

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABEL BIASI YAMANAKA

**IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES PARA A PROTEÍNA CORRESPONDENTE DO
TRANSCRITO b2a2 DO CROMOSSOMO PHILADELPHIA – PERSPECTIVAS
PARA O DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA
EM LEUCEMIAS**

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Yamanaka, Isabel Biasi

Identificação de ligantes para a proteína correspondente do transcrito b2a2 cromossomo philadelphia: perspectivas para diagnóstico e monitoramento da doença residual mínima em leucemias. / Isabel Biasi Yamanaka. – Curitiba, 2014.

77 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Juliana Ferreira de Moura

Co-orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Leucemia mieloide de fase crônica . 2. Peptídeos. 3. Diagnóstico. Título II. Moura, Juliana Ferreira de. III. Alvarenga, Larissa Magalhães. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.01

ISABEL BIASI YAMANAKA

**IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES PARA A PROTEÍNA CORRESPONDENTE DO
TRANSCRITO b2a2 DO CROMOSSOMO PHILADELPHIA- PERSPECTIVAS
PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA
EM LEUCEMIAS**

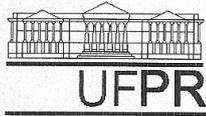
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira de Moura

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Larissa M. Alvarenga

CURITIBA

2014



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES PARA O TRANSCRITO b2a2 DO
CROMOSSOMO PHILADELPHIA - PERSPECTIVAS PARA O
DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DA DOENÇA RESIDUAL
MÍNIMA EM LEUCEMIAS”**

Por

ISABEL BIASI YAMANAKA

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**


Prof.ª. Dr.ª. Juliana Ferreira de Moura (presidente)


Prof. Dr. Roberto Rosati


Prof.ª. Dr.ª. Mara Albonei Dudeque Pianovski


Dr.ª. Márcia Holsbach Beltrame

Curitiba, 27 de agosto de 2014.

Aos meus pais Vera (*in memoriam*) e Geraldo.

Ao meu irmão Rafael.

**Por todo amor, por quem sou e
por tudo que alcancei.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade e aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo apoio financeiro;

À minha orientadora Prof^a. Dra. Juliana Ferreira de Moura, primeiramente, por ter confiado e me concedido à oportunidade de realizar este trabalho. Admiro seu profissionalismo, sensibilidade e persistência, possibilitando que a realização deste estudo se tornasse possível. Obrigada por acrescentar conhecimento à minha formação e pelo suporte em diferentes momentos;

À minha coorientadora Prof^a. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga pela orientação em diversos momentos contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio e conselhos tantas vezes prestados;

À banca avaliadora, pela disponibilidade e contribuições para melhoria deste trabalho;

Ao Dr. Roberto Rosati e Dr. Bonald de Cavalcante de Figueiredo do Instituto de pesquisa Pelé Pequeno Príncipe pela colaboração dos peptídeos sintetizados utilizados nesse estudo;

Ao Bruno, orientando do Dr. Roberto Rosati, por toda ajuda prestada;

À J. K. Scott, pelas bibliotecas de fagos gentilmente concedidas e utilizadas nesse trabalho;

Às amigas feitas durante toda essa jornada no Laboratório de Imunoquímica: Alessandra, Carla, Carine, Fernanda, Gabriela, Guilherme, Isabela, Leonardo, Luís, Mariângela, Michele, Rafaela, Rodrigo, Sabrina e Stephanie, por toda ajuda e companheirismo durante este período;

Aos demais docentes e discentes do Departamento de Patologia Básica por toda ajuda prestada em diferentes situações, especialmente às vizinhas de laboratório Juciliane, Regielly e Maíra;

À secretária do programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Luciana Marques por toda ajuda prestada em diversos momentos;

Às minhas amigas irmãs que a vida me deu: Camila, Juliana, Carolina, Mariana, Morgana, Patricia, Poliana e Daniella. Obrigada por estarem sempre presentes ao longo desses anos;

Principalmente, à minha família por todo amor cedido, por me ensinarem os valores da vida e sempre guiarem o meu caminho para eu fazer as melhores escolhas possíveis. À minha mãe, minha guerreira, meu exemplo de vida e minha inspiração. Ao meu pai, meu orgulho, meu incentivador e meu protetor. Ao meu irmão Rafael, meu eterno amigo e parceiro. Amo vocês;

E, por fim, a todas às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa;

MUITO OBRIGADA!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

-Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O cromossomo Philadelphia, encontrado principalmente em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC), expressa diferentes transcritos BCR-ABL1, sendo o principal deles o b2a2. Esses transcritos codificam proteínas que possuem atividade tirosina-quinase constitutivamente ativa e, conseqüentemente, ativam múltiplas cascatas resultando no desencadeamento da doença. Atualmente as principais metodologias empregadas no diagnóstico e monitoramento da LMC utilizam técnicas de biologia molecular que apresentam uma série de desvantagens tais como custo, necessidade de mão de obra qualificada, falta de sensibilidade e, ainda, não quantificam a proteína quimérica BCR-ABL1, a qual é o principal fator indutor da doença, principalmente porque a quantidade de RNAm não é fiel ao montante da quimera. No presente estudo, buscou-se identificar ligantes da proteína referente ao transcrito b2a2 que pudessem ser aplicados na detecção e quantificação da proteína BCR-ABL1, fornecendo um diagnóstico preciso além de uma alternativa para o monitoramento da doença residual mínima. Portanto, utilizou-se a técnica de *Phage Display* a fim de se obter peptídeos expressos em fagos com afinidade para um peptídeo sintético correspondente ao fragmento correspondente ao transcrito b2a2 (pepb2a2). Para tanto, diferentes estratégias de seleção desses peptídeos foram utilizadas, sendo a mais eficaz aquela em que se utilizou uma solução ácida concomitantemente à sonicação para a eluição. Foram identificados dois clones (25S e 13S) cujas reatividades frente ao pepb2a2 foram confirmadas por ELISA com absorbâncias de 0,97 e 1,34, respectivamente, próximas a absorbância de 1,30 do controle positivo (anticorpo monoclonal anti-b2a2). Ambos os clones apresentaram reatividade dose-dependente frente ao pepb2a2 confirmando a afinidade, fenômeno que também foi confirmado pelo ELISA de competição no qual os clones foram capazes de inibir a ligação ao anticorpo monoclonal em 27,15% e 38,12%, respectivamente. A especificidade ao pepb2a2 foi verificada quando se utilizou como alvo dois outros fragmentos BCR-ABL-1 cujas absorbâncias para o pepb3a2 foram de 0,18 e 0,26 e para o pepe1a2 foram de 0,36 e 0,42, respectivamente. Esses clones, após sequenciamento, poderão ter suas sequências amioácidas sintetizadas e acopladas a enzimas ou nanopartículas com o intuito de testá-las frente a linhagens de células comerciais que expressam BCR-ABL1 e de pacientes. Esse trabalho é pioneiro na utilização da interação peptídeo-peptídeo na seleção de ligantes para fins diagnósticos e é primeiro passo para a elaboração de novos métodos para detecção de células remissivas na doença residual mínima em leucemias.

Palavras chaves: *phage display*; leucemia mieloide crônica; peptídeo; diagnóstico; monitoramento; doença residual mínima.

ABSTRACT

The Philadelphia chromosome, found mainly in patients with chronic myeloid leukemia (CML), expresses different BCR-ABL1 transcripts, the b2a2 being the main one. These transcripts encode proteins that have constitutively active tyrosine kinase activity and are able to activate multiple cascades resulting on development of the disease. Currently the diagnostic and monitoring methods of CML use molecular biology techniques which have a number of disadvantages, such as cost, qualified professionals and lack of sensitivity. They do not quantify the chimeric protein BCR-ABL1, which is the main driving factor, and also the amount of mRNA is not equivalent to the amount of chimera. In the present study, we aimed to identify ligands of b2a2 transcript that could be applied in the detection and quantification of BCR-ABL1 protein, providing an accurate diagnosis as well as an alternative for monitoring minimal residual disease. Therefore, we used the phage display technique to obtain peptides expressed on phage with affinity for a synthetic peptide corresponding to the b2a2 transcript (pepb2a2). Different selection strategies were used for these peptides and the most effective one used an acid solution simultaneously with sonication for elution. Two clones (25S and 13S) had their reactivity to pepb2a2 confirmed by ELISA absorbance values of 0,97 and 1,34, respectively, close to absorbance value of 1,30 to the positive control (anti-b2a2 antibody). Both clones showed dose-dependence reactivity to pepb2a2 confirming their affinity, which was also confirmed by competition ELISA in which the clones were able to inhibit monoclonal antibody binding to 27,15% and 38,12%, respectively. The specificity to pepb2a2 was observed when using two other target BCR-ABL-1 transcripts whose reactivity to pepb3a2 were 0,18 and 0,26 and the pepe1a2 were 0,36 and 0,42, respectively. These clones once sequenced may have their aminoacid sequences synthesized and coupled to enzymes or nanoparticles in order to test them against commercial BCR-ABL1 cell lines and patients. This work is the first to use the peptide-peptide interaction in the selection of ligands for diagnostic purposes and is a first step towards the development of new methods for detection of remissive cells in minimal residual disease in leukemia.

Keywords: phage display; chronic myeloid leukemia; peptide; diagnostics; monitoring; minimal residual disease.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CROMOSSOMO PHILADELPHIA.....	19
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DAPROTEÍNA BCR-ABL1	21
FIGURA 3 - DEFINIÇÕESDAS RESPOSTAS DO TRATAMENTO	24
FIGURA 4 - MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS NO MONITORAMENTO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA.....	26
FIGURA 5 - ESQUEMA DA TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY.....	30
FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS REALIZADAS NESSE ESTUDO	31
FIGURA 7 - ESQUEMA DA CONJUGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS AOS CARREADORES PROTÉICOS	33
FIGURA 8 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DOS CONJUGADOS.....	36
FIGURA 9 - ESQUEMA DA PRIMEIRA ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO NO <i>PHAGE DISPLAY</i>	41
FIGURA 10 - ESQUEMA DA SEGUNDA ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO NO <i>PHAGE DISPLAY</i>	42
FIGURA 11 - ESQUEMA DA TERCEIRA ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO NO <i>PHAGE DISPLAY</i>	43
FIGURA 12 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DOS FAGOS.....	44
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DOS TRÊS PEPTÍDEOS.....	48
FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO SDS-PAGE DAS AMOSTRAS CONJUGADAS A BSA	49
FIGURA 15 - RECONHECIMENTO DASAMOSTRAS CONJUGADAS POR <i>DOT-BLOT</i> MANUAL.....	49
FIGURA 16 - REATIVIDADE DAS AMOSTRAS pepb2a2 CONJUGADAS.....	50
FIGURA 17 - TESTE DA REATIVIDADE DO <i>POOL</i> DE FAGOS AO FINAL DE CADA <i>PANNING</i>	52
FIGURA 18 - TESTE DA REATIVIDADE DO SOBRENADANTE DOS CLONES INDIVIDUALIZADOS DO 1º <i>PANNING</i>	53
FIGURA 19 - TESTE DA REATIVIDADE DO SOBRENADANTE DOS CLONES INDIVIDUALIZADOS DO 2º <i>PANNING</i>	54
FIGURA 20 - TESTE DA REATIVIDADE DO SOBRENADANTE DOS CLONES SELECIONADOS UTILIZANDO A DIFERENTES SOLUÇÕES DE BLOQUEIO DA PLACA.	55

FIGURA 21 - TESTE DA REATIVIDADE DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	56
FIGURA 22 - TESTE DA ESPECIFICIDADE DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AO pepb3a2.	57
FIGURA 23- TESTE DA ESPECIFICIDADE DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AO pepe1a2.	57
FIGURA 24 - TESTE DE COMPETIÇÃO DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES COM O ANTICORPO anti-b2a2.	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADOS DO <i>PHAGE DISPLAY</i> A PARTIR DA PRIMEIRA ESTRATÉGIA DE <i>PANNING</i>	51
TABELA 2 - RESULTADOS DO <i>PHAGE DISPLAY</i> A PARTIR DA TERCEIRA ESTRATÉGIA DE <i>PANNING</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ABL1</i>	Gene <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
<i>BCR</i>	Gene <i>breakpoint cluster region</i>
<i>BCR-ABL1</i>	Gene de fusão <i>BCR-ABL1</i>
BCR-ABL1	Proteína quimérica BCR-ABL1
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
EDTA	Quelante (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
Fagos	Bacteriófagos
FISH	hibridização fluorescente in situ
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Ig	Imunoglobulina
ITQ	Inibidores da tirosina-quinase
KLH	<i>Keyhole Lympet Hemocyanin</i>
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LNC	Leucemia Neutrofílica Crônica
OPD	Orto-fenildiamina
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBS - T	Tampão Fosfato Salino com adição do detergente Tween 20
Ph	Cromossomo Philadelphia
p190	Proteína BCR-ABL1 de 190 kDa
p210	Proteína BCR-ABL1 de 210 kDa
p230	Proteína BCR-ABL1 de 230 kDa
SMCC	<i>Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate</i>
t(9;22)	Translocação cromossômica do 9 com o 22
TBS	Tampão Fosfato Tris
TBS - T	Tampão Fosfato Tris com adição de Tween 20

TU

Transductional unit

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL.....	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 LEUCEMIAS POSITIVAS PARA O CROMOSSOMO PHILADELPHIA.....	18
2.2 LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA	18
2.2.1 Proteínas BCR-ABL1	20
2.2.2 Prognóstico da LMC e a correlação com transcritos do cromossomo Ph.....	22
2.2.3 Tratamento	22
2.2.4 Doença residual mínima.....	24
2.2.5 Diagnóstico e monitoramento da doença residual mínima	25
2.3 LIGANTES PEPTÍDICOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	31
3.1.1 Peptídeos sintéticos representativos.....	32
3.1.2 Conjugação dos peptídeos com proteínas carreadoras.....	32
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CONJUGADOS	33
3.2.1 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	34
3.2.2 SDS-PAGE das amostras conjugadas com BSA.....	34
3.2.3 Ensaio de <i>dot-blot</i> manual para pepb2a2 conjugado	35
3.2.3.1 Ensaio de ELISA das amostras pepb2a2 conjugadas	35
3.3 OBTENÇÃO DE LIGANTES PEPTÍDICOS POR <i>PHAGE DISPLAY</i> A PARTIR DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS	36
3.3.1 Preparação das bibliotecas de fagos	37
3.3.2 Seleção de ligantes peptídicos expressos na superfície de fagos- panning.	38
3.3.2.1 Primeira estratégia de panning- exposição alternada entre peptídeo conjugado com BSA ou KLH.....	38
3.3.2.2 Segunda estratégia de <i>panning</i> - utilização de imunotubo como superfície de imobilização da amostra.....	41
3.3.2.3 Terceira estratégia de <i>panning</i> - exposição apenas do peptídeo como alvo e eluição ácida com sonicação.....	42

3.4 ENSAIO DE ELISA PARA VERIFICAR A REATIVIDADE DOS FAGOS- <i>SCREENING</i>	43
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES OBTIDOS NOS <i>PANNINGS</i>	44
3.5.1 Ensaio de ELISA para verificar a reatividade dos fagos isolados	45
3.5.2 Ensaio de ELISA para verificar a afinidade dos fagos	45
3.5.3 Ensaio de ELISA para verificar a especificidade dos fagos	45
3.5.4 Ensaio de ELISA de competição	46
4 RESULTADOS	47
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	47
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CONJUGADOS COM BSA	48
4.3 REATIVIDADE DOS CONJUGADOS-pepb2a2 FRENTE A ANTICORPO ESPECÍFICO POR <i>DOT-BLOT</i>	49
4.4 REATIVIDADE DOS CONJUGADOS-pepb2a2 FRENTE A ANTICORPO ESPECÍFICO POR ELISA	50
4.5 SELEÇÃO DE FAGOS DE INTERESSE OBTIDOS NOS <i>PANNINGS</i> OBTIDOS POR <i>PHAGE DISPLAY- SCREENING</i>	51
4.7 ENSAIO DE ESPECIFICIDADE	56
4.8 ENSAIO DE COMPETIÇÃO	58
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO	64
7 PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa com expansão clonal de células malignas. A patogênese da LMC é atribuída à proteína quimérica BCR-ABL1 formada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), resultante da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, encontrado em 90-95% dos pacientes com LMC (TOHAMI, NAGLER E AMARIGLIO, 2012).

A proteína BCR-ABL1 apresenta atividade tirosina-quinase constitutivamente ativa e, desta forma, possui o potencial de ativação de múltiplas cascatas de sinalização (HOLYOAKE, 2001; KAWAUCHI *et al.*, 2003). Desta forma, diversos processos celulares como proliferação, sobrevivência, diferenciação, reparo de DNA, adesão e circulação de células hematopoiéticas sofrem interferências dessa quimera (PERROTTI, TURTURRO E NEVIANI, 2005).

Os pacientes com LMC frequentemente utilizam como tratamento inibidores seletivos da tirosina-quinase. Apesar de não serem considerados como a cura da doença, resultam em altas taxas de resposta citogenética e molecular e baixas taxas de progressão da doença, além de possuírem um perfil de toxicidade seguro e uma sobrevida livre de doença para a maioria dos pacientes a longo prazo (LE COUTRE, SCHWARZ E KIM, 2010). Eventualmente, após o tratamento, pode haver a presença de células leucêmicas residuais sem evidência clínica de doença, fenômeno denominado de doença residual mínima (DRM) (KUFE E WEICHSELBAUM, 2003).

Atualmente, a técnica de citogenética é considerada o *gold standard* para detecção do cromossomo Ph e para o monitoramento da resposta citogenética, permitindo a utilização de amostras de medula óssea ou de sangue periférico (ZHANG E ROWLEY, 2011). Ainda, outros métodos têm sido utilizados concomitantemente na tentativa de se obter um diagnóstico mais preciso, dentre eles está a técnica de FISH e a RT-qPCR. Entretanto, todas as metodologias empregadas apresentam diversas desvantagens como custo, necessidade de mão-de-obra qualificada, falta de sensibilidade e, ainda, não quantificam a proteína quimérica BCR-ABL1, a qual é o principal fator indutor da doença, principalmente porque a quantidade de RNAm muitas vezes não é fiel à da proteína BCR-ABL1 (TOHAMI, NAGLER E AMARIGLIO, 2012; VOGEL E MARCOTTE, 2012).

Métodos capazes de detectar células tumorais sejam elas iniciais, residuais ou ainda provenientes de recidivas precoces sem manifestações clínicas têm sido amplamente utilizados na tentativa de aplicar a terapêutica adequada o mais rápido possível aos pacientes (BARBOZA *et al.*, 2000). A intervenção médica precoce é extremamente importante, principalmente na DRM, exigindo que as estratégias de identificação sejam capazes de detectar células residuais à resposta ao tratamento com rapidez e precisão (KUFÉ E WEICHSELBAUM, 2003).

Portanto, na tentativa de contornar esse problema, a técnica de *Phage Display*, amplamente utilizada no estudo da interação entre moléculas, foi utilizada nesse trabalho de forma a encontrar possíveis ligantes peptídicos para a proteína correspondente ao transcrito b2a2 na tentativa de propor novas metodologias de identificação de células que expressam proteínas BCR-ABL1 além da caracterização clínica dos pacientes leucêmicos tanto para o diagnóstico inicial como para o monitoramento da DRM. Ainda, no que se refere à saúde pública nacional, existe uma dependência tecnológica no acompanhamento desses pacientes, uma vez que os insumos utilizados nas metodologias empregadas atualmente são importados. Neste contexto, a seleção desses ligantes proporciona o desenvolvimento de insumos nacionais que podem vir a desonerar o sistema de saúde e facilitar o diagnóstico e o monitoramento da DRM.

1.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção, identificação e caracterização de ligantes peptídicos para o fragmento representativo da proteína correspondente do transcrito b2a2 (pepb2a2) expresso pelo cromossomo Philadelphia.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter peptídeos contendo regiões representativas das proteínas BCR-ABL1 e torna-los antigênicos ao conjugá-los a moléculas carreadoras (BSA e KLH);
- Obter ligantes peptídicos reativos para o peptídeo representativo do transcrito b2a2 (pepb2a2);
- Caracterizar esses ligantes quanto a sua afinidade, especificidade e capacidade de inibição do anticorpo monoclonal anti b2a2;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEUCEMIAS POSITIVAS PARA O CROMOSSOMO PHILADELPHIA

O cromossomo Philadelphia (Ph) foi a primeira anormalidade cromossômica a ser associada a uma neoplasia humana (WONG E WITTE, 2004), estando presente em praticamente todos os pacientes com LMC (90-95%), em 15-30% dos casos de leucemia linfocítica aguda (LLA) e alguns casos de leucemia neutrofílica crônica (LNC) (FADERL *et al.*, 1999).

2.2 LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica mieloproliferativa caracterizada pelo acúmulo de células mieloides maduras no sangue periférico devido à expansão clonal de células tronco hematopoiéticas que apresentam o cromossomo Ph (MAURO E DRUKER, 2001).

A incidência da LMC é de 1 a 2 casos a cada 100.000 pessoas por ano, sendo mais comum em pessoas com idade média de 65 anos (MAURO E DRUKER, 2001; HEHLMANN *et al.*, 2007) e representa 15-20% dos casos de leucemia em adultos nas populações ocidentais (QUINTÁS-CARDAMA, KANTARJIAN E CORTES, 2007).

A LMC começou a ser estudada quando diversos casos de esplenomegalia, anemia e granulocitose foram descritos (WONG E WITTE, 2004). Posteriormente, foi suposto que a origem da doença seria na medula óssea e denominou-a de “leucemia mieloide”. Porém, melhor entendimento da doença só ocorreu após a descoberta do cromossomo Ph (INOKUCHI, 2006).

Este cromossomo é resultante da translocação recíproca que ocorre entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 (9;22) (q34;q11) (KURZROCK *et al.*, 2003). No processo de translocação ocorre a substituição do fragmento do gene *ABL1*, localizado no cromossomo 9q34, por parte do gene *BCR*, localizado no cromossomo 22q11, originando um gene de fusão *BCR-ABL1* (FADERL *et al.*, 1999).

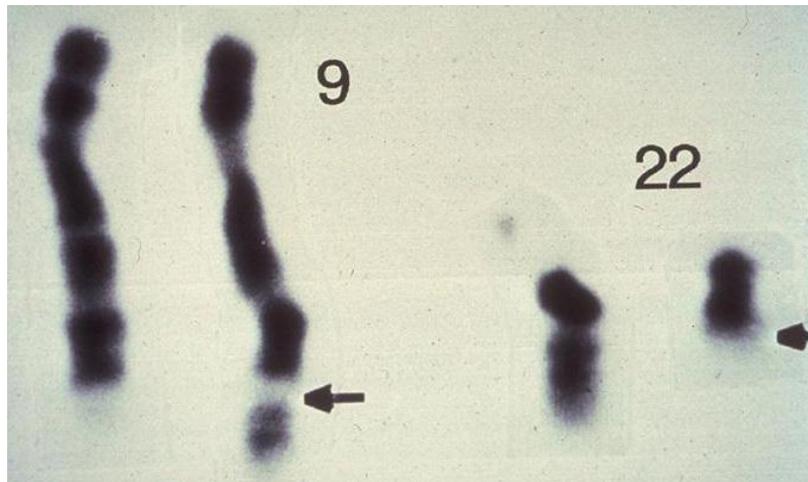


FIGURA 1 - CROMOSSOMO PHILADELPHIA. Resultado da translocação recíproca de 22q, para o braço longo, com 9q indicado pelas setas (Adaptado de FADERL *et al.*, 1999).

Os segmentos do gene *ABL1* podem ser transpostos em diferentes regiões do gene *BCR* dando origem a diferentes RNAs mensageiros (RNAm). Estes RNAm irão traduzir proteínas que variam de 190 a 230 kDa (FADERL *et al.*, 1999).

A evolução da LMC ocorre em três fases: inicia-se com uma fase crônica insidiosa, com uma duração média de 4 a 5 anos que progride para uma fase de transformação (acelerada) de duração variável, que antecede a fase terminal, denominada fase blástica (BRASIL, 2008).

Na fase crônica ocorre proliferação clonal maciça das células granulocíticas mantendo a capacidade de diferenciação, e iniciado o tratamento nessa fase há um melhor prognóstico e controle. Posteriormente, num período de tempo variável, perde-se a capacidade de diferenciação e a doença passa a ser de difícil controle (fase acelerada) e progride para uma leucemia aguda (BAIN, 2005).

Durante a fase crônica, cerca de 20% a 40% dos pacientes são assintomáticos, apresentando esplenomegalia volumosa, hepatomegalia e leucocitose com desvio à esquerda (BAIN, 2005). No sangue periférico verifica-se o desvio à esquerda com predomínio de granulócitos tais como os neutrófilos, com o aparecimento de células granulocíticas imaturas como mieloblasto, promielócito, mielócito e metamielócito, sendo que a maioria dos pacientes apresenta basofilia e eosinofilia (BAIN, 2005). Ainda pode-se observar um discreto aumento de monócitos,

a presença de eritroblastos e núcleos ou fragmentos de megacariócitos no sangue periférico (CORTES E KANTARJIAN, 2003).

Na fase acelerada verifica-se a presença de 15% a 30% de blastos, 30% de blastos e promielócitos, 20% de basófilos e menos de 100.000 plaquetas/mm³ no sangue periférico. Na evolução clonal ocorre o aparecimento de novas células apresentando a translocação (BACCARANI *et al.*, 2009).

O quadro na fase blástica é mais fácil de identificar, porém com algumas controvérsias. Alguns autores sugerem que o paciente está nessa fase quando o número de blastos for de 30% ou quando a soma dos promielócitos e blastos for de 30%. Já a classificação da OMS determina o diagnóstico quando esse número é de 20% (SWERDLOW *et al.*, 2008).

Os mecanismos responsáveis pela translocação podem desencadear algumas mudanças que levam à crise blástica. Ainda, outras aberrações ou mutações frequentes nesta fase podem ser devido à instabilidade cromossômica (HEHLMANN *et al.*, 2007).

2.2.1 Proteínas BCR-ABL1

A proteína citoplasmática BCR possui 160 kDa e diversos domínios funcionais, porém suas propriedades e funções ainda são pouco conhecidas (HOLYOAKE, 2001). Os pontos de quebra do gene *BCR* do cromossomo 22 ocorrem principalmente em três regiões: dentro de uma região de 5,8 kb, denominada de *M-BCR*, abrangendo os éxons b1 a b5, também denominados de e12 a e16; em uma área de 54,4 kb, entre os éxons e2' e e2 (*m-BCR*); e em uma porção mais distal que é menos frequente, entre os éxons e19 e e20, na região μ -*BCR* (QUINTÁS-CARDAMA, KANTARJIAN E CORTES, 2007).

A proteína ABL1 é uma tirosina-quinase de 145 kDa que participa da sinalização e remodelamento do citoesqueleto, podendo participar da regulação do ciclo celular. O grupo das tirosina-quinases inclui enzimas que fosforilam um resíduo de tirosina em um substrato (KURZROCK *et al.*, 2003). A interrupção dentro do gene *ABL1* ocorre no início do éxon Ib, no final do éxon Ia e, mais frequentemente, entre Ib e Ia (QUINTÁS-CARDAMA, KANTARJIAN E CORTES, 2007).

células progenitoras. Ainda, a proteína BCR-ABL1 também parece estar associada a alterações nos mecanismos de reparo do DNA. Estes efeitos acarretam em erros genéticos sutis que podem resultar na evolução clonal e progressão da LMC para a fase blástica (SAWERS *et al.*, 1999; FADERL *et al.*, 1999).

2.2.2 Prognóstico da LMC e a correlação com transcritos do cromossomo Ph

Os fatores que determinam o prognóstico dos grupos de risco estão baseados nos seguintes critérios: ≥ 60 anos de idade; esplenomegalia de ≥ 10 cm abaixo do rebordo costal; plaquetometria de $\geq 700.000/\text{mm}^3$; $\geq 3\%$ de blastos na medula óssea ou no sangue periférico; $\geq 7\%$ de basófilos no sangue periférico ou $\geq 3\%$, na medula óssea (INCA, 2003).

O risco 1 corresponde a 0 ou 1 desses critérios; o risco 2, a 2 deles; o risco 3, a ≥ 3 deles; e o risco 4 ≥ 1 critérios que da fase acelerada, independente do número de critérios de mau prognóstico (INCA, 2003).

Noventa e cinco por cento dos pacientes com LMC e cerca de um terço dos pacientes com LLA apresentam os transcritos b2a2 ou b3a2 que codificam uma proteína de 210 kDa (p210 BCR-ABL1). Cerca de dois terços dos pacientes com LLA e alguns casos raros de LMC ocorre a formação do transcrito e1a2 que traduz a p190 BCR-ABL1. Ainda, uma terceira proteína pode ser formada, a p230 BCR-ABL1, frequentemente encontrada em casos de leucemia neutrofílica crônica (QUINTÁS-CARDAMA, KANTARJIAN E CORTES, 2007).

Ainda, um estudo verificou a presença de cada um dos transcritos em pacientes com LMC através de RT-PCR e Nested-PCRm. Destes, 12% apresentou o transcrito b3a2, 18% o b2a2 e 32% possuíam os dois tipos. A presença do transcrito b3a2 está relacionada com contagem de plaquetas acima de $1.000.000/\text{mm}^3$, reconhecida como característica de mau prognóstico (BARBOZA *et al.*, 2000).

2.2.3 Tratamento

Atualmente, o transplante de medula óssea é a única opção de tratamento com registro comprovado de cura da LMC, porém não é a primeira opção terapêutica para a maioria dos pacientes (LE COUTRE, SCHWARZ E KIM, 2010).

A terapia utilizando inibidores da tirosina-quinase (ITQ) revolucionou o tratamento da LMC com o uso do imatinibe. Os ITQ são considerados a base do tratamento desde os primeiros estudos no final da década de 1990, apesar de não serem considerados como responsáveis pela cura da doença. Entretanto, resultam consistentemente em altas taxas de resposta citogenética e molecular, baixas taxas de progressão da doença, um perfil de toxicidade seguro e uma sobrevida livre de doença em longo prazo para a maioria dos pacientes (LE COUTRE, SCHWARZ E KIM, 2010).

A eficácia do tratamento é avaliada sob três aspectos: através da resposta hematológica, definida pela normalização de valores no sangue periférico e avaliação do tamanho do baço; da resposta citogenética, definida pela proporção de metáfases Ph- positivas residuais; e da resposta molecular definida por meio da avaliação da transcrição gênica (RNAm); ou da detecção de proteínas BCR-ABL1 residuais (HOCHHAUS *et al.*, 2000).

As definições das respostas do tratamento da LMC são mostradas na figura 3.

Categoria		Critérios
Hematológica	RHC	Normalização das contagens sanguíneas LEU < 10 × 10 ⁹ /L Sem leucócitos imaturos Plaquetas < 450 × 10 ⁹ /L Sem sinais nem sintomas de doença Sem doença extramedular
Citogenética	mRC	Metáfases Ph 36 a 95%
	sRC	Metáfases Ph 1 a 35%
	cRC	Metáfases Ph 0%
	pRC	sRC + cRC
Molecular*	RMS	= 3-log ? de BCR-ABL = 0,1% proporção BCR-ABL/ABL [†]
	RMC	Ausência de transcritos BCR-ABL detectáveis

*Baseado no teste de RT-PCR.

†Baseado na EI.

cRC = resposta citogenética completa; EI = escala internacional; LEU = contagem de leucócitos; LMC = leucemia mieloide crônica; mRC = resposta citogenética mínima; Ph = cromossomo Philadelphia; pRC = resposta citogenética parcial; RHC = resposta hematológica completa; RMC = resposta molecular completa; RMS = resposta molecular significativa; RT-PCR = cadeia da polimerase com transcriptase reversa; sRC = resposta citogenética significativa;

FIGURA 3 – DEFINIÇÕES DAS RESPOSTAS DO TRATAMENTO (Adaptado de SAWYERS, 1999).

2.2.4 Doença residual mínima

Após o tratamento, o fenômeno caracterizado pela presença de células leucêmicas residuais sem evidência clínica de doença é definida como doença residual mínima (DRM) (KUFÉ E WEICHSELBAUM, 2003). Os pacientes com LMC, depois de tratados, podem expressar transcritos *BCR-ABL1* e continuar em remissão clínica por muitos anos (FADERL *et al.*, 2004; VOGEL E MARCOTTE, 2012).

Nesse quadro os níveis de leucemia estão abaixo da detecção pela microscopia convencional. A detecção da DRM em pacientes com LMC é extremamente importante e tem o objetivo de verificar a resposta ao tratamento e possibilitar o diagnóstico precoce de eventuais recidivas (HOCHHAUS *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2007).

Para a avaliação da DRM deve-se realizar o monitoramento periódico da resposta do paciente à terapia, a fim de permitir possíveis modificações na dosagem

de drogas, inclusão de outros agentes quimioterápicos ou mudança para outras modalidades terapêuticas, incluindo o transplante alogênico de medula óssea (KANTARJIAN *et al.*, 2003).

Desta forma, métodos capazes de detectar células tumorais residuais ou recidivas precoces sem manifestações clínicas têm sido amplamente investigados na tentativa de instituir a terapêutica adequada e precoce (BARBOZA *et al.*, 2000). Sendo assim, as estratégias de monitoramento da DRM devem ser capazes de detectar recidivas da doença com maior rapidez e precisão (KUFÉ E WEICHSELBAUM, 2003).

2.2.5 Diagnóstico e monitoramento da doença residual mínima

Para o diagnóstico de LMC são realizados anamnese, exame físico, hemograma, plaquetometria, mielograma ou biópsia de medula óssea e exame de citogenética positivo para o cromossoma Ph (Ph+) em amostra de medula óssea ou exame de biologia molecular positivo em sangue periférico para o oncogene *BCR-ABL1* (BRASIL, 2011).

Dentre os achados clínicos e laboratoriais durante as fases evolutivas verifica-se na fase crônica a presença de leucocitose com ausência de displasia significativa da medula óssea, presença de blastos abaixo de 2% da leucometria, presença de basofilia absoluta e eosinofilia. Ainda pode ser encontrado monocitose absoluta, porém abaixo de 3%, exceto nos casos raros associados com a p190 BCR-ABL1. A plaquetometria pode apresentar-se normal ou aumentada e a presença de trombocitopenia não é comum. Na biópsia de medula óssea evidencia-se uma hiperplasia devido ao padrão de maturação semelhante ao do sangue periférico. O número de blastos está normalmente abaixo de 5% das células da medula óssea na fase crônica e caso esteja acima de 10% é indicativo da progressão da doença. Cerca de 40-50% dos pacientes apresentam hiperplasia megacariocítica moderada a intensa. Em 30% dos casos a biópsia inicial da medula óssea mostra fibrose reticulínea moderada ou acentuada, que é correlacionada com número aumentado de megacariócitos e aumento do volume do baço, relacionado a um pior prognóstico (BRASIL, 2011).

A fase acelerada apresenta um aumento persistente da leucometria ou da esplenomegalia não responsivo à terapia, a trombocitose não responsiva à terapia, trombocitopenia persistente não relacionada à terapia, evolução citogenética clonal após a cariotipagem, 20% ou mais de basófilos no sangue periférico e 10-19% de mieloblastos no sangue periférico ou na medula óssea (BRASIL, 2011).

Já na fase blástica observa-se a presença de blastos $\geq 20\%$ no sangue periférico ou $\geq 20\%$ das células nucleadas da medula óssea ou quando há proliferação blástica extra-medular (BRASIL, 2011).

A figura 4 mostra resumidamente as condutas a serem tomadas em relação aos métodos laboratoriais atualmente disponíveis para o monitoramento da doença residual mínima, levando em consideração as vantagens e desvantagens de cada um.

Método	Deteção	Vantagens	Desvantagens
Citogenética Convencional	Cromossomo Philadelphia em metáfase	<ul style="list-style-type: none"> Disponível maioria laboratórios 	<ul style="list-style-type: none"> Baixa sensibilidade 1-5% (20 células) Aspirado de medula óssea
FISH	Gene BCR-ABL (probe 5'- BCR e 3'- ABL)	<ul style="list-style-type: none"> Mais sensível que Citogenética (0,1-3%) Rápido (1 a 2 dias) 	<ul style="list-style-type: none"> Não detecta outras anormalidades Taxa de falsos positivos 1-10%
RT-qPCR	RNA _m BCR-ABL	<ul style="list-style-type: none"> Mais sensível (100,000 células) Quantitativo Sangue periférico 	<ul style="list-style-type: none"> Baixa reprodutibilidade Analito instável (RNA_m) Falta de padronização metodologia Controles internos

FIGURA 4 - MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS NO MONITORAMENTO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA (ADAPTADO DE TOHAMI, NAGLER E AMARIGLIO, 2012).

A técnica de citogenética é considerada o *gold standard* para detecção do cromossomo Ph e para o monitoramento da resposta citogenética, permitindo a utilização das amostras de medula óssea ou de sangue periférico, podendo ser utilizada em todas as células da linhagem mieloide em metáfase, incluindo granulócitos, monócitos, precursores eritróides, megacariócitos, linfócitos B e em

alguns linfócitos T (ZHANG E ROWLEY, 2011). Dentre as desvantagens apresentadas por esta técnica está a baixa sensibilidade (limite de 1-5% de células Ph positivo na cultura de células) e o tempo dispendido para a obtenção da cultura de células e a necessidade de aspirado de medula óssea para análise de células em metáfase (TOHAMI, NAGLER E AMARIGLIO, 2012).

Em casos que a t(9, 22) não é observada por citogenética convencional utiliza-se a técnica de FISH ou reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a fusão *BCR-ABL1* (ZHANG E ROWLEY, 2011).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é uma ferramenta de citogenética molecular que complementa a análise cromossômica convencional. Devido à sua alta sensibilidade e utilização de células tanto em metáfase e interfase, esta técnica pode ser usada para confirmar a fusão *BCR-ABL1* no diagnóstico e no monitoramento da doença residual mínima. É considerada uma ferramenta muito sensível, pois 200 ou mais células em interfase são examinados em comparação com 20 células em metáfase em análise citogenética convencional e permite a utilização de sangue periférico dos pacientes de acordo com diversos estudos que mostraram a comparação da porcentagem de células *BCR-ABL1* no sangue periférico e na medula óssea (LIMA *et al*, 2011; LANDSTROM *et al*, 2006). A reprodutibilidade dos resultados depende da utilização de sondas comerciais de boa qualidade e possui uma baixa taxa de falsos positivos que traz a sensibilidade dos ensaios FISH para 1-6% (TOHAMI, NAGLER E AMARIGLIO, 2012).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) baseia-se na detecção dos transcritos *BCR-ABL1*, a partir do RNA isolado do aspirado de medula óssea ou do sangue periférico, transcrito para cDNA e submetido para amplificação utilizando *primers* específicos para as diferentes regiões do *BCR* e do *ABL1*. Entretanto, o limite de detecção deste método é de 1 em 100.000 células, o que é considerado adequado no diagnóstico, porém não é sensível o bastante para o monitoramento da resposta molecular durante o tratamento (TOHAMI, NAGLER E AMARIGLIO, 2012).

Ainda, além do alto custo, a RT-PCR pode fornecer resultados falso-positivos e falso-negativos, sendo necessário atentar escrupulosamente ao procedimento e à técnica. Um dos principais problemas tem sido a falta de padronização dos resultados relatados por diferentes laboratórios, dificultando a comparação dos resultados de PCR por meio dos estudos clínicos. A confiabilidade e a sensibilidade do ensaio específico continuam sendo um problema devido a falta de protocolos padronizados.

É preciso ressaltar que um resultado negativo de RT-PCR ainda pode indicar a existência de até 1×10^7 células leucêmicas no paciente (Hughes *et al.*, 2006; VOGEL E MARCOTTE, 2012).

Diversos trabalhos utilizando diferentes ferramentas biotecnológicas para detecção da proteína BCR-ABL1 têm sido realizados (SUTTORP E MILLOT, 2010; SHARMA *et al.*, 2013; HONG *et al.*, 2014). Desta forma, destaca-se a importância e a necessidade do desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para o diagnóstico e o monitoramento da doença residual mínima.

Estes métodos possuem como alvo o cromossomo Ph e seus transcritos. Em muitos casos a expressão do gene é interpretada erroneamente em termos de concentrações de proteína, pois a correlação pode ser 40% menor dependendo do sistema, desta forma a quantidade de RNAm não representa o valor real correspondente à proteína (HONG *et al.*, 2014). Ainda, a detecção e quantificação da proteína quimérica BCR-ABL1 pode fornecer um melhor diagnóstico e acurácia no prognóstico (VOGEL E MARCOTTE, 2012).

2.3 LIGANTES PEPTÍDICOS

O *phage display* é uma técnica de seleção *in vitro* que permite que polipeptídeos com propriedades desejadas sejam selecionados a partir de uma coleção de variantes (RUSSEL *et al.*, 2004). A técnica foi inicialmente desenvolvida por George Smith em 1985 ao verificar que pequenos fragmentos aleatórios de DNA poderiam ser inseridos no material genético do vírus filamentososo, resultando em uma proteína de fusão incorporada no vírion, desta forma permitindo que polipeptídeos sejam expressos na superfície viral de uma forma imunologicamente acessível (SMITH, 1985).

Esta técnica representa uma poderosa ferramenta para obtenção de moléculas com grande potencial de aplicação biotecnológica aliada à tecnologia do DNA recombinante (DIAS-NETO *et al.*, 2009).

A metodologia envolve a inserção de genes que codificam milhões de proteínas no genoma de bacteriófagos obtendo-se uma biblioteca. A inserção é realizada de modo que essas proteínas sejam expressas na superfície viral,

fusionadas a uma proteína do capsídeo. Quanto maior a variedade representada na biblioteca, maior é a probabilidade de se encontrar fagos expondo proteínas que interajam com o alvo (POSNER *et al.*, 1994).

Os fagos filamentosos, como os vírus f1, fd e M13, são formados por uma fita simples e circular de DNA de cerca de 6400 bases, envolta em um capsídeo composto pelas proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. Dentre estas cinco proteínas, pVIII e pIII são mais empregadas para este fim. A proteína pVIII permite a apresentação de grandes quantidades da molécula de interesse, porém a inserção de sequências maiores que oito aminoácidos pode desestabilizar a partícula viral. Já a proteína pIII, presente em três a cinco cópias por fago, suporta a inserção de proteínas maiores, mas a infectividade do vírus pode ser comprometida (RUSSEL *et al.*, 2004).

Nas etapas de *panning*, ou seleção, representada esquematicamente na figura 5, a biblioteca é apresentada à molécula alvo, que geralmente se encontra imobilizada em suporte sólido. Fagos expressando proteínas que interagem fracamente com o alvo são eliminados por lavagens sucessivas, enquanto aqueles que expõem moléculas com elevada afinidade pelo mesmo são recuperados por eluição através de tampões ácidos ou de elevada força iônica, que desestabilizam de modo inespecífico interações entre proteínas (VODNIK *et al.*, 2011) ou com o uso da sonicação (LUNDER *et al.*, 2008).

Após a eluição, os fagos são amplificados em cultivo bacteriano e submetidos a novos ciclos de seleção (ligação, eluição e amplificação) como mostrados na figura 5. Esse processo é monitorado através da titulação dos fagos adicionados (*input*) e recuperados (*output*) em cada ciclo, e também pela realização de imunoenaios. Em geral, três a cinco ciclos são suficientes para obter um *output* composto por uma grande proporção de fagos expondo moléculas com elevada afinidade pelo ligante. Clones são então isolados desse *output*, sequenciados, analisados quanto à afinidade e especificidade e eventualmente obtidos na forma solúvel (não fusionada a um fago) e destinados às mais diversas aplicações.

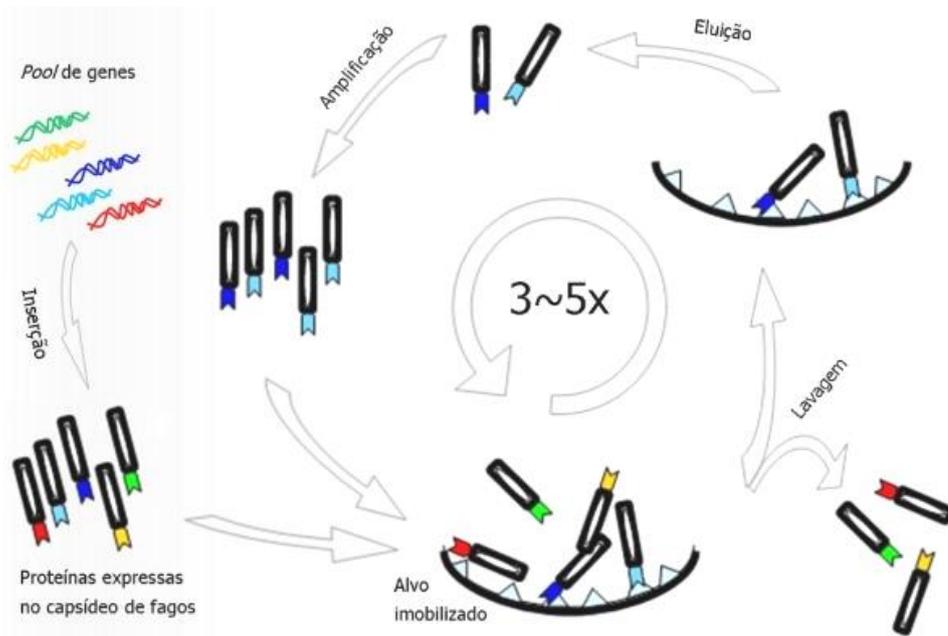


FIGURA 5 - ESQUEMA DA TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY (Adaptado de HOOGENBOOM, 2002).

A técnica de *Phage Display* já foi utilizada em diversos estudos recentes para obtenção de moléculas de interesse e posterior aplicação em testes diagnósticos (JÄGER *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2012; SHIRES *et al.*, 2014).

Portanto, esta ferramenta apresenta um grande potencial para a identificação de ligantes proteicos específicos, contribuindo com importantes perspectivas no desenvolvimento de ensaios para o diagnóstico e monitoramento da doença residual mínima para identificação da proteína BCR-ABL1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Visando alcançar os objetivos propostos neste trabalho, foram descritas resumidamente as etapas realizadas no fluxograma apresentado abaixo.

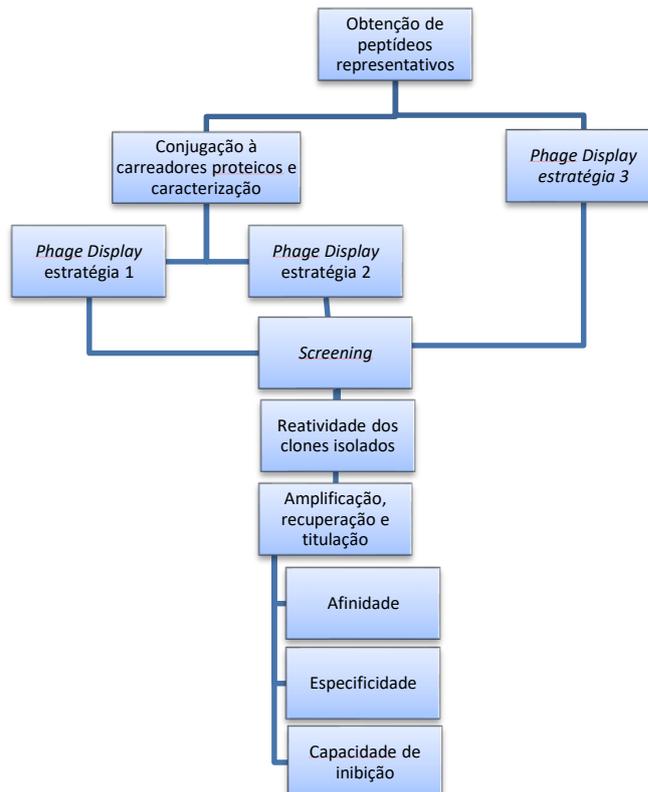


FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS REALIZADAS NESSE ESTUDO (A AUTORA, 2014).

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Visando alcançar os objetivos deste trabalho foram utilizados peptídeos sintéticos para a obtenção de ligantes peptídicos.

3.1.1 Peptídeos sintéticos representativos

Identificadas as regiões de fusão referentes às proteínas BCR-ABL1, foram obtidos três peptídeos de 14 aminoácidos sintetizados pela empresa Peptron (Coréia) contendo a região representativa da fusão de cada uma das proteínas referentes aos transcritos e1a2, b2a2 e b3a2 e uma cisteína na porção N-terminal, procedente de uma colaboração como Dr. Roberto Rosati e Dr. Bonald de Cavalcante de Figueiredo do Instituto de pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba-PR (anexos 1, 2 e 3). Estes foram denominados pepe1a2, pepb2a2 e pepb3a2, respectivamente.

3.1.2 Conjugação dos peptídeos com proteínas carreadoras

A conjugação dos peptídeos às proteínas carreadoras, *bovine serum albumin* (BSA) e *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) foi realizada de acordo com as orientações do fabricante Thermo Scientific de maneira adaptada. Inicialmente, para a ativação do BSA utilizou-se a relação 2:1 de BSA:peptídeo, a partir do BSA na concentração 10 mg/mL em 4 mL de PBS. Dissolveram-se 2,4 mg de *succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate* (SMCC) em 240 µL de dimetilformamida. As duas suspensões foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob leve agitação protegida da luz.

Para a separação do BSA ativado uma coluna PD10 foi preparada com lavagens com 200 mL de PBS e posteriormente com 50 mL de PBS-EDTA. Adicionou-se o BSA ativado, iniciando-se a eluição na coluna com a coleta das gotas em microtubos, sempre acrescentando PBS-EDTA a fim de evitar a secagem da coluna. A leitura de cada fração foi realizada em 280 nm na diluição 1:25 e realizada a plotagem dos valores no gráfico, utilizando o programa Microsoft Excel. A partir deste, identificou-se o 1º pico referente ao BSA-SMCC e incubou-se com 5 mg do peptídeo.

A solução de peptídeo foi preparada com concentração de 5 mg/mL. Adicionaram-se 5 mg de peptídeo a 1 mL de BSA-SMCC e incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação protegida da luz. Para o bloqueio das cisteínas livres foi utilizado uma solução de cisteína 5 mg/mL 1 mM e incubada por 20

minutos à temperatura ambiente sob agitação protegida da luz. As amostras foram aliquotadas e congeladas. Este procedimento foi realizado para cada um dos peptídeos individualmente.

O mesmo procedimento foi realizado para a acoplagem com KLH utilizando o KLH na concentração 10 mg/mL em 1 mL de H₂O. Foram diluídos 2 mg de SMCC em 100 µL de dimetilformamida. Incubaram-se as duas suspensões por 1 hora à temperatura ambiente sob leve agitação protegida da luz. O procedimento foi realizado segundo protocolo anterior utilizando 3 mg de cada um dos três peptídeos individualmente.

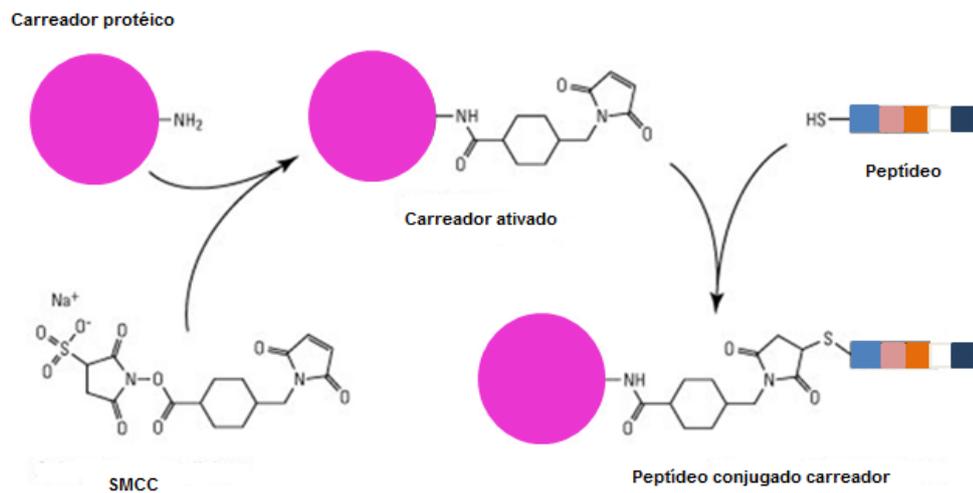


FIGURA 7 - ESQUEMA DA CONJUGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS AOS CARREADORES PROTÉICOS. Peptídeos (pepb2a2, pepb3a2 e pepe1a2) foram conjugados às moléculas carreadoras (BSA e KLH) a partir da ativação prévia destes com o *linker* SMCC, através de ligação covalente entre o grupo maleimida e as porções sulfidrilas dos resíduos de cisteína presentes nos peptídeos (A AUTORA, 2014).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CONJUGADOS

As amostras conjugadas foram devidamente caracterizadas visando comprovar a eficácia na conjugação, fundamental para garantir sua aplicabilidade em etapas posteriores.

3.2.1 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Em uma placa de 98 poços foram adicionados 180 μL de Reagente de Bradford (BRADFORD, 1972) [0,1% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução aquosa com 5% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido fosfórico] e 20 μL da amostra de proteína a ser dosada. Realizou-se uma curva padrão, utilizando como padrão BSA 1 mg/mL, variando de 0,5 a 20 μg de proteína por 20 μL de água e adicionados aos 180 μL do Reagente de Bradford. A preparação foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz. Os valores das absorbâncias foram determinados a 595nm. A concentração proteica da amostra foi determinada empregando a equação da curva padrão com o auxílio do programa Microsoft Excel.

3.2.2 SDS-PAGE das amostras conjugadas com BSA

Foi realizada uma eletroforese de proteínas, utilizando um gel de separação de acrilamida 10% (LAEMMLI, 1970) com 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) para migração das amostras conjugadas com BSA. Estas amostras foram diluídas 1:2 em tampão de amostra sob condições redutoras [tris-HCl 0,5 mol/L, pH6,8, glicerol 10%, SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v) e agente redutor β -mercaptoetanol 5% (v/v)] e fervidas por 5 minutos. Foram aplicados 5 μg de amostra nas canaletas e o gel foi submetido a uma diferença de potencial de 150 Volts em sistema BioRad na presença de tampão de corrida [tris 0,025 mol/L, glicina 0,2 mol/L e SDS 0,5%, pH 8,3).

Para coloração do gel foi utilizada solução de Coomassie R-250 [1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% ácido acético e 50% metanol] por 30 minutos

para revelação e o excesso de corante foi removido com solução descorante [10% ácido acético].

3.2.3 Ensaio de *dot-blot* manual para pepb2a2 conjugado

Como a molécula de KLH tem massa molecular que não permite a migração em gel SDS-PAGE, 1µg das amostras contendo pepb2a2 conjugadas com KLH foram utilizadas na sensibilização de uma membrana de nitrocelulose. Como controles foram utilizados apenas pepb2a2, BSA e KLH individualmente. A presença da proteína carregada foi constatada através da coloração por Ponceau. A descoloração foi feita com água e a membrana foi bloqueada com solução de caseína 5% em PBS *overnight*. Após lavagem de 3 vezes por 5 minutos com PBS-T 0,05%, a membrana foi incubada com anticorpo anti-b2a2 1:1000 [Cell Signling L99H4] durante 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem, foi acrescentado o conjugado anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase diluído 1:4000 durante 1 hora. Após as devidas lavagens, a revelação foi realizada com coloração com solução de Diaminobenzidina e Cloronaftol durante 15 minutos sob agitação e a reação foi interrompida com adição de água destilada.

3.2.3.1 Ensaio de ELISA das amostras pepb2a2 conjugadas

Uma placa de ELISA foi sensibilizada com o pepb2a2-BSA, pepb2a2-KLH e os devidos controles na concentração de 10 µg/mL em *coating buffer* (NaHCO₃ 100 mM pH 8,6) incubada *overnight* em geladeira. Entre cada etapa a placa foi lavada 4 vezes com solução de lavagem.

O bloqueio dos sítios livres foi realizado utilizando solução de caseína 2% em PBS durante 1 hora a 37 °C. A cada poço acrescentou-se o anticorpo anti-b2a2 1:1000 [Cell Signling L99H4] que foi incubado por 1 hora a 37 °C. O ensaio foi realizado em duplicatas.

Para se verificar a reação antígeno-anticorpo, adicionou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase diluído 1:4000 em tampão de incubação durante 1 hora a 37 °C. Os poços foram lavados por 6 vezes e a placa foi revelada com 100 µL de solução reveladora [2 mg de OPD (orto-fenildiamina) em 10 mL de tampão citrato e 2 µL de H₂O₂] e incubada por 20 minutos protegida da luz. A interrupção da reação foi feita com 20 µL de solução STOP [ácido sulfúrico 1:20] e realizada a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 495 nm. A análise do desvio padrão foi realizada utilizando o programa Microsoft Excel.

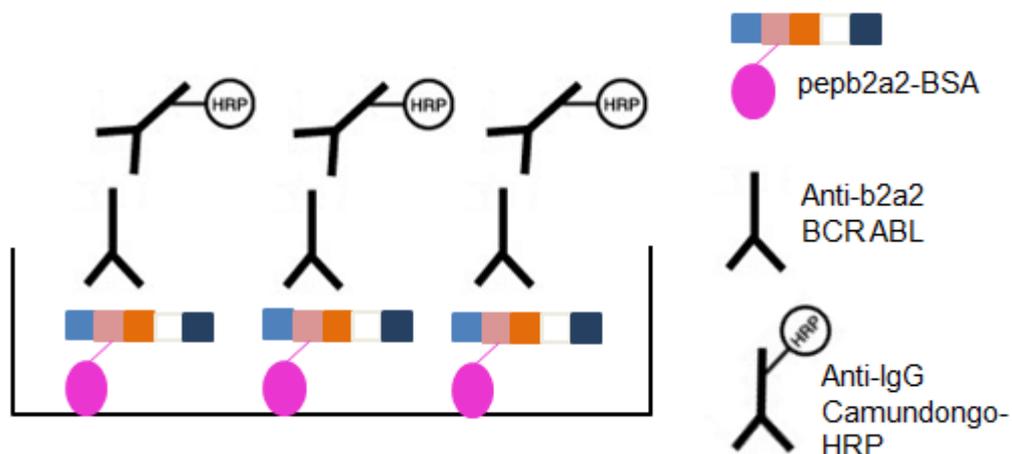


FIGURA 8 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DOS CONJUGADOS. Amostras contendo 1µg dos pepb2a2-BSA foram imobilizadas em placas de 96 poços. Adicionou-se o anticorpo anti-b2a2 (1:1000), o conjugado anti-IgG de camundongo (1:4000) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorvância das amostras foi determinada em 495nm (A AUTORA, 2014).

3.3 OBTENÇÃO DE LIGANTES PEPTÍDICOS POR *PHAGE DISPLAY* A PARTIR DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS

A técnica de *Phage Display* foi utilizada para a identificação de ligantes peptídicos para o pepb2a2, descrita por Smith (1985), com algumas modificações.

Esta ferramenta consiste na realização de seleções (*pannings*), na qual bibliotecas randômicas de fagos são apresentadas a um alvo imobilizado em uma superfície, a fim de se identificar possíveis clones de interesse.

3.3.1 Preparação das bibliotecas de fagos

Para a seleção de ligantes capazes de reconhecer os peptídeos contendo as regiões representativas das proteínas expressas na LMC foram usadas quatro bibliotecas de fagos que apresentam peptídeos de 8, 12, 15 e 17 aminoácidos. As bibliotecas utilizadas para este trabalho foram gentilmente cedidas por J. Scott (BONNYCASTLE *et al.*, 1996).

Essas bibliotecas denominadas LX-4, X15, LX-8 e X8CX8, respectivamente, foram amplificadas individualmente para posterior utilização nos *pannings*.

Inicialmente estriou-se *E. coli* K91 em meio LB sólido e incubou-se *overnight* a 37 °C a 250 rpm. Preparou-se um pré-inóculo a partir de uma colônia de *E. coli* K91 em 10 mL de meio LB líquido e incubado *overnight* a 37 °C a 250 rpm. O inóculo foi realizado a partir dos 10 mL do pré-inóculo em 100 mL de meio LB líquido, incubado até atingir densidade ótica de 1,8 em 550 nm e deixado por 30 minutos a 37 °C a 50 rpm para formação dos *pili*. A indução foi realizada com a infecção dos fagos nas bactérias *E. coli* K91 com a adição de 10¹¹ TU/mL da biblioteca em 100 mL da cultura de bactérias *E. coli* K91 e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente com agitação a cada 2 minutos. Para a amplificação, dividiram-se 100 mL da cultura de bactérias *E. coli* K91 infectadas em 2 Erlenmeyer contendo 200 mL de meio LB líquido cada contendo 0,4 µg/mL de antibiótico tetraciclina e incubou-se por 30 minutos a 37 °C a 250 rpm. Ajustou-se a concentração de antibiótico tetraciclina para 20 µg/mL e incubou-se *overnight* a 37 °C a 250 rpm.

A cultura de bactérias *E. coli* K91 infectada foi dividida em tubos Nalgene estéreis e submetidas à centrifugação por 20 minutos a 4 °C a 4000 rpm. Recuperou-se o sobrenadante e transferiu-se para tubos Nalgene estéreis e adicionaram-se 15% da solução de PEG 8000 [20% 2,5 M NaCl] e incubou-se em gelo *overnight* a 4 °C para precipitação dos fagos. Submeteu-se a uma nova centrifugação por 40 minutos a 4 °C e 8000 rpm descartando o sobrenadante e utilizando 7,5 mL de TBS [tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,5] para ressuspender o *pellet*. Após incubação por 30 minutos a 37 °C a 150 rpm a solução foi transferida para microtubos e centrifugada por 10 minutos a 4 °C a 15000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril, ao

qual foram adicionados 15% da solução de PEG 8000/NaCl incubando-se *overnight* em gelo a 4 °C.

Os fagos foram transferidos para microtubos e centrifugados por 40 minutos a 4°C a 10.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi recuperado em 1,5 mL no total de TBS. Após nova centrifugação de 10 minutos a 4 °C a 1500 rpm, a solução foi filtrada em filtro 0,22 µm previamente umedecido com TBS, recolhida em microtubos e congelada para posterior titulação.

Novamente preparou-se um pré-inóculo a partir de uma colônia de *E. coli* K91 em 10 mL de meio LB líquido o qual foi incubado *overnight* a 37 °C a 250 rpm. O inóculo foi realizado a partir dos 10 mL do pré-inóculo em 100 mL de meio LB líquido, o qual foi incubado até atingir densidade ótica de 1.8 a 550 nm e deixado por 30 minutos a 37 °C a 50 rpm para formação dos *pili*. A titulação foi realizada a partir de diluições seriadas dos fagos em meio LB líquido, a partir de 10 µL dos fagos em 100 µL de meio LB líquido. Posteriormente, 10 µL das diluições 10^{-6} , 10^{-8} e 10^{-10} foram separadas para infectar individualmente 200 µL da cultura de *E. coli* K91, a qual se encontrava em fase exponencial. As bactérias foram incubadas por 15 minutos a 37 °C sem agitação e 15 minutos a 37 °C a 250 rpm. De cada diluição, foram plaqueados 200 µL em meio LB sólido contendo tetraciclina a 20 µg/mL cujas placas foram incubadas *overnight* a 37 °C.

3.3.2 Seleção de ligantes peptídicos expressos na superfície de fagos- *panning*.

A seleção de ligantes peptídicos foi realizada utilizando diferentes estratégias a fim de se obter fagos com maior afinidade e especificidade ao pepb2a2.

3.3.2.1 Primeira estratégia de *panning*- exposição alternada entre peptídeo conjugado com BSA ou KLH

Foi utilizado como estratégia inicial o revezamento na imobilização do alvo, entre pepb2a2 conjugado com BSA e pepb2a2 conjugado com KLH na superfície

sólida. Primeiramente foi realizada a imobilização de 10 µg/mL de pepb2a2-BSA diluído em *coating buffer* (NaHCO₃ 100 mM, pH 8,6) durante 48 horas a 4 °C em uma placa de 96 poços como superfície. Após o período de imobilização, a placa ficou 2 horas sob agitação a 37 °C. A placa foi lavada 5 vezes por 2 minutos com tampão de lavagem TBS-T 0,05%.

Para bloqueio da placa, incubou-se com uma solução de bloqueio TBS-T 0,05% [contendo 3% BSA, previamente filtrada a 0,22 µm] por 2 horas sob leve agitação. A placa foi lavada conforme descrito anteriormente.

Em seguida foram adicionadas 10¹¹ TU/mL das bibliotecas de fagos LX-4 e X8CX8 e 10¹⁰ TU/mL das bibliotecas LX-8 e X15 diluídas em 10 mL de TBS-T 0,05% e incubadas *overnight* a 4°C. Preparou-se um pré-inóculo em um tubo de 50 mL contendo 10 mL de meio LB e utilizando uma colônia isolada da bactéria *E. coli* K91, a 37°C sob agitação de 225 rpm *overnight*.

Após o período de incubação, a placa ficou 2 horas sob agitação 37°C e foi submetida a 10 lavagens de 2 minutos com TBS-T 0,5% e, posteriormente, com 5 lavagens de 2 minutos com TBS-T a 0,05% para remover os fagos que não ligaram.

A placa foi incubada com tampão glicina [glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2 BSA 1 mg/mL, previamente filtrado a 0,22 µm] por 30 minutos sob agitação. Os fagos que se ligaram ao peptídeo foram recuperados por eluição ácida e recolhidos em um tubo Falcon. Posteriormente a solução foi neutralizada (pH 7,0) com solução Tris-HCl [1 M pH 9,0]. Foi retirada uma alíquota de 20 µL para posterior titulação parcial dos fagos. Preparou-se um pré-inóculo a partir de uma colônia de *E. coli* K91 em 10 mL de meio LB líquido e incubado *overnight* a 37 °C a 250 rpm. O inóculo foi realizado a partir dos 10 mL do pré-inóculo em 100 mL de meio LB líquido e incubado até atingir densidade ótica de 1.8 em 550 nm e deixado por 30 minutos a 37 °C a 50 rpm para formação dos *pili*.

Para a infecção dos fagos nas bactérias os 10 mL da solução de fagos recuperados foi dividida em dois tubos, nos quais foram adicionados 8,5 mL de cultura de bactérias K91 previamente preparadas e incubadas durante 10 minutos sem agitação. As soluções foram colocadas em 100 mL de meio LB contendo 0,02 µg/mL de tetraciclina e então deixadas por 30 minutos sob rotação de 225 rpm para obter a indução, posteriormente ajustada à concentração final de tetraciclina para 20 µg/mL e incubou-se *overnight* a 37 °C a 225 rpm.

Transferiu-se o conteúdo para um tubo Nalgene estéril e centrifugou-se o volume total a 4000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Nalgene estéril e adicionado 20% de PEG 8000. Agitou-se o tubo por inversão e incubou-se em gelo *overnight* a 4 °C para precipitação dos fagos. Preparou-se um pré-inóculo em um tubo de 50 mL contendo 10 mL de meio LB utilizando uma colônia isolada da bactéria *E. coli* K91, a 37 °C sob agitação de 225 rpm *overnight*.

O tubo contendo os fagos para precipitação foi centrifugado por 40 minutos a 4°C a 8000 rpm e eliminou-se o sobrenadante. O precipitado foi recuperado em 3 mL de solução TBS e incubado por 30 minutos a 37 °C a 150 rpm. Transferiu-se para microtubos e foram centrifugados por 10 minutos a 15000 rpm a 4 °C para eliminar os possíveis restantes celulares. Foram retirados 20 µL para posterior titulação e o restante foi congelado.

Foi realizado um pré-inóculo a partir de uma colônia de *E. coli* K91 em 10 mL de meio LB líquido e incubado *overnight* a 37 °C a 250 rpm. O inóculo foi realizado a partir dos 10 mL do pré-inóculo em 100 mL de meio LB líquido, incubado até atingir densidade ótica de 1,8 em 550 nm e deixado por 30 minutos a 37 °C a 50 rpm para formação dos *pili*.

Infectaram-se 200 µL das bactérias K91 previamente preparadas com 10 µL de cada uma das diluições de fagos. Incubou-se por 15 minutos a 37 °C sem agitação e posteriormente por mais 15 minutos a 37 °C a 225 rpm. Utilizou-se 200 µL das bactérias infectadas para titulação e plaqueou-se em LB sólido contendo 20 µg/mL e as placas foram deixadas *overnight* a 37 °C. No dia seguinte, contou-se o número de colônias.

O segundo e o terceiro *panning* foram realizados segundo o protocolo, com a imobilização de 10 µg/mL de pepb2a2-KLH e 5 µg/mL de pepb2a2-BSA, respectivamente. A placa foi bloqueada com solução de caseína 2% em PBS quando realizada a imobilização com o pepb2a2-KLH.

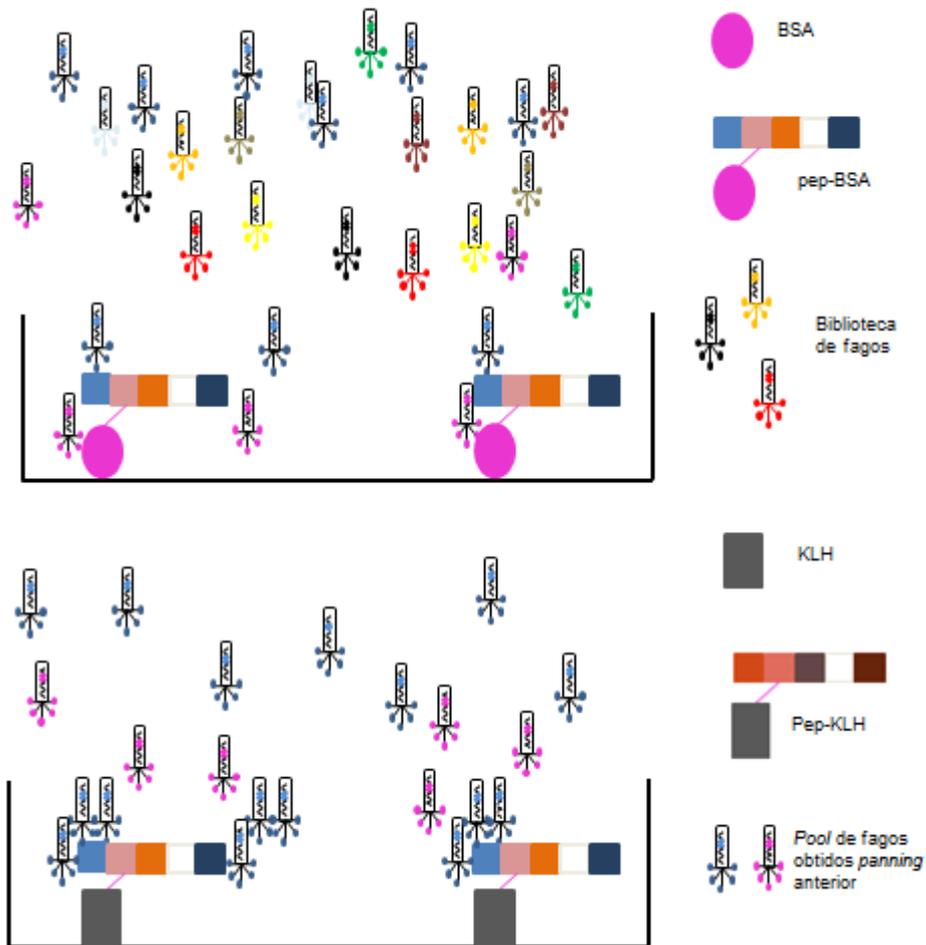


FIGURA 9 - ESQUEMA DA PRIMEIRA ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO NO *PHAGE DISPLAY*. Primeiramente, o conjugado pepb2a2-BSA foi imobilizado em placa de 96 poços na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ para reconhecimento do *pool* das bibliotecas de fagos no *panning*. O *pool* de fagos obtidos no *panning* anterior foi exposto ao conjugado pepb2a2-KLH na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e assim consecutivamente nos outros *pannings* (A AUTORA, 2014).

3.3.2.2 Segunda estratégia de *panning*- utilização de imunotubo como superfície de imobilização da amostra

Outra estratégia utilizada foi a substituição da superfície para imobilização do peptídeo, na qual foi realizada a substituição da placa de 96 poços por um imunotubo. Foram imobilizados 10 $\mu\text{g/mL}$ de pepb2a2-BSA em 1,5 mL de *coating buffer* por 48 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$. Todas as etapas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente, adequado para volume final de 1,5 mL. Este mesmo protocolo foi realizado utilizando 20 $\mu\text{g/mL}$ de pepb2a2-BSA para imobilização no imunotubo.

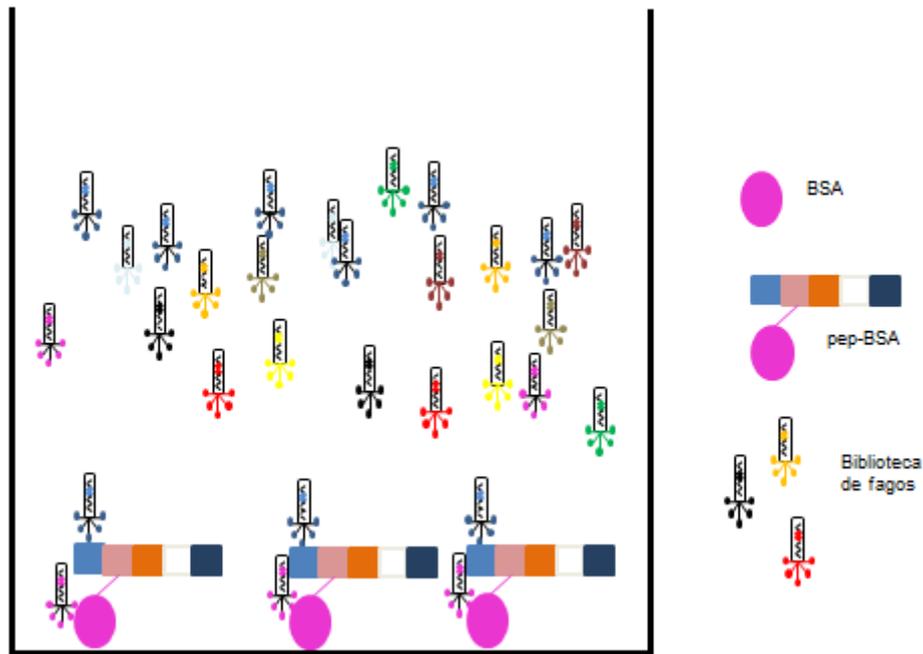


FIGURA 10 - ESQUEMA DA SEGUNDA ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO NO *PHAGE DISPLAY*. O conjugado pepb2a2-BSA foi imobilizado em imunotubo específico na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ para reconhecimento do *pool* das bibliotecas de fagos no *panning* (A AUTORA, 2014).

3.3.2.3 Terceira estratégia de *panning*- exposição apenas do peptídeo como alvo e eluição ácida com sonicação.

Outra abordagem para a seleção foi a imobilização apenas do pepb2a2 na placa de 96 poços imobilizada com 10 $\mu\text{g/mL}$ de pepb2a2 em 10 mL de *coating buffer*. Além disso, uma nova tática para eluição foi realizada, descrita por Lunder *et al*, (2008). Após a incubação das bibliotecas *overnight*, a placa foi submetida a 10 lavagens de 2 minutos com TBS-T 0,2% e, posteriormente, com 5 lavagens de 2 minutos com TBS-T 0,05% para retirar os fagos que não ligaram. A placa foi lavada 4 vezes com tampão glicina [glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2 contendo BSA 1 mg/mL, previamente filtrado a 0,22 μm] por 5 minutos sob agitação. Os fagos que se ligaram ao peptídeo foram recuperados com eluição ácida com sonicação, no qual foi realizado a adição de 100 μL /poço de tampão glicina [glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2

contendo BSA 1 mg/mL, previamente filtrado a 0,22 μm] recoberta por um adesivo e imersa em banho-maria (50 Hz) durante 10 minutos.

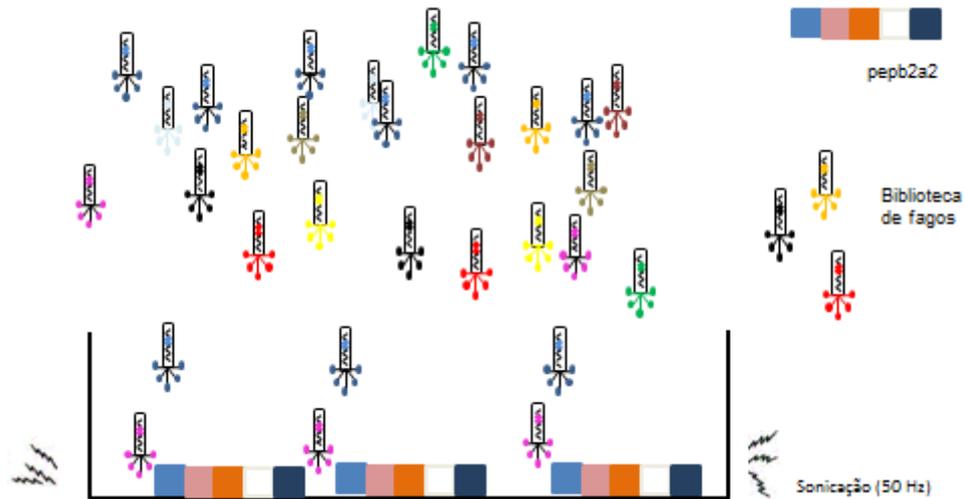


FIGURA 11 - ESQUEMA DA TERCEIRA ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO NO *PHAGE DISPLAY*. O peptídeo pepb2a2 foi imobilizado em placa de 96 poços na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ para reconhecimento do *pool* das bibliotecas de fagos no *panning* (A AUTORA, 2014).

3.4 ENSAIO DE ELISA PARA VERIFICAR A REATIVIDADE DOS FAGOS- SCREENING

Após a obtenção de fagos proveniente das diferentes estratégias utilizadas nos *pannings*, foram coletadas cada uma das colônias e cultivadas individualmente em microtubos contendo 250 μL de meio LB contendo 20 mg/mL de antibiótico tetraciclina, com exceção da bactéria K91 utilizada como controle negativo, as quais foram incubadas *overnight* a 37 $^{\circ}\text{C}$ a 250 rpm. As amostras foram submetidas à centrifugação e os sobrenadantes foram testados em monoplicatas por ELISA.

Uma placa para ELISA foi imobilizada com o pepb2a2 em cada uma das diferentes estratégias em uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em 10 mL de *coating buffer* (NaHCO_3 100 mM pH 8,6) e incubada *overnight* em geladeira. Entre cada etapa a placa foi lavada 4 vezes com solução de lavagem.

O bloqueio dos sítios livres foi realizado utilizando solução de caseína 2% em PBS durante 1 hora a 37 °C. Adicionaram-se os sobrenadantes obtidos e os *pools* de fagos final, em monoplicatas. Como controle negativo utilizou-se fago silvestre. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C.

Para verificar a interação alvo-fago foi adicionado o anticorpo anti-fago M13 conjugado à peroxidase, diluído 1:400 em tampão de incubação e incubou-se durante 1 hora a 37 °C. Os poços foram lavados por 6 vezes e a placa foi revelada com 100 µL de solução reveladora [2 mg de OPD em 10 mL de tampão citrato e 2 µL de H₂O₂] e incubada por 20 minutos protegida da luz. A interrupção da reação foi feita com 20 µL de solução *STOP* (ácido sulfúrico 1:20) e realizada a leitura espectrofotométrica a 495 nm.

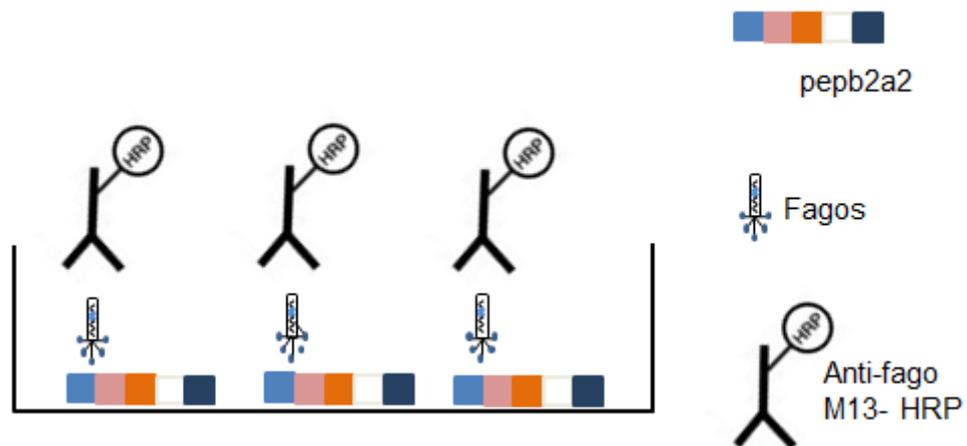


FIGURA 12 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DOS FAGOS. Amostras contendo 1µg dos pepb2a foram imobilizadas em placas de 96 poços. Adicionaram-se os fagos, o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 495nm (A AUTORA, 2014).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES OBTIDOS NOS PANNINGS

Após o *screening* dos clones utilizando o sobrenadante, foram selecionados os fagos que apresentaram maior reatividade para testes posteriores de caracterização.

3.5.1 Ensaio de ELISA para verificar a reatividade dos fagos isolados

Um ensaio de ELISA foi realizado com o mesmo formato descrito anteriormente no item 3.4, porém utilizando diferentes soluções para o bloqueio dos sítios livres: caseína 2%, BSA 2% e *Protein-free buffer* da Pierce.

3.5.2 Ensaio de ELISA para verificar a afinidade dos fagos

Após a verificação da reatividade dos fagos utilizando diferentes soluções de bloqueio, estes foram amplificados, recuperados e titulados para posterior teste através do ensaio de ELISA, o qual foi realizado com o mesmo formato descrito anteriormente no item 4.4 em triplicatas, utilizando *Protein-free buffer* da Pierce para o bloqueio dos sítios livres. Os fagos foram adicionados em diferentes concentrações, em duplicatas e utilizou-se o fago silvestre como controle negativo. A análise do desvio padrão foi realizada com o programa Microsoft Excel.

3.5.3 Ensaio de ELISA para verificar a especificidade dos fagos

Para verificar a especificidade dos fagos frente aos outros peptídeos, foi realizado com o mesmo formato descrito anteriormente no item 3.4, imobilizando a placa com 10 µg/mL de pepb3a2 e e1a2 em *coating buffer* e o bloqueio dos sítios livres realizado utilizando *Protein-free buffer* da Pierce.

Os fagos foram adicionados em diferentes concentrações, em duplicatas e utilizou-se o fago silvestre como controle negativo. A análise do desvio padrão foi realizada com o programa Microsoft Excel.

3.5.4 Ensaio de ELISA de competição

A fim de se verificar a preferência do fago pelo pepb2a2, um ensaio de ELISA foi realizado com o mesmo formato descrito anteriormente no item 3.4, na qual o bloqueio dos sítios livres realizado utilizando *Protein-free buffer* da Pierce e incubou-se os fagos em diferentes concentrações juntamente com o anticorpo anti-b2a2 1:150000 [Cell Signling L99H4], em duplicatas e utilizou-se o fago silvestre como controle negativo.

Como secundário, adicionou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, diluído 1:4000 em tampão de incubação durante 1 hora a 37 °C. A análise do desvio padrão foi realizada com o programa Microsoft Excel.

4 RESULTADOS

Este estudo foi delineado visando a obtenção de peptídeos ligantes para o peptídeo representativo do transcrito b2a2 do gene *BCR-ABL1* do cromossomo Ph.

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As proteínas BCR-ABL1 geradas a partir do transcrito b2a2 possuem 927 aminoácidos referentes ao gene *BCR* fusionadas a 1096 aminoácidos do *ABL1*. A segunda forma derivada de b3a2 é resultante da fusão de 902 aminoácidos do *BCR* com a mesma sequência de *ABL1*. A outra forma, geralmente encontrada em pacientes com LLA e codificada por e1a2, possui 426 aminoácidos referentes a *BCR* fusionada com o éxon a2 do *ABL1* (GUO *et al.*, 1994). Baseando-se nas sequências destas proteínas disponíveis no banco de dados Genbank, três peptídeos correspondentes à região de junção *BCR-ABL1* foram desenhados pelo Dr. Roberto Rosati do Instituto Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba-PR.

Conforme mostrado na figura 13 foram sintetizados peptídeos correspondentes a essas junções, com 14 aminoácidos de cada um dos transcritos adicionando-se à região N-terminal uma cisteína a fim de conferir a esta molécula a capacidade de ser conjugada a outras posteriormente.

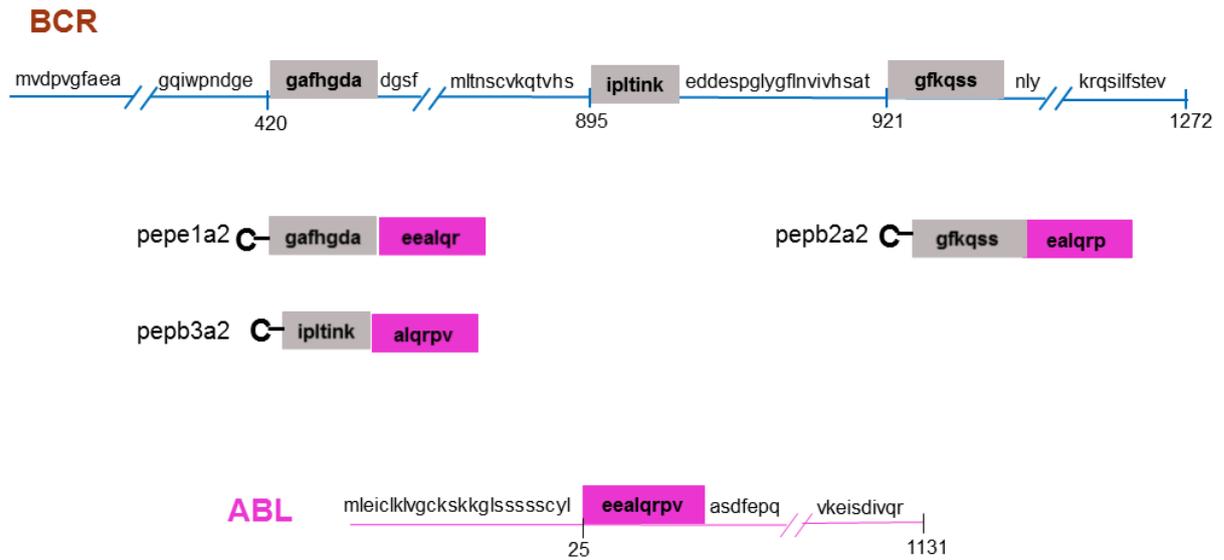


FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DOS TRÊS PEPTÍDEOS (pepb2a2, pepb3a2 e pepe1a2). Verificam-se os aminoácidos provenientes do *BCR* e do *ABL1*, em azul e rosa, respectivamente (A AUTORA, 2014).

A cisteína confere ao peptídeo a possibilidade de ligação com *linker*, como SMCC, que possibilita a posterior conjugação com proteínas carreadoras, como BSA e KLH.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CONJUGADOS COM BSA

A eficácia da conjugação dos peptídeos ao BSA foi verificada por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida como mostrado na figura 14. Houve aumento na massa dos conjugados em relação à molécula de BSA.



FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO SDS-PAGE DAS AMOSTRAS CONJUGADAS A BSA. Amostras contendo 5 μ g dos conjugados pepe1a2-BSA, pepb2a2-BSA e pepb3a2-BSA foram submetidas à eletroforese com SDS a 12,5%. Após a migração as bandas foram visualizadas por Coomassie-Blue.

4.3 REATIVIDADE DOS CONJUGADOS-pepb2a2 FRENTE A ANTICORPO ESPECÍFICO POR *DOT-BLOT*

Foi realizado um ensaio de *dot-blot* manual para confirmar a conjugação do pepb2a2 às moléculas de KLH e BSA. A figura 15 mostra a presença das amostras protéicas coradas por Ponceau e a confirmação da conjugação após incubação com anticorpo específico anti-b2a2 e revelação com solução de DAB/Cloronaftol.

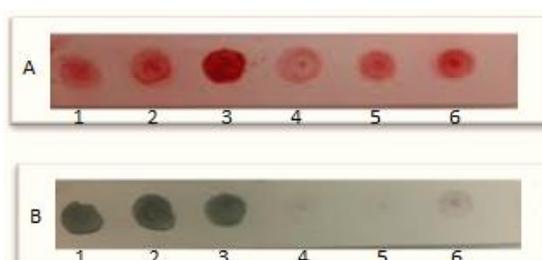


FIGURA 15 - RECONHECIMENTO DAS AMOSTRAS CONJUGADAS POR *DOT-BLOT* MANUAL. Amostras contendo 1 μ g foram sensibilizadas em membrana de nitrocelulose: pepb2a2-KLH (1), pepb2a2-KLH após diálise (2), pepb2a2-BSA (3), pepb2a2 (4), KLH (5) e BSA (6). Em A coloração por Ponceau. Em B após a incubação com anticorpo anti-b2a2 (1:1000) e o conjugado anti-IgG de camundongo (1:4000) marcado com peroxidase e adicionado o substrato. A visualização foi realizada com DAB/Cloronaftol.

A disponibilidade apenas do anticorpo anti-b2a2 [Cell Signing Technologies] possibilitou ensaios com pepb2a2. A partir desta limitação, foi possível a confirmação deste conjugado à BSA e KLH após visualização com solução de DAB/Cloronaftol. O mesmo não foi visualizado nos controles, contendo apenas BSA e KLH. A partir deste resultado, podemos inferir que os outros dois peptídeos, pepe1a2 e pepb3a2, também podem ter sido adequadamente conjugados à estas duas moléculas.

4.4 REATIVIDADE DOS CONJUGADOS-pepb2a2 FRENTE A ANTICORPO ESPECÍFICO POR ELISA

Através do ELISA, corroborando o resultado do *dot-blot*, verificou-se que houve o reconhecimento do anticorpo monoclonal específico para as amostras contendo o peptídeo pepb2a2, não havendo reconhecimento dos controles.

Desta forma, os ensaios sugerem que os peptídeos foram devidamente conjugados aos dois carreadores.

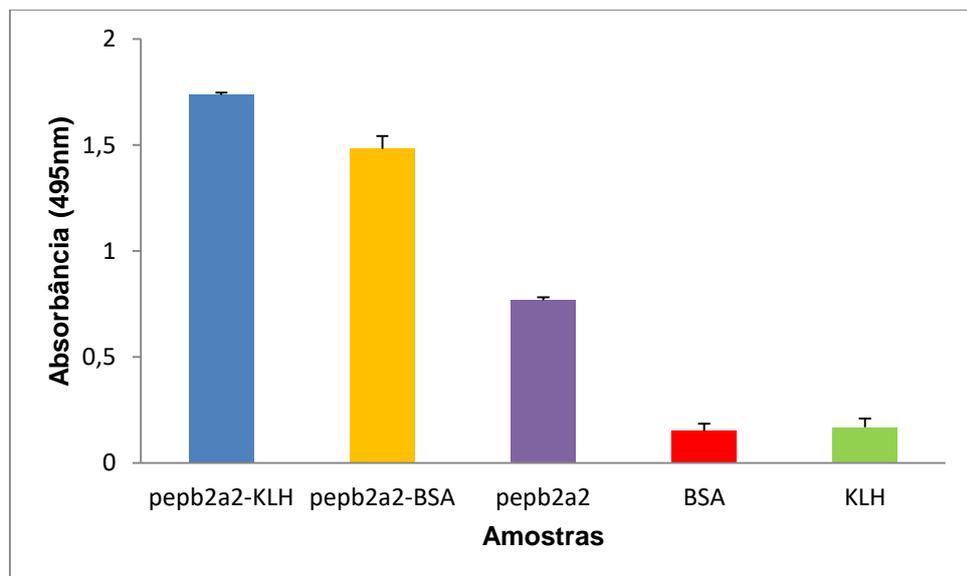


FIGURA 16 - REATIVIDADE DAS AMOSTRAS pepb2a2 CONJUGADAS. Amostras contendo 1µg dos pepb2a2-KLH, pepb2a2-BSA, pepb2a2, BSA e KLH foram imobilizadas em placa de 96 poços. Adicionou-se o anticorpo anti-b2a2 (1:1000), o conjugado anti-IgG de camundongo (1:4000) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 495nm.

Como mostrado nas figuras 15 e 16, foi possível a conjugação aos carreadores com o auxílio de um *linker*, no caso o SMCC, resultando em uma conjugação eficiente ao BSA e KLH e com rendimento satisfatório após dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

4.5 SELEÇÃO DE FAGOS DE INTERESSE OBTIDOS NOS *PANNINGS* POR *PHAGE DISPLAY- SCREENING*

A partir da técnica do *phage display* utilizando a primeira estratégia de *panning*, houve uma diminuição no número de fagos recuperados (*output*) em relação aos adicionados na seleção (*input*) conforme mostrado na tabela 1.

TABELA 1 – RESULTADOS DO *PHAGE DISPLAY* A PARTIR DA PRIMEIRA ESTRATÉGIA DE *PANNING*

	<i>Input</i>	<i>Output</i>	Após amplificação
<i>Panning 1</i>	1×10^{11}	5×10^{10}	1×10^{12}
<i>Panning 2</i>	2×10^{12}	1×10^6	7×10^{11}
<i>Panning 3</i>	2×10^{12}	5×10^6	6×10^{12}

(A AUTORA, 2014).

Porém, nesta primeira estratégia, utilizando-se o *pool* de fagos por ELISA, não houve reatividade ao final de cada *panning* (figura 17).

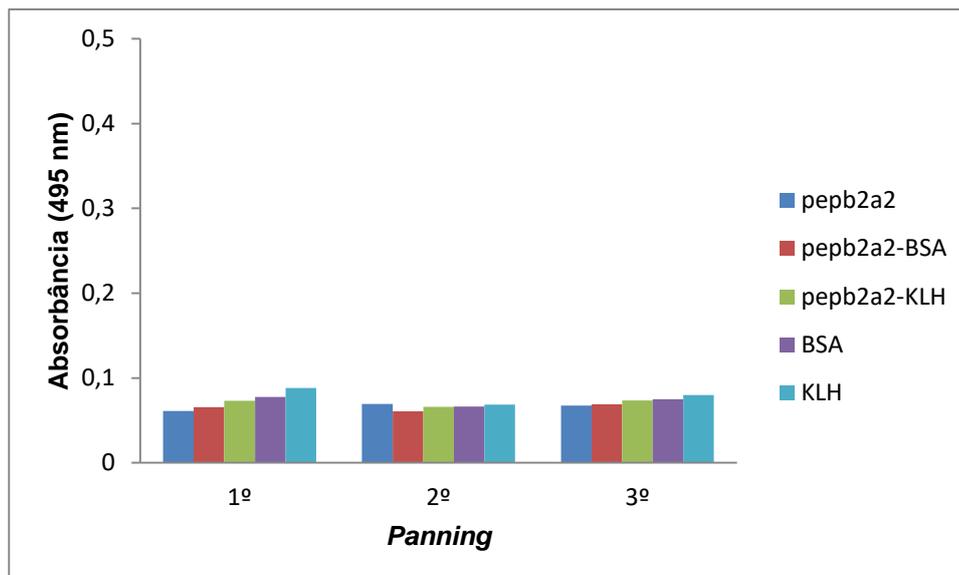


FIGURA 17 - TESTE DA REATIVIDADE DO *POOL* DE FAGOS AO FINAL DE CADA *PANNING*. O peptídeo pepb2a2 foi imobilizado em placa de 96 poços. Adicionaram-se amostras representativas do *pool* de fagos finais recuperados ao final de cada *panning*: 1º *panning* refere-se a seleção do pepb2a2-BSA 10 µg/mL, o 2º *panning* pepb2a2-KLH 10 µg/mL e o 3º *panning* com pepb2a2-BSA 5 µg/mL. Adicionou-se o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 495 nm.

Após individualização, foram obtidos 23 clones na primeira seleção, 15 clones na segunda e 15 clones na terceira, porém nenhum deles apresentou reatividade quando testados por ensaio de ELISA em diferentes formatos (dados não mostrados).

Na tentativa de seleção de fagos reativos, realizou-se a segunda estratégia utilizando um imunotubo como fase sólida para realização do *panning*, porém não foi possível a obtenção de nenhum clone após a etapa de eluição ácida.

Na busca por ligantes peptídicos específicos para pepb2a2, utilizou-se a terceira estratégia utilizando o pepb2a2 como alvo e a utilização de uma solução ácida concomitantemente a sonicação na etapa de eluição. Esta não possibilitou uma quantificação dos fagos recuperados (*output*) em relação aos adicionados na seleção (*input*) conforme mostrado na tabela 2, entretanto após a individualização, esta estratégia mostrou-se a melhor escolha, pois possibilitou a obtenção de clones reativos.

TABELA 2 - RESULTADOS DO *PHAGE DISPLAY* A PARTIR DA TERCEIRA ESTRATÉGIA DE *PANNING*

	<i>Input</i>	<i>Output</i>	Após amplificação
Panning 1	1×10^{11}	-	3×10^8
Panning 2	2×10^{12}	-	4×10^8

(A AUTORA, 2014).

Destes clones, foram selecionados 37 após o primeiro *panning* e 49 após o segundo *panning*. Estes clones foram cultivados e seus sobrenadantes foram testados por ensaio de ELISA para verificar quanto à reatividade de cada um.

Após o *screening* individual destes clones referentes ao *panning 1* (figura 18) e ao *panning 2* (figura 19), foram identificados 5 clones utilizando como critério para seleção os fagos que apresentaram absorvância 3 vezes o valor da menor absorvância. Destacados em vermelho nas figuras 18 e 19 estão os clones selecionados: S28 proveniente do primeiro *panning* e 13S, 25S, 39S e 41S provenientes do segundo *panning*.

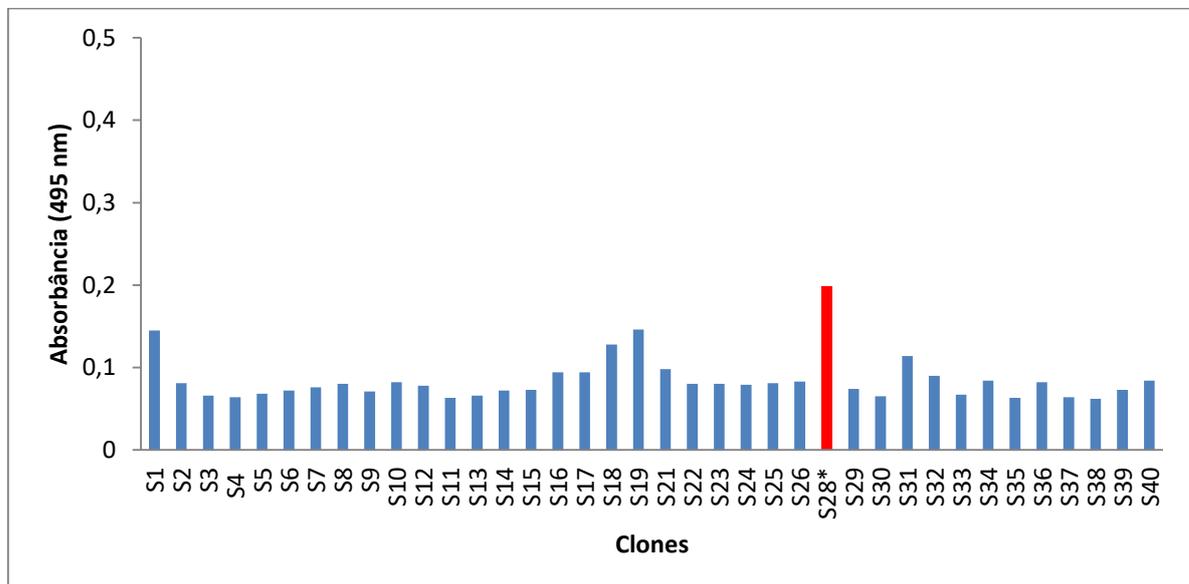


FIGURA 18 - TESTE DA REATIVIDADE DO SOBRENADANTE DOS CLONES INDIVIDUALIZADOS DO 1º PANNING. O peptídeo pepb2a2 foi imobilizado em placa de 96 poços. Após centrifugação, os sobrenadantes dos 37 clones individualizados foram adicionados. Adicionou-se o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu substrato específico. A leitura da absorvância das amostras foi determinada em 495 nm. Foi escolhido o clone (indicado em vermelho) cujo peptídeo apresentou reatividade frente ao pepb2a2 três vezes maior que a absorvância obtida com o clone de menor reatividade (0,061) nos *pannings*.

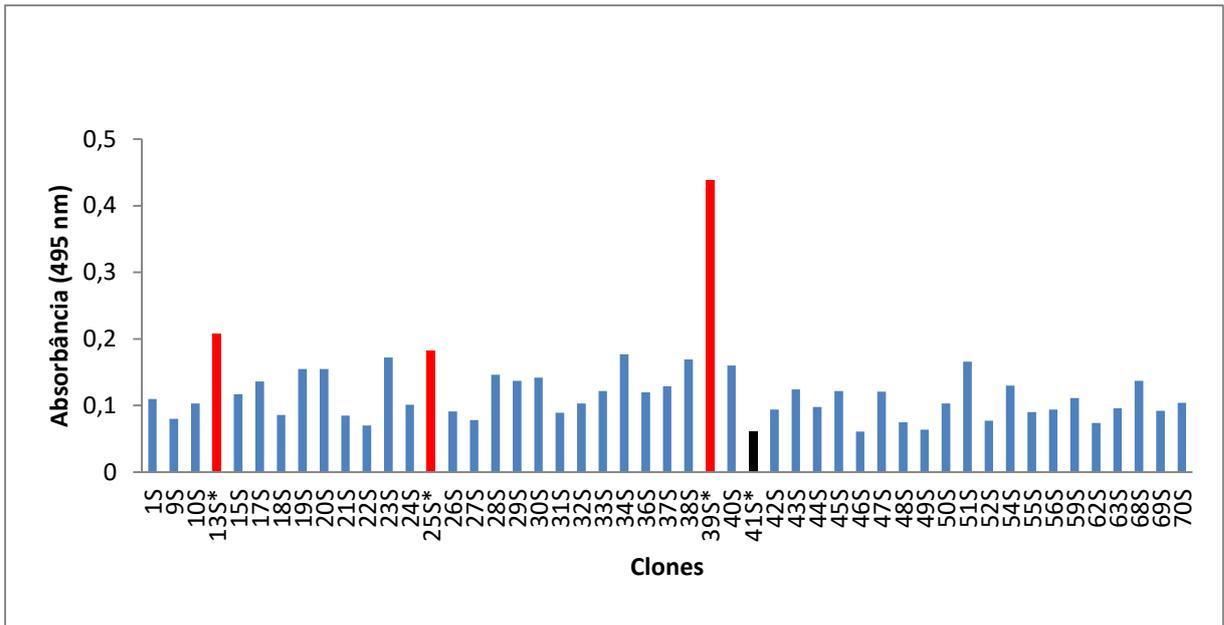


FIGURA 19 - TESTE DA REATIVIDADE DO SOBRENADANTE DOS CLONES INDIVIDUALIZADOS DO 2º PANNING. O peptídeo pepb2a2 foi imobilizado em placa de 96 poços. Após centrifugação, os sobrenadantes dos 49 clones individualizados foram adicionados. Adicionou-se o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 495 nm. Foram escolhidos clones (indicados em vermelho) cujos peptídeos apresentaram reatividade frente ao pepb2a2 no mínimo três vezes maior que a absorbância obtida com o clone de menor reatividade (0,061) nos *pannings* (indicado em preto).

Utilizando-se diferentes soluções de bloqueio, obteve-se os resultados mostrados na figura 20. O melhor resultado foi aquele obtido com a solução de bloqueio *free protein* da Pierce em que os clones 35S e 13S mostraram absorbâncias superiores a 0,6.

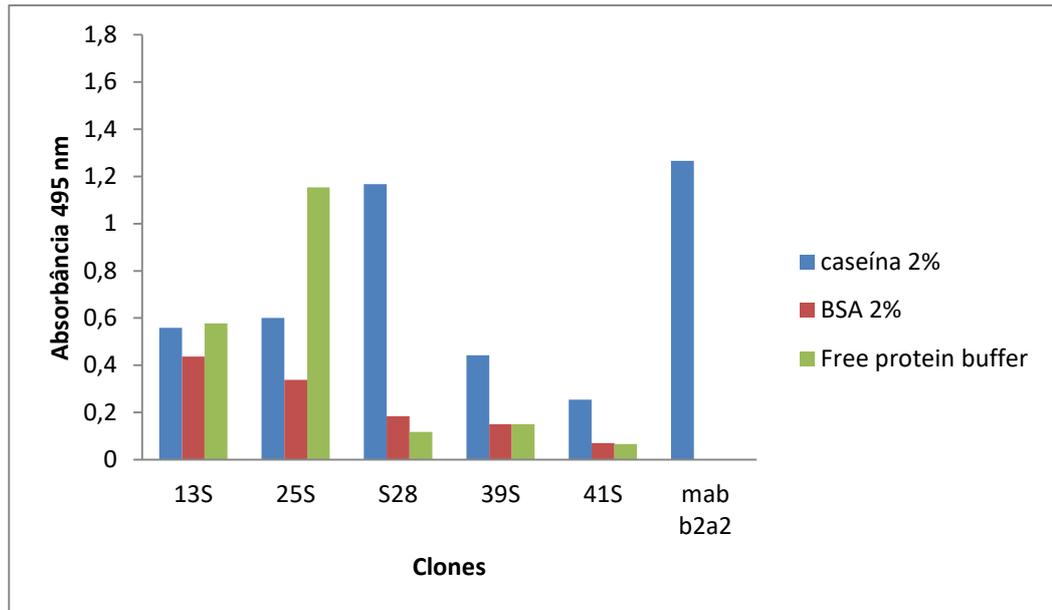


FIGURA 20 - TESTE DA REATIVIDADE DO SOBRENADANTE DOS CLONES SELECIONADOS UTILIZANDO A DIFERENTES SOLUÇÕES DE BLOQUEIO DA PLACA. O peptídeo pepb2a2 foi imobilizado em placa de 96 poços e os sítios livres foram bloqueados utilizando caseína 2% PBS, BSA 2% e *Protein-free buffer* (PBS) da Pierce. Após centrifugação, os sobrenadantes dos clones individualizados foram adicionados. Adicionou-se o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 495 nm.

Um ensaio de ELISA utilizando diferentes concentrações dos fagos selecionados e do fago silvestre (F.S.), que não expressa nenhum peptídeo, foi realizado para verificar a reatividade dos clones individualmente. Verificou-se que o fago 13S e 25S em concentração de 10^{10} TU/mL se destacaram em relação a sua reatividade nas diferentes concentrações (figura 21).

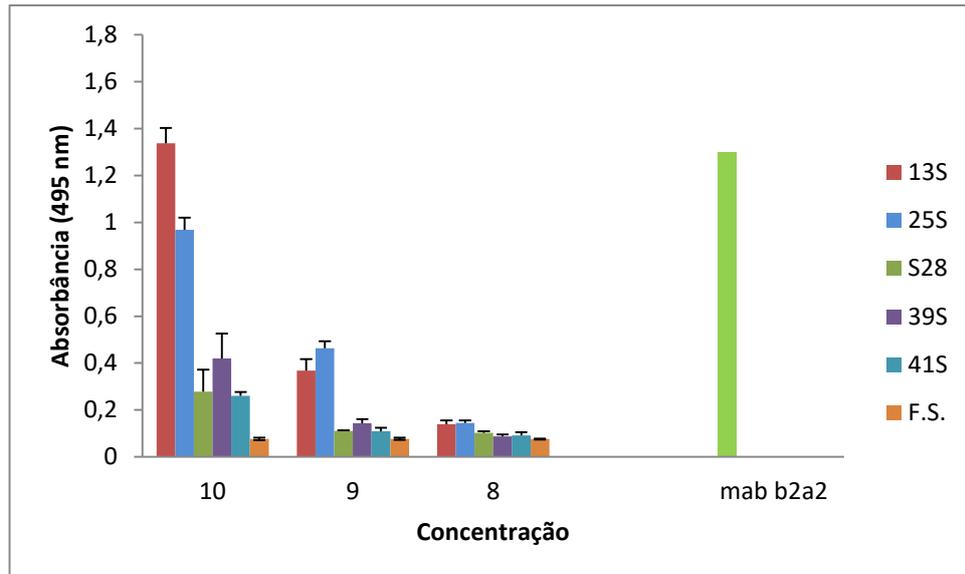


FIGURA 21 - TESTE DA REATIVIDADE DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. O peptídeo pepb2a2 foi imobilizado em placa de 96 poços. Os fagos selecionados e o fago silvestre (F.S.) foram adicionados nas concentrações de 10^{10} , 10^9 e 10^8 TU/mL e utilizou-se o anticorpo anti-b2a2 como controle positivo. Adicionou-se o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 495 nm.

4.7 ENSAIO DE ESPECIFICIDADE

Os fagos 13S e 15S testados frente a outros dois peptídeos sintéticos correspondentes aos transcritos pepb3a2 e pepe1a2 e usado o fago silvestre (F.S.), que não expressa nenhum peptídeo, como controle negativo. A seguir (figura 22) observa-se a baixa reatividade de cada um dos fagos frente ao pepb3a2 em diferentes concentrações.

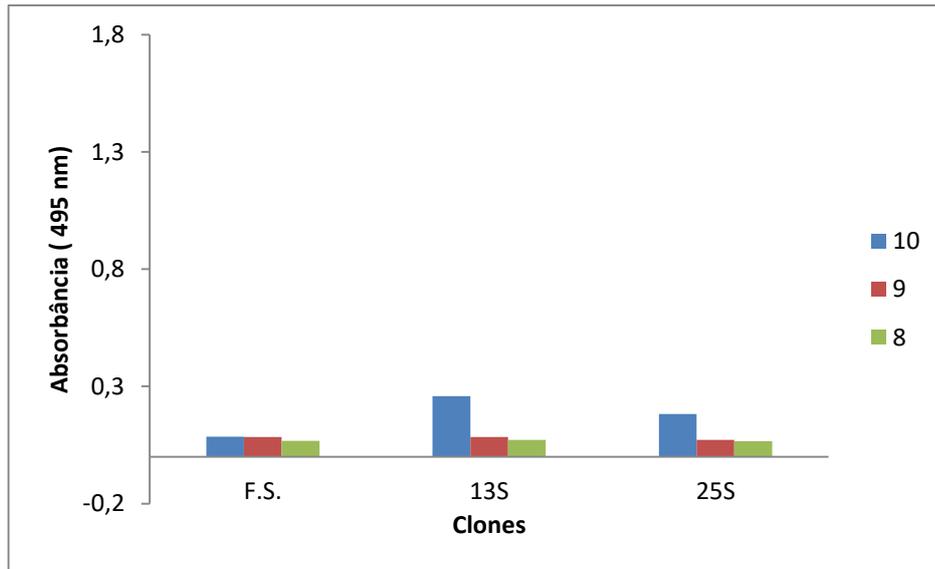


FIGURA 22 - TESTE DA ESPECIFICIDADE DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AO pepb3a2. O peptídeo pepb3a2 foi imobilizado em placa de 96 poços. Adicionaram-se os fagos nas concentrações de 10^{10} , 10^9 e 10^8 TU/ mL e o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 495 nm.

O mesmo ensaio foi realizado frente ao pepe1a2 como descrito acima. Observa-se a baixa reatividade dos fagos frente a este peptídeo (figura 23).

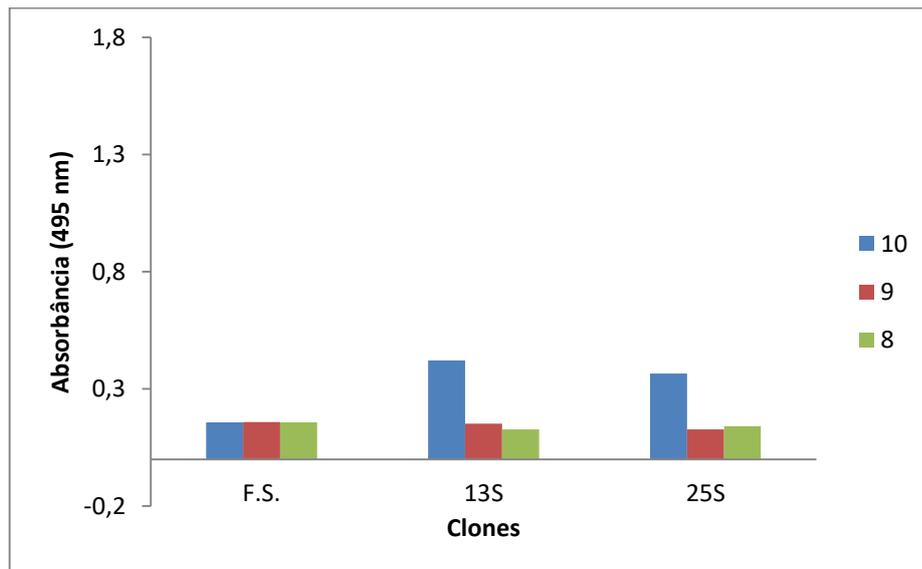


FIGURA 23- TESTE DA ESPECIFICIDADE DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AO pepe1a2. O peptídeo pepe1a2 foi imobilizado em placa de 96 poços. Adicionaram-se os fagos nas concentrações de 10^{10} , 10^9 e 10^8 TU/mL e o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 495 nm.

4.8 ENSAIO DE COMPETIÇÃO

Foi realizado um ensaio de ELISA para verificar se os clones 13S e 25S eram capazes de interferir na reação entre o pepb2a2 imobilizado na placa e o anticorpo monoclonal anti-b2a2 (1:150.000) e utilizado o fago silvestre (F.S.), que não expressa nenhum peptídeo como controle negativo. Como observado na figura 24, houve inibição dessa reação em 38,12% e 27,15%, respectivamente. Não havendo interferência do fago silvestre.

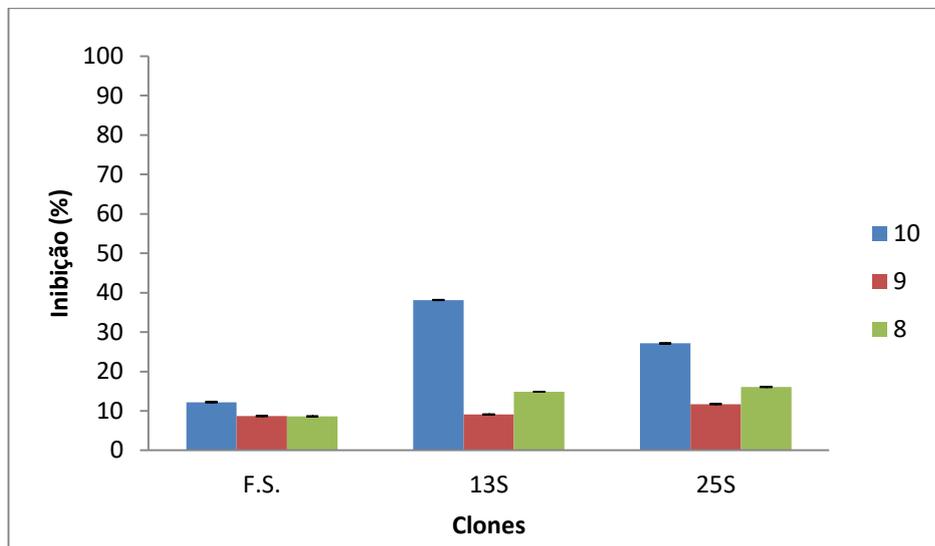


FIGURA 24 - TESTE DE COMPETIÇÃO DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES COM O ANTICORPO anti-b2a2. O peptídeo pepb2a2 foi imobilizado em placa de 96 poços. Adicionaram-se os fagos nas concentrações de 10^{10} , 10^9 e 10^8 TU/ mL concomitantemente ao anticorpo anti-b2a2 (1:150000), o conjugado anti-IgG de camundongo (1:4000) marcado com peroxidase e seu substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 495 nm.

5 DISCUSSÃO

O diagnóstico, bem como o monitoramento da DRM, de algumas leucemias como a LMC e LLA utiliza como um dos parâmetros a presença do cromossomo Ph, isto é, de uma translocação *BCR-ABL1* (FADERL *et al.*, 1999).

As técnicas atualmente disponíveis para detecção da translocação que utilizam biologia molecular tem suas vantagens embora apresentem também uma série de desvantagens (TOHAMI, NAGLER E AMARIGLIO, 2012) sendo a mais importante a incapacidade de detecção da proteína quimérica uma vez que a quantidade de RNAm nem sempre é fiel ao montante da proteína expressa. Por isso, pesquisadores tem defendido a investigação e quantificação das proteínas quiméricas (GUO *et al.*, 1996).

Diante disto e devido a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento dos métodos de diagnóstico com maior sensibilidade, menor custo e que leve em consideração o bem-estar do paciente, foi utilizada a técnica de *Phage Display* neste trabalho com o objetivo de identificar ligantes para a principal proteína do transcrito do cromossomo Ph, denominado de b2a2.

A técnica de *Phage Display* vem sendo aplicada no diagnóstico de diversificadas doenças (LIONAKIS *et al.*, 2005; MANHANI *et al.*, 2011). Diversos trabalhos (JÄGER *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2012; SHEN, XIE E EDWARDS, 2013; SHIRES *et al.*, 2014) têm empregado esta técnica na tentativa de obter marcadores para o câncer e até mesmo em algumas leucemias.

Baseando-se em um estudo americano que mostra a interação peptídeo-peptídeo como uma alternativa para a identificação de marcadores diagnósticos (ZHANG, ZHU E KODADEK, 2000), diferentes estratégias foram realizadas neste trabalho de forma a selecionar peptídeos com afinidade para um peptídeo sintético correspondente ao fragmento correspondente ao transcrito b2a2 (pepb2a2).

Para tanto, peptídeos representativos à região de fusão das três proteínas correspondente aos três principais transcritos do cromossomo Ph foram sintetizados (pepb2a2, pepb3a2 e pepe1a2) e conjugados a proteínas carreadoras, como BSA e KLH, com o intuito de favorecer a seleção a partir de uma biblioteca de fagos utilizando-se moléculas de baixo peso molecular (HIROSE *et al.*, 1998). Este processo foi devidamente caracterizado para a posterior seleção de fagos. O aumento

da massa molecular das amostras conjugadas à BSA adicionada a cada canaleta (figura 14) indica que houve eficácia na metodologia empregada para conjugação dos peptídeos a essa proteína. Ainda, os ensaios de *dot-blot* manual e ELISA confirmaram esse resultado, uma vez que um anticorpo específico anti-b2a2 reconheceu o pepb2a2-BSA e não os devidos controles (figura 15 e 16).

A conjugação ao KLH não foi possível ser confirmada pelo SDS-PAGE devido à alta massa molecular apresentada por esta molécula. Devido a este fato, os resultados obtidos com os ensaios de *dot-blot* manual e ELISA (figura 15 e 16) inferem que houve eficiência na conjugação à este carreador pelo reconhecimento do anticorpo específico anti-b2a2 ao pepb2a2-KLH e não dos devidos controles.

Na primeira estratégia de seleção do *Phage Display*, o peptídeo pepb2a2 foi carreado com BSA e utilizado como alvo para uma biblioteca de peptídeos expressos em fagos. De forma a direcionar a seleção para os peptídeos e não para a albumina, na seleção seguinte foi utilizado como proteína carreadora o KLH (HIROSE *et al.*, 1998). Inicialmente os resultados foram satisfatórios devido à diferença entre o título de fagos recuperados no primeiro *panning* em relação ao segundo (tabela 1), sugerindo que a maioria dos fagos recuperados no segundo seria mais específica. Porém, os clones selecionados, quando em presença do pepb2a2, não se mostraram reativos por teste de ELISA (dados não mostrados).

Baseando-se em estudo recente do nosso grupo de pesquisa (FOGAÇA *et al.*, 2014), na tentativa de expor o pepb2a2 de maneira mais efetiva e em maior concentração, utilizaram-se, como fase sólida, imunotubos específicos para a técnica de *Phage Display*. Por essa estratégia, não foram obtidos nem mesmo clones para serem testados.

Finalmente, como terceira estratégia, utilizou-se o pepb2a2 diretamente na placa, ou seja, sem proteína carreadora além da utilização do processo de sonicação e acidez para a etapa de eluição dos fagos (LUNDER *et al.*, 2008). A partir de então, obteve-se sucesso na clonagem de peptídeos apresentados em fagos com afinidade para o pepb2a2. Esse fato pode explicar parcialmente, o resultado negativo obtido com a primeira estratégia tendo em vista que a sonicação, realizada na terceira tentativa, torna o processo de eluição mais eficiente, desligando o fago com maior afinidade pelo pepb2a2.

Este fato foi comprovado através dos resultados obtidos no ELISA realizado com cada um dos clones (figura 18 e 19) mostrando que a houve seleção de 4

bacteriófagos que melhor interagiram com o peptídeo pepb2a2. Curiosamente, mesmo lavando a placa com solução ácida para retirada de fagos de baixa afinidade e utilizando a sonicação como técnica de eluição, houve a recuperação de fagos que não apresentaram reatividade frente ao pepb2a2.

No *screening* inicial, comparando-se as reatividades do sobrenadante dos clones recuperados com resultados obtidos por outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (DE MOURA *et al.*, 2011; FOGAÇA *et al.*, 2014), as absorbâncias foram de duas a três vezes menor. Isso já era esperado, uma vez que nesses casos citados foram utilizados anticorpos de 150 kDa, e nosso alvo, o pepb2a2, apresenta somente 14 aminoácidos (cerca de 1,6 kDa). Portanto, de acordo com Zhang *et al.* (2000) seria de se esperar uma baixa afinidade além da possibilidade de reatividade cruzada, ou seja, baixa especificidade. Isso foi notado quando se verificou que a reação dos peptídeos apresentados por fagos frente ao pepb2a2 não era dose-dependente quando se utilizava caseína como agente bloqueador do ELISA (dados não mostrados). Foi então que outros agentes bloqueadores foram testados utilizando o sobrenadante contendo fagos, conforme mostrado na figura 20. Verificou-se que alguns clones S28, 39S e 41S reagiram, na realidade, com a caseína, perdendo sua reatividade quando o a solução bloqueadora fora substituída por uma solução sem proteínas. Com o clone 13S não houve modificação, porém o 25S, antes pouco reativo, apresentou absorbância próxima do anticorpo monoclonal anti b2a2 utilizado como controle positivo.

Utilizando-se como agente bloqueador a solução livre de proteínas (ASBACH *et al.*, 2010), e ainda quantidades conhecidas de fagos (1×10^{10} , 1×10^9 e 1×10^8 TU/ml⁻¹), foi verificado que clones 13S e 25S apresentaram dose-dependência em relação à reatividade ao pepb2a2. Esse resultado somado ao fato de haver uma reatividade quase nula do fago silvestre, que não expressa nenhum peptídeo, indica que há especificidade na ligação, ou seja, a reatividade refere-se ao peptídeo apresentado pelo fago e não às proteínas do capsídeo do vírus.

Um resultado bastante positivo que deve ser enfatizado foi o fato da absorbância obtida com 13S e 25S, quando em concentração de 1×10^{10} TU/ml, ter sido muito semelhante à encontrada utilizando-se o anticorpo monoclonal anti b2a2 (figura 21).

Em relação à especificidade dos clones 25S e 13S frente ao pepb2a2 comparado aos outros dois fragmentos correspondentes aos transcritos (e1a2 e

b3a2), verificou-se pelo ELISA que a técnica de *Phage Display* foi eficiente na seleção de peptídeos específicos para o alvo utilizado como também mostrado por Manhani *et al.* (2011).

Quando realizado o ELISA de competição, os clones 13S e 25S foram capazes de inibir a ligação do anticorpo monoclonal ao pepb2a2 diminuindo sua reatividade em 38,12% e 27,15%, respectivamente. Mais uma vez mostrando a especificidade dos ligantes selecionados e sua capacidade de inibir a ligação do pepb2a2 a uma molécula no mínimo 100 vezes maior que eles.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de afinidade, especificidade e competição destaca-se que os peptídeos expressos em fagos dos clones 13S e 25S se mostraram tão bons ligantes do fragmento correspondente ao transcrito b2a2 expresso pelo cromossomo Ph quanto o anticorpo monoclonal. Vale ressaltar, ainda, que estes apresentaram uma reatividade muito superior ao esperado levando em conta que esses peptídeos identificados são moléculas muito pequenas.

É a primeira vez que a técnica de *Phage Display* é utilizada para selecionar peptídeos com afinidade por peptídeos. Embora os peptídeos selecionados apresentem possivelmente uma menor afinidade, eles podem ser uma alternativa para o diagnóstico (ZHANG, ZHU E KODADEK, 2000; AHMED *et al.*, 2014) e até mesmo no tratamento de determinadas doenças (SHEN, XIE E EDWARDS, 2013). Ainda, diversos trabalhos (SHEN, XIE E EDWARDS, 2013; AHMED *et al.*, 2014) argumentam que, apesar da alta afinidade e alta especificidade, algumas desvantagens na utilização de anticorpos monoclonais, como a dificuldade na produção utilizando métodos *in vivo* baseados em células, sem contar o elevado custo e a dificuldade na purificação. Além disso, os peptídeos como marcadores específicos apresentam diversas vantagens: podem ser armazenado durante longos períodos de tempo, sem o receio de deterioração e são mais baratos de produzir em relação a anticorpos monoclonais e são relativamente livres de contaminantes, tais como substâncias tóxicas de sistemas de expressão (AHMED *et al.*, 2014).

Este trabalho foi o primeiro passo dado para a obtenção de ligantes sintéticos que podem ser empregados como ferramentas biotecnológicas para o uso na saúde humana. É notório que o estudo para a caracterização dos peptídeos selecionados por *Phage Display* deve ser continuado, especialmente com a sequência peptídica na sua forma sintética, com a análise da afinidade por ressonância plasmônica, ou da interação por balança de cristal de quartzo, etc.

Estudos recentes mostram que peptídeos sintéticos podem ser utilizados como alvos em biossensores no monitoramento da LMC (YANG *et al.*, 2013) fato que nos encoraja a dar continuidade a esse estudo.

Os peptídeos na forma sintética podem ser acoplados a marcadores como a biotina (YANG *et al.*, 2013) ou expressos em sistemas heterólogos conjugados a enzimas como a fosfatase alcalina, por exemplo, para serem utilizados em imunodiagnósticos ou ainda acoplados a nanopartículas ou *beads* para serem empregados em citometria de fluxo. Assim, esses ligantes peptídicos apresentam uma variedade de aplicações em métodos de detecção e diagnóstico.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a tecnologia de *Phage Display* foi eficiente na obtenção de ligantes peptídicos baseando-se na interação peptídeo-peptídeo para o fragmento representativo do transcrito b2a2 (pepb2a2) expresso pelo cromossomo Ph.

Foi possível a conjugação dos peptídeos representativos às proteínas carreadoras de forma eficiente, uma vez que os resultados obtidos pelas técnicas de eletroforese, *dot-blot* manual e ELISA confirmaram a caracterização dos conjugados apresentando rendimento satisfatório.

Inicialmente, a estratégia utilizando estes conjugados mostrou-se adequada ao favorecer a exposição dos fragmentos na seleção de possíveis ligantes. Entretanto, nosso estudo não obteve resultados satisfatórios quando utilizando placa de 96 poços nem imunotubos específicos como superfície.

A seleção com o pepb2a2 diretamente na placa e a utilização de uma solução ácida concomitantemente com sonicação na etapa de eluição dos fagos propiciou a obtenção de peptídeos apresentados em fagos com afinidade e especificidade para pepb2a2.

Em resumo, nossos resultados nos encorajam a continuar os estudos inclusive com os outros transcritos, uma vez que a técnica é uma ferramenta biotecnológica bastante promissora cujos peptídeos selecionados podem vir a ser uma alternativa aos ensaios diagnósticos e ao monitoramento da doença residual mínima em leucemias.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios prévios de reconhecimento dos fagos em extratos celulares de linhagens comerciais que apresentam a proteína quimérica BCR-ABL1 para posteriores ensaios em pacientes com LMC;
- Prosseguir estudos de caracterização desses ligantes utilizando as sequências peptídicas obtidas na sua forma sintética;
- Realizar estudos conjugando esses peptídeos a nanopartículas ou marcadores enzimáticos;
- Obter fagos para os outros transcritos expressos pelo cromossomo Ph (b3a2 e e1a2) utilizando a técnica de *Phage Display*;

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. S. R.; SADDI, V. A. Monitoring minimal disease in chronic myeloid leucemia by real time PCR. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, p. 382-386, 2007.

ARAP, M. A. Phage Display Technology- Applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p 1-9, 2005.

AHMED, N. *et al.* Mimitags: the use of phage display technology to produce novel protein-specific probes. **J Immunol Methods**, v. 405, p. 121-9, Mar 2014.

BACCARANI, M. *et al.* Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 35, p. 6041-51, Dec 2009.

BAIN, B. J. Diagnosis from the blood smear. **N Engl J Med**, v. 353, n. 5, p. 498-507, Aug 2005.

BARBOZA, L. P., SOUZA, J. M., SIMÕES, F. V., BRAGANÇA, I. C., ABDELHAY, E. Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em Leucemia Mieloide Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 89-98, 2000.

BRASIL. Portaria n. 90, de 15 de março de 2011. Revoga a Portaria n. 706/ 2010. Brasília, **Diário Oficial da União**, 2011.

BRASIL. Portaria n. 649, de 11 de novembro de 2008. Aprova na forma de anexo, as Diretrizes para o tratamento da Leucemia Mielóide Crônica do adulto. Brasília, **Diário Oficial da União**, 2008.

BONNYCASTLE, L. L. *et al.* Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. **J Mol Biol**, v. 258, n. 5, p. 747-62, May 1996.

BRADFORD, F. C. CONSERVING OUR HARVESTS. **Science**, v. 95, n. 2471, p. 465-9, May 1942.

CORTES, J.; KANTARJIAN, H. Advanced-phase chronic myeloid leukemia. **Semin Hematol**, v. 40, n. 1, p. 79-86, Jan 2003.

DE MOURA, J. *et al.* Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine** 29, 7992-8001, 2011.

DIAS-NETO, E. *et al.* Next-generation phage display: integrating and comparing available molecular tools to enable cost-effective high-throughput analysis. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8338, 2009.

FADERL, S. *et al.* Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making? **Blood**, v. 93, n. 9, p. 2755-9, May 1999.

FADERL, S.; HOCHHAUS, A.; HUGHES, T. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 18, n. 3, p. 657-70, ix-x, Jun 2004.

FOGAÇA, R. L. *et al.* Phage-displayed peptides as capture antigens in an innovative assay for *Taenia saginata*-infected cattle. **Appl Microbiol Biotechnol**, Aug 2014

GUO, J. Q. *et al.* Comparison of bcr-abl protein expression and Philadelphia chromosome analyses in chronic myelogenous leukemia patients. **Am J Clin Pathol**, v. 106, n. 4, p. 442-8, Oct 1996.

GUO, J. Q. *et al.* BCR-ABL protein expression in peripheral blood cells of chronic myelogenous leukemia patients undergoing therapy. **Blood**, v. 83, n. 12, p. 3629-37, Jun 1994.

HEHLMANN, R. *et al.* Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 370, n. 9584, p. 342-50, Jul 2007.

HIROSE, M. *et al.* Isolation of anti-glutathione antibodies from a phage display library. **Protein Eng**, v. 11, n. 3, p. 243-8, Mar 1998.

HOCHHAUS, A. *et al.* Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. **Leukemia**, v. 14, n. 6, p. 998-1005, Jun 2000.

HOLYOAKE, D. T. Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: lessons to be learned from the laboratory. **Br J Haematol**, v. 113, n. 1, p. 11-23, Apr 2001.

HONG, S. H. *et al.* Detection and quantification of the Bcr/Abl chimeric protein on biochips using LDI-TOF MS. **Chem Commun (Camb)**, v. 50, n. 37, p. 4831-4, May 2014.

HUGHES, T. ABL kinase inhibitor therapy for CML: baseline assessments and response monitoring. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 211-8, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Conduas do INCA: Leucemia Mieloide Crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 5-8, 2003.

INOKUCHI, K. Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. **J Nippon Med Sch**, v. 73, n. 4, p. 178-92, Aug 2006.

JÄGER, S. *et al.* Leukemia-targeting ligands isolated from phage-display peptide libraries. **Leukemia**, v. 21, n. 3, p. 411-20, Mar 2007.

KANTARJIAN, H. M. *et al.* Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses. **Blood**, v. 101, n. 1, p. 97-100, Jan 2003.

KAWAUCHI, K. *et al.* Involvement of Akt kinase in the action of STI571 on chronic myelogenous leukemia cells. **Blood Cells Mol Dis**, v. 31, n. 1, p. 11-7, 2003 Jul-Aug 2003.

KUFE, D.; WEICHSELBAUM, R. Radiation therapy: activation for gene transcription and the development of genetic radiotherapy-therapeutic strategies in oncology. **Cancer Biol Ther**, v. 2, n. 4, p. 326-9, 2003 Jul-Aug 2003.

KURZROCK, R. *et al.* Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. **Ann Intern Med**, v. 138, n. 10, p. 819-30, May 2003.

LE COUTRE, P.; SCHWARZ, M.; KIM, T. D. New developments in tyrosine kinase inhibitor therapy for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 6, p. 1771-80, Mar 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.

LIONAKIS, M. S. *et al.* Development of a ligand-directed approach to study the pathogenesis of invasive aspergillosis. **Infect Immun**, v. 73, n. 11, p. 7747-58, Nov 2005.

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

MANHANI, M. N. *et al.* Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 6, p. 322-9, Jun 2011.

MAURO, M. J.; DRUKER, B. J. STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. **Oncologist**, v. 6, n. 3, p. 233-8, 2001.

PARK, H. Y. *et al.* Screening of peptides bound to breast cancer stem cell specific surface marker CD44 by phage display. **Mol Biotechnol**, v. 51, n. 3, p. 212-20, Jul 2012.

PERROTTI, D.; TURTURRO, F.; NEVIANI, P. BCR/ABL, mRNA translation and apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 12, n. 6, p. 534-40, Jun 2005.

POSNER, R. G. *et al.* Continuous spectrofluorometric analysis of formyl peptide receptor ternary complex interactions. **Mol Pharmacol**, v. 45, n. 1, p. 65-73, Jan 1994.

QUINTÁS-CARDAMA, A.; KANTARJIAN, H.; CORTES, J. Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 10, p. 834-48, Oct 2007.

RUSSEL, M.; LOWMAN, H. B.; CLACKSON, T. Introduction to phage biology and phage display. In: CLACKSON, T.; LOWMAN, H. **Phage display**. Oxford: Oxford Unity Press, 2004. p. 1-26. Livro.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med**, v. 340, n. 17, p. 1330-1340, 1999.

SHARMA, A. *et al.* Quantum dots self assembly based interface for blood cancer detection. **Langmuir**, v. 29, n. 27, p. 8753-62, Jul 2013.

SHEN, D.; XIE, F.; EDWARDS, W. B. Evaluation of phage display discovered peptides as ligands for prostate-specific membrane antigen (PSMA). **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68339, 2013.

SHIRES, K. *et al.* Serine and proline-rich ligands enriched via phage-display technology show preferential binding to BCR/ABL expressing cells. **Hematol Oncol Stem Cell Ther**, v. 7, n. 1, p. 32-40, Mar 2014.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-7, Jun 1985.

SUTTROP, M.; MILLOT, F. Treatment of pediatric chronic myeloid leukemia in the year 2010: use of tyrosine kinase inhibitors and stem-cell transplantation. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2010, p. 368-76, 2010.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELO, J. VARDIMAN, J. W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, 4th edition, 2008.

TOHAMI, T.; NAGLER, A.; AMARIGLIO, N. Laboratory tools for diagnosis and monitoring response in patients with chronic myeloid leukemia. **Isr Med Assoc J**, v. 14, n. 8, p. 501-7, Aug 2012.

VODNIK, M. *et al.* Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 790-817, 2011.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 4, p. 227-32, Apr 2012.

WONG, S.; WITTE, O. N. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 247-306, 2004.

YANG, T. Y. *et al.* A multiple reaction monitoring (MRM) method to detect Bcr-Abl kinase activity in CML using a peptide biosensor. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56627, 2013.

ZHANG, Y.; ROWLEY, J. D. Chronic myeloid leukemia: current perspectives. **Clin Lab Med**, v. 31, n. 4, p. 687-98, x, Dec 2011.

ZHANG, Z.; ZHU, W.; KODADEK, T. Selection and application of peptide-binding peptides. **Nat Biotechnol**, v. 18, n. 1, p. 71-4, Jan 2000.

ANEXOS

ANEXO 1 – DATA SHEET DO PEPTÍDEO b2a2 BCR-ABL1.....	74
ANEXO 2 - DATA SHEET DO PEPTÍDEO b3a2 BCR-ABL1	52
ANEXO 3 – DATA SHEET DO PEPTÍDEO e1a2 BCR-ABL1.....	76
ANEXO 4 – ARTIGO PUBLICADO	77

ANEXO 1 – DATA SHEET DO PEPTÍDEO b2a2 BCR-ABL1

Peptide Analysis Data Sheet

Peptide Name : BCR_ABL_b2a2
Peptide Lot Number : 10-51806

Sequence : C-I-P-L-T-I-N-K-E-E-A-L-Q-R
molecular formula : C70 H122 N20 O22 S1

Ordered by Dr. Bonald de Cavalcante de Figueiredo

Quantity Ordered : 20.0 mg Quantity Delivered : 20.0 mg

HPLC Analysis

Instrument : SHIMADZU
Flow Rate : 1.0ml / min
Gradient : 0%-20% B in 2 min
 20%-50% B in 10 min
 50%-80% B in 2 min
 A;0.1%TFA water, B;0.1%TFA acetonitrile
Column : Shiseido capcell pak C18 Column
Detection : 220 nm
Purity : See Enclosed

Mass Analysis

Instrument : HP 1100 series LC/MSD
MS Expected : 1626.88
MS Found : 1627

Solubility

Soluble in water (1 mg/ml)

Comment :

Released by

**PEPTRON**

Tel +82-42-360-8890 Fax +82-42-360-8808
Email: peptide@peptron.com <http://www.peptron.com>

ANEXO 2 – DATA SHEET DO PEPTÍDEO b3a2 BCR-ABL1

Peptide Analysis Data Sheet

Peptide Name : BCR_ABL_b3a2
Peptide Lot Number : 10-51808

Sequence : C-G-F-K-Q-S-S-K-A-L-Q-R-P-V
molecular formula : C67 H113 N21 O19 S1

Ordered by Dr. Bonald de Cavalcante de Figueiredo

Quantity Ordered : 20.0 mg Quantity Delivered : 20.0 mg

HPLC Analysis

Instrument : SHIMADZU
Flow Rate : 1.0ml / min
Gradient : 0%-10% B in 2 min
 10%-40% B in 10 min
 40%-70% B in 2 min
 A;0.1%TFA water, B;0.1%TFA acetonitrile
Column : Shiseido capcell pak C18 Column
Detection : 220 nm
Purity : See Enclosed

Mass Analysis

Instrument : HP 1100 series LC/MSD
MS Expected : 1547.82
MS Found : 1548

Solubility

Soluble in water (1 mg/ml)

Comment :

Released by

**PEPTRON**

Tel +82-42-360-8890 Fax +82-42-360-8808
Email: peptide@peptron.com <http://www.peptron.com>

ANEXO 3 – DATA SHEET DO PEPTÍDEO e1a2 BCR-ABL1

Peptide Analysis Data Sheet

Peptide Name : BCR_ABL_e1a2
Peptide Lot Number : 10-51807

Sequence : C-G-A-F-H-G-D-A-E-A-L-Q-R-P
molecular formula : C62 H94 N20 O20 S1

Ordered by Dr. Bonald de Cavalcante de Figueiredo

Quantity Ordered : 20.0 mg Quantity Delivered : 20.0 mg

HPLC Analysis

Instrument : SHIMADZU
Flow Rate : 1.0ml / min
Gradient : 0%-20% B in 2 min
 20%-50% B in 10 min
 50%-80% B in 2 min
 A;0.1%TFA water, B;0.1%TFA acetonitrile
Column : Shiseido capcell pak C18 Column
Detection : 220 nm
Purity : See Enclosed

Mass Analysis

Instrument : HP 1100 series LC/MSD
MS Expected : 1470.67
MS Found : 1471

Solubility

Soluble in water (1 mg/ml)

Comment :

Released by



PEPTRON

Tel +82-42-360-8890 Fax +82-42-360-8808
Email: peptide@pepton.com <http://www.pepton.com>

ANEXO 4 – ARTIGO PUBLICADO

Appl Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s00253-014-5968-0

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING

Phage-displayed peptides as capture antigens in an innovative assay for *Taenia saginata*-infected cattle

Rafaela L. Fogaça · Janaina Capelli-Peixoto · Isabel B. Yamanaka · Rodrigo P. M. de Almeida · João Carlos D. Muzzi · Mariangela Borges · Alvimar J. Costa · Carlos Chávez-Olortegui · Vanete Thomaz-Soccol · Larissa M. Alvarenga · Juliana de Moura

Received: 5 May 2014 / Revised: 16 July 2014 / Accepted: 18 July 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Bovine cysticercosis is detected during the routine *post mortem* examination of carcasses by visual inspection (knife and eye method). However, the sensitivity of this procedure is several times lower than immunoassays, even when it is performed by qualified professionals. In the present study, a new generation capture antigens were screened from a phage display peptide library using antibodies from *Taenia saginata*-infected animals. Eight phage clones were selected, and one, Tsag 3 (VHTSIRPRCQPRAITPR), produced similar results to the *T. saginata* metacestode crude antigen (TsCa) when used as a capture antigen in an ELISA. The phage-displayed peptides competed with TsCa for binding sites, reducing the reactivity by approximately 30 %. Alanine scanning indicated that proline, arginine, and serine are important residues for

antibody binding. Tsag 1 (HFYQITWLPNTFFPAR), the most frequent affinity-selected clone, and Tsag 6 (YRWPSTPSASRQATL) shared similarity with highly conserved proteins from the Taeniidae family with known immunogenicity. Due to their epitopic or mimotopic properties, these affinity-selected phages could contribute to the rational design of an *ante mortem* immunodiagnosis method for bovine cysticercosis, as well as an epitope-based vaccine to interrupt the taeniosis/cysticercosis complex.

Keywords Bovine cysticercosis · Immunodiagnosis · Phage-displayed peptide · *Taenia saginata*

Rafaela L. Fogaça and Janaina Capelli-Peixoto contributed equally to this work.

R. L. Fogaça · J. Capelli-Peixoto · I. B. Yamanaka · R. P. M. de Almeida · J. C. D. Muzzi · M. Borges · L. M. Alvarenga · J. de Moura
Departamento de Patologia Básica, UFPR, Curitiba, PR, Brazil

R. L. Fogaça · V. Thomaz-Soccol · L. M. Alvarenga · J. de Moura
Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR, Curitiba, PR, Brazil

J. Capelli-Peixoto · I. B. Yamanaka · M. Borges · V. Thomaz-Soccol · L. M. Alvarenga · J. de Moura (✉)
Pós graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, UFPR, Curitiba, PR, Brazil
e-mail: julianademoura@ufpr.br

A. J. Costa
CPPAR—Centro de Pesquisas em Sanidade Animal, UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil

C. Chávez-Olortegui
Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte, Brazil

Introduction

Taenia saginata is a tapeworm responsible for zoonosis whose biological cycle is characterized by the taeniosis/cysticercosis complex. The complex occurs most commonly in environments that lack sanitation and/or effective methods of meat inspection and control. This parasitosis is found in both developing (Thomaz-Soccol et al. 2010) and developed countries (Dorny and Praet 2007; Allepuz et al. 2012; Calvo-Artavia et al. 2013).

The adult parasite is found in the small intestine of humans (taeniosis), the only definitive host. The life cycle involves the infection of cattle, which is the intermediate host, via the ingestion of *T. saginata* eggs scattered in pasture or water, culminating in the development of the infective larval stage (metacestode) in the musculature (cysticercosis). Human infection occurs by eating raw or improperly cooked bovine meat that contains the viable larval stage (Hoberg 2002).

The development of the metacestode in the bovine musculature rarely causes symptoms, but it causes financial losses to the livestock sector because of the condemnation of infected