disseminação da infecção no país. Em Goiás, a primeira detecção de anticorpos contra os herpesvírus bovinos ocorreu no final da década de 80 do século XX<sup>31</sup>. A presença do vírus em animais do Estado foi confirmada também por estudos posteriores de diferentes segmentos da população bovina (rebanho de

leite, corte, misto)<sup>32-34</sup>. A soroprevalência de anticorpos contra o BoHV-1 varia em cada região do Brasil. Na região Nordeste, a prevalência de anticorpos varia entre 56 e 96%, dependendo do tipo de criação analisada e do método diagnóstico utilizado<sup>35-39</sup>. Na região Centro-Oeste, a soropositividade encontrada nos rebanhos foi de 83%<sup>33</sup> e 51,9%<sup>34</sup>. No Sudeste do país, a ocorrência de anticorpos contra o vírus variou de 14,2 a 87,3% em Minas Gerais<sup>40</sup>. Por último, na região Sul, foram encontradas variações de 18,8 a 64,41% de animais reagentes para BoHV-1<sup>41-44</sup>.

A imunidade ao BoHV-1 é robusta, intensa e duradoura. Durante a infecção primária, há produção e liberação de interferon (INF- $\gamma$ ) e citocinas inflamatórias (interleucina 2, IL-2) pela resposta imune inespecífica do hospedeiro na tentativa de eliminar ou amenizar a infecção viral<sup>45</sup>. A resposta imune específica também é ativada na infecção primária, sendo a imunidade humoral detectada a partir do 7º dia pós-infecção e persistindo por vários anos. As imunoglobulinas detectadas (IgM, IgG e IgA) atingem os maiores níveis séricos a partir do 14º dia pós-infecção. Após esse período os níveis de IgM declinam rapidamente enquanto que os níveis de IgG declinam lentamente. A IgA é detectada nas secreções nasais e genitais entre os 4-30 dias pós-infecção. Bezerros recém-nascidos adquirem anticorpos ao ingerirem o colostro, porém, os anticorpos adquiridos apenas amenizam os sinais clínicos da doença não impedindo a infecção<sup>46</sup>.

A resposta imune celular pode ser detectada entre os 7-10 dias pós-infecção. Os linfócitos T (LT) são ativados e exercem citotoxicidade após reconhecimento de epítopos virais das glicoproteínas gB, gC, gD, gE, gI e gG que se encontram associados à moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície das células infectadas, causando lise destas. Linfócitos T CD8+ reconhecem epítopos virais associados a proteínas de MHC-I e linfócitos T CD4+ à epítopos associados à MHC-II. Além disso, os linfócitos CD4+ contribuem com os linfócitos B na produção de anticorpos<sup>46,47</sup>. O BoHV-1 também pode causar imunossupressão no hospedeiro por meio da diminuição da expressão de moléculas MHC e apresentação de antígenos, ocasiona a morte das células T citotóxicas e prejudica a função e atividade de macrófagos (fagocitose, quimiotaxia) e linfócitos (proliferação, citotoxicidade), com redução dos níveis de IL-2. Estes mecanismos favorecem a instalação de outros agentes, com o conseqüente desenvolvimento de doenças secundárias que contribuem no Complexo Doença Respiratória dos Bovinos<sup>46</sup>.

O diagnóstico presuntivo da infecção por herpesvírus é feito por meio do histórico da propriedade, sinais clínicos e lesões observadas ao exame físico, porém, para confirmar a suspeita da doença devem-se realizar exames laboratoriais. Se o animal está na fase aguda da

doença devem ser utilizadas técnicas para a detecção do vírus, antígenos ou DNA. Utilizam-se as técnicas de imunofluorescência (IFA) e imunoperoxidase (IPX) para a identificação do agente viral e ensaio imunoenzimático (EIE) para a detecção de antígenos virais. A detecção pode ser realizada de forma direta em esfregaços celulares, tecidos frescos, congelados ou incluídos em parafina, ou após o isolamento em cultivo celular. Essas reações baseiam-se na reação de anticorpos específicos com o antígeno nas amostras suspeitas<sup>11,48,49</sup>.

A detecção de anticorpos para micro-organismos que estabelecem infecções persistentes, como é o caso dos herpesvírus, indica a condição de portador, sendo utilizada para a detecção individual ou condição da situação do rebanho. A sorologia pode ser realizada por soroneutralização (SN) ou EIE. Essas técnicas são utilizadas em inquéritos soropidemiológicos, certificação de rebanhos para comércio internacional, triagem de reprodutores destinados à coleta e comercialização de sêmen, apoio a programas de erradicação e posterior vigilância, além de fins investigativos em estudos vacinais com desafio viral. A técnica de SN permite a identificação das diferentes fases da infecção e a ativa circulação viral no rebanho quando da coleta de amostras e realização de testes pareados<sup>49-52</sup>.

O controle visa diminuir a incidência da infecção por BoHV-1 nos animais susceptíveis dentro do rebanho uma vez que não há tratamento e a infecção é persistente nos rebanhos devido à presença de animais com infecção latente<sup>7</sup>. Algumas medidas minimizam o risco de disseminação viral dentro do rebanho, como manejo sanitário e nutricional adequados, desinfecção periódica das instalações, controle de pragas e imunização dos animais<sup>28</sup>. De maneira geral, adota-se a estratégia de controle adequada à situação epidemiológica do rebanho ou do país. Deve-se realizar uma análise de custo-benefício considerando a prevalência, manifestação clínica da doença, o grau de melhoramento genético dos animais, despesas com exames laboratoriais (sorodiagnóstico e identificação viral), vacinação e descarte de animais infectados antes da implementação de programas de combate ao BoHV-1<sup>53,54</sup>.

Os rebanhos que apresentam elevado número de animais soropositivos, com evidência de infecção clínica, sistemas de recria e confinamento que agregam animais de várias procedências e propriedades de compra e venda (animais de várias origens) devem realizar o controle por meio de vacinação contínua e regular. Dessa forma a circulação viral e ocorrência de novos casos diminuirão. Os rebanhos com ausência da enfermidade ou com sorologia negativa devem implementar medidas de biossegurança para evitar a entrada do agente etiológico. Nesse caso, recomenda-se teste e descarte de animais reagentes antes que

sejam introduzidos no rebanho além da realização de testes periódicos para verificar e eliminar possíveis animais positivos<sup>7</sup>.

As vacinas destacam-se dentro das medidas de controle por diminuírem a severidade dos sinais clínicos e a circulação viral. Entretanto, não impedem a infecção por vírus de campo bem como se forem vacinas compostas por vírus vivo possibilitam que os animais vacinados se tornem infectados de forma latente. No Brasil, estão atualmente autorizadas para o comércio vacinas contra o BoHV-1 com vírus completo, inativado, atenuado convencional e atenuado mutante temperatura-sensível (TS)<sup>7,54,55</sup>.

As vacinas inativadas são obtidas a partir do vírus vivo, inativado por métodos físicos ou químicos. Como o vírus é incapacitado de replicar-se nas células do hospedeiro, elas induzem principalmente a imunidade humoral. Possuem menor eficácia quando comparadas com as vacinas vivas atenuadas, necessitando de revacinações frequentes<sup>53</sup>, porém, são mais seguras devido à impossibilidade de replicação viral no hospedeiro. Por esse motivo são consideradas seguras para fêmeas gestantes<sup>55</sup>. As vacinas inativadas minimizam a manifestação dos sinais clínicos e reduzem a excreção viral<sup>56</sup>. Além disso, as vacinas inativadas não induzem latência e não apresentam risco de reversão da virulência ou recombinação genética. Contudo, não previnem contra infecções posteriores causadas por vírus de campo ou primo-infecção em bezerros amamentados com o colostro de vacas imunizadas durante a gestação, além da possibilidade de causarem latência<sup>55,57</sup>.

As vacinas anti-BoHV-1 são atenuadas pela realização de passagens seriadas do vírus em cultivo celular. A atenuação reduz o potencial patogênico do vírus, mas mantém sua capacidade de replicação no organismo animal<sup>57</sup>. As vacinas atenuadas convencionais induzem tanto a resposta imune humoral quanto a celular, necessitando da aplicação de uma única dose para garantir uma imunidade prolongada. Contudo, não são totalmente seguras, pois há possibilidade de reversão da virulência já que as mutações produzidas na atenuação são ao acaso e completamente desconhecidas, com isso não se podem prever as circunstâncias que ocasionam a reversão<sup>57</sup>. Além disso, podem causar infecção fetal e abortamento, sendo descansável a utilização de vacinas atenuadas convencionais em fêmeas gestantes e também podem ocasionar sinais clínicos leves e estabelecer latência<sup>57,58</sup>.

As vacinas temperatura-sensíveis (TS) são obtidas a partir do cultivo celular de variantes virais capazes de replicar sob temperaturas mais baixas que a temperatura do organismo hospedeiro (geralmente 30-33°C). Essas variantes virais são incapazes de replicar à temperatura corporal e, por isso, não causam infecção sistêmica quando administradas ao hospedeiro. As vacinas TS são administradas via intranasal, induzem rápida imunidade na

mucosa local, sem risco de infecção fetal pelo BoHV-1. Como não se disseminam via sistêmica, são utilizadas contra doença genital causada pelo BoHV-1 (balanopostite e vulvovaginite)<sup>11,57</sup>.

As vacinas utilizadas no Brasil são incompatíveis com programas de erradicação, pois não permitem a diferenciação entre animais infectados (portadores) e animais vacinados. Nesse sentido, vacinas geneticamente modificadas são utilizadas em programas de controle e erradicação de infecções que produzem infecções persistentes, como o BoHV-1<sup>57</sup>. As vacinas com marcadores antigênicos – *differentiation of infected from vaccinated animals* (princípio DIVA), utilizadas em vários países europeus, mas em fase de desenvolvimento no Brasil<sup>11</sup>, conseguem fazer essa distinção sorológica, porém, a vacinação é associada com teste sorológico - geralmente um teste ELISA - que detecta anticorpos contra a proteína viral deletada, mas que está presente no vírus de campo. Ou seja, a detecção de anticorpos específicos contra esta proteína indica que os animais foram infectados com o vírus de campo<sup>57,59,60</sup>.

As vacinas para o BoHV-1, utilizando o princípio DIVA, são produzidas pela deleção do gene que codifica a gE<sup>61</sup>. Este gene não é essencial para a replicação viral e o seu produto, a gE, induz boa resposta imune humoral<sup>55</sup>. A vacina glicoproteína E deletada (gE-) é segura para fêmeas gestantes, não ocasionando efeitos deletérios nelas e nem em seus fetos<sup>58</sup>. Essas vacinas são comercializadas acompanhadas do teste diagnóstico específico e sua utilização possibilita a implantação de programas de vacinação em áreas de risco, sem prejudicar a perda da condição de rebanho livre ou prejuízo ao trânsito de animais<sup>57</sup>.

As vacinas para o BoHV-1 disponíveis no mercado brasileiro induzem títulos contra o BoHV-1 abaixo daqueles sugeridos como compatíveis com proteção<sup>62</sup>. É preciso melhorar a imunogenicidade e eficácia das vacinas atuais e, simultaneamente, desenvolver vacinas diferenciais para utilização em programas de erradicação. Essa necessidade incentiva o uso de novas tecnologias para desenvolver novas vacinas virais contra o BoHV-1<sup>63,64</sup>.

O fato é que não existe um procedimento padrão para medidas de controle e profilaxia das infecções causadas por herpesvírus. Cada propriedade estabelece os procedimentos de acordo com a soroprevalência e aparecimento de sinais clínicos da doença. A disseminação do BoHV-1 nos rebanhos de leite e corte de diversas regiões do Brasil aliada a falta de informações a respeito de índices reprodutivos e produtivos, utilizando raças bovinas adaptadas ou não ao nosso clima e ao tipo de manejo zootécnico tem gerado diferentes condutas entre técnicos e criadores, com relação a adoção de condutas profiláticas para o BoHV-1<sup>53</sup>.

Nesse sentido, a prospecção de epítomos do BoHV-1 por meio da sua interação com anticorpos anti-BoHV-1 é uma abordagem alternativa para seleção de novos antígenos vacinais e de diagnóstico. Esse processo de seleção *in vitro* é denominado *phage display*. Essa seleção biológica (*biopanning*), com utilização de bibliotecas de *phage display* é uma metodologia que permite selecionar peptídeos ou outras biomoléculas com diversas finalidades, dentre elas a identificação de motivos de ligação de receptores bioquímicos, mapeamento de superfícies celulares e teciduais, aplicações em genômica e proteômica, obtenção de medicamentos, vacinas e inibidores enzimáticos<sup>65-68</sup>.

O *Phage display* foi descrito inicialmente por Smith<sup>69</sup>. Essa técnica utiliza bacteriófagos (vírus de bactéria) geneticamente modificados para expressar sequências de peptídeos na sua superfície, permitindo ao pesquisador fazer uma varredura em células, tecidos ou órgãos em busca de pares receptores-ligantes<sup>70</sup>. Os ligantes são os peptídeos identificados que se ligam a receptores presentes no alvo em estudo. Como a informação codificadora da sequência do peptídeo está contida no genoma do bacteriófago, uma única partícula viral ligada a superfície de uma célula ou tecido pode ser recuperada por infecção bacteriana, e o peptídeo responsável identificado<sup>70</sup>. O *Phage display* permite o estudo das interações moleculares de uma única molécula ou célula, sem necessidade de qualquer conhecimento prévio sobre a natureza da mesma. Essa técnica representa uma poderosa ferramenta para obtenção de moléculas com grande potencial de aplicação biotecnológica<sup>71</sup>.

Inicialmente, genes que codificam milhões de proteínas aleatórias são inseridos no genoma de bacteriófagos gerando uma biblioteca de fagos. Após a inserção os fagos expressam essas proteínas na superfície viral, fusionadas a uma proteína do capsídeo. Uma maior variedade de peptídeos na biblioteca gera uma maior probabilidade de seleção de fagos expondo proteínas que interajam como o alvo-ligante<sup>72</sup>.

No *phage display*, a biblioteca de fagos é apresentada às moléculas-alvo, que geralmente se encontram imobilizadas em suporte sólido (placa de imunoensaio, membrana, microesfera, etc.) (FIGURA 4). Interações fracas entre os fagos expressando proteínas e o alvo são desfeitas por lavagens sucessivas, enquanto aqueles fagos que expõem moléculas com elevada afinidade pelo alvo são recuperados por eluição (FIGURA 4). Estes representam o resultado da bioprospecção<sup>73,74</sup>. A eluição é feita com a utilização de tampões ácidos ou de elevada força iônica, que desestabilizam de modo inespecífico interações entre proteínas<sup>74,75</sup>.

A próxima etapa é amplificar os fagos eluidos em cultivo bacteriano e submetê-los a novos ciclos de seleção (ligação, eluição e amplificação) (FIGURA 4). O processo é monitorado através da titulação dos fagos adicionados (entrada) e recuperados (saída) em

cada ciclo, além da realização de imunoenaios que confirmam a afinidade de seleção. De três a cinco ciclos são suficientes para obtenção de um quantitativo de saída com fagos expondo moléculas com elevada afinidade pelo alvo-ligante. Colônias de clones isoladas desse quantitativo de saída são sequenciadas e analisadas quanto à sensibilidade e especificidade, e eventualmente obtidas na forma não fusionada a um fago (solúvel), sendo destinados a diversas aplicações<sup>76,77</sup>.

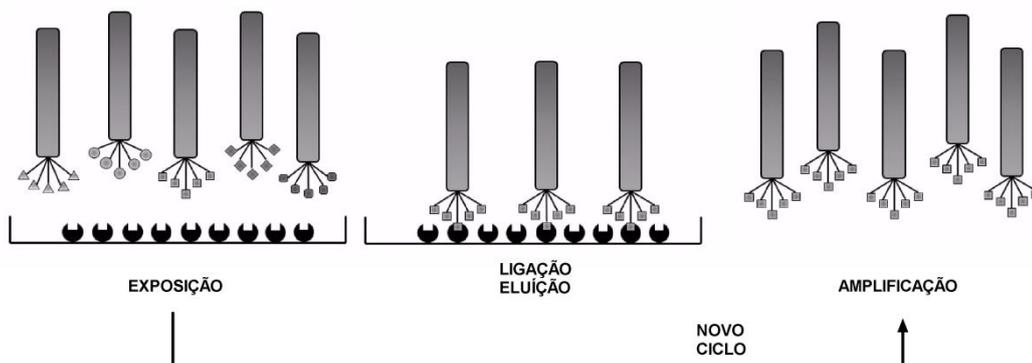


FIGURA 4 - Representação esquemática de um processo de seleção por *phage display*. Uma biblioteca de peptídeos é exposta ao alvo immobilizado na placa de microtitulação (EXPOSIÇÃO). Fagos contendo peptídeos ligantes são selecionados e fagos com baixa afinidade ao alvo são descartados (LIGAÇÃO). Fagos ligantes com alta afinidade ao alvo são eluídos da placa (ELUIÇÃO). Os clones reativos são amplificados (AMPLIFICAÇÃO) em *Escherichia coli* e o processo repetido por vários ciclos.

Fonte: Adaptado de NEB<sup>78</sup>.

Os bacteriófagos (fagos) são vírus da família *Inoviridae*, gênero *Inovirus*, que infectam bactérias, tanto gram-negativas quanto gram-positivas<sup>79</sup>. Os fagos utilizados no *Phage display* são filamentosos e infectam enterobactérias como *E. coli*. A utilização de fagos filamentosos como vetores de clonagem tem como vantagens a estabilidade em ampla faixa de pH, de temperatura e ainda podem se acumular em elevada concentração nas células bacterianas infectadas sem causar lise às células<sup>73,76,80-84</sup>.

O fago filamentoso mais utilizado em bibliotecas de *phage display* é o M13 (FIGURA 5). Ele tem uma estrutura em forma de haste flexível com um genoma circular de DNA-fita simples de cerca de 6400 bases, envolta em um capsídeo composto pelas proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. Embora estas cinco proteínas possam ser utilizadas para apresentação de moléculas, pVIII e pIII são as mais empregadas para este fim<sup>82,85,86</sup>. Embora

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<sup>87</sup>.

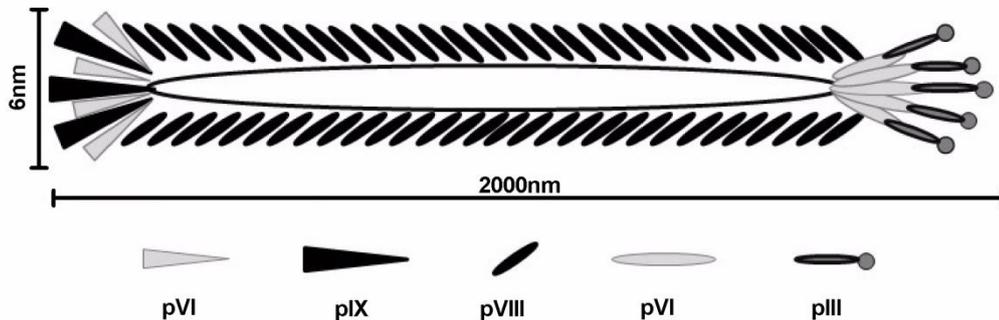


FIGURA 5 - Representação esquemática do bacteriófago M13. Desenho mostrando as proteínas constituintes da capa proteica do vírus: pIII, pVI, pVIII, pIX e pVII.

Fonte: adaptado de Konthur e Walter<sup>88</sup>.

O fago M13 possui uma rápida propagação e não necessita de seleção por antibiótico. Além disso, o gene *lacZ*, incluído neste vetor por Messing<sup>89</sup>, facilita a seleção entre colônias bacterianas infectadas com fagos de bibliotecas (colônias azuis) e colônias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (colônias brancas). O vetor M13 permite a construção e propagação de bibliotecas de *phage display* pelo uso de técnicas padronizadas para fagos M13. Para pequenos insertos, a biblioteca pode ser amplificada repetidamente com pouca perda de sequências e diversidade<sup>90-92</sup>.

As bibliotecas de peptídeos randômicos são as mais utilizadas. Os peptídeos podem ser expressos em forma linear ou conformacional, e são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítomos contínuos ou descontínuos. Porém, sabe-se que as imunoglobulinas interagem preferencialmente com epítomos não lineares, dessa forma a introdução de cisteínas nas extremidades da sequência randômica impõe ao peptídeo uma conformação circular pela formação de uma ponte dissulfeto<sup>81,85,93-95</sup>. Além disso, depois de selecionados, os peptídeos podem ser sintetizados quimicamente ou clonados e expressos em um sistema adequado<sup>76,85,96</sup>.

As bibliotecas de peptídeos comerciais constituem-se de monômeros (-mer) compostos por 7 ou 12 resíduos de aminoácidos, que apresentam uma complexidade de 2

bilhões de clones independentes. As bibliotecas de sete aminoácidos lineares (7-mer) e sete aminoácidos flanqueados por cisteínas (C7C-mer) apresentam aproximadamente  $1,28 \times 10^9$  possíveis sequências enquanto que as bibliotecas compostas por doze resíduos lineares (12-mer) apresentam aproximadamente  $4,1 \times 10^{11}$  sequências. Além disso, elas contêm uma sequência ligante curta (Gly-Gly-Gly-Ser) entre o peptídeo exposto e a pIII<sup>78</sup>.

Os peptídeos selecionados por meio da técnica de *phage display* a partir de epítomos naturais possuem pelo menos dois usos. Primeiramente, como mimetopos, ou seja, peptídeos que não se assemelham ao ligante natural, porém mimetizam o epítomo natural. As similaridades físico-químicas, de organização conformacional tridimensional ou de sequência linear possibilitam esse mimetismo<sup>85</sup>. Os mimetopos possuem as mesmas propriedades imunogênicas do determinante que deu origem à especificidade do anticorpo em questão e podem, portanto, ser destinados a aplicações de diagnóstico<sup>97</sup> e terapêutica<sup>98</sup>. A segunda utilização de peptídeos identificados a partir de epítomos naturais seria como componente de vacinas sintéticas. Nesse caso, somente aqueles peptídeos antigênicos seriam úteis no desenvolvimento de preparados vacinais, uma vez que, os anticorpos produzidos contra estes mimetopos devem reconhecer o epítomo natural do patógeno real<sup>85</sup>.

Considerando as perdas econômicas causadas em rebanhos com BoHV-1, assim como a possibilidade de embargo comercial pela presença destes patógenos e a importância econômica da bovinocultura no Estado de Goiás e no Brasil, a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias e produtos relacionados ao diagnóstico ou controle (vacinas) do BoHV-1 tem uma importância estratégica para a manutenção da qualidade da pecuária leiteira e de corte em nossa região, garantindo abertas as fronteiras para a exportação, cada vez mais exigentes quanto à qualidade sanitária dos animais.

Dessa forma este estudo concentrou-se em identificar dentro de uma biblioteca comercial apresentada em fagos, peptídeos mimetopos reativos a anticorpos produzidos por animais naturalmente infectados pelo BoHV-1. Os objetivos específicos foram: purificar anticorpos por meio da cromatografia de afinidade em coluna de *Shepharose* imobilizada com antígenos totais do BoHV-1; selecionar peptídeos miméticos a antígenos totais de BoHV-1 utilizando bibliotecas de *phage display*; sequenciar, caracterizar e avaliar o potencial para o diagnóstico da infecção pelo BoHV-1 dos mimetopos selecionados.

## REFERÊNCIAS

1. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes.** Estatística Exportação por Ano. [acesso 22 jul 2015]. Disponível em: [http://www.abiec.com.br/3\\_pecuaria.asp](http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp).
2. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Produção da Pecuária Municipal, v.41, 2013. [acesso 11 nov 2015]. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2013/ppm2013.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf).
3. **Organização Mundial para a Saúde Animal e Oficina Internacional de Epizootias.** OIE, 2015. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. Office International des Epizooties (OIE). [acesso 18 mar 2015]. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>.
4. Junqueira JRC, Alfieri AA. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina: Ci Agrárias*. 2006;27(2):289-29.
5. Rufino FAL, Seneda MM, Alfieri AA. Impacto do herpesvírus bovino 1 e do vírus da diarreia viral bovina na transferência de embriões. *Arch Vet Sci*. 2006;11(1):78-84.
6. Kirkbride CA. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest*. 1992;4(2):175-80.
7. Franco AC, Roehe PM. Herpesviridae, In: Flores EF, **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM; 2007. 433-488p.
8. Davison JÁ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, Mcgeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. The order Herpesvirales. *Arch Virol*. 2009; 154(1):171-177.
9. Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*. 2010; 143(1):52-69.
10. **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).** Taxonomy, 2014. [acesso 16 nov 2015]. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
11. Franco AC, Roehe PM, Varela APM. Herpesvirinae. In: Flores, EF. **Virologia Veterinária**. Virologia Geral e Doenças Víricas. 2ed. Santa Maria: UFSM, 2012. 503-570p.
12. Delhon G, Moraes MP, Lu Z, Afonso CL, Flores EF, Weiblen R, Kutish GF, Rock DL, 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J Virol*. 2003; 77(19):10339-10347.
13. Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS. Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev*. 2009; 10(1):85-98.
14. Roizmann B, Knipe MD. Herpes simplex virus and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanok RM, Monath TP, Melnick JL, Roizman B, Straus SE. **Fields Virology**. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. 2231-2295p.

15. Roizman B, Pellett PE. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: Knipe DM, Howley PM. **Fields virology**. 4ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 2381-2397p.
16. Delhon G. Replicação dos vírus RNA. In: Flores EF. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM; 2007. 137-164p.
17. Thiry J, Widén F, Grégoire F, Linden A, Belák S, Thiry E. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. **BioMed Central Vet Res**. 2007; 3(26). doi:10.1186/1746-6148-3-26.
18. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Vet Res**. 2007;v.38(2):181-209.
19. Kit S, Qavi H, Gaines JD, Billingsley P, McConnell, S. Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. **Arch Virol**. 1985; 86(1-2):63-83.
20. Silva AM, Flores EF, Weiblen R, Canto MC, Irigoyen LF, Roehle PM, Sousa RS. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Rev Microbiol**. 1999; 30(1):22-31.
21. **Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare (SCAHAW)**. 2000. Report on Bovine Herpesvirus 1 (BHV1) marker vaccines and the accompanying diagnostic tests. Scientific Committee on Animal Health and Welfare, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. [acesso 4 jul 2015]. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out49\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out49_en.pdf).
22. Caron L, Flores EF, Weiblen R, Scherera CFC, Irigoyenb LF, Roehle PM, Odeond A, J.-H Sure. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Vet Microbiol**. 2002; 84(4):285-95.
23. Kunrath CF, Vogel FSF, Oldoni I, Flores EFF, Weiblen R, Dezengrini R, Torres FD, Pan, KA. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciêñ Rural**. 2004;34(6):1877-1883.
24. Henzel A, Diel DG, Arenhart S, Vogel FSF, Weiblen R, Flores EF. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras infectadas experimentalmente. **Pesq Vet Bras**. 2008;28(3)140-148.
25. Jone C. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. **Clin Microbiol Rev**. 2003; 16 (1):79-95.
26. Mettenleiter, TC. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Res**. 2003; 92(2):197-206.

27. Affonso IB, Amoril JGR, Alexandrino B, Buzinaro MG, Ramos ASM, Samara, SI. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BOHV-1) nas dez regiões de planejamento do estado de Goiás, Brasil. **Ciênc Anim Bras**. 2010; 11(4):892-898.
28. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. **Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2007. 2156p.
29. Yates, W. D. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. **Can J Comp Med**. 1982;46(3):225-263.
30. Galvão CL, Doria JD, Alice FJ. Anticorpos neutralizantes para o vírus rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil. **Bol Inst Biol Bahia**. 1962/1963; 6(1); 15-25.
31. Anunciação AVM, Leite R, Moreira EC. Presença de anticorpos para o Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) em bovinos nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, através da prova de Hemaglutinação Passiva. **Arq Bras Med Vet Zootec**. 1989; 41(5):433-441.
32. Faria BO, Freneau GE, Brito WMED, Campos JR ACP, Vieira S. Estudo de anticorpos contra o herpes vírus bovino tipo 1 em touros em municípios de entorno de Goiânia, GO. **Rev Bras Rep An**. 2003;27(3):543-546.
33. Vieira S, Brito WMED, Souza WJ, Alfaia BT, Linhares CL. Anticorpos para o Herpesvírus Bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. **Ciênc Anim Bras**, 2003;4(2)131-137.
34. Barbosa ACVC, Brito WMED, Alfaia BT. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciênc Rural**. 2005;35(6):1368-1373.
35. Silva FF, Castro RS, Melo LEH, Abreu SRO, Muniz AMM. Anticorpos neutralizantes contra o HVB-1 em bovinos do Estado de Pernambuco. **Arq Bras Med Vet Zootec**. 1995;47(4):597-599.
36. Melo CB, Oliveira AM, Figueiredo HCP, Leite RC, Lobato ZIP. Prevalência de anticorpos contra Herpesvírus bovino-1, vírus da Diarreia Bovina a Vírus e Vírus da Leucose Enzoótica Bovina em bovinos do Estado de Sergipe, Brasil. **Rev Bras Reprod Anim**. 1997;21(2)160-161.
37. Melo CB, Azevedo, EO, Alfaro, AEP, Lobato ZIP, Lobato, FCF, Leite RC. Anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino 1 (HVB 1) em bovinos do sertão da Paraíba. **Ciênc Vet Trop**. 1999;2: 43-44.
38. Cerqueira RB, Carminati R, Silva JM, Soares GC, Meyer R, Sardi S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Braz J Vet Res Anim Sci** [online] 2000; 37(6). [acesso 1 out 2015] Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-95962000000600014&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000600014&lng=en&nrm=iso&tlng=en). ISSN: 1678-4456.

39. Sousa VE, Freitas EJP, Sá JS, Bezerra DC, Bezerra NPC, Santos HP, Pereira HM. Frequência de anticorpos contra Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos não vacinados da Bacia Leiteira de Imperatriz-MA, **Brasil Vet Zootec**. 2011;18(4):p.775-778.
40. Melo CB, Lobato ZIP, Camargos MF, Souza GN, Martins NRS, Leite RC. Distribuição de anticorpos para herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos. **Arq Bras Med Vet Zootec**. 2002;54(6):575-580.
41. Lovato LT, Weiblen R, Tobias FL, Moraes MP. Herpesvírus bovino tipo1 (BHV1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciênc Rural**. 1995;25(3):425-430.
42. Vidor T, Halfen DC, Leite TE, Coswig LT. Herpes Bovino Tipo 1 (BHV-1). I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciênc Rural**. 1995;25(3):421-424.
43. Médici KC, Alfieri AA, Alfieri AF. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciênc Rural**. 2000;30(2):347-350.
44. Dias JA, Alfieri AA, Médici KC, Freitas JC, Neto JSF, Muller EE. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. **Pesq Vet Bras**. 2008;28(3):161-168.
45. Levings RL, Roth JA. Immunity to bovine herpesvirus 1: I. Viral lifecycle and innate immunity. **Anim Health Res Ver**. 2013;14(1):88-102.
46. Levings RL, Roth JA. Immunity to bovine herpesvirus 1: II. Adaptive immunity and vaccinology. **Anim Health Res Ver**. 2013;14(1):103-123.
47. Machado PRL, Carvalho L, Araújo MIAS, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An Bras Dermatol**. Riode Janeiro. 2004;79:647-662.
48. Brum MCS, Weiblen R. Detecção, indentificação e quantificação de vírus. IN: Flores EF. **Virologia Veterinária**. Virologia Geral e Doenças Víricas. 2ed. Santa Maria. UFSM. 2012, 54-82p.
49. Flores EF, Cargnelutti JF. Diagnóstico Laboratorial de infecções víricas. In: Flores, EF. **Virologia Veterinária**. Virologia Geral e Doenças Víricas. 2ed. Santa Maria: UFSM. 2012, 326-365p.
50. Parreño V, Romera SA, Makek L, Rodriguez D, Malaar D, Maidana S, Compaired D, Combessies G, Vena MM, Garaicoechea L, Wigdorovitz A, Marangunich L, Fernandez F. Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and Guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards. **J Virol Meth**. 2010; 169(1): 143-153.

51. Bashir S, Singh R, Sharma B, Yadav S. Development of a sandwich ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1. **Asian Pacif J Trop Med.** 2011; 4(5): 363-366.
52. Organização Mundial para a Saúde Animal e Oficina Internacional de Epizootias. OIE, 2015. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.** OIE, 2015. 1178p. [acesso 22 jul 2015]. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>.
53. Del Fava C, Pituco EM, D'angelo JL. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Rev Ed Cont.** 2002; 5(3):300-312.
54. PITUCO EM. Aspectos clínicos, prevenção e controle da IBR. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal São Paulo. **Infobibos** - Informações Tecnológicas, 2009. [acesso 6 set 2011]. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2009\\_2/IBR/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/IBR/index.htm).
55. Van Drunen Littel-van den Hurk S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Vet Microbiol.** 2006;113(3-4):275-82.
56. Moreira SPG, Sâmara SI, Arita GMM, Ferreira F, Pereira GT. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Braz J Vet Res Anim Sci.** 2001;38:127-130.
57. Canal CW, Vaz CSL. Vacinas víricas. In: Flores EF. **Virologia Veterinária.** Virologia Geral e Doenças Víricas. 2ed. Santa Maria. UFSM. 2012, 367-398p.
58. Spilki FR; Silva AD, Batista HBCR.; Oliveira AP, Winkelmann E, Franco AC, Porciúncula JA, Roehe PM. Field evaluation of during gestation and horizontal spread of a recombinant differential bovine herpesvirus 1 (BoVH-1) vaccine. **Pes Vet Bras.** 2005;25:54-58.
59. Del Fava C, Arcaro JRP, Pozzi CR, Arcaro Júnior I, Fagundes H, Pituco EM, De Stefano E, Okuda LH, Vasconcellos SA. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arq Inst Biol.** 2003;70(1):25-33.
60. Silva MS, Brum MCS, Weiblen R, Flores EF. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987- 2006). **Pesq Vet Bras.** 2007;27(10):403-408.
61. Anziliero D, Santos CMB, Bauermann FV, Cardozo L, Brum MCS., Weiblen R, Flores EF. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is attenuated and immunogenic for calves. **Pesq Vet Bras.** 2011;31:23-30.
62. Silva LF, Weiblen R, Flores EF. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciênc Rur.** 2007;37(5):1471-74.
63. Meeusen ENT, Walker J, Peters A, Pastoret P-P, Jungersen G. Current status of veterinary vaccines. **Clin Microbiol Rev.** 2007;20(3):489-510.

64. Zhao X, Xi J. The vaccines for bovine herpesvirus type 1: a review. **Afr J Biotechnol**. 2011;10(50):10072-10075.
65. Fuchs S, Kasher R, Balass M, Scherf T, Harel M, Fridkin M, Sussman J, Katchalski-katzir E. The binding site of acetylcholine receptor: from synthetic peptides to solution and crystal structure. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2003; 998(1):93-100.
66. Gnanasekar M, Rao KV, He YX, Mishra PK, Nutman TB, Kaliraj P, Ramaswamy K. Novel phage display-based subtractive screening to identify vaccine candidates of *Brugia malayi*. **Infect Immun**. 2004; 72(8):4707-4715.
67. Sidhu SS, Koide S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. **Curr Opin Struct Biol**. 2007;17(4):481-487.
68. Wang LF, Yu M. Epitope mapping using phage-display random fragment libraries. **Methods in Molecular Biology**. 2ed. Humana Press. 2009; 524:315-332p.
69. SMITH GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**. 1985; 228(4705): 1315-1317.
70. BENHAR I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol Adv**. 2001; 19(1):1-33.
71. Dias-Neto E, Nunes DN, Giordano RJ, Sun J, Botz GH, Yang K, Setubal JC, Pasqualini R, Arap W. Next-Generation Phage Display: Integrating and Comparing Available Molecular Tools to Enable Cost-Effective High-Throughput Analysis. **PLoS ONE**. 2009; 4(12): e8338.
72. Posner B, Smiley J, Lee I, Benkovic S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. **Trends Biochem Sci**. 1994; 19(4):145-150.
73. Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnol Adv**. 2010; 28(6):849-858.
74. Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**. 1988;73(2):305-318.
75. Vodnik M, Zager U, Strukelj B, Lunder M. Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. **Molecules**. 2011; 16(1):790-817.
76. Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. **Phage display – a laboratory manual**. San Diego. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
77. Vodnik M, Zager U, Strukelj B, Lunder M. Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. **Molecules**. 2011; 16:790-817.
78. New England Biolabs (NEB). Protein Tools: Ph.D. **Phage Display Libraries Instruction Manual**. Ipswich: New England Biolabs, 2011. 44p.

79. Mcauliffe O, Ross R, Fitzgerald GF. The new phage biology: from genomics to applications. In: Mccrath S, Sinderen D. van der (Eds.). **Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology**. Wymondham: Caister Academic Press, 2007. 1-43p.
80. Sidhu SS, Weiss GA, Wells JÁ. High copy display of large proteins on phage for functional selections. **J Mol Biol**. 2000; 296(2):487-495.
81. Azzazy HME, Highsmith WE. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin Biochem**. 2002; 35(6): 425- 445.
82. Kehoe JW, Kay BK. Filamentous phage display in the new millennium. **Chem Ver**. 2005; 105(11):4056-72.
83. Paschke M. Phage display systems and their applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2006; 70(1):2-11.
84. Hemminga MA, Vos WL, Nazarov PV, Koehorst RB, Wolfs CJ, Spruijt RB, Stopar D. Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages. **Eur Biophys J**. 2010; 39(4): 541-550.
85. Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. **Chem Ver**. 1997; 97(2):391-410.
86. Russel M, Lowman HB, Clackson T. Introduction to phage biology and phage display. In: Clackson T, Lowman H. **Phage display**. Oxford: Oxford Unity Press, 2004. 1-26p.
87. Brígido MM, Maranhão AQ. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biociencia Cienc Desenvolv**. 2002; (26): 44-51.
88. Konthur Z, Walter G. Automation of phage display for high-throughput antibody development. **Targets**. 2002;1(1):30-36.
89. Messing J. New M13 vectors for cloning. **Meth Enzymol**. 1983;101:20-78.
90. Messing J, Gronenborn B, Muller-Hill B, Hans Hopschneider P. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1977; 74(9): 3642-3646.
91. Messing J, Norrander J, Kempe T. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. **Gene**. 1983; 26(1): 101-106.
92. Rader C, Steinberger P, Barbas CF. Selection from antibody libraries. In: Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. **Phage Display: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001. 10.11-10.20p.
93. Davies DR, Padlan EA, Sheriff S. Antibody-antigen complexes. **Annu Rev Biochem**. 1990; 59: 439-473.
94. Romanov VI, Durand DB, Petrenko VA. Phage display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. **Prostate**. 2001; 47(4):239- 251.

95. Dybwad A, Lambin P, Sioud M, Zouali M. Probing the specificity of human myeloma proteins with a random peptide phage library. **Scand J Immunol.** 2003; 57(6):583-590.
96. Zwick MB, Bonnycastle LL, Noren KA, Venturini S, Leong E, Barbas CF, Noren CJ, Scott JK. The Maltose-Binding Protein as a Scaffold for Monovalent Display of Peptides Derived from Phage Libraries. **Anal Biochem.** 1998; 264(1):87-97.
97. Casey JL, Coley AM, Parisi K, Foley M. Peptide mimics selected from immune sera using phage display technology can replace native antigens in the diagnosis of Epstein-Barr virus infection. **Protein Eng Des Sel.** 2009; 22(2):85-91.
98. Liu JK, Teng Q, Garrity-Moses M, Federici T, Tanase D, Imperiale MJ, Boulis NM. A novel peptide defined through phage display for therapeutic protein and vector neuronal targeting. **Neurobiol Dis.** 2005;19(3):407-418.

## **CAPÍTULO 2 - PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES MIMÉTICOS A ANTÍGENOS TOTAIS DE HERPESVÍRUS BOVINO 1 POR MEIO DE *PHAGE DISPLAY***

### **RESUMO**

Neste estudo a tecnologia de *phage display* foi utilizada para selecionar novos antígenos mimetopos de glicoproteínas do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e que apresentam potencial para uso em vacinais e diagnóstico. Foi realizado um *biopanning* a partir de uma biblioteca de peptídeos randômicos e lineares composta de 12 resíduos de aminoácidos fusionada à pIII de fagos M13, contra IgGs específicas para o BoHV-1, purificadas em coluna de cromatografia por afinidade – *Sepharose*, a partir de bovinos soropositivos. Foram feitos três ciclos de seleção e amplificação para o enriquecimento dos alvos ligantes (peptídeos) aos anticorpos anti-BoHV-1. A reatividade do *pool* de clones selecionados foi confirmada por EIE demonstrando a eficiência da seleção a partir dos anticorpos específicos. Um total de 44 clones foi isolado e as sequências de aminoácidos dos peptídeos foram determinadas pelo sequenciamento. Para avaliação da especificidade individual, realizou-se o ELISA dos clones mais frequentes, tendo como controle o fago M13 sem peptídeo. A versatilidade do *phage display* e sua robustez permitiram o *screening* de três peptídeos (B, C e E) com afinidade por anticorpos anti-BoHV-1. Os peptídeos fusionados aos fagos também foram avaliados quanto ao seu poder imunogênico para a formulação de vacinas baseada em mimetopos de antígenos virais. Nos testes de imunização em coelhos, os três peptídeos induziram a produção de anticorpos específicos, porém, estes não foram capazes de neutralizar a lise celular ocasionada pelo BoHV-1 em placa. De acordo com os resultados dos imunoenaios um dos peptídeos (E) apresentou potencial de utilização como reagente para o diagnóstico virológico por ensaio ELISA-fago, que discrimina amostras de soro positivas e negativas para o BoHV-1.

**Palavras-chave:** *biopanning*, *phage display*, diagnóstico, herpesvírus bovino, biblioteca de peptídeos, mimetopos

## ABSTRACT

In this study we used the phage display and biopanning technology to select new antigens that are glycoprotein mimotopes of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and which have potential for use in vaccines and diagnostics. We performed a selection using a linear random peptide library consisting of 12 amino acid residues fused to the protein III of M13 phage against BoHV-1 specific IgGs, purified by affinity chromatography - Sepharose column. There were three rounds of selection and amplification for the enrichment of target ligands (peptides) of anti-BoHV-1 antibodies. The reactivity of the pool of selected clones was confirmed by EIE, showing the efficiency by selection of specific antibodies. A total of 44 clones were isolated and the amino acid sequences of the peptides were determined by sequencing. In order to evaluate the serum reactivity of the peptides, phage-ELISAs of the most frequent clones were performed. The wild-type phage M13 (Wt) was used as a negative control. The versatility and robustness phage display screening allowed three peptides (B, C and E) with affinity for anti-BoHV-1 antibodies. The peptides fused to the phage were also evaluated for their immunogenic power for the development of vaccines based on mimotopos of viral antigens. Immunization of rabbits with the peptides induced specific production of serum antibodies, but they were not able do neutralize BoHV-1 cell lysis. According to the results of immunoassays, the peptide (E) shows potential to their use as reagent for a virological diagnostic phage-ELISA assay, which discriminates positive and negative BoHV-1 serum sample.

**Keywords:** biopanning, phage display, diagnosis, bovine herpesvirus, peptide library, mimotopes

## 1 INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) pertence ao gênero *Varicellovirus*, subfamília *Alphaherpesvirinae* dentro da família *Herpesviridae*. Os membros dessa subfamília caracterizam-se por apresentar ciclo de replicação curto, rápida disseminação em células de cultivo, amplo espectro de hospedeiros e capacidade de estabelecer infecções latentes em gânglios sensoriais. O estabelecimento e a reativação de infecções latentes permitem a manutenção e disseminação desses agentes no rebanho<sup>1,2</sup>.

O BoHV-1 é um dos principais patógenos de bovinos, sendo responsável por grandes prejuízos econômicos à exploração pecuária. Clinicamente, as infecções pelo BoHV-1 manifestam-se sob formas distintas, entre as quais se destacam a respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina, IBR), genital (vulvovaginite pustular infecciosa/balanopostite pustular infecciosa, IPV/IPB), abortamentos e outros transtornos reprodutivos, conjuntivites e infecção generalizada em neonatos. A infecção pelo BoHV-1 tem distribuição mundial, com exceção de alguns países europeus que erradicaram a infecção, e são responsáveis por perdas econômicas produtivas e reprodutivas<sup>3,4</sup>.

O BoHV-1 figura na lista da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE)<sup>5</sup> como patógeno de significativo interesse socioeconômico para o comércio de animais e produtos animais, imprimindo restrições ao comércio internacional de animais vivos ou seus subprodutos - sêmen, embriões e produtos de biotecnologia - previstos no Código Internacional de Saúde Animal<sup>5</sup>. Não existe um procedimento padrão para medidas de controle e profilaxia das infecções causadas por herpesvírus, sendo comum a utilização de vacinas para prevenção da manifestação de sinais clínicos por meio da indução da produção de anticorpos pelo organismo do animal. As vacinas comercializadas no Brasil – compostas por vírus completo, inativado ou atenuado convencional e atenuado mutante temperatura-sensível (TS), são incompatíveis com programas de erradicação, pois não permitem a diferenciação entre animais infectados (portadores) e animais vacinados. Já as vacinas com marcadores antigênicos conseguem fazer essa distinção quando associadas com teste sorológico que detecta anticorpos contra a proteína viral deletada, porém, a utilização dessas vacinas geneticamente modificadas é inviável no Brasil devido a custos altos<sup>6,7</sup>.

A seleção de epítomos por meio da sua interação com anticorpos específicos pode ser uma abordagem alternativa para seleção de novos antígenos com potencial para uso em vacinas e diagnóstico. Neste contexto, o *phage display*, bibliotecas de peptídeos apresentados na superfície de fagos, é uma ferramenta importante para a seleção de mimetopos baseada na

afinidade de ligação a uma molécula alvo por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning*. O *biopanning* é realizado pela incubação da biblioteca de peptídeos contra um alvo imobilizado em um suporte sólido (placas de microtitulação, beads, membranas, etc.). Após vários ciclos de seleção, os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA e/ou imunoenaios<sup>8-12</sup>.

Objetivou-se selecionar peptídeos miméticos com alta afinidade por anticorpos anti-BoHV-1 a partir de uma biblioteca comercial de peptídeos recombinantes apresentados em fagos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Soroteca bovina

Foram utilizadas 50 amostras de soro bovino, das quais 25 eram positivas para anticorpos anti-BoHV-1 e as outras 25 eram negativas, todas foram previamente testadas por ELISA kit comercial da IDEXX (Bovine Rhinotracheitis virus antibody test kit, HerdChek<sup>®</sup>, IDEXX). As amostras são parte da soroteca bovina conservada em freezer a -20°C, que se encontra no Laboratório de Virologia Animal (IPTSP).

### 2.2 Cepa viral e titulação

Os procedimentos de multiplicação e manutenção do BoHV-1 (Vírus de referência Los Angeles - L.A.)<sup>13</sup> foram realizados no laboratório de Virologia Animal no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG). As amostras de vírus foram multiplicadas em células “Madin-Darby bovine kidney” (MDBK) cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM-Sigma<sup>®</sup>) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 6% e antibióticos usuais (penicilina e estreptomicina) em estufa com ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

O vírus foi titulado através de diluições na razão de 10 (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-11</sup>), sendo que cada diluição foi colocada em quatro orifícios de uma placa de microtitulação (*Maxisorp* – *Nunc* – Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) onde foi adicionada suspensão de células. O título viral (1 TCID<sub>50</sub>) foi estabelecido pela mais alta diluição que apresentou efeito citopático (ECP) em pelo menos 50% dos orifícios após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo este acrescido de

0,25 correspondente a cada orifício a mais em que houve ECP, de acordo com o método de Spearman-Kärber<sup>14</sup>. Posterior à titulação, foi definida a diluição que continha 100TCID<sub>50</sub>, dose que foi usada na soroneutralização segundo House e Baker<sup>15</sup>.

## **2.3 Seleção com a biblioteca de peptídeos**

### **2.3.1 Purificação das imunoglobulinas provenientes dos soros bovinos**

A purificação de IgGs dos soros bovinos positivos foi realizada por cromatografia em coluna de afinidade Sepharose-BoHV-1. Para estabilização da coluna, a fase sólida foi lavada duas vezes com tampão de ligação (PBS pH 7,2, com 0,2% de azida sódica). Alíquotas (3 mL) do *pool* de soro bovino, feito com amostras de soro positivas para anticorpos Anti-BoHV-1, previamente diluídas no tampão de ligação, foram submetidas à cromatografia e imobilizadas por afinidade ao vírus (BoHV-1 L.A.) ligado na *sepharose*. Após várias lavagens com o tampão de ligação, os anticorpos foram eluídos com tampão de eluição (Glicina 1M, pH 2,6; contendo 0,2% de ázida sódica) e coletadas frações de 1000 µL em microtubos contendo 100 µL de tampão de neutralização (Tris 1M, pH 8,5; NaCl 1,5M). As IgG's negativas foram purificadas em coluna de proteína A, G e L nas mesmas condições das IgGs positivas. O protocolo seguiu as instruções do fabricante da resina *Sepharose*<sup>®</sup> 4B (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

As frações coletadas passaram por diálise contra PBS 1X e a solução foi filtrada em filtro Milipore 0,22 µm, para obtenção do anticorpo purificado e as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford<sup>16</sup>.

### **2.3.2 Avaliação da qualidade das imunoglobulinas purificadas em gel SDS-PAGE**

A qualidade e pureza das frações de anticorpos foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (16%). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (SDS 1%, Tris 1% pH 6,8, azul de bromofenol a 0,02% e glicerol 20%). A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente com tampão superior (Tris base 0,1M; Glicina 0,1M e SDS 0,1%), e com tampão inferior (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9), na voltagem de 100V. Após a corrida, o gel foi corado na solução de Coomassie-blue para a visualização das cadeias leve (25 kDa) e pesada (50 kDa) das imunoglobulinas do bovino. O marcador de peso

molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (*Thermo Scientific*®) foi aplicado no gel para comparação com as amostras<sup>17,18</sup>.

### 2.3.3 Seleção Biológica (*Biopanning*)

Para esse ensaio utilizou-se uma biblioteca de peptídeos de doze resíduos de aminoácidos (Ph.D.<sup>-12</sup> Phage Display Peptide Library Kit – New England Biolabs®), possuindo uma complexidade de mais de dois bilhões de clones independentes. Os procedimentos foram realizados seguindo o mesmo protocolo previamente descrito pelo fabricante do kit.

Aproximadamente 15 µg de IgG purificada do *pool* de soro positivo para o BoHV-1 foram colocados em 3 poços de uma placa de microtitulação (Maxisorp - Nunc®) e incubados a 4°C em câmara úmida *overnight*. Após a incubação, a solução de IgG foi descartada e a placa bloqueada com 250 µL de um tampão de bloqueio (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.6, 5 mg/mL BSA) por 2 horas à temperatura de 4°C. O tampão de bloqueio foi retirado e a placa lavada seis vezes com TBST (50mM Tris-HCl pH 7,5; NaCl 150mM, 0,1% de Tween-20), para retirada dos anticorpos não ligantes.

Dez microlitros da biblioteca de peptídeos original (aproximadamente  $2 \times 10^9$  fagos) foram diluídos em 100 µL TBST (0.1% Tween-20) e acrescentados no poço da placa e mantidos sob agitação por 1h à temperatura ambiente. Após o período de incubação, o sobrenadante contendo os fagos não ligados foi desprezado e o orifício lavado seis vezes com solução TBST (0,1% Tween-20). Os fagos ligados à IgG purificada foram eluídos com o tampão de eluição (0,2 M glicina-HCl, pH 2,2, contendo 1 mg/mL albumina de soro bovino-BSA) por 10 minutos sob agitação a 4°C. O eluato foi transferido para microtubos e neutralizado com 15 µl do tampão de neutralização (1M Tris-HCl, pH 9,1).

Alíquotas dos fagos eluídos foram utilizados para a primeira titulação, conforme descrita no item 2.3.4. O eluato remanescente contendo fagos foi utilizado para a amplificação pela infecção em *Escherichia coli*-ER2738 e posteriormente sendo titulados. Este valor da titulação foi utilizado para calcular um volume de entrada correspondente para o título de entrada inicial no próximo ciclo ( $2 \times 10^9$  fagos).

Uma nova sensibilização da placa foi feita utilizando 15 µg de anticorpo purificado e incubados a 4°C em câmara úmida *overnight*. A placa foi bloqueada com 250 µL de um tampão de bloqueio (0,1M NaHCO<sub>3</sub>; pH 8,6; 5 mg/mL BSA) por 2 h à temperatura de 4°C. Foi lavada seis vezes com TBST (50mM Tris-HCl pH 7,5; NaCl 150mM, 0,1% de

Tween-20). O eluato amplificado da biblioteca de peptídeos titulado no primeiro ciclo foi adicionado aos poços e mantido sob agitação por 1h a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos pela lavagem dos orifícios da placa por dez vezes com TBST (0.1% Tween-20) no primeiro ciclo de seleção e nos ciclos subsequentes com TBST (0.5% Tween-20). Os fagos ligantes às IgG's purificadas foram eluídos com 100  $\mu$ L do tampão de eluição (0,2 M glicina-HCl; pH 2,2; contendo 1 mg/mL BSA) por 10 min a temperatura ambiente e imediatamente neutralizados com 15  $\mu$ L do tampão de neutralização (1M Tris-HCl, pH 9,1). Alíquotas dos fagos eluídos foram utilizadas para a determinação do título e o eluato remanescente, contendo fagos, utilizado para a reamplificação, pela infecção em *E. coli* ER2738 segundo protocolo descrito no Kit (Ph.D.<sup>-12</sup> Phage Display Peptide Library Kit<sup>®</sup>). Para o enriquecimento dos fagos contendo os peptídeos ligantes foram feito três ciclos de seleção (*biopanning*).

### 2.3.4 Titulação dos fagos

Para as titulações dos eluatos não amplificados dos três ciclos de seleção, foram realizadas quatro diluições seriadas ( $10^{-1}$  até  $10^{-4}$ ) utilizando 1  $\mu$ L dos fagos (eluato) diluídos em 9  $\mu$ L de meio de cultura Luria-Bertani (LB - 10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl) com tetraciclina. Em cada diluição foram acrescentados 200  $\mu$ L de *E. coli* ER2738, crescida em meio LB (fase mid-log, DO 600~0,5), e um volume de 3 mL de TOP Agar pré-aquecidos (meio LB acrescido de bacto-agar ou agarose, 7 g/L) que foram colocadas na superfície de placas de Petri com meio LB sólido contendo X-gal (*β*-galactosidase chromogenic substrate) (40  $\mu$ g/ml) e IPTG (isopropil *b*-D-tiogalactoside) (0.5 mM).

As placas foram incubadas invertidas a 37°C *overnight*. As colônias que apresentaram cor azul demonstram a hidrólise do substrato X-Gal e a expressão do gene da *β*-galactosidase (*lacZ*) dos fagos pelas bactérias ER2738. Os títulos de entrada e saída para todas as diluições (número de colônias azuis x fator de diluição) foram obtidos pela contagem dessas colônias azuis. Os resultados foram expressos por ufp/ $\mu$ L (unidades formadoras de placa por  $\mu$ L).

Os eluatos amplificados e não amplificados foram titulados seguindo o mesmo protocolo descrito para titulação. Apenas diferem as diluições para titulação dos fagos amplificados, que variam de  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$ .

## 2.4 Caracterização dos clones (peptídeos)

### 2.4.1 Extração de DNA dos fagos

A obtenção de DNA de bacteriófagos filamentosos foi realizada segundo protocolo descrito pelo fabricante utilizando o Kit Ph.D<sup>-12</sup> Phage Display Peptide Library<sup>®</sup>. Colônias azuis obtidas dos três ciclos de seleção foram transferidas separadamente das placas de meio sólido para microtubos e crescidas em meio LB líquido por 5 horas. Os tubos foram centrifugados por 30 segundos a 14000 rpm e o sobrenadante transferido para um novo tubo estéril. Os fagos foram precipitados com uma solução de polietilenoglicol e cloreto de sódio (PEG 20% /NaCl 2,5M) e sua capa protéica rompida pela adição de iodeto de sódio 4M, sendo o DNA liberado para posterior precipitação e purificação com etanol. A qualidade e quantidade do DNA fita simples foram verificadas em gel de agarose a 0,8 %<sup>19</sup>.

### 2.4.2 Sequenciamento e análise em bancos de dados protéicos

O sequenciamento do DNA do fago foi realizado utilizando o *DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE<sup>®</sup>) utilizando o sequenciador automático capilar MegaBace 1000 (Amersham Biosciences<sup>®</sup>). Para a reação do sequenciamento foi utilizado o iniciador 5' CCCTCATAGTTAGCGTAACG 3', que flanqueia a região dos peptídeos randômicos fusionado à superfície dos fagos.

A sequência de nucleotídeos foi traduzida em sequência de aminoácidos (3'5' Frame 1) utilizando o software *ExpASy Translate Tool* (<http://web.expasy.org/translate/>).

## 2.5 Análises da reatividade dos clones por ensaio imunoenzimático (Phage-ELISA)

### 2.5.1 Amplificação dos clones para os imunoenaios

Para o protocolo de amplificação dos fagos que foram submetidos aos ensaios imunoenzimáticos realizados, uma colônia de *E. coli* ER2738 foi inoculada em 20 mL de meio LB com tetraciclina e incubada sob agitação a 37°C *overnight*.

No dia seguinte, a cultura foi diluída em meio LB autoclavado na proporção de 1:100 e um volume de 20 mL distribuído em 5 tubos esterelizados. O volume de 5 µl das amostras *stock* dos clones selecionados e do fago M13 foi adicionado separadamente em cada

tubo contendo meio de cultura, e incubados a 37°C sob agitação constante e vigorosa por 5 horas. Após esse período, as culturas foram transferidas para tubos Falcon e centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos (descartando o *pellet* formado), onde foi acrescentado 1/6 do volume de uma solução de PEG 20%/NaCl 2,5M. Esta mistura de amostras do sobrenadante com PEG/NaCl foi mantida em repouso *overnight* a 4°C.

Após o período de precipitação em geladeira os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 1 mL de TBS (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl). Os sedimentos ressuspensos foram transferidos para microtubos e submetidos a nova centrifugação (14.000 rpm/5 minutos/4°C) para a retirada de resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e reprecipitado com 1/6 do seu volume com PEG/NaCl seguido por incubação em gelo entre 15 a 60 minutos.

Uma nova centrifugação foi realizada após a incubação em gelo (14.000 rpm/10 minutos/4°C) e o precipitado ressuspendido em 50 µl de TBS. Alíquotas dos fagos amplificados foram utilizadas para a determinação do título pela infecção em *E. coli* ER2738 no subitem 2.3.4 deste material.

### **2.5.2 Fago selvagem**

Como controle negativo das reações nos ensaios imunoenzimáticos foi utilizado o fago M13KE (*New England BioLabs*<sup>®</sup>). Esse fago é usado como controle ou para titulação dos estoques de fagos por não apresentar peptídeo fusionado na pIII do capsídeo viral. Os procedimentos de amplificação, precipitação e dosagem para o fago selvagem foram os mesmos utilizados para os fagos selecionados com as bibliotecas.

### **2.5.3 Phage-ELISA**

Os clones foram testados por ELISA *in-house* para verificar a reatividade com um *pool* de amostras de soro bovino positivas para anticorpos anti-BoHV-1 (25 amostras), previamente testadas pelo ELISA comercial. O fago sem inserto foi usado como controle negativo (M13). O valor do ponto de corte foi definido arbitrariamente como sendo duas vezes o valor da densidade ótica (OD) obtida com fago M13. Valores maiores que um (01) foram considerados positivos.

Placas de alta afinidade (UltraCruz ELISA Plate, Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>) de 96 poços foram adsorvidas com 1 µL de cada clone/*pool* diluído em 49 µL de tampão carbonato-bicarbonato. Como controle negativo utilizou-se o fago M13. O teste foi realizado em duplicata. A placa foi incubada overnight a 4°C, em câmara úmida. No dia seguinte, desprezou-se o conteúdo dos poços, acrescentando 100 µL/poço de solução de bloqueio (Tampão carbonato-bicarbonato/5% leite em pó desnatado), seguido por incubação a 37°C/2h em repouso. Depois do bloqueio e após desprezar o conteúdo dos poços as placas foram lavadas uma vez com PBS 1X pH 7,4.

As amostras de soro foram diluídas a uma proporção de 1:20 em solução de bloqueio. Adicionou-se 50 µL/poço dos soros diluídos, seguido por incubação a 37°C por um período de duas horas. Após esta etapa, as placas foram lavadas seis vezes com PBST 0,05%, e incubadas a 37°C por 1 hora com anti-IgG bovino conjugado com peroxidase na proporção de 1:5000 (Sigma<sup>®</sup>) em solução de PBS 1X com 1% de leite em pó desnatado. Ao final da incubação, as placas foram novamente lavadas seis vezes e reveladas pela adição de 50 µL/poço do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato 0,1M pH 5,0). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N e a densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

Um segundo ELISA foi feito com dois *pools* de soro bovino, um composto por 25 amostras negativas e outro por 25 amostras positivas para anticorpos anti-BoHV-1. Neste imunoensaio, realizado nas mesmas condições do anterior, o ponto de corte foi calculado como sendo a média das OD's do *pool* de soro negativo mais 3 vezes o desvio padrão das OD's dos mesmos. O valor do índice de ELISA (IE) foi calculado de acordo com a fórmula:  $IE = OD \text{ amostra} / OD \text{ cut off}$ . Amostras com  $IE > 1.0$  foram consideradas positivas. Apenas os fagos que apresentaram maior reatividade com o *pool* de soros positivos para BoHV-1 (25 amostras), e não reativos com o *pool* de soros dos animais negativos (25 amostras), foram selecionados para a última etapa dos imunoensaios.

O terceiro e último ELISA foi realizado apenas com os clones individuais que obtiveram melhores desempenhos no ELISA anterior. Para este imunoensaio utilizou-se 32 amostras de soro individuais, sendo 16 amostras positivas e 16 amostras negativas para o BoHV-1. Os clones específicos e individuais foram amplificados e titulados nas mesmas condições descritas no subitem 2.6.3. O teste T de Student, realizado com o programa "GraphPad Prism for Windows", Versão 5.00<sup>20</sup>, foi utilizado para determinar a diferença entre os soros positivos e negativos<sup>17,18</sup>.

## 2.6 Imunização de coelhos com os peptídeos selecionados

Foram utilizados dez coelhos da raça Nova Zelândia, adultos, machos, saudáveis, com peso entre 3,0 e 4,0 kg. Os animais foram mantidos no Coelhário da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, alojados em gaiolas individuais, sob condições adequadas de espaço físico (mínimo de 0,36 metros quadrados de área de piso/animal, 36 centímetros de altura), temperatura (entre 16 e 22°C), bem como água à vontade e ração comercial de acordo com as recomendações do fabricante (200 g/animal/dia). A metodologia utilizada nesse projeto foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás, conforme protocolo nº 20/2012 (ANEXO 1).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais, cada grupo com dois coelhos (QUADRO 1). Foram realizadas quatro imunizações, todas por via subcutânea, e o soro dos animais foi coletado nos momentos zero (0) (antes da 1ª imunização), 14 dias (antes da 2ª), 28 dias (antes da 3ª), 42 dias (antes da 4ª) com a última coleta de soro após sete dias da 4ª e última imunização (QUADRO 1)<sup>21</sup>. Após contenção física do animal em decúbito lateral, um total de 5 mL de sangue era coletado pela punção da veia safena.

QUADRO 1 - Grupos experimentais (letras maiúsculas) para imunização com dois coelhos cada (números após as letras) e seus respectivos inóculos.

Grupos <sup>a</sup>	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2
Inóculo	PBS <sup>b</sup>		Adjuvante <sup>c</sup> + M13 <sup>d</sup>		Vacina comercial		Adjuvante + E <sup>e</sup>		Adjuvante + B/C <sup>e</sup>	

<sup>a</sup>Grupo A: Coelho 1 e Coelho 2, [...], Grupo E: Coelho 1 e Coelho 2; <sup>b</sup>Solução salina fosfatada; <sup>c</sup>Adjuvante incompleto de Freund; <sup>d</sup>Fago selvagem sem inserto; <sup>e</sup>B/C/E: fagos selecionados com clones de peptídeos deste estudo.

Os inóculos de peptídeos foram previamente preparados com o adjuvante de Freund incompleto (*Santa Cruz Biotechnology*®), utilizando-se de 50 µL a uma concentração de 10<sup>11</sup> ufp/mL dos peptídeos escolhidos homogeneizados com volume igual do adjuvante. Como controle negativo, dois animais foram imunizados com fago M13 na mesma dose com o objetivo de avaliar a resposta frente às proteínas do bacteriófago sem a influência do peptídeo teste.

A vacina comercial “IBR-BVD” (Hertape Calier®) foi utilizada como controle positivo de imunização. Ela é composta pelo herpesvírus bovino (BoHV-1 - Colorado) e vírus

da diarreia viral bovina (BVDV - NADL e BVDV - Nova Iorque), ambos inativados. Apesar de ser indicada para a prevenção da IBR/BVD nas espécies bovinas, a vacina foi utilizada porque os coelhos são susceptíveis à infecção pelo herpesvírus bovino e em condições experimentais desenvolvem enfermidade neurológica aguda fatal, após contato com o patógeno<sup>22</sup>.

Devido ao número experimental reduzido de animais, optou-se por imunizar um dos grupos (E) com dois peptídeos juntos (clones B+C), o inóculo preparado continha quantidades iguais de cada clone.

### **2.6.1 Análise da reatividade dos soros de coelhos imunizados com os peptídeos selecionados em ensaio imunoenzimático**

Para verificar a reatividade das amostras de soro dos coelhos imunizados com os peptídeos selecionados anteriormente foi realizado o ELISA. Como controle negativo, utilizou-se o soro de dois animais imunizados com fago M13 com o objetivo de avaliar a resposta frente às proteínas do bacteriófago sem a influência do peptídeo teste. Como controle positivo utilizou-se o soro de dois animais imunizados com a vacina comercial “IBR-BVD” (Hertape Calier<sup>®</sup>), de forma que a placa de ELISA foi sensibilizada com vírus L.A. (controle positivo).

Placas de 96 poços foram adsorvidas com 1 µL de cada clone diluído em 49 µL de tampão carbonato-bicarbonato (concentração final 1 µg/µL), a mesma concentração foi utilizada para o controle negativo. Para o controle positivo a placa foi sensibilizada com uma suspensão viral de BoHV-1 na proporção de 1:2,5 em tampão carbonato-bicarbonato. O teste foi realizado em triplicata. A placa foi incubada *overnight* a 4°C, em câmara úmida. No dia seguinte, desprezou-se o conteúdo dos poços, acrescentando 100 µL/poço de solução de bloqueio (Tampão carbonato-bicarbonato/5% leite em pó desnatado), seguido por incubação a 37°C/2h em repouso. Depois do bloqueio e após desprezar o conteúdo dos poços, as placas foram lavadas uma vez com PBS 1X pH 7,4.

As amostras de soro, previamente inativadas a 56°C durante 30 minutos, foram diluídas a uma proporção de 1:50 em solução de bloqueio utilizando-se de 50 µL/poço, seguido por incubação a 37°C por um período de duas horas. Após esta etapa, as placas foram lavadas seis vezes com PBST 0,05%, e incubadas por 1 hora a 37°C com anti-IgG de coelho marcado com biotina na proporção de 1:5000 (Sigma<sup>®</sup>) em solução de PBS 1X com 1% de leite em pó desnatado. A placa foi lavada seis vezes com PBST 0,05%, e foram adicionados

50 µL/poço de streptavidina conjugada à peroxidase diluída 1:80000, em solução de PBS 1X com 1% de leite em pó desnatado e incubadas por 1 hora a 37°C. Após esta etapa, as placas foram lavadas e a revelação ocorreu pela adição de 50 µL/poço do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) 1 mg/mL em tampão Citrato 0,1M pH 5,0). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N e a densidade ótica (DO) foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

A análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey foi utilizada para verificar a diferença entre as imunizações, utilizando o programa “GraphPad Prism for Windows”, “Version” 5.00<sup>20</sup>. O resultado foi considerado significativo quando o  $p < 0,05$ .

### **2.6.2 Soroneutralização**

A detecção de anticorpos soroneutralizantes para BoHV-1 foi realizada de acordo com a técnica de soroneutralização (SN) descrita por House e Baker<sup>15</sup>. Após prévia inativação a 56°C/30 minutos, diluições dos soros dos coelhos (1:2 a 1:128), realizadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM, SIGMA<sup>®</sup>, EUA), foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades e incubadas com a diluição equivalente a 100 TCID<sub>50</sub> do protótipo L.A. de BoHV-1 (v/v). Após incubação por uma hora a 37°C, uma suspensão de  $3 \times 10^5$  células MDBK em meio DMEM 50 µL/cavidade foi adicionada e as placas incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por três dias (com leituras as 24, 48 e 72 horas).

Em todas as microplacas, foram feitos controles de célula, de vírus e de citotoxicidade dos soros com o objetivo de evitar resultados falsos. As amostras foram consideradas positivas para a presença de anticorpos contra o BoHV-1, quando havia inibição de lise celular a partir da diluição 1:4<sup>23</sup>. O título de anticorpos foi dado pelo inverso da última diluição na qual não houve ECP, ou seja, onde houve neutralização do vírus pelos anticorpos. A leitura foi realizada em microscópio de campo invertido Zeiss modelo Telaval 31 (aumento de 5X).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Seleção com a biblioteca de peptídeos

As imunoglobulinas foram purificadas do *pool* de soros de bovinos positivos para anticorpos anti-BoHV-1, com utilização da coluna de cromatografia por afinidade - Sepharose. O rendimento das IgGs foi de aproximadamente 5,1 mg/mL, e a amostra caracterizada parcialmente quanto à pureza por SDS-PAGE. A figura 6-A mostra o padrão eletroforético da amostra de IgG-Anti-BoHV-1 purificada. Na coluna “IgG (+)” identifica-se uma banda de aproximadamente 50 kDa, correspondente a cadeia pesada, e outra banda de aproximadamente 25 kDa, correspondente a cadeia leve das imunoglobulinas bovina purificadas.

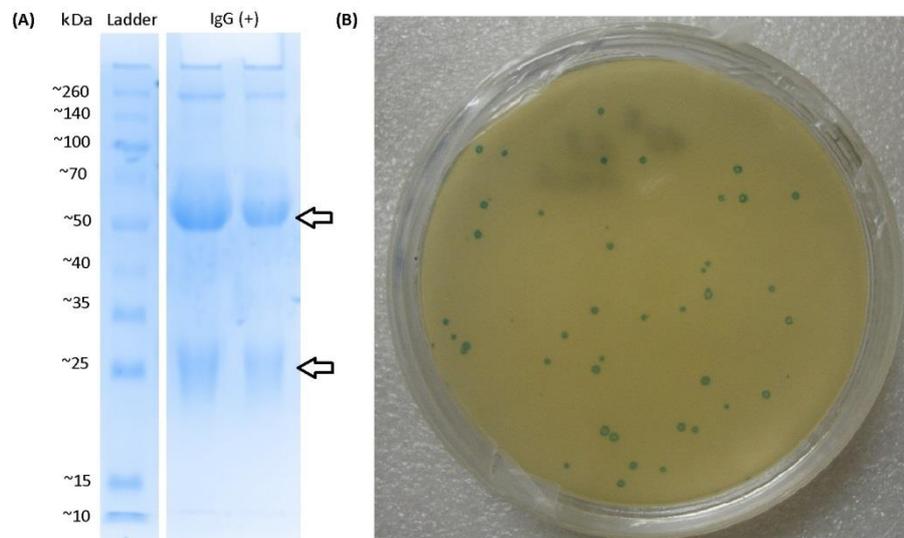


FIGURA 6 - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (16%) e placa de Petri para titulação dos fagos. (A) Avaliação da purificação de anticorpos por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. LADDER = marcador de peso molecular; IgG = imunoglobulinas bovinas purificadas do *pool* de soros positivos (+) para anticorpos anti-BoHV-1. As setas indicam a presença de duas bandas correspondentes às cadeias leve (25 kDa) e pesada (50 kDa) da IgG bovina. (B) Placa de Petri com meio LB sólido contendo X-gal e IPTG. Os títulos de entrada e saída, para todas as diluições, foram obtidos pela contagem das colônias azuis (ufp).

Todos os eluatos contendo fagos amplificados e não amplificados, obtidos durante o *biopanning*, foram titulados para estimar a quantidade de fagos selecionados nos três ciclos de seleção com a biblioteca de peptídeos. Os títulos de entrada e saída foram obtidos pela contagem das unidades formadoras de colônia (ufp) (FIGURA 6-B).

O título de entrada foi constante,  $2 \times 10^9$  ufp/ $\mu$ L. Já os títulos de saída para o primeiro, segundo e terceiro ciclos de seleção foram, respectivamente,  $1,2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^2$  e  $1,6 \times 10^4$  ufp/ $\mu$ L (QUADRO 2).

QUADRO 2 - Título (ufp/ $\mu$ L) obtido no processo de seleção dos fagos da biblioteca Ph.D.<sup>-12</sup> ligantes às IgGs provenientes do *pool* de soros positivos para BoHV-1.

Ciclos de Seleção	Título de entrada ufp/ $\mu$ L	Título de saída ufp/ $\mu$ L	Lavagens PBST (%) Tween 20
1º	$2 \times 10^9$	$1,2 \times 10^4$	0,1% 6 lavagens
2º	$2 \times 10^9$	$3 \times 10^2$	0,5% 6 lavagens
3º	$2 \times 10^9$	$1,6 \times 10^4$	0,5% 10 lavagens

### 3.2 Caracterização dos clones (peptídeos) reativos - Sequenciamento

Obteve-se um total de 44 clones isolados após titulação dos três ciclos de seleção. Somente as sequências de DNA sem erros de sequenciamento ou recombinação foram traduzidas. Dos 44 clones sequenciados um total de 27 (61,3%) clones foram validados. Os clones de sequências idênticas foram agrupados como mostrados na Tabela 1, obtendo-se o total de 16 sequências diferentes.

TABELA 1 - Frequência das sequências de DNA válidas traduzidas em sequência de aminoácidos, geradas após o sequenciamento e análise dos clones selecionados da biblioteca.

CLONE	SEQUÊNCIA aa	FREQUÊNCIA (%)	CICLO DE SELEÇÃO
A	Y S A H N Y I G D S G P	18,5	3º
B	A H S A N N F D V K G I	18,5	1º, 2º e 3º
C	A L W P P N L H A W V P	14,8	1º, 2º e 3º
D	H N T D Q R A V E F R N	3,7	2º
E	D R A L Y G P T V I D H	3,7	2º

F	HILLAAVDKNPE	3,7	1°
G	LPNMQLPNLELL	3,7	1°
H	ALYTLYPPDSLH	3,7	1°
I	QKSWHTHPQASM	3,7	1°
G	W-NPHMPNVKLS	3,7	1°
K	TTNGRDGLTIMA	3,7	3°
L	GWYEHNNYYQGV	3,7	3°
M	NHYLSYPSNPGI	3,7	3°
N	TVQYMFDQIGLQ	3,7	3°
O	TPMVERNYYNAAD	3,7	3°
P	WYTGPTTRFTPSE	3,7	3°

---

### 3.3 Análise da reatividade dos clones selecionados por ensaio imunoenzimático (Phage-ELISA)

Essa etapa foi composta por uma triagem em imunoenaios. O primeiro ELISA verificou a reatividade dos 16 clones selecionados frente a um *pool* de soro de animais positivos para anticorpos anti-BoHV-1. O fago M13 foi usado como controle negativo com o objetivo de avaliar a reação cruzada do soro com o mesmo (FIGURA 7-A). Apenas sete dentre os 16 clones foram considerados reativos com as IgG's anti-BoHV-1, porém apenas cinco clones (B, C, E, F e G) foram escolhidos para o próximo imunoenensaio por apresentarem os maiores índices ELISA (IE). Os outros nove clones apresentaram  $IE < 1$  e por esse motivo não foram inseridos no gráfico da Figura 7-A (dados não mostrados).

O segundo ELISA feito verificou a reatividade dos clones selecionados com as IgGs positivas e negativas (*pool*) para infecção pelo BoHV-1. No gráfico da Figura 7 nota-se que houve diferença significativa na reatividade dos fagos com os soros positivos e negativos (FIGURA 7-B).

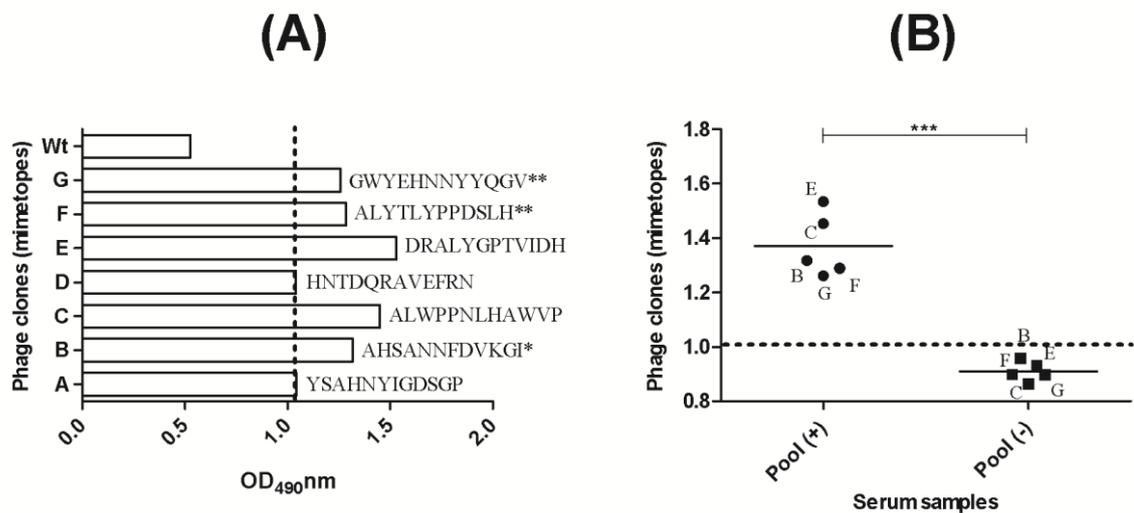


FIGURA 7 - Reatividade dos clones selecionados com soros bovinos. (A) ELISA dos clones individuais (A, B, C, D, E, F e G) e do fago M13 (*wild-type* - Wt) ( $10^{11}$ ufp) usando um *pool* de soros positivos para IgG anti-BoHV-1. O valor do ponto de corte (*cut off*) (linha pontilhada) foi definido arbitrariamente como sendo duas vezes o valor da densidade ótica obtido com o fago M13. \*O peptídeo B não está presente na Figura 1 do artigo apresentado pelo capítulo 3. \*\*Os clones H e L, presentes na Tabela 1, foram renomeados para F e G, respectivamente. (B) ELISA dos clones selecionados usando um *pool* de soros positivos (+) e outro de soros negativos (-) para IgG anti-BoHV-1 (teste t: \*\*\*  $p < 0.05$ ). O *cut off* (linha pontilhada) foi calculado como sendo a média das OD's do *pool* de soro negativo mais três vezes o desvio padrão das OD's dos mesmos. O título de anticorpos é expresso pelo valor do índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula  $IE = OD \text{ amostra} / OD \text{ cut off}$ . Amostras com  $IE > 1$  foram consideradas positivas.

Os clones B, C e E apresentaram maior reatividade com o *pool* de soro positivo para BoHV-1, sendo posteriormente selecionados para o terceiro e último teste de ELISA. O objetivo foi verificar a reatividade dos clones selecionados com amostras individuais de soros bovinos positivos e negativos para anticorpos anti-BoHV-1, previamente testado conforme descrito na metodologia.

Os clones de fagos foram adsorvidos nos poços das placas de ELISA e incubados com 16 diferentes amostras de animais positivos e 16 amostras negativas para o BoHV-1. Previamente realizou-se um ELISA para padronização de soros (diluições 1:50, 1:100) (dados não mostrados), de forma que os resultados obtidos com as amostras dos soros diluídos 1:50 foram satisfatórios. A análise estatística evidenciou diferença significativa apenas para os clones C e E, sendo considerada satisfatória para o clone E. Para o clone B não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados das amostras dos soros positivos e

negativos. Apenas o clone E diferenciou satisfatoriamente soros positivos e negativos (FIGURA 8).

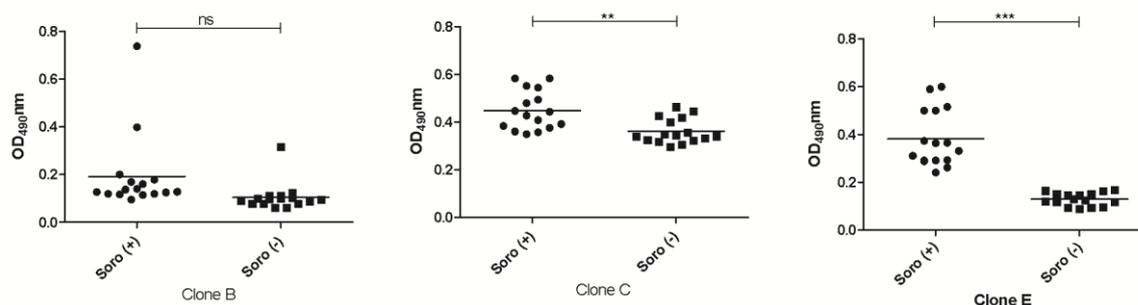


FIGURA 8 - Reatividade dos fagos selecionados por *phage display* com 16 amostras de soros positivos e 16 soros negativos para anticorpos anti-BoHV-1 (valores médios das leituras DO). (\*\*\*teste-t:  $p = 0,0001$ ; \*\*teste-t:  $p = 0,0012$ ; <sup>ns</sup>teste-t:  $p = 0,0541$ ; <sup>ns</sup>: não significativo) (Prisma 5.0, GraphPad).

### 3.4 Imunização de coelhos com os peptídeos selecionados

Coelhos foram imunizados com os peptídeos selecionados (B, C e E) para verificar se os anticorpos produzidos no soro, provenientes desta imunização, seriam capazes de neutralizar o BoHV-1 em placa. Além da soroneutralização, foram realizados testes ELISA para verificar a reatividade das amostras de soro frente aos peptídeos.

#### 3.4.1 Análise da reatividade dos soros de coelhos imunizados com os peptídeos selecionados em ensaio imunoenzimático

A média da densidade ótica (OD) do soro dos animais antes de serem imunizados (Pré-Imune) foi comparada a media das OD's ao final das imunizações. A estatística evidenciou a diferença entre os resultados das amostras dos soros antes e após as imunizações (FIGURA 9). O grupo controle positivo (Vacina) e os grupos dos peptídeos em teste, Clone E e B+C apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle negativo (fago M13) Pós-imune ou em comparação às OD's de todos os tratamentos antes da imunização (Pré-Imune) (FIGURA 9). Não foram observadas diferenças significativas entre as OD's da Vacina e dos clones B+C ou E e entre as OD's dos Clone E e do grupo B+C. Observa-se que os quatro inóculos utilizados (vacina comercial "IBR-BVD" - Hertape

Calier); M13: fago selvagem sem inserto; Fagos selecionados com clones de peptídeos: E e B+C geraram uma resposta imune com presença de anticorpos capazes de reconhecer o inóculo utilizado na sensibilização da placa de ELISA (FIGURA 10).

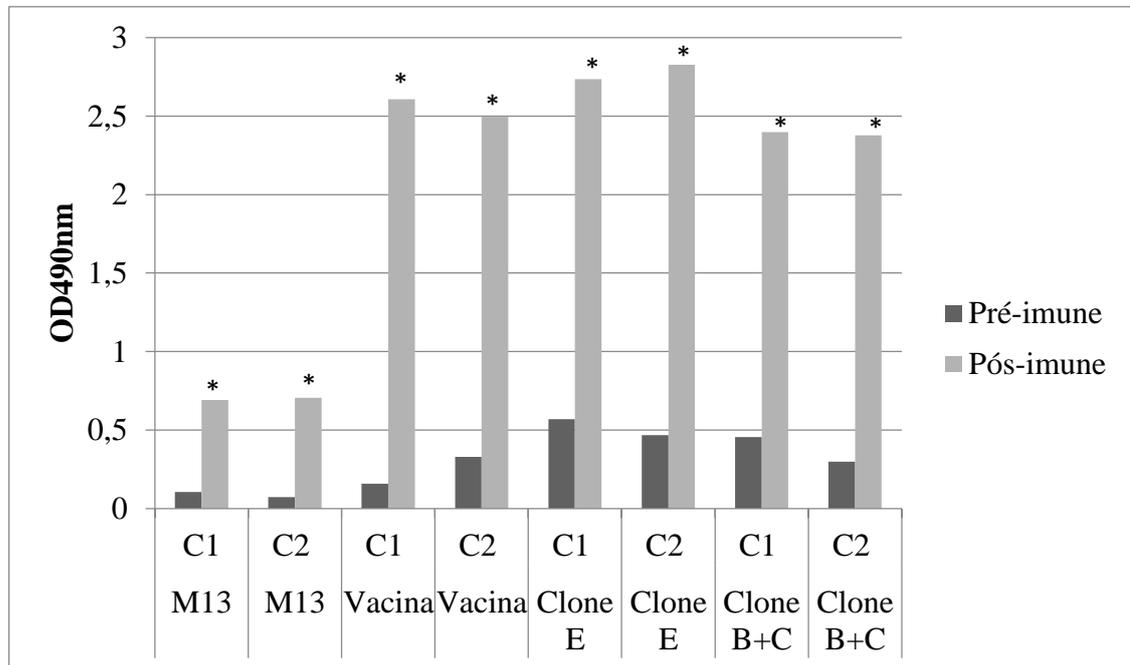


FIGURA 9 - Resultados de ELISA para detecção de anticorpos presentes no soro de coelhos submetidos a imunização em quatro doses de quatro inóculos diferentes. Inóculos: M13: fago selvagem sem inserto; vacina comercial “IBR-BVD” (Hertape Calier®); Fagos selecionados com clones de peptídeos: E e B+C. Cada animal é representado pela letra C dentro de cada tratamento. \*Significância  $p < 0,05$  quando comparado com a média das OD's do soro dos animais antes da imunização (Pré-imune) ou com o controle negativo (M13) Pós-imune. Análise por One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

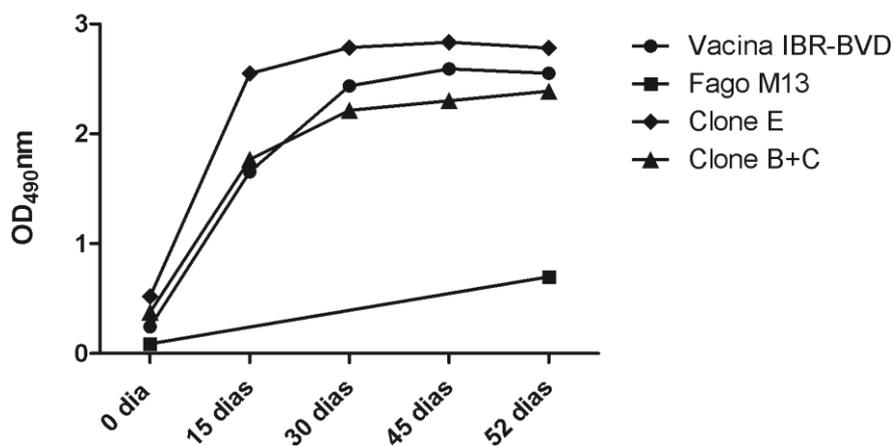


FIGURA 10 - Reatividade do soro de coelhos submetidos a imunização com quatro inóculos diferentes. Cada grupo foi composto por dois animais. Círculo: placa de ELISA sensibilizada com a cepa L.A. do BoHV-1 Quadrado: sensibilização da placa com o fago M13. Losango: sensibilização da placa com o Clone E (peptídeo). Triângulo: sensibilização da placa com os clones B e C (peptídeo), na mesma proporção e concentração.

### 3.4.2 Soroneutralização

A Tabela 2 mostra os títulos de anticorpos dos coelhos imunizados. Os animais dos grupos D e E (imunizados com fagos expressando os peptídeos B, C e E), A (imunizados com PBS) e B (imunizados com o fago selvagem M13) permaneceram negativos à prova de soroneutralização - o soro produzido não tinha atividade neutralizante - durante todo o período de estudo, ou seja, não houve inibição da lise celular provocada pelo BoHV-1.

Os animais do grupo C (imunizados com a vacina comercial) apresentaram título de anticorpos a partir da terceira imunização (28 dias), porém, apenas um dos animais (C1) foi considerado como positivo por apresentar inibição de lise celular na diluição 1:4<sup>23</sup>. O coelho C2 só pode ser considerado como positivo a partir da quarta imunização (42 dias) onde apresentou título de anticorpos neutralizantes de 1:64. Ao final das imunizações (49 dias), os dois animais imunizados com a vacina comercial (C1 e C2) apresentaram título de anticorpos idêntico (1:64), ou seja, houve neutralização do vírus pelos anticorpos presentes no soro desses animais (TABELA 2).

TABELA 2 - Resposta sorológica de coelhos imunizados com diferentes inóculos experimentais frente ao BoHV-1, analisada por soroneutralização. Títulos individuais de anticorpos obtidos após a primeira (0 DIAS), segunda (14 DIAS), terceira (28 DIAS), quarta (42 DIAS), quinta e última (49 DIAS) sorologia.

Grupo <sup>b</sup> (Inóculo)	Título de anticorpos (Diluição) <sup>a</sup>				
	Momento zero (0 DIAS)	14 DIAS	28 DIAS	42 DIAS	49 DIAS
A1 + A2 (PBS <sup>c</sup> )	-	-	-	-	-
B1 e B2 (M13 <sup>d</sup> )*	-	-	-	-	-
C1 (Vacina <sup>e</sup> )	-	-	1:16**	1:16	1:64
C2 (Vacina)	-	-	1:2	1:64**	1:64
D1 e D2 (Clone E <sup>f</sup> )*	-	-	-	-	-
E1 e E2 (Clones B+C <sup>f</sup> )*	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>O soro dos coelhos foi diluído nas proporções: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128; <sup>b</sup>Cinco grupos experimentais (A, B, C, D e E), cada grupo possui dois coelhos; <sup>c</sup>PBS: solução salina fosfatada; <sup>d</sup>Fago selvagem (M13); <sup>e</sup>Vacina comercial “IBR-BVD” (Hertape Calier<sup>®</sup>); <sup>f</sup>Clones expressando peptídeos; \*Por apresentarem os mesmos resultados, os dados de cada coelho (p.ex.: coelho B1 e coelho B2) foram mantidos numa mesma linha; \*\*A partir da diluição 1:4 as amostras foram consideradas positivas por inibirem a lise celular.

#### 4 DISCUSSÃO

A utilização da técnica de *phage display* não necessita de conhecimento prévio dos antígenos naturais contra qual uma resposta imune é dirigida<sup>24</sup>. Dessa forma, bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos foram rastreadas usando anticorpos antígeno-específicos para o BoHV-1. Os anticorpos policlonais usados na seleção de peptídeos de bibliotecas de fagos foram provenientes de um *pool* de amostras de soro obtidas de bovinos com título de anticorpos para o BoHV-1. O processo de purificação por cromatografia de afinidade em *sepharose* de imunoglobulinas a partir do *pool* de animais soropositivos ao BoHV-1 mostrou ser eficiente, evidenciado pelos fragmentos de cadeia leve e pesada características das imunoglobulinas bovinas. Todo o processo resultou na concentração e purificação de imunoglobulinas específicas. O emprego de tais anticorpos antígeno-específicos policlonais para selecionar peptídeos em bibliotecas de fagos aumenta a possibilidade de encontrar peptídeos miméticos (mimetopos) de antígenos virais do BoHV-1.

Goodyear e Silverman<sup>25</sup> citaram que no início da prospecção, a biblioteca é altamente diversificada e contém um pequeno número de ligantes específicos ao alvo e a cada ciclo de seleção o número de fagos específicos tende a aumentar com o consequente aumento do número de fagos de saída. A eficiência da seleção através da titulação de fagos ao final de

cada ciclo de seleção foi avaliada e constatou-se enriquecimento dos fagos ligantes e específicos ao alvo (anticorpos policlonais) (QUADRO 2). Resultados semelhantes de enriquecimento ao final do *biopanning* para seleção de peptídeos foram descritos por outros autores que utilizaram *phage display* em seus respectivos trabalhos<sup>26-28</sup>.

Ao utilizar o *phage display* para selecionar peptídeos fusionados a proteínas de bacteriófagos com anticorpos monoclonais, a seleção a cada ciclo tende a enriquecer os fagos que apresentam o mesmo motivo ou peptídeo<sup>24</sup>. Como foram utilizados anticorpos totais presentes no soro de animais naturalmente infectados pelo BoHV-1, nosso *pool* de soros continha uma variabilidade de anticorpos contra diferentes glicoproteínas virais do envelope do herpesvírus bovino. De forma que a realização de vários ciclos de seleção enriqueceria a quantidade de peptídeos com alta afinidade pelos anticorpos específicos para o antígeno desejado, porém com motivos ou sequências de aminoácidos diferentes.

A cada ciclo de seleção ocorreu um aumento na reatividade do *pool* de fagos frente a IgG's dos bovinos soropositivos para o BoHV-1. Isso ocorreu, pois foram utilizadas concentrações maiores de detergente a cada ciclo, proporcionando uma maior estringência. Além disso, o aumento no número de lavagens deve ter permitido a retirada dos fagos não reativos. De forma que, apenas fagos com alta afinidade ao ligante (IgG anti-BoHV-1) permaneceram. Como a seleção biológica dos peptídeos foi feita utilizando anticorpos policlonais (IgG bovina), para não perder tanta variabilidade por uma possível seleção preferencial, foram executados apenas três ciclos de seleção, pois de acordo com nosso objetivo uma maior variabilidade de peptídeos poderia significar uma maior oferta ao sistema imune, de diferentes epitopos miméticos a proteínas virais, conseqüentemente uma maior eficiência para o controle imunológico do BoHV-1.

A sequência peptídica dos 44 clones selecionados foi determinada por sequenciamento do inserto no DNA do fago, o qual revelou 16 sequências diferentes de aminoácidos. Os fagos correspondentes a estas sequências foram amplificados para testá-los com anticorpos policlonais (IgG's) presentes no soro de animais positivos para o BoHV-1 e controle (M13) (FIGURA 7-A). Dentre os fagos avaliados, três (B, C e E) foram selecionados por possibilitarem a melhor diferenciação entre animais soropositivos para o BoHV-1 em comparação aos soronegativos (FIGURA 7-B). Curiosamente, dentre os três, apenas as sequências de aminoácidos dos clones B e C tiveram maior frequência em comparação ao clone E (TABELA 1), talvez a frequência observada estivesse diminuída por uma menor eficiência na reação de sequenciamento. Muitas variáveis contribuem para a constituição da subpopulação de fagos recuperada no final da técnica. Mccafferty<sup>29</sup> demonstrou que a seleção

depende da afinidade de interação entre o peptídeo expresso pelo fago e o ligante. Porém, se dois fagos em uma mesma biblioteca possuem a mesma afinidade, mas diferentes níveis de expressão, o de maior expressão será preferencialmente selecionado. Além disso, se dois fagos de mesma afinidade apresentam diferentes taxas de crescimento, haverá uma tendência de recuperação do fago de maior rendimento, o que pode ter ocorrido com o clone E, que foi selecionado no segundo e não no terceiro ciclo de seleção.

O fago M13 (sem peptídeo recombinante expresso na superfície) apresentou baixa reatividade com as IgG's presentes no *pool* de soros positivos para o BoHV-1, caracterizada por um índice ELISA menor que um (FIGURA 7-A), indicando que não houve uma interação ou reconhecimento significativo de proteínas do próprio fago pelas imunoglobulinas específicas. O dado obtido reforça a eficiência da técnica para a seleção apenas do peptídeo recombinante reativo ao alvo desejado (IgG).

No ELISA que verificou a reatividade dos clones pré-selecionados (A, B, C, D, E, F, e G) com um *pool* de soro de animais positivos para o BoHV-1 (FIGURA 7-A), apesar de todos os clones apresentarem-se reativos com as IgG's anti-BoHV-1 do *pool* de soros positivos com  $IE > 1$ , apenas cinco clones (B, C, E, F e G) foram escolhidos por apresentarem maior reatividade. Os clones A e D não foram avaliados por terem seus IE's bem menores quando comparados aos outros (B, C, E, F e G). No segundo teste ELISA, os mesmos clones (B, C, E, F e G) continuaram a apresentar maior reatividade e melhor capacidade de diferenciar entre o *pool* de soro de animais positivos e negativos para o BoHV-1 (FIGURA 7-B), porém, apenas os três que apresentaram os maiores IE's foram escolhidos.

No ELISA *in-house* frente a 16 soros positivos e 16 soros negativos para o BoHV-1, foi verificada a reatividade dos três clones individualmente (B, C e E), entretanto a análise estatística evidenciou diferença entre os resultados das amostras dos soros positivos e negativos com os peptídeos apenas dos clones C e E (FIGURA 8). E, apesar das diferenças significativas apenas o E diferenciou soros positivos dos negativos (FIGURA 8). Assim, o clone E, expressando o peptídeo DRALYGPTVIDH, foi escolhido como sendo o melhor clone, com base na maior reatividade apresentada em todos os testes de ELISA realizados e na sua capacidade de discriminar amostras de soro positivas de negativas para anticorpos anti-BoHV-1 (FIGURA 8). Considerando que os clones, no processo de *biopanning*, são reconhecidos e selecionados por meio da afinidade às imunoglobulinas específicas para herpesvírus bovino, purificada por meio de cromatografia de afinidade com proteínas totais virais, e que estas mesmas imunoglobulinas são reativas a determinado peptídeo expresso na superfície do bacteriófago, pode-se afirmar que o clone selecionado (E) mimetiza alguma

estrutura proteica viral. Uma análise *in silico* poderá confirmar qual o nível de similaridade entre as sequências de aminoácidos da proteína viral e do peptídeo selecionado.

Os peptídeos miméticos exibidos na superfície de bacteriófagos demonstraram ser uma ferramenta útil para a diferenciação sorológica entre *pools* de soro bovino positivo e negativo para BoHV-1, dessa forma eles foram submetidos a uma pesquisa adicional como um imunógeno a base de epitopo para determinar o seu potencial uso como vacina. Utilizamos coelhos para realizar a imunização com os peptídeos selecionados (E e B+C), a vacina comercial e o fago M13. Como os coelhos são considerados um bom modelo experimental para os herpesvírus, tendo sido utilizados em diferentes estudos da infecção e da resposta imunológica ao BoHV-5<sup>22,30,31</sup>, estes foram utilizados para avaliar se os anticorpos desenvolvidos durante a resposta imune aos peptídeos inoculados seriam capazes de soroneutralizar o vírus em cultivo celular.

A diferença estatística (FIGURA 9) encontrada entre os soros pré e pós-imunização demonstra que os animais desenvolveram anticorpos contra os peptídeos selecionados nos imunoenaios. Os animais imunizados como controles (vacina e fago M13) também desenvolveram uma resposta imune frente aos inóculos que os imunizaram. Além disso, pode-se verificar uma fase de aumento exponencial dos níveis de anticorpos nos grupos vacinados com os peptídeos E, B+C e vacina comercial, onde o maior pico de IgG ocorreu após a terceira imunização (FIGURA 10). A partir da terceira imunização, ou segunda para alguns dos animais, houve uma fase denominada platô, na qual os níveis não se alteraram ou alteraram muito pouco (entre 30 e 52 dias), seguindo-se a última fase da resposta, a fase de declínio, na qual ocorreria uma diminuição progressiva dos anticorpos específicos circulantes caso os animais não fossem mais imunizados e nem tivessem sofrido eutanásia (FIGURA 10) (CEUA - protocolo nº 20/2012).

Os testes ELISA confirmaram que os coelhos imunizados com os peptídeos produziram anticorpos anti-peptídeos (anti-pep). Nos ensaios imunoenzimáticos, apesar do grupo controle negativo ter gerado uma resposta imune com presença de anticorpos anti-M13 capazes de reconhecer o inóculo M13, as diferenças encontradas entre as OD's dos grupos Vacina e peptídeos (Clone E e B+C) com o controle negativo (M13) pós-imune ( $p < 0,05$ ) demonstraram que as proteínas do bacteriófago não influenciaram na resposta imune aos peptídeos testados. Os resultados do fago M13 nos ensaios comprovaram que os peptídeos fusionados na pIII dos clones selecionados foram reconhecidos pelos anti-pep das amostras dos soros de bovinos naturalmente infectados com o BoHV-1 e pelos coelhos imunizados. Os

dados do resultado sugerem que o peptídeo E tem uma maior imunogenicidade em comparação às proteínas do fago M13 (FIGURA 9).

Para diminuir o risco do não desenvolvimento de uma forte resposta imune durante as imunizações foi utilizado o adjuvante incompleto de Freund (sem adição de *M. tuberculosis*). Ele foi capaz de criar um contexto inflamatório para induzir o desenvolvimento da resposta imune específica dirigida aos peptídeos inoculados nos coelhos. Caso houvesse sido utilizado um inóculo feito apenas com os peptídeos obtidos diluídos em água, esses peptídeos seriam apresentados fora de um contexto inflamatório, conseqüentemente não induziriam o desenvolvimento de uma resposta imune e sim uma condição de anergia celular ou tolerância adaptativa<sup>32</sup>.

Com relação a soroneutralização, a utilização de peptídeos para imunização em coelhos não apresentou resultados satisfatórios. O soro dos animais imunizados com os peptídeos (E e B+C) e o fago M13 não foi capaz de neutralizar o BoHV-1 na diluição equivalente a 100 TCID<sub>50</sub>. Apenas o grupo imunizado com a vacina comercial apresentou títulos de anticorpos neutralizantes (TABELA 2). Em geral, parece difícil haver a produção de anticorpos com atividade neutralizante a partir da imunização de peptídeos sintéticos, como mostrado no estudo de Niederhäuser et al.<sup>33</sup>, onde cabras foram imunizados com um peptídeo sintético epitopo do vírus da raiva. Shoji et al.<sup>34</sup> também não conseguiram produzir atividade neutralizante contra o vírus da gripe (Influenza A) em coelhos imunizados com peptídeos sintéticos.

É importante lembrar que quando partículas virais do BoHV-1 infectam as células do seu hospedeiro, é necessária a interação entre várias glicoproteínas de envelope para que haja adsorção e penetração celular<sup>4,35,36</sup>. O sistema imune reconhece algumas dessas glicoproteínas, que são imunogênicas (gB, gC, gD e outras), para que haja a produção de anticorpos. Aceita-se que a imunização feita nos coelhos, com um inóculo formado exclusivamente por um único peptídeo (Clone E) ou dois (clones B+C), não seja suficiente para desenvolver uma resposta imune protetora por produzir anticorpos que, teoricamente, reconheceriam apenas um tipo de glicoproteína e conseqüentemente não seriam suficientes para neutralizar o vírus BoHV-1 em cultivo celular. Especula-se que a inoculação de um conjunto de peptídeos mimetopos a essas glicoproteínas ao invés de apenas um mimetopo de uma glicoproteína poderia gerar uma resposta imune adequada com produção de anticorpos soroneutralizantes. Refazer o *phage display* com a utilização de anticorpos monoclonais específicos para as glicoproteínas de maior imunogenicidade do BoHV-1, além de aumentar o número de ciclos da bioprospecção poderia ser uma alternativa para selecionar um conjunto

de mimetopos capazes de gerar a referida resposta imune adequada. Adicionalmente, para aumentar a concentração do inóculo dos peptídeos poderia ser utilizada uma síntese química de peptídeos.

Apesar de Kishchenko et al.<sup>37</sup> afirmarem que peptídeos apresentados por fagos se ligam mais facilmente aos anticorpos do que quando são apresentados de forma linear como peptídeos sintéticos, é possível evitar a conformação linear, imitando a conformação de apresentação dos peptídeos pelas pIII dos fagos com síntese de mimetopos unidos por peptídeos espaçadores (PD). Segundo Silva<sup>38</sup>, essa conformação é mais eficiente para estimular células do sistema imune.

## 5 CONCLUSÕES

A tecnologia do *phage display* foi eficiente para a identificação de um peptídeo mimético antigênico que apresenta potencial antigênico para ser utilizado no diagnóstico sorológico do BoHV-1, e como base para a construção de peptídeo sintético a partir de sua sequência (DRALYGPTVIDH). No caso do BoHV-1, um número maior de amostras deverá ser avaliado para a padronização do uso deste peptídeo em testes sorológicos.

Uma resposta imunológica foi desenvolvida por coelhos frente a imunização destes com o peptídeo E (DRALYGPTVIDH). Houve produção de títulos de anticorpos anti-pepE, conferindo a especificidade necessária para os experimentos de *phage display*.

## REFERÊNCIAS

1. Franco AC, Roehe PM. Herpesviridae, In: Flores EF, **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM; 2007. 433-488p.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Taxonomy**, 2014. [acesso 16 nov 2015]. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
3. Kunrath CF, Vogel FSF, Oldoni I, Flores EFF, Weiblen R, Dezingrini R, Torres FD, Pan, KA. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciêñ Rural**. 2004;34(6):1877-1883.
4. Franco AC, Roehe PM. Herpesviridae, In: Flores EF, **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. 433-488p.

5. Organização Mundial para a Saúde Animal e Oficina Internacional de Epizootias. OIE, 2015. 2015. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015**. Office International des Epizooties (OIE). Disponível em: <http://www.oie.int/en>. [acesso mar 2015].
6. Del Fava C, Pituco EM, D'angelo JL. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Rev Ed Cont**. 2002;5(3):300-312.
7. Silva MS, Brum MCS, Weiblen R, Flores EF. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987- 2006). **Pesq Vet Bras**. 2007;27(10):403-408.
8. SMITH GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**. 1985; 228(4705): 1315-1317.
9. Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**. 1988;73(2):305-318.
10. Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. **Phage display – a laboratory manual**. San Diego. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
11. Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnol Adv**. 2010; 28(6):849-858.
12. Vodnik M, Zager U, Strukelj B, Lunder M. Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. **Molecules**. 2011; 16:790-817.
13. Madin SH; York CJ; Vmckercher DG. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**. 1956; 124, 721-722.
14. Thrusfield, M. **Veterinary epidemiology**. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 483p.
15. House JA, Baker JA. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. **Cornell Vet**. 1971;61(2):320-335.
16. Bradford, MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**. 1976;72(1-2):248-254.
17. Santos EM, Cardoso R, Souza GRL, Goulart R, Heinemann MB, Leite RC, Reis JKP. Selection of peptides for serological detection of equine infectious anemia. **Genet Mol Res**. 2012;11(3):2182-2199.
18. Santos EM, Rone Cardoso R, Filho LRG, Heinemann MB, Leite RC, Dos Reis JKP. Selection of ligand peptides with the ability to detect antibodies in enzootic bovine leukosis. **Afr J Biotechnol**. 2012;11(28):7302-7312.
19. Wilson RK. Ph.D.<sup>TM</sup> Phage Display Libraries. Instruction Manual. **Biotechniques**. 1993;15:414-422.

20. PRISMA -**GraphPad Prism**- Versão 5.0 (computer program). California, USA, 2009.
21. FIOCRUZ. **Manual de utilização de animais**, 2008. CEUA – FIOCRUZ: RIO DE JANEIRO; 2008 [acesso 2 jan 2014]. Disponível em: [http://www.comissoes.propp.ufu.br/sites/comissoes.propp.ufu.br/files/Anexos/Bookpage/Manual\\_procedimentos\\_FIOCRUZ.pdf](http://www.comissoes.propp.ufu.br/sites/comissoes.propp.ufu.br/files/Anexos/Bookpage/Manual_procedimentos_FIOCRUZ.pdf).
22. Beltrão N, Flores EF, Weiblen R, Silva AM, Roehe PM, Irigoyen LF. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): Coelhos como modelo experimental. **Pesq Vet Bras**. 2000;20(4):144-150.
23. Médici KC, Alfieri AA, Alfieri AF. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciênc Rur**. 2000;30(2):347-350.
24. Moreau V, Granier C, Villard S, Laune D, Molina F. Discontinuous epitope prediction based on mimotope analysis. **Bioinformatics**. 2006;22(9):1088-1095.
25. Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. **Chem Rev**. 1997;97(2):391-410.
26. Azzazy HM, Highsmith EE Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin Biochem**. 2002;35(6):425-45.
27. Goodyear CS.; Silverman, GJ. Phage-display methodology for the study of protein-protein interactions. In: Golemis EA, Adams PD. **Protein-protein interactions: a molecular cloning manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 2005, 141-165p.
28. Toledo-Machado CM, Machado De Avila RA, Nguyen C, Granier C, Bueno LL, Carneiro CM, Menezes-Souza D, Carneiro RA, Chávez-Olórtegui C, Fujiwara RT . Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Mimotope Peptides Selected from Phage Displayed Combinatorial Libraries. **Biomed Res Int**. 2015;1-10, 2015. doi:10.1155/2015/401509.
29. Mccafferty J. Phage display: factors affecting panning efficiency. In: Kay BB, Winter J, Maccafferty J. **Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual**. San Diego: Academic Press, 1996, 261-276p.
30. Silva AM, Flores EF, Weiblen R, Canto MC, Irigoyen LF, Roehe PM, Sousa RS Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Rev Microbiol**. 1999;30(1):22-31.
31. Dezengrini R, Silva SC, Weiss M, Oliveira MS, Traesel CK, Weiblen R, Flores EF, Efeitos do Foscarnet sobre a infecção pelos herpesvírus bovino tipos 1 e 5 em coelhos1. **Pesq Vet Bras**. 2010;30(8):623-630.
32. Ryan KR, Patel SD, Stephens LA, Anderton SM. Death, adaptation and regulation: the three pillars of immune tolerance restrict the risk of autoimmune disease caused by molecular mimicry. **J Autoimmun**. 2007;29(4):262-271.
33. Niederhäuser S, Bruegger D, Zahno ML. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. **Vaccine** 2008;26(52):6749–6753.

34. Shoji I, Kaoru S, Mikihiro Y, Ritsuko K-K, Yuji I, Shota N, Teruo Y, Yoshinobu O, Kazuyoshi I. Immunization of rabbits with synthetic peptides derived from a highly conserved  $\beta$ -sheet epitope region underneath the receptor binding site of influenza A virus. **Biologics**. 2013; 7:233-241.
35. Tyler KL, Nathanson N. Pathogenesis of viral infections. Capítulo 7. In: Knipe DM, Howley PM. **Fields' Virology**, 4ed.; vol.1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001; 199-243p.
36. Campadelli-Fiume G, Amasio M, Avitabile E, Cerretani A, Forghieri C, Gianni T, Menotti L. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. **Rev Med Virol.** 2007;17(5):313-326.
37. Kishchenko G, Batliwala H, Makowski L. Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13. **J Mol Biol**. 1994;241(2):208-13.
38. Silva PR. **Identificação de mimetopos bioativos do *Cryptococcus neoformans* por phage display e análise dos efeitos destes peptídeos sobre células mononucleares e granulócitos humanos *in vitro***. [Tese] Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2012.

**CAPÍTULO 3 - A CONFORMATIONAL EPITOPE MAPPED IN THE BOVINE  
HERPESVIRUS TYPE 1 ENVELOPE GLYCOPROTEIN B BY PHAGE DISPLAY  
AND THE HSV-1 3D STRUCTURE**

Descreve-se a seguir o mapeamento de um epítipo de glicoproteína do envelope viral do BoHV-1. A estrutura 3D do HSV-1 foi utilizada como modelo haja vista o BoHV-1 não possuir modelos estruturais 3D delineados.

O artigo obedece a redação e formatação padrão por exigência do periódico onde foi publicado.



Contents lists available at ScienceDirect

## Research in Veterinary Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yrvsc](http://www.elsevier.com/locate/yrvsc)

## A conformational epitope mapped in the bovine herpesvirus type 1 envelope glycoprotein B by phage display and the HSV-1 3D structure

Greyciele R. Almeida<sup>a,c</sup>, Luiz Ricardo Goulart<sup>b</sup>, Jair P. Cunha-Junior<sup>d</sup>, Luiz A.M. Bataus<sup>a</sup>, Greice Japolla<sup>a,c</sup>, Wíliam M.E.D. Brito<sup>c</sup>, Ivan T.N. Campos<sup>a</sup>, Cristina Ribeiro<sup>a</sup>, Guilherme R.L. Souza<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

### article info

#### Article history:

Received 18 March 2015

Received in revised form 20 May 2015

Accepted 30 May 2015

Available online xxxx

#### Keywords:

BoHV-1

Glycoprotein B

Epitope mapping

Discontinuous epitope

Structural homology

### abstract

The selected dodecapeptide <sup>1</sup>DRALYGPTVIDH<sup>12</sup> from a phage-displayed peptide library and the crystal structure of the envelope glycoprotein B (Env gB) from Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) led us to the identification of a new discontinuous epitope on the Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) Env gB. In silico analysis revealed a short BoHV-1 gB motif (<sup>338</sup>YKRD<sup>341</sup>) within an epitope region, with a high similarity to the motifs shared by the dodecapeptide N-terminal region (<sup>2</sup>YxARD<sup>1</sup>) and HSV-1 Env gB (<sup>326</sup>YARD<sup>329</sup>), in which the <sup>328</sup>Arg residue is described to be a neutralizing antibody target. Besides the characterization of an antibody-binding site of the BoHV-1 Env gB, we have demonstrated that the phage-fused peptide has the potential to be used as a reagent for virus diagnosis by phage-ELISA assay, which discriminated BoHV-1 infected serum samples from negative ones.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

The Herpesviridae family member bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) is an etiologic agent that is associated with respiratory infections and reproductive disorders in cattle, including infectious bovine rhinotracheitis (IBR), infectious pustular vulvovaginitis (IPV) and balanoposthitis (Engels and Ackermann, 1996). Despite the low mortality rate of BoHV-1, infection with this agent exerts a high economic impact due to fetal infection, abortion and reduced production (Mechor et al., 1987; Kahrs, 2001). The World Organization for Animal Health (OIE) classified BoHV-1 into list of notifiable diseases, which consists of transmissible diseases that are considered to be of socio-economic and/or public health importance and are therefore of relevance for the international trade of animals and animal products (OIE, 2015).

To control this disease, subunit vaccine approaches have been widely used; most of these approaches are based on viral envelope glycoproteins, which are the most important elicitors of protective immune responses (Manservigi and Cassai, 1991). A large number of BoHV-1-encoded genes are viral structural proteins. Ten of these genes encode glycoproteins, which are associated with the viral envelope. The gC,

gD, gE, gG and gI are also involved in viral virulence (Van Oirschot et al., 1996; Kaashoek et al., 1998). The major envelope glycoproteins gB, gC and gD, along with gE, are the main immune elicitor proteins in BoHV-1 infections (Tikoo et al., 1995). These three major env glycoproteins have been used as antigens in many platforms for the BoHV-1 control. (Oliver et al., 2009; Khattar et al., 2010; Gogev et al., 2002). Glycoprotein B is highly conserved among members of the Herpesviridae family and is crucial for viral replication. gB also plays an important role in the processes of viral fusion, penetration into the host cell and cell-to-cell spread (Kaashoek et al., 1998; Heldwein and Krummenacher, 2008).

In the present study, we have used the phage display technology (Sidhu, 2000) in order to select and characterize peptides that can be used in place of entire virus glycoproteins to aid in BoHV-1 diagnosis or control. The selection of peptides to mimic protein structure motifs based on the peptide library approach is a powerful tool for antigen prospecting across a wide range of microorganisms. However, the majority of studies that used this methodology are based on the primary structure of the peptides (Gazarian et al., 2011; Santos et al., 2012; Prudencio et al., 2011; Cunha-Junior et al., 2010). To address the lack of available information related to the 3D structure of BoHV-1 proteins, we demonstrated an alternative in silico approach for epitope mapping of BoHV-1 that was based on recombinant peptides selected by phage display and then conformationally aligned with the homologous 3D structure of Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1).

\* Corresponding author at: Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Campus II, Samambaia, Goiânia, GO, CEP: 74001-970, Brazil. Tel.: +55 62 3521 1436.

E-mail addresses: [greyci\\_almeid@hotmail.com](mailto:greyci_almeid@hotmail.com) (G.R. Almeida), [lrgoulart@ufu.br](mailto:lrgoulart@ufu.br) (L.R. Goulart), [jair.cunha.junior@gmail.com](mailto:jair.cunha.junior@gmail.com) (J.P. Cunha-Junior), [bataus@ufg.br](mailto:bataus@ufg.br) (L.A.M. Bataus), [gre\\_vet@hotmail.com](mailto:gre_vet@hotmail.com) (G. Japolla), [wilia@hotmail.com](mailto:wilia@hotmail.com) (W.M.E.D. Brito), [ivan@icb.ufg.br](mailto:ivan@icb.ufg.br) (I.T.N. Campos), [cris.lino@gmail.com](mailto:cris.lino@gmail.com) (C. Ribeiro), [grlino@gmail.com](mailto:grlino@gmail.com) (G.R.L. Souza).

The study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments (CEUA) of the Federal University of Goiás (protocol number 20/2012).

We used a combinatorial library of random dodecapeptides fused to a minor coat protein (pIII) of the M13 phage (Ph.D.<sup>TM</sup>-12 Phage Display Peptide Library Kit—NEB) to select peptides that were reactive against purified IgG, by affinity chromatography, from a serum bank of seropositive bovines infected with BoHV-1. Six clones (phage-displayed peptide) were isolated, their DNA sequences were determined, and translated using the online Translate software hosted in the Expert Protein Analysis System server (Artimo et al., 2012).

In order to evaluate the serum reactivity of the peptides, two phage-ELISAs were performed as previously described (Barbas et al., 2001; Cunha-Junior et al., 2010). For the first—to evaluate the reactivity with positive serum for BoHV-1—microplates were coated with  $1 \times 10^{11}$  pfu of clones per well and then assayed using a pool of positive bovine serum samples. The reaction was developed by incubation with peroxidase-labeled goat anti-bovine IgG (1:1000) and a final step of adding 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1 mg/ml o-phenylenediamine. The wild-type phage M13KE (Wt) was used as a negative control to evaluate the specificity of BoHV-1 positive sera only for the peptide displayed on the surface of isolated phages. For this purpose, the cut off was arbitrarily defined as  $2 \times$  the OD value of the Wt.

For the second ELISA, only the selected phage clones from above the cut off were assayed using a pool of serum samples previously defined as positive or negative for BoHV-1 infection. In this reaction, the cut off was calculated as the mean OD of negative control sera plus 3 SDs. Antibody titers were expressed as ELISA index (EI) values, according to the formula:  $EI = OD \text{ sample} / OD \text{ cut off}$ . Samples with EI values  $\geq 1.0$  were considered positive. In order to evaluate the performance of the most reactive clone, an additional ELISA was performed as described before with 30 individual positive and negative sera samples to evaluate sensitivity and specificity.

As defined previously, the arbitrary wild type phage cut off was able to identify four reactive peptides, with a pool of positive serum, through the biopanning selection. Despite the reactivity of these peptides, only phage clone C, which expressed the dodecapeptide DRALYGPTVIDH, was chosen based on its having the highest reactivity among phage-ELISAs (Fig. 1 A and B). We were also able to confirm the differential reactivity of clone C, which could discriminate BoHV-1 infected serum samples from negative ones (Fig. 1C).

In order to map specific epitope in the BoHV-1 envelope proteins, the clone C was further investigated on an epitope mapping server using affinity-selected peptides (<http://pepitope.tau.ac.il/>) (Mayrose et al., 2007). Because no solved 3D structure of BoHV-1 antigens is available, the in silico analysis was performed using herpes simplex virus (HSV-1) glycoproteins as templates based on homologous genes that encode viral glycoproteins. This strategy was feasible due to the high similarity among family members.

The peptide structural alignment was performed with solved HSV-1 envelope glycoproteins in the protein data bank (i.e., gD: [pdb]1L2G[chains A,B,C,D], [pdb]1JMA[chains A,B]; gE: [pdb]2GIY[chains A,B] and gB: [pdb]2GUM[chains A,B,C]) (<http://www.rcsb.org/pdb>). The alignment revealed a best hit with the crystal structure of the extracellular domain of gB from HSV-1 [pdb]2GUM[A], which presented 82% homology (e-value:  $4.23e-06$ ) to ten residues of the queried peptide (Fig. 2A and B). Only one residue substitution (i.e., peptide isoleucine [Ile<sup>10</sup>] to the HSV-1 threonine [Thr<sup>341</sup>]) was observed (Fig. 2C). Additionally, we compared the same ten residues segment between HSV-1 and BoHV-1 gBs. Eight of them were conserved or presented an amino acid substitution that preserved the physicochemical properties of the original structure (data from BLASTp alignment with entire gBs, score: 661 bits and e-value: 0.0, [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>]). These values show the presence of two shared homologous segments that are formed by discontinuous amino acid residues that are displayed

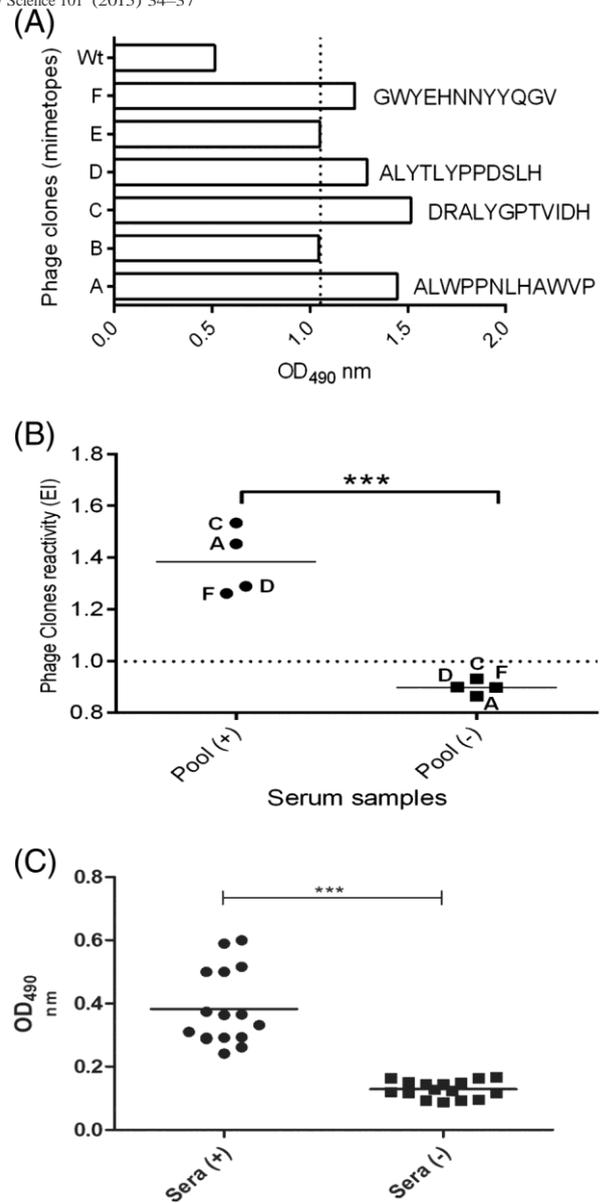


Fig. 1. (A) Reactivity of individual clones (A,B,C,D,E,F) and wild-type phage M13KE (Wt) ( $1 \times 10^{11}$  pfu) using pool of positive serum sample for BoHV-1 infection. Cut off defined as  $2 \times$  the OD value of Wt (dotted line). (B) Phage-ELISA with selected clones (A, C, D, F) using pool of positive (+) or negative (-) serum samples for BoHV-1 infection (t test; \*\*\* p < 0.05). EI values  $\geq 1.0$  (dotted line) were considered positive. (C) Phage-ELISA—reactivity of 15 individual sera for each group of animals, which were positive (+) or negative (-) for BoHV-1 infection (t test; \*\*\* p < 0.05).

together and probably shape an antibody-binding site, featuring an epitope on the protein surface (Fig. 2D).

Neutralizing monoclonal antibodies (mAb) for HSV-1 gB have been described by isolating single-amino acid monoclonal antibody resistance mutants or via peptide mapping using ELISA (Heldwein et al., 2006). One of these antibodies (mAb H233) recognizes the arginine<sup>328</sup> (YAR<sup>328</sup>D) in the gB extracellular domain. Here we demonstrate a region in the BoHV-1 gB, in which the R<sup>340</sup> residue is flanked by a highly similar sequence (YKR<sup>340</sup>D) that fell into the N-terminal dodecapeptide sequence motif (<sup>5</sup>YxARD<sup>1</sup>) selected and characterized here by phage display.

Previous reports of cattle immunization with gB have produced a neutralizing antibody and a specific T-cell response, which confer protection against a virulent BoHV-1 challenge. The extracellular domain of gB was also shown to be sufficient to induce a protective immune

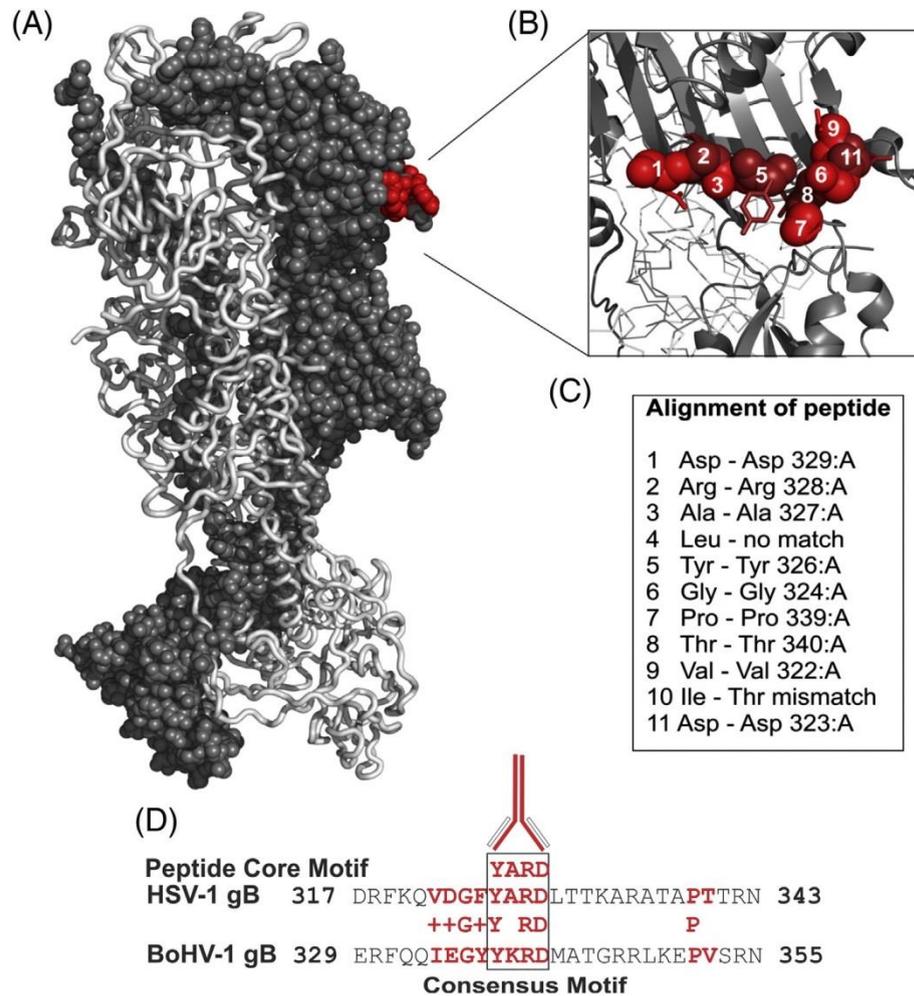


Fig. 2. (A) Gray space fill—gB chain A (Heldwein et al., 2006). Red space fill—the antibody recognition epitope is. (B) Discontinuous amino acid sequence of the epitope on the protein surface. (C) Alignment showing the peptide match within the target protein and the location of the residues on HSV-1 gB chain A. (D) Blastp with the segments from BoHV-1 and HSV-1 gBs. Full red region—conserved epitopes corresponding to the peptide alignment. Boxed region—consensus motif. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

response (Gao et al., 1994; Gao et al., 1995). An immunodominant region in the BoHV-1 gB (aa 254–532) has been reported as a recognition domain by T cells from cattle that were immunized with the extracellular domain of recombinant gB, in which the amino acid sequence<sup>–331</sup>QQIEGYKRD<sup>352</sup>MATGRRLKEPV<sup>352</sup>– was appointed as being the B-cell recognition site (Gao et al., 1999). Consistent with our results, the peptide core motif, herein described, are included within the segment (underlined), showing to be critical on the T- and B-cell interplay throughout the natural immune response.

In conclusion, the selected peptide displayed on the surface of the bacteriophage was shown to be a useful tool for BoHV-1 epitope mapping and, as being immunodominant, has the potential for the virus diagnosis and will be subjected to an additional investigation in near future as an epitope-based immunogen to determine its potential use in virus neutralization. Furthermore, the strategy described here can be used for a wide range of microorganisms of veterinary interest, in order to uncover new potential epitopes for theranostic applications for animal health—molecules that combine diagnostics and therapeutics functionalities.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq—Conselho Nacional de Pesquisa; FAPEG—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás, and CAPES—Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Ensino superior (MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/Pro Centro-Oeste no 31/2010).

#### References

- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., Stockinger, H., 2012. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research* 40 (1), 597–603.
- Barbas, C.F.I.I.I., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J., 2001. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Cunha-Junior, J.P., Souza, G.R.L., Prudencio, C.R., Barbosa, B.F., Goulart, L.R., Mineo, J.R., 2010. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. *Immunobiology* 215, 26–37.
- Engels, M., Ackermann, M., 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology* 53, 3–15.
- Gao, Y., Leary, T.P., Eskra, L., Splitter, G.A., 1994. Truncated bovine herpesvirus-1 glycoprotein 1 (gp1) initiates a protective local immune response in its natural host. *Vaccine* 12, 145–152.
- Gao, Y., Daley, M.J., Splitter, G.A., 1995. BHV-1 glycoprotein 1 and recombinant interleukin 1 beta efficiently elicit mucosal IgA response. *Vaccine* 13, 871–877.
- Gao, Y., Wang, C., Splitter, G.A., 1999. Mapping T and B lymphocyte epitopes of bovine herpesvirus-1 glycoprotein B. *Journal of General Virology* 80, 2699–2704.
- Gazarian, K., Setién, A.A., Gazarian, T., Pierle, S.A., 2011. Phage display identifies two caprine arthritis encephalitis virus Env epitopes. *Veterinary Research* 42, 87.
- Gogev, S., Vanderheijden, N., Lemaire, M., Schyns, F., D'Offay, J., Deprez, I., Adam, M., Eloit, M., Thiry, E., 2002. Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein gC or gD. *Vaccine* 20, 1451–1465.

- Heldwein, E.E., Krummenacher, C., 2008. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 1653–1668.
- Heldwein, E.E., Lou, H., Bender, F.C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Harrison, S.C., 2006. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313, 217–220.
- Kaashoek, M.J., Rijsewijk, F.A., Ruuls, R.C., Keil, G.M., Thiry, E., Pastoret, P.P., Van Oirschot, J.T., 1998. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine* 16, 802–809.
- Kahrs, R.F., 2001. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. *Viral Diseases of Cattle*, 2nd ed. Iowa State University Press, Ames, pp. 159–170 (chapter 18).
- Khattar, S.K., Collins, P.L., Samal, S.K., 2010. Immunization of cattle with recombinant Newcastle disease virus expressing bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D induces mucosal and serum antibody responses and provides partial protection against BHV-1. *Vaccine* 28 (18), 3159–3170.
- Manservigi, R., Cassai, E., 1991. The glycoproteins of the human herpesviruses. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 14 (2), 81–95.
- Mayrose, I., Shlomi, T., Rubinstein, N.D., Gershoni, J.M., Ruppin, E., Sharan, R., Pupko, T., 2007. A graph-based algorithm for epitope mapping using combinatorial phage-display libraries. *Nucleic Acids Research* 35 (1), 69–78.
- Mechor, G.D., Rousseaux, C.G., Radostits, O.M., Babiuk, L.A., Petrie, L., 1987. Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Canadian Journal of Veterinary Research* 51, 452–459.
- Oliver, S.L., Sommer, M., Zerboni, L., Rajamani, J., Grose, C., Arvin, A.M., 2009. Mutagenesis of Varicella-Zoster Virus glycoprotein b: putative fusion loop residues are essential for viral replication, and the furin cleavage motif contributes to pathogenesis in skin tissue in vivo. *Journal of Virology* 83, 7495–7506.
- Prudencio, C.R., Rezende Rodrigues, A.A., Cardoso, R., Souza, G.R.L., Szabó, M.P.J., Goulart, L.R., 2011. Cutaneous hypersensitivity test to evaluate phage display anti-tick borne vaccine antigen candidates. *Experimental Parasitology* 129 (4), 388–392.
- Santos, E.M., Cardoso, R., Souza, G.R.L., Goulart, L.R., Heinemann, M.B., Leite, R.C., Reis, J.K.P., 2012. Selection of peptides for serological detection of equine infectious anemia. *Genetics and Molecular Research* 11 (3), 2182–2199.
- Sidhu, S.S., 2000. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 610–616.
- Tikoo, S.K., Campos, M., Babiuk, L.A., 1995. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Advances in Virus Research* 45, 191–223.
- Van Oirschot, J.T., Kaashoek, M.J., Rijsewijk, F.A., Stegeman, J.A., 1996. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *Journal of Biotechnology* 44, 75–81.
- World Organisation for Animal Health, 2015. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. Office International des Epizooties (OIE) (<http://www.oie.int/en>).

## CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tecnologia de *phage display* foi eficiente para selecionar um peptídeo antigênico mimético que apresenta potencial para ser utilizado como antígeno em plataformas diagnósticas para animais soropositivos ao BoHV-1, e como base para a construção de peptídeos sintéticos a partir de sua sequência de 12 resíduos de aminoácidos.

A introdução de motivos repetidos unidos por sequências espaçadoras (PPGGGPP) pode ser importante para aumentar a resposta imunológica induzida por peptídeos miméticos uma vez que permite à sequência de mimetopos tomar uma conformação mais estável e favorável para atuar como um ligante. Dessa forma, propõe-se um tipo de design para a síntese química do peptídeo E: [NH<sub>3</sub>]-**MOTIF**-PPGGGPP-**MOTIF**-PPGGGPP-**MOTIF**-[CONH<sub>2</sub>]-**BSA**. A prolina induz uma dobra na molécula aproximando os motivos (sequência do pepE - DRALYGPTVIDH). Porém, é importante realizar uma análise de bioinformática para estimar o comportamento da molécula, sendo que a sequência amino-terminal deve permanecer livre. Adicionalmente, pode-se adicionar no motivo um pedaço da molécula que faz parte da pIII do bacteriófago, por exemplo (X = motivo proteico; Resíduos em negrito = parte da pIII): X<sup>1</sup>-X<sup>12</sup>**GGGSAETVESCL**. Isso apenas poderá ser feito se a parte carboxi-terminal participar do motivo, mais uma vez a análise de bioinformática poderia confirmar por meio da incorporação da sequência da pIII (em negrito) na estrutura 3D.

Análises *in silico* fornecem ferramentas que aceleram o processo de identificação de novos antígenos para vacinas ou diagnóstico, uma vez que o próprio algoritmo faz uma pré-análise do ensaio imunológico, poupando ensaios desnecessários com antígenos que não irão ser eficazes. Neste trabalho, realizou-se primeiro os ensaios imunoenzimáticos. Em estudos futuros sobre prospecção de novos mimetopos, será interessante a realização prévia da análise *in silico* antes da realização de imunoensaaios.

A prospecção de mimetopos de BoHV-1 pode ser aplicada a outras glicoproteínas, como gC ou gD, com a finalidade de gerar vacinas de subunidades que podem ser testadas quanto à sua eficácia, em comparação com as vacinas atuais (inativadas). Um ponto positivo de se produzir uma vacina para IBR composto por mimetopos seria impedir o estabelecimento de latência viral causada pelas vacinas compostas por vírus vivo (ativas).

A estratégia de utilização do *phage display* aqui descrita pode ser aplicada não apenas para os vírus, mas para uma vasta gama de micro-organismos de interesse veterinário, a fim de descobrir novos mimetopos potenciais para as aplicações de saúde animal terapêuticas - moléculas que combinam diagnóstico com uma terapia específica. A utilização

de peptídeos em imunoenaios é bem atrativa. Os antígenos expressos em fagos podem ser produzidos em larga escala e a um custo relativamente baixo, pois os fagos carreadores de peptídeos são amplificados em bactérias. Futuramente, o peptídeo selecionado neste trabalho, conjuntamente com outros peptídeos que serão identificados e estudados, poderão compor kits diagnósticos por ensaio imunoenzimático.

## ANEXO 1 - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 11 de agosto de 2014.

### PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA/ENSINO PROTOCOLADO NA CEUA SOB O Nº. 020/12

#### I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** Prospecção de epítomos e anticorpos recombinantes para o desenvolvimento de uma plataforma para terapêutica e diagnóstico de micro-organismos relacionados a doenças reprodutivas de interesse animal.
2. **Pesquisador Responsável:** Guilherme Rocha Lino de Souza
3. **Unidade/Órgão do pesquisador:** ICB/UFG
4. **Pesquisadores Participantes:**  
Guilherme Rôcha Lino de Souza  
Luiz Artur Mendes Bataus  
Wilia Marta Elsner Diederichsen de Brito  
Ana Flávia Batista Penido  
Greice Japolla
5. **Unidade onde será realizado:** Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular ICB/III/ Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP)/ Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária Universidade Federal de Goiás.
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 07/03/2012
7. **Data da apresentação do Pedido de Emenda:** 20/01/2014
8. **Data atendimento de pendência:**
9. **Data do segundo relato:** 11/08/2014

#### II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

#### III - Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o *Relatório Final* baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

**IV - Data da reunião: 11/08/2014**

RENATA  
MAZARO:12343522812  
2014.08.25 16:34:17  
-03'00'

**Dra. Renata Mazaro e Costa**  
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG