

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS (scFv) CONTRA ISOLADOS DE CAMPO DO
VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA DAS GALINHAS
UTILIZANDO PHAGE DISPLAY**

Camila Cesário Fernandes

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS (scFv) CONTRA ISOLADOS DE CAMPO DO
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS
UTILIZANDO PHAGE DISPLAY**

Camila Cesário Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2010

Fernandes, Camila Cesário
F362p Produção de fragmentos de anticorpos monoclonais (scFv) contra
isolados de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas
utilizando "phage display" / Camila Cesário Fernandes - - Jaboticabal,
2010
xiv, 70 f.; il.; 28 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Hélio José Montassier
Banca examinadora: Camillo Del Cistia Andrade, Janete
Apparecida Desidério Sena.
Bibliografia

1. Bronquite_vírus. 2. Anticorpo monoclonal.. 3. Ave_bronquite.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 616.988:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAMILA CESÁRIO FERNANDES – Nascida aos 12 de abril de 1982, natural de Jaboticabal, Estado de São Paulo, formou-se em Ciências Biológicas modalidade licenciatura em março do ano de 2006 e modalidade bacharelado em junho de 2007 pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP/Jaboticabal. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq de fevereiro de 2003 a julho de 2004, no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP/Jaboticabal. Estagiou no laboratório de Genética de Bactérias e Biologia Molecular Aplicada, do Departamento de Biologia da FCAV/UNESP/Jaboticabal de agosto de 2004 a julho de 2006 e no laboratório de Imunologia e Virologia, do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP/Jaboticabal de agosto de 2006 a julho de 2007, tendo desenvolvido seu trabalho de graduação intitulado “Construção do gene codificador do fragmento de anticorpo monoclonal de cadeia única scFv anti-dioxina”. Ingressou no mestrado em agosto de 2007, no programa de Microbiologia Agropecuária na FCAV/UNESP/Jaboticabal.

Tudo posso

Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória
Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer ...
Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não entendem
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso... em Jesus!

Celina Borges

OFEREÇO

Aos meus pais,

Antonio Carlos e Neusa,

Pelo esforço, incentivo, confiança, por acreditarem no meu potencial e principalmente pela oportunidade para a minha realização profissional e pessoal. Vocês são os responsáveis pela pessoa em que me transformei hoje. Amo vocês!

A minha irmã

Catarine,

Sempre com uma palavra amiga nas horas certas....

Dedico a todos os cientistas que no decorrer dos anos contribuíram de maneira eficaz e inteligente para a ciência chegar aos perfis que é hoje.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, o princípio e o fim de todas as coisas, por estar presente em todos os momentos da minha vida, sejam estes de felicidade ou tristeza, e por tudo que tem me proporcionado, pela maneira paciente com que atende as minhas orações, pelo socorro nas horas de aflições, o meu muito obrigado!

Ao **Prof^o. Dr^o. Hélio José Montassier**, pela orientação, ensinamentos, dedicação e paciência, por ter acreditado em mim durante estes anos, sou muito grata pelas oportunidades que me concederam e por contribuir para meu crescimento profissional.

Aos **Prof^o. Dr^o. Jesus Aparecido Ferro** e a **Prof^a. Dr^a. Maria Inês Tiraboshi Ferro**, pela disponibilidade no uso dos equipamentos de seu laboratório e por deixar as portas sempre abertas para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao **Prof^o. Dr^o. Manoel Victor Franco Lemos** e a **Prof^a. Dr^a. Janete Ap. Desidério Sena**, pela constante disponibilidade no uso das facilidades do laboratório e contribuições extremamente valiosas.

A **Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes Macedo Lemos**, pela disponibilidade no uso dos equipamentos de seu laboratório e contribuições para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, **Prof^a. Dr^a. Janete Ap. Desidério Sena** e **Dr. Camillo Del Cistia Andrade** pela disponibilidade em participar da defesa e pelas inúmeras contribuições dadas para a finalização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Virologia, **Aliandra, Aline, Igor, Cíntia, Ketherson, Fátima, Phillip**, e em especial a técnica **Maria de Lourdes Feres Tamanini (Lurdinha)** e a minha amiga de hoje e sempre **Mariana**, pela ajuda,

dedicação, auxílios prestados nas horas difíceis, pelas conversas e por terem me amparado e ajudado na realização deste trabalho.

Aos amigos do BCC **Gustavo, Flávia** e em especial ao **Júlio**, pelas conversas, por me amparar nas horas difíceis, pelos conhecimentos passados e pela ajuda essencial que deram para o andamento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, pelo apoio, e em especial a técnica **Eliane Cristina da Cunha Alves**, agradeço a amizade e competência que sempre demonstrou e a ajuda sempre quando necessário.

Aos amigos de ontem, de hoje e os que ainda virão, pelas conversas nas horas boas e ruins, pelas bebedeiras, muito obrigada pelos anos de convivência, pela amizade conquistada, por confiarem em mim e por serem meus amigos, embora aqui não citados mais sempre lembrados.

A todos os funcionários do departamento de Microbiologia, agradeço o carinho e a atenção oferecida.

A **FAPESP** pelo apoio financeiro a este trabalho processo nº 07/57902-5 e pela bolsa de mestrado.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

A **MERIAL-Saúde Animal** pela doação dos ovos embrionados SPF.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV – UNESP de Jaboticabal, pelas condições oferecidas e apoio recebido.

Ao Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP de Jaboticabal, ao qual o Laboratório de Virologia e Imunologia está vinculado, onde este trabalho foi realizado.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra participaram de minha formação e na realização deste trabalho, aqui omitidos, mas não esquecidos, muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	4
III. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos Específicos	20
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Propagação e purificação do VBI	21
4.2. Biblioteca de anticorpos monoclonais contra o VBI no sistema de “phage display”	21
4.2.1. Extração de DNA plasmidial da linhagem TG1 de <i>E. coli</i> contendo a construção do fagomídio Pcantab5E + inserto gênico VH-LINKER-VL	22
4.2.2. Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	22
4.3. Recuperação da biblioteca com fago auxiliar M13K07.....	23
4.4. Seleção de fagos expressando fragmentos de anticorpos com especificidade para o VBI (“Panning”)	24
4.5. Preparação da placa mãe de <i>E. coli</i> TG1	26
4.6. Avaliação dos fragmentos de anticorpos apresentados em fagos a partir de clones enriquecidos (“Screening”)	26
4.7. Avaliação da especificidade dos fragmentos de anticorpos apresentados em fagos frente às proteínas do vírus da bronquite infecciosa pela técnica de Western Blotting	28
4.8. Análise da reatividade do clone C5P1 apresentado em fago frente à proteína N recombinante do VBI.....	29

4.9. Análise do gene codificador do fragmento de anticorpo recombinante apresentado em fago por seqüenciamento de nucleotídeos.....	30
4.10. Subclonagem em vetor pET28a.....	31
4.10.1. Oligonucleotídeos iniciadores.....	33
4.10.2. Extração de DNA plasmidial do clone C5P1.....	33
4.10.3. Amplificação do gene artificial VH-linker-VL-C5P1 para clonagem no vetor pET28a.....	33
4.10.4. Digestão do vetor pET28a.....	34
4.10.5. Purificação e quantificação do vetor pET28a e do produto gênico amplificado codificador de VH-linker-VL.....	34
4.10.6. Preparo de células competentes <i>E. coli</i> linhagem ER2566.....	35
4.10.7. Ligação do gene artificial VH-linker-VL-C5P1 ao vetor pET28a.....	35
4.10.8. Transformação das células competentes de <i>E. coli</i> ER2566.....	35
4.10.9. Seleção dos clones transformantes de <i>E. coli</i> ER2566.....	36
4.10.9.1. Análise dos clones bacterianos transformantes por meio da técnica de PCR com oligonucleotídeos iniciadores.....	36
4.10.9.2. Seqüenciamento de nucleotídeos dos clones bacterianos transformantes.....	37
4.10.10. Indução e expressão em mini-escala dos clones bacterianos transformantes A8C5P1, C3C5P1, D4C5P1 e G12C5P1 de <i>E. coli</i> ER2566.....	38
4.10.11. Análise da expressão dos fragmentos de anticorpos monoclonais por SDS-PAGE e Western Blotting.....	38
4.10.12. Expressão do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N3 em larga escala e concentração com PEG.....	39
4.10.13. Análise da expressão em larga escala do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N3 por SDS-PAGE e Western Blotting.....	40
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. Seleção dos fragmentos de anticorpos scFv de galinha contra o vírus da bronquite infecciosa.....	41

5.2. Seqüenciamento de nucleotídeos do gene VH-linker-VL presente no clone C5P1	46
5.3. Subclonagem em vetor pET28a e expressão do fragmento scFv solúvel em <i>E. coli</i>	48
5.3.1. Subclonagem do segmento gênico VH-linker-VL em vetor pET28a e transformação em <i>Escherichia coli</i> ER2566.....	48
5.3.2. Identificação dos clones bacterianos portadores do fragmento gênico VH-linker-VL.....	50
5.3.3. Produção do fragmento de anticorpo scFv-N3.....	51
VI. CONCLUSÃO	55
VII. REFERÊNCIAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS

BI: Bronquite Infecciosa
cDNA: ácido desoxiribonucleico complementar
CDR: regiões determinantes de complementariedade
DEPC: “Diethyl – pirocarbonate”
DNA: ácido desoxiribonucleico
DO: densidades ópticas
ELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
FR: “framework”
HI: inibição da hemaglutinação
HVR: regiões hipervariáveis
IPTG: isopropiltio- α -D-galactosídeo
LCA: Líquido Córeo Alantóide
LPD: leite em pó desnatado
OPD: Orto-Fenileno-Diamina
PEG: polietilenoglicol
PCR: Reação da Polimerase em Cadeia
PBS: solução salina tamponada com fosfato
PBS-T: solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF : polyvinylidene fluoride
RFLP: “Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNA :ácido ribonucleico
RNAm : ácido ribonucleico mensageiro
RT: transcrição reversa
scFv: “single chain fragment variable”
scFv-N: fragmento de anticorpo monoclonal de cadeia única contra a proteína N
SPF: “Specific Pathogen Free”
TA: temperatura ambiente

TBE: tampão tris-borato-EDTA

TCB: tampão carbonato bicarbonato

TCF: tampão citrato fosfato

VBI: Vírus da Bronquite Infecciosa

VH: gene codificador da porção variável da cadeia pesada de imunoglobulinas

VL: gene codificador da porção variável da cadeia leve de imunoglobulinas

VN: vírus-neutralização

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema contendo a organização estrutural do vírus da bronquite infecciosa e as quatro proteínas estruturais principais; a proteína de nucleocapsídeo (N), a glicoproteína da matriz (M), a pequena proteína de membrana (E) e a glicoproteína das espículas de superfície (S).....	7
Figura 2. Esquema contendo a organização estrutural do bacteriófago filamentosso M13 e as cinco proteínas da capa protéica; pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX.....	14
Figura 3. O vetor de expressão em <i>E. coli</i> pET 28a (Novagen)	32
Figura 4. Atividade ligante ao antígeno dos scFv expressos em bacteriófago filamentosso analisados por ELISA indireto	43
Figura 5. Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE mostrando as proteínas virais e Membrana de Western blotting mostrando a caracterização imunoquímica dos anticorpos apresentados em fago, forma insolúvel, positivos para reatividade cruzada com os três isolados de campo do VBI.....	44
Figura 6. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE e Membrana de Western blotting mostrando a caracterização do clone C5P1	45
Figura 7. Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácido das regiões variáveis das cadeias pesada e leve do gene scFv do clone C5P1	47
Figura 8. Eletroforograma do vetor pET28a digerido e da purificação do fragmento gênico VH-linker-VL do clone C5P1	49
Figura 9. Eletroforograma do DNA plasmidial extraído dos clones A8C5P1, C3C5P1, D4C5P1 e G12C5P1 amplificados por PCR, com combinação de oligonucleotídeos...	51
Figura 10. Análise da produção do fragmento de anticorpo scFv-N3.....	53

PRODUÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS MONOCLONAIS (scFv) CONTRA ISOLADOS DE CAMPO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS UTILIZANDO PHAGE DISPLAY

RESUMO - Anticorpos monoclonais se constituem na base de vários testes usados na detecção e na identificação de antígenos. Nesse contexto, tais imuno-reagentes têm sido extensivamente empregados na identificação de estirpes virais envolvidas na etiologia de surtos de bronquite infecciosa a campo, permitindo o aperfeiçoamento das técnicas de detecção e caracterização antigênica do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI). No presente estudo, uma biblioteca de fragmentos de anticorpos de galinha originalmente preparada por “phage display” contra a estirpe vacinal (H120) do VBI, foi usada para a seleção de fragmentos de anticorpos recombinantes com reatividade cruzada para as estirpes heterólogas IBVPR01, IBVPR05, isoladas de surtos a campo no Brasil e SE-17, isolada nos Estados Unidos. Após três ciclos de “panning”, foi identificado pelo ELISA um conjunto de 15 anticorpos scFv expressos em fagos e com reatividade cruzada para essas mesmas estirpes do VBI. A análise por Western-blotting revelou que três desses clones apresentavam fagos expressando fragmentos de anticorpos monoclonais com reatividade cruzada para a nucleoproteína N das três estirpes do VBI e também para a forma recombinante dessa nucleoproteína derivada da estirpe M41. Concluindo, os fragmentos de anticorpos monoclonais recombinantes scFv-N produzido em fagos interagem com um epítipo mais conservado da proteína N do VBI e apresentam um grande potencial para utilização na detecção e no diagnóstico direto desse vírus e no estudo de evolução de variantes desse vírus.

Palavras-chave: vírus da bronquite infecciosa, estirpes variantes, proteína de nucleocapsídeo, reatividade cruzada, anticorpos monoclonais recombinantes por phage-display.

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FRAGMENTS (scFv) AGAINST FIELD ISOLATES OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS OF CHICKENS BY PHAGE DISPLAY

SUMMARY - Monoclonal antibodies are the basis of various techniques used for antigen detection or characterization, and their use is specially recommended for the identification of viral strains involved in the etiology of outbreaks of infectious bronchitis, because these antibodies are homogeneous, highly specific and fully characterized, allowing the improvement of detection of immunological techniques and antigenic characterization of avian infectious bronchitis virus strains (IBV). We used a phage display library prepared previously against the IBV vaccine strain (H120) for the selection of new scFv antibody fragments reacting with heterologous IBV strains isolated from outbreaks in Brazil (IBVPR01, IBVPR05) and USA (SE-17). After three cycles of panning a set of 15 scFv antibodies was expressed in phages and exhibited cross-reaction in ELISA with these three viral strains. Western-blotting analysis showed that three of this clone set were expressing scFv specific for the nucleoprotein of these IBV strains, as well as to the recombinant form of this protein derived from M41 strain of IBV. In conclusion, the recombinant fragments of monoclonal antibodies expressed by phage-display technique have a great potential for future use in immunodiagnostic techniques and study the evolution of variant strains of this virus.

Keywords: infectious bronchitis virus, cross reactivity, nucleocapsid protein, variant strains, phage-display recombinant monoclonal antibodies

I. INTRODUÇÃO

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) é o agente etiológico da bronquite infecciosa (BI), uma enfermidade aguda e altamente contagiosa, que acomete aves da espécie *Gallus gallus*. Este vírus replica-se primariamente nas células epiteliais do aparelho respiratório e, após viremia, pode estabelecer sítios secundários de infecção em outros órgãos como os rins, ovidutos e no trato digestório, juntamente com o aparelho respiratório. Lesões de severidade variável podem ser encontradas, as quais se agravam pela ocorrência de infecções bacterianas secundárias, acarretando reduções consideráveis no desempenho produtivo das criações avícolas afetadas por esta virose.

Esta enfermidade está distribuída mundialmente e destaca-se como um dos mais importantes problemas sanitários para o plantel avícola, em virtude de acarretar acentuadas reduções na capacidade produtiva das aves afetadas com perdas econômicas consideráveis para a avicultura industrial.

O VBI, patógeno viral responsável por esta doença, pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e ao gênero *Coronavirus* constituindo-se no protótipo dessa família. Inicialmente com base nas propriedades antigênicas e sorológicas detectadas pela utilização de anticorpos poli e monoclonais, o VBI foi classificado no grupo 3, sendo tais resultados posteriormente confirmados pelo seqüenciamento genômico dos sorotipos mais relevantes desse vírus.

Este vírus é constituído por quatro diferentes proteínas estruturais; a glicoproteína de espícula (S) que é clivada pós-traducionalmente em duas subunidades (S1 e S2), a glicoproteína integral de membrana (M), a pequena proteína de membrana (E) e a proteína fosforilada de nucleocapsídeo (N). Diversas alterações podem ocorrer na composição, estrutura e propriedades antigênicas dessas proteínas, em decorrência de fenômenos de mutação e recombinação, que fazem parte da evolução do agente, e afetam os genes codificadores dessas proteínas. Esses eventos são responsáveis pela

elevada variabilidade genética e antigênica do VBI, o que torna extremamente difícil o controle desta doença.

Vários métodos têm sido investigados para a detecção e identificação do VBI e para a discriminação de estirpes variantes desse vírus, incluindo, os procedimentos de biologia molecular como RT-PCR, os testes de imunodiagnóstico, como a inibição da hemaglutinação (HI), a vírus neutralização (VN) e os testes imunoenzimáticos, especialmente quando realizados com anticorpos monoclonais contra os principais antígenos do VBI (proteína N, glicoproteína S1 e glicoproteína M).

Desta forma, a utilização de anticorpos monoclonais tem trazido uma contribuição relevante ao diagnóstico laboratorial da BI. A produção de anticorpos monoclonais contra o VBI, por sua vez, tem sido feita predominantemente por meio das técnicas convencionais de hibridoma, que apresenta uma série de limitações. Alternativamente a essa metodologia para o preparo de anticorpos monoclonais, existe a tecnologia de “phage display”. Esta última trata-se de um procedimento fundamentado no uso da tecnologia do DNA recombinante, que conduz a criação de uma biblioteca de apresentação de fragmentos de anticorpos monoclonais de cadeia única (scFv) em bacteriófagos, a fim de se selecionar clones relevantes, produtores de anticorpos, scFv, para o antígeno desejado.

Em suma, na técnica de “phage display”, a partir do RNA extraído de células B provenientes de órgãos linfóides de um animal imunizado, é possível obter, por técnicas de RT-PCR, uma biblioteca dos genes codificadores das porções variáveis de cadeia pesada (VH) e de cadeia leve (VL) de imunoglobulinas, os quais são fusionados com o auxílio de uma seqüência codificadora de um peptídeo “linker” para reconstituir um gene artificial (VH-linker-VL) o qual codifica os diversos fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) de anticorpos monoclonais. Através da inserção desse gene artificial em locais específicos do vetor fagomídeo é possível obter a produção de proteínas fusionadas, reunindo o scFv com a proteína III do fago filamentoso M13, que em condições apropriadas são expressas na superfície dos fagos, mantendo conservada sua atividade combinatória, e então podendo ser selecionados para o antígeno de interesse. Depois de avaliados quanto à especificidade, os fragmentos de anticorpos scFv podem

ser expressos na forma solúvel por células de *Escherichia coli*, que é um sistema de clonagem e expressão pioneiro e bem sucedido para a produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos.

Além disso, as aves, quando comparadas aos mamíferos, apresentam vantagens na produção de anticorpos monoclonais pela técnica de “phage display”, pois em seu repertório gênico para a produção de imunoglobulinas existem apenas um gene VH e um gene VL funcionais, que têm alteradas algumas de suas seqüências internas (CDRs) pela inserção de segmentos de pseudogenes de VH ou de VL. Assim, apenas um par de iniciadores é necessário para a amplificação de cada uma dessas regiões gênicas e, por conseguinte, a construção da biblioteca de anticorpos se torna relativamente mais simples.

Considerando todas as explicações anteriores, neste trabalho foram selecionados fragmentos de anticorpos monoclonais recombinantes com reatividade cruzada para as estirpes IBVPR01, IBVPR05 e SE-17, heterólogas a vacinal H120 do VBI, a partir de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos monoclonais anteriormente preparada por “phage display” derivada de células do baço de aves hiperimunizadas com a estirpe vacinal H120 do VBI para se selecionar fragmentos de anticorpos monoclonais contra três estirpes do VBI, tendo sido obtidos e caracterizados fragmentos de anticorpos monoclonais expressos em fagos com reatividade cruzada para epítomos conservados da proteína N dessas estirpes do VBI. Selecionou-se um clone, com especificidade para a proteína N do VBI, que teve seu gene codificador VH-linker-VL extraído e posteriormente ligado ao vetor pET28a (Novagen) que foi utilizado na transformação de *E. coli* (ER2566) para que o fragmento de anticorpo com especificidade para a nucleoproteína (scFv-N) e com reatividade cruzada para as três estirpes de campo do VBI fosse expresso, sob a forma solúvel.

II. REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com a Organização Internacional de Epizootias, a bronquite infecciosa (BI) é uma doença aguda e altamente infecciosa de aves, caracterizada primeiramente por sintomas e lesões no trato respiratório (OIE, 2000). A BI foi observada pela primeira vez em 1930, no estado norte-americano de Dakota do Norte, sendo descrita por Schalk & Hawn (1931). No Brasil, foi diagnosticada primeiramente por Hipólito em 1957.

O agente etiológico dessa patologia é o vírus da bronquite infecciosa (VBI) que acomete aves de ambos os sexos e das mais diferentes idades, seja na produção de frangos de corte, na produção de ovos e, ainda em aves reprodutoras. Essa enfermidade ocorre praticamente em todas as regiões do mundo, onde são desenvolvidas atividades na avicultura industrial. O controle dessa enfermidade é extremamente difícil devido à existência de múltiplos sorotipos e variantes do vírus que podem não responder a proteção cruzada induzida pelas estirpes vacinais de referência (CAPUA, 1999; DI FABIO & ROSSINI, 2000; CAVANAGH & NAQI, 2003; CAVANAGH & GELB, 2008).

Assim, por ser o Brasil um dos maiores produtores avícolas do mundo, a BI configura-se como um grande problema para a avicultura nacional (DI FABIO et al., 2000) e as informações relatadas acima, revelam a importância de serem adotados métodos de diagnóstico rápidos e sensíveis para a detecção e identificação do VBI, a fim de serem utilizados nos programas de controle desta doença.

O VBI pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e gênero *Coronavirus* (grupo III), possuindo um genoma de 27,6 Kb de comprimento, constituído de uma fita de RNA simples, não segmentada, com polaridade positiva. As partículas virais são pleomórficas, apesar de haver predominância de partículas esféricas, com aproximadamente 120nm de diâmetro, e o virion apresenta projeções em sua superfície, as quais conferem um formato de coroa (*Coronavirus*). Quatro diferentes proteínas estruturais foram identificadas no VBI, a proteína de nucleocapsídeo (N), a glicoproteína da matriz (M), a pequena proteína de membrana (E) e a glicoproteína das

espículas de superfície (S), a qual é clivada pós-traducionalmente em duas subunidades S1 e S2 (LAI & CAVANAGH, 1997; CAVANAGH, 2005; 2007).

A glicoproteína M interage com o nucleocapsídeo interno da partícula viral e tem cerca de 230 aminoácidos, sendo que desses, somente 10% estão exteriorizados no envelope viral. Além da glicoproteína M, são encontradas pequenas quantidades de uma proteína pequena não-glicosilada (proteína E) que é formada por aproximadamente 100 aminoácidos. Essas duas proteínas são necessárias para a maturação e formação de partículas virais íntegras e maduras do VBI (CAVANAGH, 2007).

A proteína do nucleocapsídeo (N) está intimamente relacionada com o RNA genômico e apresenta um bom grau de conservação em sua seqüência de nucleotídeos, ocorrendo, entretanto, pequenas variações entre as diferentes estirpes do VBI (BOURSNELL et al., 1985; BOURSNELL et al., 1987; CAVANAGH, 1995). Foi demonstrado também que a proteína N é a principal proteína do capsídeo, sendo produzida em grande quantidade durante a infecção viral. Apresenta uma estrutura altamente conservada, com cerca de 94 a 99% de identidade entre as várias estirpes do VBI. Segundo RESENDE (2003), grandes mutações na proteína N poderiam afetar a estabilidade e a viabilidade viral. É altamente imunogênica, sendo, por conseguinte capaz de induzir a produção de anticorpos específicos e de linfócitos T efetores com atividade específica, sobretudo aqueles com ação citotóxica (SEO et al., 1997). Dessa forma, a proteína N do VBI reúne um número significativo de atributos para se constituir no antígeno de eleição para detecção do VBI, ou de anticorpos anti-virais específicos, presentes em amostras clínicas colhidas de aves suspeitas de infecção pelo VBI (NDIFUNA et al., 1998).

A glicoproteína S, por sua vez, encontra-se intimamente associada com o envelope viral, sendo que a subunidade S2 atua no sentido de fixar essa molécula na camada bi-lipídica do envelope viral, enquanto que a subunidade S1, mais externa e globular, é responsável pela interação com receptores específicos presentes na superfície de células alvo da infecção pelo VBI para que ocorra a adsorção viral a tais células (CAVANAGH, 2007).

Em vista da relevância da glicoproteína S para a infectividade do VBI; uma vez que interage com receptores de células alvo, foram encontrados, na subunidade S1, sítios antigênicos indutores de anticorpos vírus-neutralizantes (VN) e inibidores da hemaglutinação (HI), levando a associação desta proteína como a principal estrutura antigênica responsável pela indução de respostas protetoras nas aves imunizadas, após convalescença de infecção ou vacinação, ou ainda pela caracterização dos diferentes sorotipos do VBI (KOCH et al., 1990; IGNJATOVIC & GALLI, 1994; GELB et al., 1997; LAI & CAVANAGH, 1997; WANG et al., 2002).

A glicoproteína S apresenta oito sítios antigênicos importantes, sendo que seis estão presentes na fração S1, e foram identificados como S1-A/B/C; que se encontram sobrepostos e S1-D, S1-E, e S1-F, enquanto que, na fração S2, localizam-se mais dois sítios, S2-G e S2-H. Foi relatado, também, que esses sítios, com exceção de S1-F e S2-H, podem induzir a produção de anticorpos VN (CAVANAGH et al., 1984; MOCKETT et al., 1984; KOCH et al., 1990; KOCH et al., 1991). Outro aspecto interessante está relacionado à grande variabilidade existente no gene S1, especialmente em determinadas regiões definidas como hipervariáveis (HVRs). Três dessas regiões foram mapeadas e denominadas HVR-1, HVR-2 e HVR-3, sendo estas, responsáveis pela interação com anticorpos VN, por isso, constituem-se em determinantes dos sorotipos específicos apresentados pelas diversas estirpes variantes do VBI (MOORE et al., 1998).

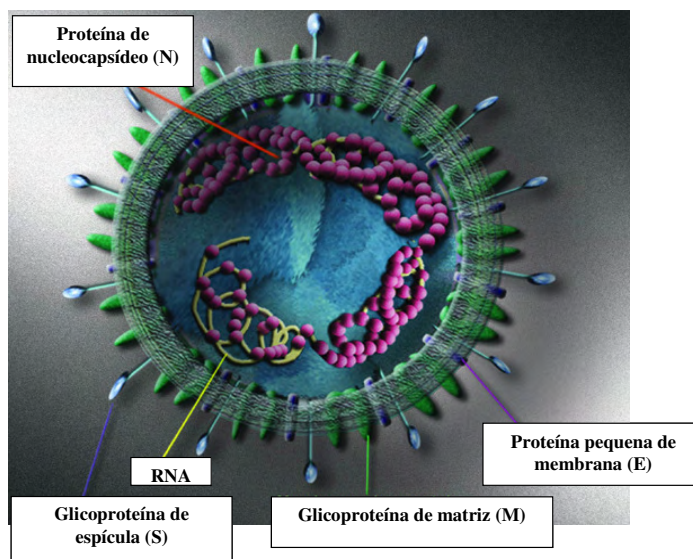


Figura 1. Esquema contendo a organização estrutural do vírus da bronquite infecciosa e as quatro proteínas estruturais principais; a proteína de nucleocapsídeo (N), a glicoproteína da matriz (M), a pequena proteína de membrana (E) e a glicoproteína das espículas de superfície (S) (www.cellresearch.com/20033/20033COVER.htm).

A evolução do VBI é um fenômeno freqüente, pois este vírus apresenta alta capacidade de variabilidade genética, o que se traduz pelo aparecimento de alterações marcantes na composição, estrutura e propriedades antigênicas de suas proteínas. Essas alterações acarretam mudanças relevantes nas características fenotípicas, como por exemplo, nas propriedades antigênicas e naquelas associadas à virulência e/ou a patogenicidade desse agente infeccioso, sendo descritos em diversas partes do mundo mais de 20 sorotipos (CAVANAGH et al., 1992; IGNJATOVIC & SAPATS, 2001; CAVANAGH & NAQI, 2003).

A existência e a geração continuada de diferentes estirpes estão diretamente relacionadas com a ocorrência de fenômenos de deleção, mutação e recombinação do RNA genômico viral (KUSTERS et al., 1989; CAVANAGH et al., 1992; LEE & JACKWOOD, 2000). Há ainda, evidências da ocorrência de recombinação natural entre as diferentes estirpes do VBI (KUSTERS et al., 1990; WANG et al, 1993; JIA, 1995).

Como consequência de mutações e recombinações gênicas, há o aparecimento das variações antigênicas e biológicas entre as estirpes do VBI (HOPKINS, 1974; DARBYSHIRE, 1978; COOK, 1984; CAVANAGH, 2007). A grande variabilidade que ocorre nos *coronavirus* aviários se configura na principal causa de perdas econômicas à produção avícola mundial, devido ao aparecimento de novos sorotipos ou variantes, que antigênica e geneticamente são distintas das estirpes selvagens e vacinais (GELB et al., 1991).

Quanto à patogenia da infecção pelo VBI foi verificado que ela pode evoluir sob quatro formas clínicas e anatomopatológicas diferentes. Durante as primeiras semanas de vida das aves, ocorrem sinais respiratórios caracterizados por espirros, estertores úmidos da traquéia, morbidade alta e mortalidade elevada. Nos frangos de corte, sob a forma de nefrite-nefrose, com aumento acentuado dos rins, diarreia aquosa, morbidade e mortalidade variáveis (5 a 20%). Nas poedeiras e reprodutoras, ocasionam queda de postura (5 a 30%), produção de ovos defeituosos (casca mole, rugosa, despigmentada), na fase de recria, urolitíase, completa atrofia renal, morbidade e mortalidade variáveis (2 a 10%) (SILVA, 1989; CAVANAGH & NAQI, 1997; DI FÁBIO & ROSSINI, 2000).

As estirpes do VBI, independente do seu tropismo, infectam primariamente células ciliadas da mucosa do aparelho respiratório das aves e produzem lesões características na traquéia, que é o órgão de eleição para sua multiplicação, sendo por isto uma doença primária do aparelho respiratório (KING & CAVANAGH, 1991). No entanto, a patogenia deste vírus é variável, em termos de tropismo tecidual, apresentando não somente tropismo para o trato respiratório, como também tropismo para células dos rins, dos ovidutos e, ou, do aparelho digestório, de acordo com o patotipo da estirpe viral (DHINAKAR & JONES, 1996).

Há também, alguns patotipos do VBI que causam lesões renais mais proeminentes, de vários graus de comprometimento dos tecidos que compõe esse órgão e estão relacionados à etiologia da nefrite-nefrose aviária (KING & CAVANAGH, 1991); recentemente, foi isolada uma estirpe nefropatogênica em Israel (MEIR et al., 2004). Outros aspectos curiosos, dentro do estudo de variantes de patotipos do VBI foram descritos quando houve o isolamento de uma variante enterotrópica que foi capaz

de causar lesões em algumas partes do intestino, bem como o de uma outra variante que causa miopatia peitoral apresentando edema gelatinoso e hemorragia no músculo peitoral das aves (KING & CAVANAGH, 1991; DHINAKAR & JONES, 1996).

A BI é uma das doenças aviárias mais difíceis de serem controladas, pois o VBI dissemina-se muito rapidamente, por via aerógena entre as aves de uma granja, devido ao período bastante curto de incubação desse vírus (18-48h) e de sua natureza altamente contagiosa e, ainda levando-se em consideração que milhares de aves são criadas dentro de um mesmo galpão. Acresce-se ainda o fato desse vírus estar presente nas secreções respiratórias, nas fezes, sendo facilmente disseminado por meio de aerossóis.

Embora menos freqüente, foi relatado que ocorre a transmissão mecânica do VBI por seres humanos através de roupas ou calçados contaminados e mesmo por meio de fômites, equipamentos usados no manejo de aves infectadas. Nesse sentido, deve ser destacado, ainda, que o VBI pode penetrar no organismo das galinhas através de inalação ou ingestão de alimentos ou água contaminada, passando a se replicar inicialmente no trato respiratório superior (DI FABIO et al., 2000; ABREU et al., 2006).

Desde a descrição do primeiro isolado do VBI no Brasil por HIPÓLITO (1957), este vírus tem sido continuamente isolado em varias regiões do país e tem sido associado a diversos tipos de manifestações patológicas (DI FABIO et al., 2000; ITO et al., 2006; VILLARREAL, 2007). Na década de 80 foi reportado o isolamento no Brasil, de VBI com características antigênicas similares ao sorotipo Arkansas (BRANDEN et al., 1986) e, no início da década de 90, WENTZ (1992) demonstrou alguns isolados brasileiros com características sorológicas bem distintas daquelas das estirpes de referência e que eram relacionadas ao sorotipo Massachusetts (M41), Arkansas, ou Connecticut. Nessa mesma linha de pesquisa DI FABIO et al. (2000) através de técnica de vírus-neutralização realizada com 15 amostras brasileiras observaram que apenas uma apresentava relação de proximidade com o sorotipo Massachusetts, ao passo que as restantes tiveram que ser classificadas em quatro grupos antigênicos distintos.

No Brasil, a presença de um número significativo de variantes genéticas do VBI com características distintas das estirpes de referência de outros países, tem sido

relatada com elevada frequência desde o ano de 2000 (MONTASSIER et al., 2006; VILLARREAL, 2007).

Assim, a circulação de variantes do VBI, no Brasil e no mundo, destaca a importância de se procurar desenvolver ferramentas de diagnóstico direto que sejam mais efetivas e práticas, para serem empregadas no diagnóstico laboratorial desse vírus, tal como se configuram as diversas técnicas de imunodiagnóstico, tendo como imuno-reagentes anticorpos monoclonais contra os principais antígenos do VBI.

Em vista de tudo que foi apresentado acima, podemos conceber que as estirpes de VBI existentes atualmente em nosso país provavelmente já estavam circulando no plantel avícola nacional há um longo tempo, antes mesmo da introdução de procedimentos imunoprolifáticos com vacinas vivas constituídas principalmente pelas estirpes do genótipo/sorotipo Massachusetts. Ainda, deve-se ter em mente que um número considerável de estirpes brasileiras do VBI pode ser classificado em um único grupo constituído de amostras autóctones, o qual difere de todos os demais grupos já descritos em estudos filogenéticos anteriormente realizados e que reúnem estirpes conhecidas desse mesmo vírus e oriundas das mais diversas partes do mundo (MONTASSIER et al., 2006; VILLARREAL, 2007).

As medidas que tem sido mais amplamente adotadas para o controle da BI fundamentam-se na combinação de abordagens básicas de biossegurança (isolamento, lotes próximos com idade uniforme, limpeza, desinfecção e vazio sanitário), juntamente com programas imunoprolifáticos elaborados em conformidade com as condições específicas de cada região do país.

O controle da BI está principalmente fundamentado no uso de vacinas formuladas com estirpes "vivas" e atenuadas do VBI, ou ainda de vacinas constituídas por estirpes inativadas associadas a adjuvantes oleosos (CAVANAGH & NAQI, 2003). No entanto, a BI permanece, em vários países, inclusive no Brasil, como um dos problemas mais proeminentes para a sanidade avícola, mesmo com a ampla utilização das vacinas acima mencionadas, que não impedem o aparecimento freqüente de novos sorotipos e estirpes variantes do VBI (GELB et al., 1991), indicando a importância e a necessidade de que se busquem novas alternativas de preparações imunogênicas mais

eficazes para fazer frente aos mecanismos de evasão desse vírus que não raro conduzem a ruptura do estado de imunidade conferido por essas vacinas nos hospedeiros imunizados (CAPUA, 1994; JIA, 1995; MONTASSIER et al., 2006; VILLARREAL, 2007).

Os métodos de diagnóstico convencionais do VBI são baseados no isolamento viral em ovos embrionados livres de patógenos específicos (“Specific Pathogen Free” – SPF) (GELB et al., 1989) ou em cultura celulares (HOPKINS, 1974), seguidos da identificação antigênica dos vírus isolados pelas técnicas de vírus-neutralização (VNT) ou inibição da hemaglutinação (HI) (DHINAKAR RAJ & JONES, 1996).

Para a detecção e identificação do VBI podem também ser usadas as técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia pela polimerase, antecedida pela reação de transcrição reversa (RT-PCR) da forma convencional e pela PCR em tempo real antecedida pela transcrição reversa (RT-PCR) e associadas com a técnica de polimorfismo do tamanho de fragmentos do genoma do VBI gerados por enzimas de restrição (RFLP) se constituem nas técnicas mais recentes e precisas para fazer o diagnóstico e diferenciação das estirpes variantes desse vírus, mas que ainda apresentam custos bastante elevados (DE WIT, 2000; MEIR et al., 2009).

Outra alternativa para o diagnóstico laboratorial da BI é a técnica de isolamento do VBI a partir da inoculação em anéis traqueais de embriões SPF, que se revelou bastante sensível. Esse método pode ser associado a reação de imunofluorescência direta, permitindo a detecção mais rápida do VBI (BHATTACHARJEE et al., 1994). O VBI pode ser também detectado diretamente em tecidos de aves infectadas por meio de técnicas de imunohistoquímica ou por hibridização *in situ* (HANDBERG, 1999).

Dentre as alternativas de procedimentos de imunodiagnóstico, IGNJATOVIC & ASHTON (1996); KARACA e colaboradores (1992) demonstraram que anticorpos monoclonais contra importantes epítomos das proteínas S, N e M do VBI são capazes de fazer a diferenciação entre estirpes vacinais do VBI e outras amostras isoladas de plantéis vacinados. Esses mesmos anticorpos permitiram verificar os níveis de similaridade antigênica entre as amostras isoladas do VBI, identificando a presença de importantes mutações nas estirpes variantes, bem como diferenciando esses vírus,

independente se eles eram ou não do mesmo sorotipo. Em outros estudos, KANT e colaboradores (1992) relataram que anticorpos monoclonais contra a glicoproteína S1 do VBI permitiram a seleção de mutantes resistentes à neutralização, os quais após a análise da seqüência de nucleotídeos do gene da proteína S desses vírus variantes, bem como a seqüência deduzida de aminoácidos dessa mesma proteína, mostraram a presença de cinco sítios antigênicos mais relevantes e que estavam diretamente envolvidos na interação com anticorpos VN. Dentre estes sítios, três eram similares a sítios antigênicos identificados em outras espécies de *coronavirus*.

Com relação à proteína N do VBI IGNJATOVIC e McWATERS (1991), produziram anticorpos monoclonais, pela técnica de hibridoma, que foram capazes de caracterizar e diferenciar estirpes desse mesmo vírus. Estes anticorpos eram voltados para epítomos internos da proteína de nucleocapsídeo, e diferenciaram as estirpes do VBI em cinco grupos antigênicos distintos.

Fica evidente, portanto, a importância da utilização de anticorpos monoclonais na caracterização da variabilidade antigênica que ocorre entre estirpes isoladas do VBI. Tais anticorpos permitem fazer a investigação molecular dos epítomos e, quando usados em conjunto a dados de análises genéticas ou bioquímicas complementares, apresentam um elevado poder discriminatório em ensaios imunológicos apropriados. Nesse sentido, verifica-se que a utilização de anticorpos monoclonais sorotipo-específicos para as estirpes Massachusetts-41, Arkansas e Connecticut tem sido fortemente recomendada na identificação de sorotipos envolvidos nos surtos a campo de bronquite infecciosa (KARACA et al., 1992; IGNJATOVIC & ASHTON, 1996; CAPUA, 1999).

Quanto aos procedimentos usados para a produção de anticorpos monoclonais, constata-se que após a publicação do artigo original sobre a produção de anticorpos monoclonais em cultura de células por KÖHLER & MILSTEIN (1975), os métodos e estratégias para produção desse tipo de anticorpos evoluíram bastante, incorporando a manipulação genética e trazendo os anticorpos ao cenário biotecnológico. As flexibilidades na manipulação genética e o acúmulo de informações sobre estrutura e função fizeram das imunoglobulinas, um produto de alto valor econômico e com

grandes perspectivas. A gama de especificidade aliada à versatilidade de construção e configuração do sítio ligante ao antígeno faz dos anticorpos um excelente modelo de estudo em interação molecular e uma matéria-prima para gerar imunoderivados com ação farmacológica, diagnóstico e como marcadores moleculares, onde progressivamente, tais anticorpos vêm substituindo os anticorpos monoclonais convencionais obtidos de hibridomas (FILPULA, 2007; MARASCO & SUI, 2007).

O avanço da tecnologia do DNA recombinante permitiu o desenho de moléculas recombinantes de anticorpos artificiais que se comportam de forma idêntica ao anticorpo original. Os anticorpos recombinantes são normalmente produzidos na forma de fragmentos polipeptídicos que preservam o parátopo do anticorpo original. A forma mais comumente produzida e aplicada é o fragmento de cadeia única das regiões variáveis de anticorpo (scFv). Esses fragmentos de anticorpos apresentam peso molecular de cerca de 30 kDa e, contém os domínios variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo, que se encontram unidos por um peptídeo conector (“linker”) (BRÍGIDO & MARANHÃO, 2002).

Vetores capazes de promover a síntese de anticorpos ou de seus fragmentos recombinantes em clones de bactéria ou de células animais em cultura foram descritos anteriormente (RUSSEL et al., 2004). Devido à facilidade de manipulação destes vetores, tornou-se possível a construção de moléculas com as mais diversas formas e funções (ANDRADE et al., 2000), onde é possível se escolher a função e o desenho da molécula a ser sintetizada.

Diversas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para expressar uma grande variedade de polipeptídios na superfície de bacteriófagos, de bactérias, de leveduras ou de outros vírus (MARASCO & SUI, 2007). A técnica de expressão de proteínas na superfície de bacteriófagos filamentosos é um mecanismo considerado simples e que permite relacionar a proteína selecionada para a característica desejada à seqüência de DNA e, em adição a isso, possibilita a seleção de bibliotecas compostas por até 10^{12} clones (WITTRUP, 1999).

Essa técnica foi desenvolvida por GEORGE SMITH em 1985, o qual expressou pela primeira vez a enzima de restrição *EcoRI* fusionada a proteína oito (pVIII) do

capsídeo de um bacteriófago. Tipicamente, é utilizado o bacteriófago M13, um vírus filamentososo que parasita bactérias gram-negativas que por sua vez apresentam pilus F. Esse vírus é formado por uma fita simples de DNA envolta em uma capa protéica constituída de cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) e utiliza a maquinaria de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir. Neste sistema o gene codificador da proteína de interesse é fusionado a um dos genes codificadores das proteínas da capa protéica do fago. Quando as partículas do fago são produzidas numa célula de bactéria, a proteína híbrida do capsídeo é incorporada à partícula viral e o DNA do fago contendo o gene fusionado, é empacotado (RODI & MAKOWSKI, 1999). Assim é possível expressar uma população de diversos peptídeos e empregar estes fagos em estudos de interação entre proteínas, estabilidade, entre outros, promovendo uma rápida purificação de peptídeos com as características desejadas (SCOTT & SMITH, 1990).

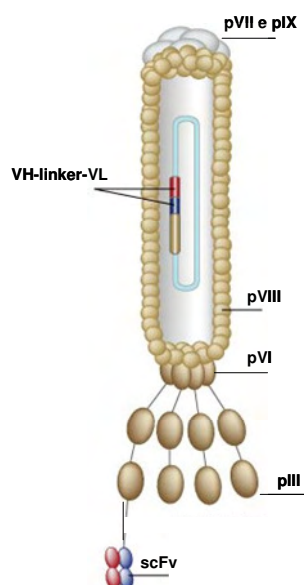


Figura 2. Esquema contendo a organização estrutural do bacteriófago filamentososo M13 e as cinco proteínas da capa protéica; pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX.

Segundo KICZAK e colaboradores (2001), a grande vantagem deste método é a ligação direta que se tem entre o fenótipo observado e um genótipo encapsidado que permite a rápida obtenção da seqüência gênica de interesse que foi selecionada. De maneira geral, duas abordagens básicas podem ser feitas com esta técnica. A primeira é a inserção de uma mutação em um gene estrutural do vírus levando a expressão do peptídeo mutado na superfície da partícula viral em condições tais que as funções essenciais do produto daquele gene não sejam afetadas. A segunda abordagem é a produção de uma biblioteca de peptídeos a partir da inserção de um oligonucleotídeo degenerado, o qual será expresso como fusão de uma das proteínas da capa viral (RODI & MAKOWSKI, 1999). Segundo MAKOWSKI (1994), a perfeita exposição de um peptídeo na superfície do fago possibilita a atuação desta proteína como um ligante, uma enzima ou um imunógeno que desempenha uma determinada função em processos biológicos.

Como qualquer outra técnica de biologia molecular, existem limitações que devem ser destacadas. Por compreender um sistema biológico, este responde de maneira diferente a diversas mutações que podem ser feitas. Algumas mutações podem acarretar problemas na replicação enquanto outras podem ser extremamente vantajosas para o fago, tanto em relação ao crescimento, como em relação à estabilidade da partícula viral (RODI & MAKOWSKI, 1999). Outras limitações observadas por ADEY e colaboradores (1995), compreendem a seleção de uma classe de fagos que são isolados por se ligarem diretamente ao plástico (poliestireno) dos tubos utilizados no processo de seleção. Porém os autores destacam que se esse processo for realizado de maneira eficiente, uma quantidade significativamente maior de fagos que se liga a proteína alvo deve estar presente, mascarando os fagos selecionados por se ligarem ao poliestireno. Para evitar ou minimizar estes problemas, os autores sugerem que seja usado uma alta quantidade da proteína alvo a ser imobilizada e que os tubos de seleção sejam bloqueados. Este conjunto de limitações é responsável por problemas que fazem com que algumas das aplicações desta técnica não tenham sido bem sucedidas (WILSON & FINLAY, 1998).

É de grande destaque dentro da tecnologia de “phage display” a expressão de fragmentos funcionais de anticorpos que, após sua apresentação pelo fago, podem ser selecionados de acordo com sua afinidade de ligação e especificidade para testes de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, e também imunoterapia para uma grande diversidade de patologias (BENHAR, 2001; AZZAZY & HIGHSMITH JR, 2002; KRETZCHMAR & VON RUDEN, 2002). Isso foi alcançado com a fusão das regiões codificadoras da porção variável do anticorpo (Fv) na porção amino-terminal do gene III do fago M13, originando o fragmento de cadeia única de anticorpo (scFv – “single chain fragment variable”) (McCAFFERTY et al., 1990).

A apresentação de fragmentos de anticorpos na superfície de fagos torna possível, dentre outras coisas, mimetizar a seleção que ocorre em nível do sistema imune, através da randomização de seqüências codificadoras das regiões determinantes de complementariedade (CDRs) ou da construção de bibliotecas combinatórias de VH e de VL de animais imunizados ou de pacientes. A obtenção de uma biblioteca combinatória de fragmentos de anticorpos se faz a partir do cDNA de linfócitos que serve como molde para uma reação de PCR, permitindo a construção de uma biblioteca de oligonucleotídeos sintéticos que potencialmente varre todo o genoma do imunoloma dos pacientes ou dos animais imunizados, possibilitando a produção de quase todo o repertório de especificidades de anticorpos desses indivíduos (SCHMITZ et al., 2000; BENHAR, 2001).

Com vistas à produção de anticorpos pela técnica de “phage display”, deve ser destacado que as aves apresentam diversas vantagens para o desenvolvimento desta metodologia quando comparada aos mamíferos, pois as aves contêm apenas um gene VH e um gene VL funcionais, e estes genes têm alteradas suas CDRs pela inserção de segmentos de pseudogenes de VH ou de VL. Assim, apenas um par de iniciadores é necessário para a amplificação da região variável de cada uma dessas cadeias e, por conseguinte, a construção da biblioteca de anticorpos se torna relativamente mais simples (REYNAUD et al., 1987; REYNAUD et al., 1989; McCOMARK et al., 1993; ANDRIS-WIDHOPF et al., 2000).

Inúmeros pesquisadores têm construído anticorpos monoclonais recombinantes derivados de linfócitos B de galinhas imunizadas, pela técnica de “phage display”, contra uma variedade de proteínas virais, como por exemplo, contra o vírus da doença de Gumboro (SAPATS, et al., 2003; 2006) e do próprio vírus da bronquite infecciosa das galinhas – VBI (CAETANO, et al., 2009; CAETANO 2009), obtendo sucesso, tanto na detecção como neutralização destes patógenos virais.

A construção do fragmento de anticorpo scFv pressupõe que os genes VH e VL amplificados sejam fusionados com o auxílio de uma seqüência de nucleotídeos “linker” para reconstituir genes artificiais (VH-linker-VL) os quais são capazes de codificar os diversos fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) de anticorpos monoclonais (KRETZSCHMAR & VON RUDEN, 2002).

Deve-se destacar ainda que, através da inserção desses genes em locais específicos do vetor fagomídeo é possível produzir proteínas de fusão reunindo o scFv com a proteína III do fago filamentoso M13, sendo que sob condições apropriadas de estímulo, tais proteínas de fusão são expressas na superfície dos fagos, mantendo conservada a atividade combinatória dos scFv assim expressos, podendo ser selecionados para o antígeno de interesse (KRETZSCHMAR & VON RUDEN, 2002; SAPATS et al., 2003; 2006). Depois de avaliados quanto à especificidade, os scFv podem ser expressos na forma solúvel por células de *Escherichia coli*, que foi desde logo um dos primeiros hospedeiros a fazer parte de sistemas de clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos bem sucedidos (WALSH, 1998; GUO et al., 2003).

A produção heteróloga de proteínas recombinantes em *E. coli* corresponde uma etapa crítica em projetos biotecnológicos. A escolha de um sistema de expressão e otimização da produção depende da natureza da proteína heteróloga e de sua aplicação.

A descoberta de promotores e repressores específicos do genoma de *E. coli*, de uma variedade de vírus de *E. coli* e de células eucarióticas permitiu a manipulação da expressão de proteínas e a clonagem de genes sob o controle de um dado promotor cuja expressão pode ser induzida ou contínua. O primeiro, e mais comumente usado sistema de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é baseado no operon lac.

Neste sistema, o DNA de interesse é clonado em fago (no caso de biblioteca de cDNA de expressão) ou plasmídeo contendo o *lacI* (repressor), *lacP* (promotor) e *lacZ* (gene estrutural transcrito para mRNA da α -galactosidase). A indução da transcrição é obtida pela adição de um análogo da lactose sintético e não degradável, o IPTG (isopropiltio- α -D-galactosídeo), o qual se associa ao repressor e inibe-o, deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase e conseqüente transcrição do gene (WALSH, 1998).

Este sistema é amplamente difundido devido à facilidade e baixo custo de se cultivar *E. coli*, e pela reprodutibilidade e abundância de proteína que produz. Além disso, modificações nos vetores e linhagens de *E. coli* são freqüentemente feitas no sentido de aumentar a eficiência e versatilidade do sistema original. Com isto, e com o advento de novos sistemas de expressão em células de eucariotos (levedura, insetos, mamífero), a expressão de proteínas clonadas tornou-se uma abordagem poderosíssima que vem revolucionando os estudos de estrutura, função, purificação e identificação de novas proteínas (WEICKERT et al., 1996).

De maneira ideal, quando se pensa em expressão heteróloga, espera-se que a proteína de interesse seja estável, não tóxica para a bactéria, solúvel, produzida em grande quantidade e possa ser facilmente purificada. Um procedimento muito utilizado é o de expressar a proteína de interesse em fusão com um "tag" específico que permita a fácil purificação da mesma através de cromatografia por afinidade em resinas às quais se encontram acoplada a ligantes aos quais o "tag" possa se ligar especificamente. Uma outra vantagem óbvia de se produzir uma proteína de fusão, é no caso da expressão de polipeptídeos pequenos ou mesmo peptídeos, os quais, sem fusão, seriam instáveis e rapidamente degradados na célula (WALSH, 1998).

A produção de proteínas recombinantes é geralmente um processo simples, eficiente e de baixo custo, podendo suprir de imediato algumas necessidades da pesquisa básica, tais como, produção de anticorpos e purificação destes por afinidade, permitindo a expressão em grande escala, para fins industriais ou clínicos (WEICKERT et al., 1996; WALSH, 1998).

Atualmente são escassos os anticorpos mono e policlonais específicos para agentes infecciosos em medicina veterinária disponíveis, o que torna limitante a realização de pesquisas e também a aplicação de diversos métodos de imunodiagnóstico. Com isso, a evolução das técnicas de produção sintética de fragmentos de anticorpos funcionais possibilita a obtenção de anticorpos com alta sensibilidade e especificidade, fazendo com que a amplificação de seu uso se torne uma realidade que possa ser empregada no diagnóstico e diferenciação das estirpes do VBI que são constantemente isoladas em nosso país.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Contribuir com o diagnóstico etiológico e a imunoprofilaxia da bronquite infecciosa das galinhas, através da produção de fragmentos de anticorpos monoclonais pela técnica de “phage display” e fazer a aplicação de tais anticorpos em ensaios imunológicos destinados à detecção, à caracterização antigênica e à avaliação da reatividade cruzada de novos isolados de campo do VBI.

3.2. Objetivos Específicos

- Preparar fragmentos de anticorpos monoclonais (scFv) com reatividade cruzada para isolados de campo do VBI por “phage display” a partir de biblioteca existente de fagomídeos com inserção do gene VH-linker-VL obtida de cDNA do baço de aves hiperimunizadas com a estirpe de referência vacinal H120 do VBI.

- Avaliar a especificidade e efetividade desses anticorpos monoclonais produzidos em ensaios imunológicos contra estirpes/isolados de campo do VBI.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Propagação e purificação do VBI

Três diferentes isolados de campo do VBI cedidos pelo Laboratório de Patologia de Aves e Suínos da EMBRAPA - Concórdia – SC, IBVPR01; IBVPR05 e SE-17, foram propagados por meio da inoculação na cavidade alantóide de ovos embrionados de galinhas SPF (“specific pathogen free”), com 9 a 11 dias de incubação (GELB et al., 1989; GELB & JACKWOOD, 1998). Volumes de cerca de 500 mL do líquido alantóide proveniente da propagação de cada um desses isolados do VBI, foram colhidos 36 h após a inoculação, resfriados a 4 °C, por no mínimo 4 h e, em seguida, o líquido alantóide foi colhido e imediatamente centrifugado a 3.000 xg, 4 °C por 10 min, para a clarificação da suspensão viral.

A suspensão viral contida no líquido alantóide proveniente da propagação de cada um desses isolados do VBI foi concentrada pela adição de polietilenoglicol e cloreto de sódio (8,7% PEG-8000 e 2,7% NaCl). Em seguida, foi feita a purificação das partículas virais por meio de ultra-centrifugação usando-se gradientes contínuos e descontínuos de sacarose (CARDOSO et al., 1996; SOUSA et al., 2000).

4.2. Biblioteca de anticorpos monoclonais contra o VBI no sistema “phage display”

Uma biblioteca de fragmentos de anticorpos scFv associados a fagos, foi previamente preparada em nosso laboratório pela técnica de “phage display” em *Escherichia coli*, a partir do RNAm extraído do baço de galinhas hiper-imunizadas com a estirpe H120 de referência vacinal do VBI (CAETANO et al., 2009). Desta biblioteca foi feito um “pool” reunindo todas as colônias colhidas de 9 placas e preparados

estoques em glicerol para congelamento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1,2 mL de bactérias e 333 μL de glicerol 80%). Para se utilizar esta biblioteca em nosso estudo, foi feito, inicialmente, o descongelamento dessas células estocadas em glicerol e realizado protocolos de verificação da presença do inserto gênico VH-linker-VL nas células de *E. coli* TG1.

4.2.1. Extração de DNA plasmidial da linhagem TG1 de *E. coli* contendo a construção do fagomídio pCANTAB5E + inserto gênico VH-linker-VL

A extração de DNA plasmidial foi feita através do kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System - Promega de acordo com as especificações do fabricante. A quantificação do DNA plasmidial foi feita em gel de agarose com o padrão de quantificação molecular "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen) e com o auxílio do Biofotômetro (Eppendorf).

4.2.2. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Com o intuito de se verificar a presença do inserto gênico VH-linker-VL codificador dos fragmentos de anticorpos scFv nas células de *E. coli* TG1 da biblioteca de "phage display", foram feitas amplificações por meio da técnica de PCR, a partir das preparações extraídas de DNA plasmidial e usando-se os iniciadores específicos da extremidade 5' e 3' do gene VH-linker-VL. Previamente à aplicação dessas reações, elas foram otimizadas quanto aos parâmetros referentes à concentração de cada par de iniciadores e do perfil térmico de incubação. Após a avaliação acima foi definido um programa ideal de incubação para essa técnica de PCR, o qual ficou assim constituído: 1 ciclo de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min seguindo-se mais 30 ciclos, cada um composto por três passos; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min, para desnaturação do DNA, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min, para o anelamento e 2 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a extensão das fitas e um ciclo de extensão final de 10 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os produtos amplificados com os iniciadores na técnica de PCR, acima descrita, foram visualizados em gel de agarose. O gel utilizado para esta separação eletroforética

foi preparado na concentração de 1% de agarose fundida em tampão TBE 0,5x Tris-Borato (0,045 M), EDTA (1 mM), adicionado de 3 µL de brometo de etídio e submetidos a uma voltagem adequada às dimensões do gel. As bandas dos produtos amplificados foram visualizadas em transiluminador (UV) e fotodocumentadas. O padrão de tamanho molecular utilizado para a visualização dos fragmentos foi 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Após a verificação e comprovação de que o inserto gênico estava presente nas células de *E. coli* TG1 desta biblioteca foi feita a seleção de novos fragmentos de anticorpos scFv contra os isolados de campo do VBI: IBVPR01, IBVPR05 e SE-17 através de 3 ciclos seguidos de identificação-amplificação-purificação (“panning”).

4.3. Recuperação da biblioteca com fago auxiliar M13K07

As células da biblioteca a serem recuperadas foram diluídas em meio 2xTY (17 g triptona, 10 g extrato de levedura, 5 g NaCl e H₂O q.s.p. 1000 mL) até a DO A₆₀₀ de 0,3, obtendo-se um volume final de 120 mL. Adicionou-se ampicilina a uma concentração final de 100 µg/µL e glicose a uma concentração final de 2%. A cultura foi incubada a 37 °C e 250 rpm por uma hora, quando foi adicionado o fago auxiliar M13K07 à cultura, em uma multiplicidade de infecção (moi) de 5:1. Para determinar o volume de fago a ser adicionado, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$(5 \times 10^8 \text{ células/ U } A_{600}) \times (\text{moi de } 5) \times (\text{leitura obtida a } A_{600}) \times (\text{volume final de células})$$

Considerando-se que foi obtida uma leitura de A₆₀₀=0,354 e um volume final de 120 mL, foi então adicionado 1062 x 10⁸ pfu de fago auxiliar e, como este foi fornecido em uma suspensão contendo uma concentração de 5,3 x 10¹¹ pfu/mL, foram efetivamente adicionados 200,4 µL de fago auxiliar M13K07.

A cultura foi incubada por 2 h a 37 °C e 250 rpm, centrifugando-se posteriormente a 1.000 xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e as células ressuspensas em 30 mL de 2xTY-AK (meio 2xTY acrescido de ampicilina 100 µg/mL e kanamicina 50 µg/mL), transferindo-se para um outro erlenmeyer e

incubando-se a 37 °C, de 12-14 h a 250 rpm. No dia seguinte, as células foram sedimentadas a 1.000 xg por 20 min à temperatura ambiente (TA) e o sobrenadante, contendo os fagos, foi transferido para um tubo de centrifuga previamente autoclavado. Esse material foi utilizado no procedimento de seleção por meio do “panning”, o qual é descrito abaixo.

4.4. Seleção de fagos expressando fragmentos de anticorpos com especificidade para as estirpes heterólogas do VBI (“Panning”)

O “panning” tem como objetivo a captura dos fragmentos de anticorpos sob a forma de scFv apresentados em fagos que tenham afinidade para os antígenos alvo de interesse, que são adsorvidos a um suporte sólido. Abaixo estão descritos, em conjunto, os protocolos de precipitação dos fagos recombinantes e de “panning”.

Foram usadas mini-garrafas de cultura de 25 cm² (Costar, Corning, NY, USA) recobertas com 5 mL do conjunto das três estirpes do VBI – IBVPR01, IBVPR05 e SE-17 sob a forma de suspensão viral purificada, na concentração protéica de aproximadamente 4 µg/mL (diluição 1:20) preparada em tampão carbonato-bicarbonato (50 mM; pH 9,6 – TCB) e incubadas de 12-14 h a 4 °C. Incubou-se, também, uma colônia de *E. coli* TG1 retirada de uma placa de meio mínimo em um volume de 5 mL de meio 2xTY. No dia seguinte, a mini-garrafa de cultura foi então lavada três vezes com PBS (salina tamponada com fosfato; 0,01 M tampão fosfato; 2,7 mM KCl₂; 137 mM NaCl; pH 7,4) contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T) e adicionada do bloqueador (10% leite em pó desnatado – LPD e PBS), incubando-se 1 h a 37 °C. Durante este tempo, a suspensão de fagos obtidos na recuperação da biblioteca (descrito no item anterior) foram precipitados com 2 mL de solução de PEG/NaCl. Após misturar bem, o material foi incubado em banho de gelo por 60 min. Na seqüência, os fagos foram precipitados através de centrifugação a 10.000 xg por 20 min a 4 °C e adicionados à garrafa, sendo diluídos os 4 mL do fago recombinante com 4 mL de PBS-T e LPD, estes foram adicionados a mini-garrafa e incubados por 2 h a 37 °C. Durante esse intervalo, foi

preciso preparar as bactérias da cepa TG1 na fase log. Para tanto, foram transferidos 150 µL da cultura crescida de 12-14 h para 15 mL de meio 2xTY e incubou-se a 37°C a 250 rpm, até que a A_{600} fosse aproximadamente 0,3. De acordo com a cinética de crescimento desta linhagem de *E. coli*, foi necessário um intervalo de aproximadamente 1 h para atingir-se a densidade óptica (DO) desejada.

Após a incubação da suspensão dos fagos no frasco previamente adsorvido com as suspensões purificadas dos três diferentes isolados de campo do VBI, descartou-se o sobrenadante e lavou-se a superfície interna desse frasco 20 vezes com PBS e outras 20 vezes com PBS-T. Ao final das lavagens, adicionou-se ao frasco um volume de 10 mL de cultura de *E. coli* da cepa TG1 na fase log e este foi incubado por 1 h a 37 °C e 250 rpm, para que as bactérias fossem re-infectadas pelos fagos que estivessem ligados ao VBI adsorvido à superfície do frasco. Decorrido este intervalo de tempo, a suspensão de células bacterianas foi então transferida para um tubo de polipropileno, e duas alíquotas de 500 µL foram separadas para estoques em glicerol. Após a retirada das alíquotas, foi adicionado ampicilina 100 µg/mL, glicose 2% e 4×10^{10} pfu de M13K07 (GE Healthcare) e incubado por 1 h a 37 °C e 250 rpm. Após essa incubação as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 1.000 xg durante 20 min e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 10 mL de meio 2xTY-AK sendo incubado de 12-14 h a 37 °C e 250 rpm para realização de um novo ciclo de “panning”. A ampicilina é responsável pela seleção das células bacterianas que contêm o fagomídeo, enquanto a kanamicina seleciona as células que foram infectadas pelo fago auxiliar, e, portanto, produzem o scFv.

No dia seguinte, iniciou-se o segundo ciclo de “panning”, exatamente conforme descrito acima, no total foram realizados 3 ciclos. Ao final do terceiro ciclo as bactérias re-infectadas pelos fagos selecionados foram plaqueadas em meio sólido SOBAG (10 g tripton, 2,5 g extrato de levedura, 0,25 g NaCl, 7,5 g ágar e H₂O q.s.p. 465 mL, autoclavar e após esfriar adicionar MgCl₂ 1 M, glicose 2 M e ampicilina 20 mg/mL). As placas secas foram invertidas e incubadas de 12-14 h a 30 °C.

4.5. Preparação da Placa Mãe de *E. coli* TG1 selecionadas com os fagomídeos contendo os genes VH-linker-VL

A placa mãe foi preparada, colocando-se 500 µL de meio 2xTY-AG em cada tubo de uma placa cluster (Costar 4410) e transferindo-se colônias isoladas em tubos separados, usando-se, para isso, palitos autoclavados. Foram retiradas 480 colônias das placas de meio seletivo e produziram-se cinco placas mãe, que foram incubadas de 12-14 h a 30 °C e 250 rpm, em câmara úmida. No dia seguinte as placas foram retiradas da câmara úmida, e 150 µL de glicerol 80% foram acrescentados em cada tubo da placa cluster e estas foram guardadas em freezer -70 °C. Essa placa serviu como fonte primária para produção de anticorpos apresentados em fagos a serem utilizados numa triagem inicial que indicará quais clones estão produzindo anticorpos com reatividade cruzada para os isolados de campo do VBI estirpes IBVPR01, IBVPR05 e SE-17 (“screening”).

4.6. Avaliação da reatividade dos fragmentos de anticorpos recombinantes (scFv) apresentados em fago a partir de clones enriquecidos

A avaliação da biblioteca de fragmentos de anticorpos monoclonais (scFv) expressos em fagos foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA indireto). Dessa forma, para obtenção dos fragmentos scFv expressos em fagos foram seguidas as instruções do módulo de expressão do kit “Recombinant Phage Antibody System” (Amersham Bioscience).

Foram preparados 50 mL de meio 2xTY-AG contendo $2,5 \times 10^{10}$ pfu M13K07, distribuindo-se 400 µL em cada tubo de uma placa cluster (P1). Transferiu-se 40 µL da cultura saturada de cada tubo da placa mãe ao tubo correspondente da placa P1 e, incubou-se por 2 h a 37 °C e 150 rpm em câmara úmida. Após esse período, a placa foi

centrifugada a 1.500 xg por 20 min a TA e o sobrenadante foi descartado, cuidadosamente. Foram preparados 50 mL de 2xTY-AK e distribuiu-se um volume de 400 µL em cada tubo da placa P1, que foi então incubado a 37 °C, 250 rpm de 12-14 horas.

Em paralelo com esse procedimento uma microplaca de 96 cavidades, (Costar) foi adsorvida com volumes de 50 µL/cavidade da suspensão purificada da mistura das estirpes IBVPR01, IBVPR05 e SE-17 na concentração protéica de aproximadamente 4 µg/mL (diluição 1:20 em TCB), esta foi incubada a 4 °C de 12-14 h para realização do ELISA. No dia seguinte foram realizados os protocolos descritos abaixo.

A placa P1 foi centrifugada (1.500 xg por 20 min) e a placa de ELISA bloqueada com PBS + 10% LPD, por 45 min a 37 °C em câmara úmida. Uma outra microplaca (P3) foi bloqueada nas mesmas condições, para ser utilizada posteriormente na diluição dos fagos. Antes de serem adicionados à placa de ELISA, os anticorpos recombinantes em fago precisam ser diluídos em tampão de bloqueio (PBS + 10% LPD) para redução das interações inespecíficas entre os anticorpos e as proteínas circundantes do meio, ou mesmo à superfície da microplaca. Ao final da centrifugação, 322 µL do sobrenadante de cada tubo da placa P1 foi transferido para os tubos correspondentes de outra placa denominada P2. O sobrenadante contém os fagos que apresentam o scFv fusionado à extremidade C-terminal da proteína 3 do fago. A microplaca P3 foi lavada e adicionou-se a cada cavidade 50 µL de PBS + 10% LPD, transferindo-se depois 50 µL de cada tubo da placa P2 para a cavidade correspondente da microplaca, resultando em uma diluição 1:2 dos produtos da placa P2. Após lavagem da microplaca de ELISA os anticorpos recombinantes em fago, diluídos e bloqueados, foram transferidos da microplaca P3 para as cavidades correspondentes da microplaca de ELISA, a qual foi incubada por 2 h a TA. Após esse período, a placa foi lavada e adicionou-se o anticorpo secundário anti-fago M13 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído 1:1000 em 10% LPD + PBS-T, sendo a reação incubada por 1 h a 37 °C. Na etapa seguinte adicionou-se o conjugado a enzima peroxidase anti-IgG de coelho na sua diluição ideal 1:2000 em PBS-T + 10% de LPD, incubando-se por 1 h 30 min a 37 °C. Ao final a microplaca foi

então lavada para que fosse adicionado o substrato (H_2O_2) e o cromógeno orto-fenileno-diamina (OPD) (Acros Organics, New Jersey, USA) em tampão citrato-fosfato pH 4,9 (TCF). Após 15 min, a reação foi bloqueada, adicionando-se HCl 2 N, e realizou-se a leitura das absorvâncias a 490 nm. Segundo o módulo de expressão do kit “Recombinant Phage Antibody System” (Amersham Bioscience) eram considerados positivos os valores de D.O. acima de 0,2. Como controle negativo e positivo para o VBI foi utilizado um “pool” de amostras de soro sanguíneo de aves SPF, mantidas em isoladores com ar filtrado e pressão positiva.

4.7. Avaliação da especificidade dos fragmentos de anticorpos monoclonais apresentados em fagos frente às proteínas do vírus da bronquite infecciosa pela técnica de Western Blotting

Os clones que apresentaram os maiores valores de densidades ópticas (DOs) foram selecionados e avaliados em ensaio de Western blotting para a determinação da especificidade dos mesmos. Para isso, 30 μ g das proteínas virais da mistura concentrada das estirpes IBVPR01, IBVPR05 e SE-17 foi adicionada a um tampão contendo 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1 % SDS; 10 % de glicerol; 0,001 % de azul de bromofenol e 1 % de 2-mercaptoetanol. A amostra assim preparada foi fervida por 2 min e aplicada em gel de poliacrilamida, sendo usado o gel de empilhamento na concentração de 3 % e o gel de separação na concentração de 12 %. A separação eletroforética pela técnica de SDS-PAGE foi então realizada, utilizando-se um sistema de tampão descontínuo segundo LAEMMLI (1970). As bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas, em um dos géis, através da coloração com Coomassie-Brilliant Blue.

Os polipeptídeos previamente separados pela eletroforese do outro gel de poliacrilamida com SDS foram eletrotransferidos em cuba de transferência úmida para uma membrana de PVDF (Amersham Bioscience), utilizando-se um tampão de transferência contendo 50 mM de TRIS; 384 mM de glicina e 20 % (v/v) de metanol pH 8,3; sendo o processo realizado a 90 V por 45 min e a 4 °C. Após o fim da

transferência, a eficiência da mesma foi verificada corando-se a membrana com 0,1 % Ponceau S dissolvido em ácido acético 1 % e fazendo-se, a seguir, a descoloração, com água destilada. Em seguida, a membrana foi submetida ao bloqueio com 10 mL de PBS-T+5 % LPD (salina tamponada com fosfato; 0,01 M tampão fosfato; 2,7 mM KCl₂; 137 mM NaCl; pH 7,4), sob agitação suave por 1 h a TA. Procedeu-se, na fase seguinte, a reação utilizando-se os fragmentos de anticorpos monoclonais apresentados em fagos (diluídos 1:2 em PBS-T + 5 % LPD), que foram usados como anticorpos primários, tendo sido preparados como descrito no item 4.6 e a reação foi incubada por 1 h a TA sob agitação leve. Após a incubação, a membrana foi lavada 4 vezes com PBS-T por 5 min e 1 vez com PBS por 10 min, e foi adicionado a reação o anticorpo secundário anti-M13 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) na diluição de 1:500, sendo incubado por 1 h a TA sob agitação. Novas lavagens foram feitas com PBS-T e PBS. Na etapa seguinte adicionou-se o conjugado a enzima peroxidase anti-IgG de coelho na sua diluição ideal 1:250 em PBS-T + 5 % de LPD, incubando-se essa reação por 1 h a TA.

Após as lavagens com PBS-T e PBS, a reatividade dos fragmentos de anticorpos recombinantes foi detectada com a adição do substrato FAST DAB (dietil-amino-etil-benzidina – 0,7 mg e peróxido de hidrogênio/uréia – 1,6 mg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que foi dissolvido de acordo com as instruções do fabricante. Para interrupção da reação de degradação enzimática, a membrana foi lavada com água deionizada e posteriormente dessecada em TA e, ao final, guardada ao abrigo da luz (TOWBIN et al., 1979). Para referência de peso molecular foi utilizado o padrão kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad) e como controle negativo líquido alantóide de ovos embrionados SPF.

4.8. Análise da reatividade do clone C5P1 apresentado em fago frente à proteína N recombinante do VBI

Com a finalidade de se caracterizar melhor a reatividade do fragmento de anticorpo recombinante scFv produzido pelo clone C5P1, primeiramente 30 µg das

proteínas presentes na suspensão concentrada das 3 estirpes do VBI, a proteína N recombinante da estirpe IBVPR05 do VBI (GIBERTONI et al., 2009) e o líquido alantóide colhido de ovos embrionados SPF, foram separadas pela técnica de SDS-PAGE segundo LAEMMLI (1970) e transferidas para a membrana de polivinilidenodifluoreto – PVDF (Amershan Bioscience, Piscataway, NJ, USA) para a realização da técnica de western-blotting, sendo que o clone C5P1 foi utilizado como anticorpo primário e o restante da reação seguiu o protocolo descrito no item 4.7.

4.9. Análise do gene codificador do fragmento de anticorpo recombinante apresentado em fago por sequenciamento de nucleotídeos do clone C5P1

A amostra de DNA plasmidial obtida do clone bacteriano C5P1 foi quantificada e, depois submetida à reação de sequenciamento, utilizando-se 1 μ L de “Big Dye Terminator” (Perkin Elmer), 3 μ L de tampão [2,5X] (Tris-HCl 200 mM, pH 9,0 e MgCl₂ 5 Mm), 10 pmoles/ μ L de cada um dos iniciadores (Dsense primer e Dantisense primer, descritos no manual do fagomídeo pCANTAB5E), 200 ng de DNA e água destilada Milli-Q, previamente esterilizada (q.s.p) 10 μ L. As reações seguiram os seguintes ciclos de amplificação, 1 ciclo de 96 °C por 2 min, seguidos de 35 ciclos de 96 °C por 30 segundos para desnaturação, 52 °C por 1 min para anelamento, 60 °C por 4 min para polimerização, ao término dos ciclos, as amostras foram mantidas a 4 °C até o uso. Após a reação de sequenciamento (“cycle-sequencing”), o produto obtido foi lavado com isopropanol. Após 15 min a TA, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 30 min a 20 °C para a precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, 2 vezes, com etanol 70%, seguido de centrifugação a 4000 rpm, 15 min a 20 °C. As amostras foram secas em bomba a vácuo por 5 min e submetidas ao sequenciamento em seqüenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Os cromatogramas foram analisados no programa BioEdit, e aqueles que apresentaram bom rendimento foram submetidos a análise e montagem do gene, assim como a verificação das ORFs e CDRs para posterior clonagem e expressão do

fragmento de anticorpo monoclonal de cadeia única, na forma solúvel, no vetor pET28a (Novagen).

4.10. Subclonagem em vetor pET28a

Para a expressão do fragmento de anticorpo solúvel foi utilizado o sistema de expressão pET28a (Novagen) (Figura 3). Este vetor possui a marca de seleção para o antibiótico kanamicina, sendo a expressão do DNA controlada pelo promotor induzível T7, o qual permite a produção da proteína recombinante em altos níveis em meio contendo IPTG. Adicionalmente, este vetor carrega uma cauda de poli-histidina na extremidade carboxi-terminal e amino-terminal, o que permite a produção de proteínas recombinantes fusionadas a seis resíduos de histidina, tornando mais fácil a purificação da proteína de fusão recombinante através de técnicas de cromatografia de afinidade com resinas de sepharose combinadas ao níquel.

A bactéria *E. coli* linhagem ER2566 foi empregada como célula hospedeira para a clonagem e expressão do inserto gênico de interesse.

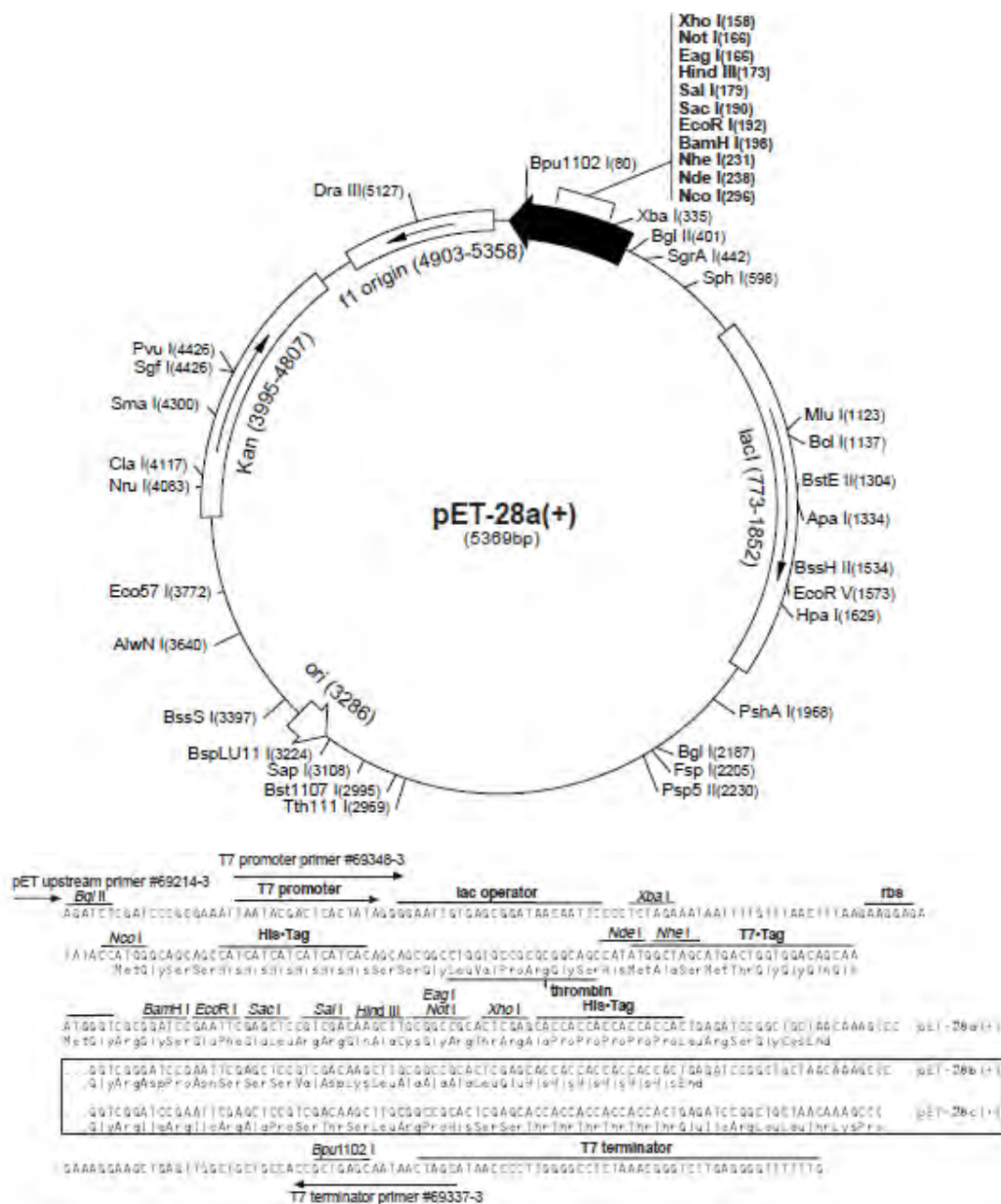


Figura 3. O vetor de expressão em *E. coli* pET28a (Novagen).

4.10.1. Oligonucleotídeos iniciadores

Para a amplificação do gene artificial VH-linker-VL do clone C5P1 e posterior clonagem e expressão do mesmo no vetor pET28a foi necessário a inclusão de um novo sítio de restrição (NdeI) na extremidade 5' desse fragmento gênico, com isso foi desenhado um novo iniciador VHF-NdeI (5'GAATCCCATATGGTGACGTTGGACG 3').

4.10.2. Extração de DNA plasmidial do clone C5P1

O clone selecionado, C5P1 foi submetido à extração de DNA plasmidial utilizando o Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System - Promega de acordo com as especificações do fabricante. A quantificação do DNA plasmidial foi feita em gel de agarose com o padrão de quantificação molecular "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen) e com o auxílio do Biofotômetro (Eppendorf).

4.10.3. Amplificação do gene artificial VH-linker-VL-C5P1 para clonagem no vetor pET28a

A reação de PCR para amplificação do gene extraído do clone C5P1 utilizou o novo iniciador VHF-NdeI e o iniciador VLR-NotI utilizado na construção anterior. Previamente à aplicação dessas reações, elas foram otimizadas quanto aos parâmetros referentes à concentração de cada par de iniciadores e do perfil térmico de incubação. Após a avaliação acima foi definido um programa ideal de incubação para essa técnica de PCR, o qual ficou assim constituído: 1 ciclo de 95 °C por 5 min seguindo-se mais 35 ciclos, cada um composto por três passos; 94 °C por 1 min, para desnaturação do DNA, 55,8 °C por 1 min, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 2 min a 68 °C para a extensão das fitas e um ciclo de extensão final de 10 min a 68 °C.

A análise dos produtos amplificados pela PCR foi realizada através de eletroforese como descrito no item 4.2.2.

Após a análise dos produtos amplificados na PCR, por eletroforese em gel de agarose, foi comprovado que o produto amplificado do gene VH-linker-VL apresentava o tamanho esperado, isto é, aproximadamente 750 pb, antes de o mesmo ser destinado à ligação com o vetor pET28a (Novagen).

4.10.4. Digestão do vetor pET28a com as enzimas de restrição

Previamente a reação de ligação do gene VH-linker-VL ao vetor pET28a este foi digerido utilizando-se a seguinte reação, 1 ug de DNA, 1x de tampão 3, 20 U da enzima *NdeI* (Biolabs), 10 U da enzima *NotI* (Biolabs), 0,1 ug de BSA (10 ug/uL) completando o volume final da reação com 20 uL com água DEPEC. A reação foi incubada a 37 °C por 16 h e posteriormente a enzima foi inativada a 70 °C por 20 minutos.

4.10.5. Purificação e quantificação do vetor pET28a e do produto gênico amplificado codificador de VH-linker-VL

A reação de digestão do vetor pET28a e o produto de interesse amplificado por PCR codificador do gene VH-linker-VL foram purificados, utilizando-se o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Bioscience) e seguindo-se as especificações do fabricante. Após purificação os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose nas mesmas condições descritas no item 4.2.2.

4.10.6. Preparo de células competentes *E. coli* linhagem ER2566

As células de *E. coli* ER2566 foram crescidas em 1 mL de meio 2xTY, no intervalo de 12-14 h, a 250 rpm e a 37 °C. No dia seguinte 100 mL de 2xTY foram inoculados com a cultura inicial e incubados sob agitação de 200 rpm a 37 °C até atingir uma $DO_{600} \cong 0.7$. A cultura foi centrifugada a 4000 xg durante 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 30 mL de $CaCl_2$ (100 mM) em gelo. As células foram novamente centrifugadas 4000 xg durante 15 min a 4 °C, sendo que esse processo de lavagem repetiu-se mais uma vez nas mesmas condições descritas acima. Após isso, as células foram ressuspensas em 4 mL de $CaCl_2$ (100 mM) e adicionado 1 mL de glicerol (80%). Foram feitas alíquotas de 50 μ L que foram armazenadas em freezer -70 °C.

4.10.7. Ligação do gene artificial VH-linker-VL-C5P1 ao vetor pET28a

A reação de ligação do produto obtido na PCR do item 4.10.3 foi feita utilizando-se 50 ng/ μ L de DNA, 1 μ L ligation buffer 10x, 100 ng/ μ L do vetor pET28a, 6 U de enzima T4 DNA Ligase (Biolabs) e água tratada com DEPC para um volume final de 10 μ L. A reação foi incubada a 16 °C por 14 h.

4.10.8. Transformação das células competentes de *E. coli* linhagem ER2566

Na transformação, as células competentes foram descongeladas em banho de gelo e a elas foi adicionado 4 μ L da reação de ligação. Foi feita uma agitação suave e as células foram incubadas em banho de gelo por 30 min. Após esse tempo foi feito o choque térmico transferindo as células para banho-maria a 42 °C por 2 min. As células foram colocadas novamente em banho de gelo e adicionado 250 μ L de meio SOC

(Invitrogen) e incubadas por 1 h, 250 rpm a 37 °C. Posteriormente 100 e 200 µL das células foram plaqueados em meio sólido 2xTY acrescido de kanamicina (50 µg/mL) e incubados a 37 °C por 16 h.

A placa mãe *E. coli* ER2566 foi preparada como descrito no item 4.5., tendo sido colhidas 96 colônias transformantes.

4.10.9. Seleção dos clones transformantes *E. coli* ER2566

Quatro clones da placa mãe do item 4.10.8 foram selecionados para a verificação do processo de clonagem, sendo que 10 µL destes clones foram inoculados em 5 mL de meio líquido 2xTY contendo kanamicina e incubados de 12-14 h, a 250 rpm e a 37 °C. O DNA plasmidial desses clones foi extraído de acordo com o item 4.2.1 e com esse material foi realizado PCR e o sequenciamento a fim de se confirmar a presença do inserto gênico dentro do vetor pET28a, nos clones transformantes testados.

4.10.9.1. Análise dos clones bacterianos transformantes por meio da técnica de PCR com combinações de oligonucleotídeos iniciadores

A técnica de PCR foi realizada com combinação de oligonucleotídeos específicos para o fragmento gênico de interesse e para o vetor utilizado, a fim de se confirmar a presença do inserto gênico no vetor.

Para uma reação de 25 µL, utilizou-se 2,5 µL de tampão de PCR (10X), 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o inserto gênico e para o vetor, 1,5 mM de MgCl₂, 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), e completou-se o volume (q.s.p.) com água tratada com DEPC e, ao final,

adicionou-se 2,0 μ L de DNA plasmidial dos clones A8C5P1, C3C5P1, D4C5P1 e G12C5P1.

Estas reações foram testadas com quatro oligonucleotídeos combinados dois a dois para cada reação, sendo que dois deles eram referentes as extremidades 5' (T7f) e 3' (T7r) do vetor e os outros dois correspondiam a extremidade 5' (VHF-Nde) e 3' (VLR-Not) do gene codificador do fragmento polipeptídico scFv.. Para estas reações foi definido um programa ideal de incubação o qual ficou constituído: 1 ciclo de 95 °C por 5 min seguindo-se mais 35 ciclos, cada um composto por três passos; 94 °C por 1 min, para desnaturação do DNA, 55,8 °C por 1 min, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 2 min a 72 °C para a extensão das fitas e um ciclo de extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos amplificados na PCR realizada com as combinações dos oligonucleotídeos foram analisados segundo o item 4.2.2.

4.10.9.2. Sequenciamento de nucleotídeos dos clones bacterianos transformantes

As amostras de DNA plasmidial obtidas dos clones bacterianos A8C5P1, C3C5P1, D4C5P1 e G12C5P1 foram quantificadas e, depois submetidas à reação de seqüenciamento como descrito no item 4.9, com modificações feitas apenas nos oligonucleotídeos iniciadores, nesta etapa foram utilizados os oligonucleotídeos recomendados pelo manual do vetor pET28a (Novagen).

4.10.10. Indução e expressão em mini escala dos clones transformantes A8C5P1, C3C5P1, D4C5P1 e G12C5P1 de *E. coli* ER2566

Os quatro clones foram incubados em 5 mL de meio 2xTY acrescido de 50 µg/mL de kanamicina com agitação de 250 rpm a 37 °C por 12-14 h. Após a incubação foi transferido 1 mL da cultura para 50 mL de meio 2xTY + kanamicina e incubados a 37 °C com agitação de 250 rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0.6-0.8, uma alíquota de 3 mL (cultura não induzida) foi retirada de cada frasco em seguida foi adicionado IPTG numa concentração final de 0,2 mM para cada clone, sendo a cultura incubada a 30 °C, sob agitação orbital a 200 rpm e no período de 4 h. Ao término do período de incubação, as células foram centrifugadas a 12000 xg durante 10 minutos a TA, os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em 3 mL de tampão de lise (50 mM de fosfato de potássio pH 7,8; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10% glicerol; 0,5% Triton X-100; 10 mM Imidazol e 3 mM de PMSF). A lise celular foi realizada em sonicador de células (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500), “Duty cycle 10%”, “Out put control 5”, permanecendo 3 min com intervalos de 20 segundos. Após a lise, o material foi centrifugado a 12000 xg durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante guardado a -20 °C.

4.10.11. Análise da expressão dos fragmentos de anticorpos monoclonais por SDS-PAGE e Western blotting

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 4.7, sendo utilizado gel descontínuo de poliácridamida contendo sódio-dodecil-sulfato (SDS-PAGE, concentrações de 3% e 12%) para a separação das proteínas presentes no sobrenadante obtidos dos lisados celulares. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF. Para a detecção da expressão do fragmento de anticorpo recombinante scFv-N3 (clones A8C5P1, C3C5P1, D4C5P1 e G12C5P1) foi

utilizado o anticorpo monoclonal anti-histidina (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:500 e o conjugado a enzima peroxidase anti-IgG de camundongo na diluição de 1:500. Para referência de peso molecular do gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi utilizado o padrão BenchMark protein ladder (Invitrogen) e para a membrana o padrão Kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad).

4.10.12. Expressão do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N3 em larga escala e concentração com PEG

Para a produção em larga escala do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N3 as células recombinantes isoladas do clone G12C5P1 foram inoculadas em 20 mL de meio 2xTY + kanamicina e incubadas a 250 rpm, 37 °C por 12-14 h. Posteriormente 5 mL foram transferidos para 4 frascos contendo 250 mL de meio 2xTY + kanamicina e incubados nas mesmas condições até atingir a DO_{600} entre 0.6-0.8, quando o indutor IPTG foi adicionado a uma concentração final de 0,2 mM, sendo as culturas incubadas a 30 °C, 200 rpm por 4 h. As células induzidas foram centrifugadas a 12000 xg durante 10 minutos a TA, os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspendidas em 25 mL de tampão de lise. A lise celular foi realizada em sonicador de células (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500), "Duty cycle 10%", "Out put control 5", permanecendo 3 min com intervalos de 20 seg para cada frasco. Após a lise o material foi centrifugado a 12000 xg durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado no procedimento de concentração com PEG em membrana de diálise. A concentração da proteína total foi mensurada antes e após concentração usando o reagente "Protein Assay" (Bio-Rad) baseado no método de Bradford (1976).

4.10.13. Análise da expressão em larga escala do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N3 por SDS-PAGE e Western blotting

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 4.10.11.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos fragmentos de anticorpos scFv de galinha contra o Vírus da Bronquite infecciosa

Bibliotecas de anticorpos apresentados em fagos têm sido usadas como uma poderosa ferramenta para a geração de anticorpos monoclonais contra agentes infecciosos virais em várias áreas, como medicina humana e veterinária. Recentemente, um estudo utilizando “phage display” possibilitou a produção de fragmentos de anticorpos monoclonais de cadeia simples (scFv) contra o vírus da febre aftosa (FOORD et al., 2007), da dengue (CABEZAS et al., 2008) e da influenza A (POUNGPAIR et al., 2009). Além disso, SAPATS e colaboradores (2003, 2006) já haviam produzido sinteticamente fragmentos de anticorpos contra estirpes de referência e estirpes variantes de alta virulência do vírus da doença de Gumboro e, ainda, em outro trabalho relacionado, OZAWA e colaboradores (2005) detectaram em uma biblioteca de scFv três clones reativos para o vírus da doença de Newcastle, enquanto PARK e colaboradores (2005) através de uma biblioteca de anticorpos monoclonais de cadeia única produzida em galinhas detectaram e caracterizaram scFv contra *Eimeria acervulina*, um patógeno causador de coccidiose em aves.

Fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) apresentados em bacteriófagos filamentosos podem ser isolados sinteticamente ou derivados de animais não-imunizados ou imunizados com um antígeno de interesse. Na biblioteca derivada de animais não-imunizados o animal doador das seqüências codificadoras de anticorpos não é sensibilizado contra o antígeno de interesse; e na biblioteca imune, que possibilita a obtenção de clones específicos para o antígeno inoculado, os linfócitos B específicos são enriquecidos e passam pelo processo de maturação *in vivo* no sistema imune do animal (BENHAR, 2001; WILLATS, 2002).

Neste estudo uma biblioteca imune de fragmentos de anticorpos monoclonais (CAETANO, 2009, CAETANO et al., 2009) foi utilizada a fim de se selecionar os

anticorpos que apresentassem reatividade cruzada contra três estirpes variantes do VBI, sendo duas delas isoladas de surtos a campo no Brasil (IBVPR01 e IBVPR05) e a outra isolada dos Estados Unidos (SE-17). Deve-se destacar que a busca por novos anticorpos monoclonais contra o VBI é importante, pois este vírus é responsável por grandes prejuízos econômicos em plantéis avícolas no Brasil e no mundo, e também devido à alta taxa de variação genética que apresenta na natureza, podendo ser considerado um importante modelo de evolução viral (MONTASSIER et al., 2006; VILLARREAL et al., 2007). Essa variabilidade é consequência de fenômenos de mutação e de recombinação que ocorrem no curso de evolução do VBI, determinando o surgimento de novas variantes fenotípicas e, sobretudo de novos sorotipos ou tipos antigênicos desse vírus (CAVANAGH, 2007; KANT et al., 1992).

Após três ciclos de “panning” contra suspensões antigênicas purificadas das três estirpes heterólogas do VBI – IBVPR01, IBVPR05 e SE-17, foram selecionados 5×10^2 clones. Os clones obtidos foram analisados através do método de ELISA indireto e usando a suspensão viral purificada dos três isolados de campo do VBI. Esta análise permitiu a seleção inicial de 15 clones (C5P1; G8P1; B7P2; B8P2; B9P2; B10P2; C1P2; D8P2; E10P2; F9P2; F10P2; F11P2; G8P2; E4P3 e E5P4), que apresentaram maior reatividade para os antígenos do VBI, isto é, valores de DO > 0.2, portanto positivos, de acordo com o módulo de expressão do kit “Recombinant Phage Antibody System” (Amersham Bioscience), (Figura 4). Nesse contexto, considerando positivos os clones com DO > 0.2, ZHAO e colaboradores (2007) na seleção de anticorpos monoclonais scFv contra a proteína N do vírus da doença de Gumboro conseguiram uma biblioteca com 3×10^9 clones na qual apenas 10 clones apresentaram DO > 0.2, já SAPATS e colaboradores (2006) com uma biblioteca de $9,2 \times 10^7$ clones contra estirpes de alta virulência para a doença de Gumboro observaram que 22 clones ou scFv apresentaram alta afinidade ligante ao antígeno usado na imunização e no “panning”.

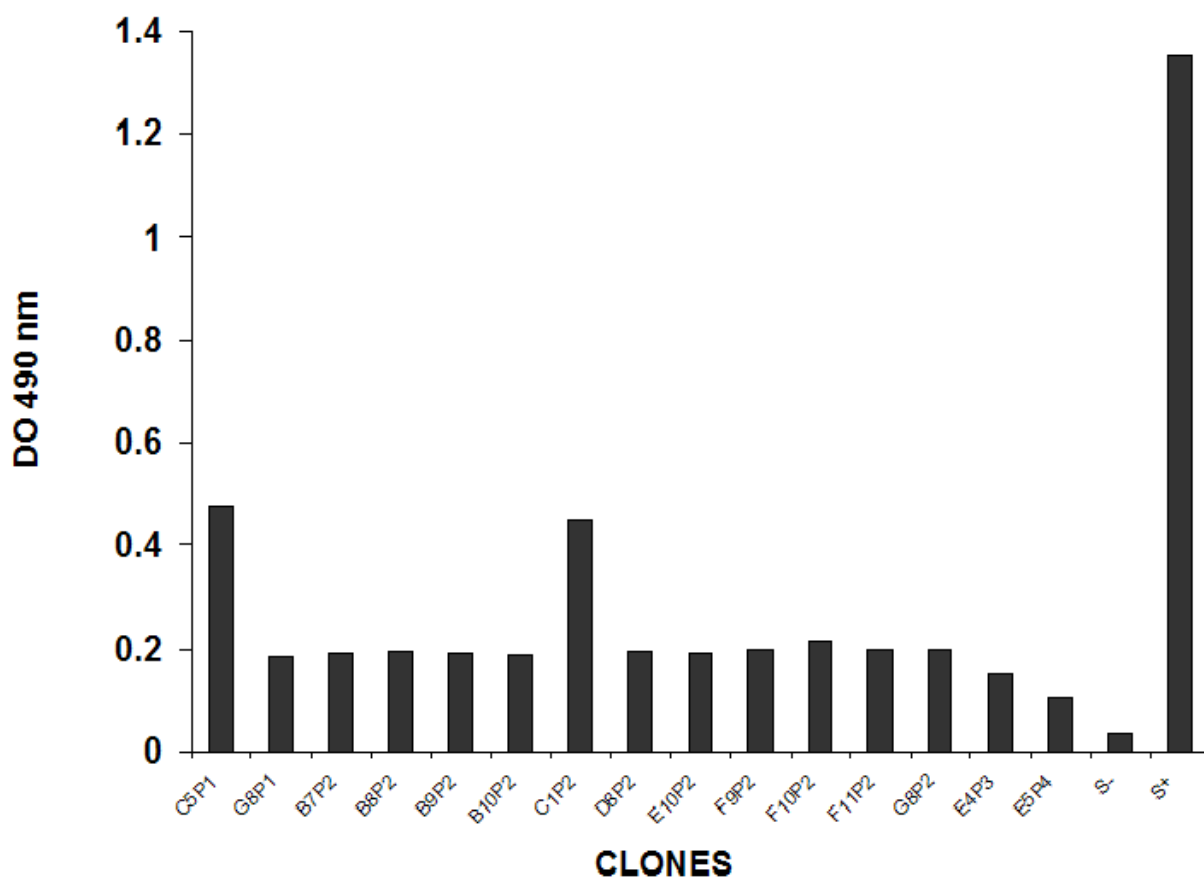


Figura 4. Atividade ligante ao antígeno dos scFv expressos em bacteriófago filamentosos analisados por ELISA indireto.

Os três clones que revelaram os maiores valores de DO (C5P1 com DO=0.477; C1P2 com DO=0.451 e F10P2 com DO=0.215) foram submetidos ao ensaio de Western blotting para avaliação da especificidade frente às proteínas estruturais do VBI. Destes clones, apenas dois apresentaram reatividade no Western-blotting, para a proteína de nucleocapsídeo (N) do VBI, (C5P1 e C1P2) (Figura 5), sendo que o terceiro não demonstrou reatividade para nenhuma das proteínas do VBI, provavelmente em razão de sua baixa reatividade no ELISA, tendo sido, em razão disso, descartado.

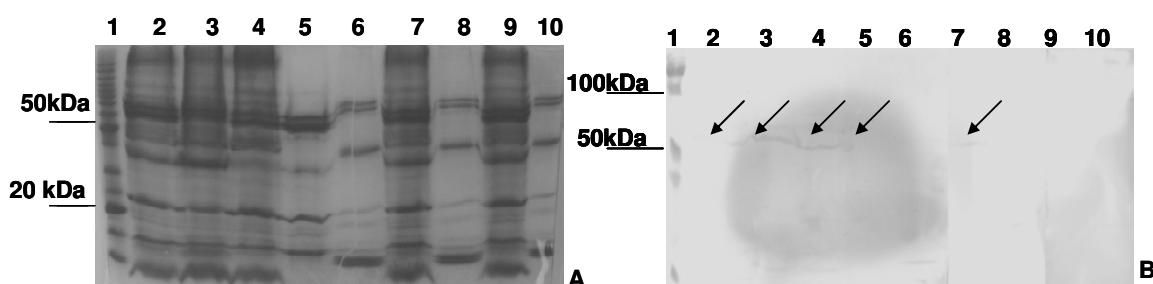


Figura 5. (A) Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE mostrando as proteínas virais. Canaletas (1) Padrão de peso molecular Bench Mark (Invitrogen), (2, 7 e 9) Misturas das estirpes virais IBV-PR01, IBV-PR05 e SE-17, (3) IBV-PR05, (4) IBV-PR01, (5) SE-17, (6, 8 e 10) LCA negativo. (B) Membrana de Western blotting mostrando a caracterização imunológica dos anticorpos apresentados em fago, positivos para reatividade cruzada com os três isolados de campo do VBI. Canaletas (1) Padrão de peso molecular Kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad), (2, 3, 4, 5 e 6) clone C5P1, (7 e 8) clone C1P2, (9 e 10) clone F10P2.

O clone C5P1 mostrou a maior reatividade no ELISA indireto, com $DO=0.477$, e quando submetido ao ensaio de Western blotting foi o que apresentou maior marcação frente a proteína N do VBI para as estirpes utilizadas em sua seleção, este foi então escolhido para ter a sua reatividade avaliada frente a proteína N recombinante da estirpe M41 do VBI produzida em *E. coli* (GIBERTONI et al., 2009), demonstrando nesse ensaio uma forte marcação para esta proteína (Figura 6), o que confirma a sua especificidade antigênica e reforça que a reatividade desse fragmento de anticorpo recombinante é provavelmente direcionada para um epítipo bastante conservado do VBI, já que a estirpe M41 pertence ao mesmo sorotipo da estirpe H120, mas difere das estirpes heterólogas (IBVPR01, IBVPR05 e SE-17) que foram usadas para o “panning” e seleção inicial do fragmento de anticorpo recombinante.

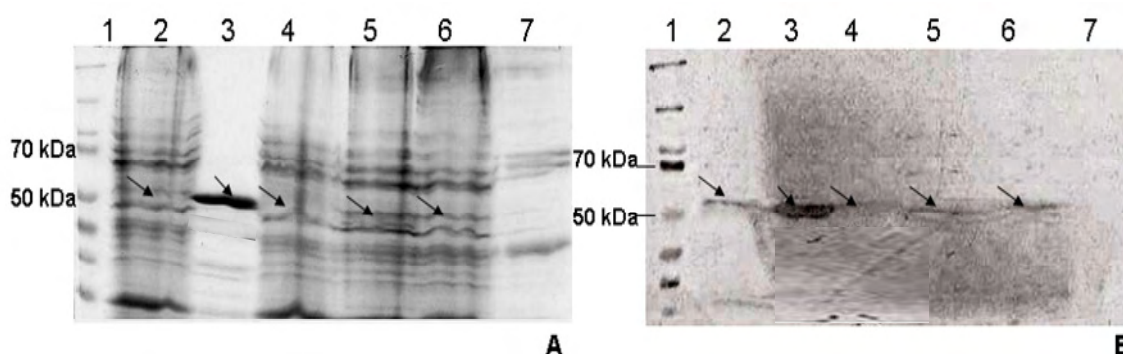


Figura 6. (A) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE e (B) Membrana de Western blotting mostrando a caracterização do clone C5P1. Canaletas (1) Padrão de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas), (2) mistura das proteínas virais das estirpes IBVPR01, IBVPR05 e SE-17, (3) proteína N recombinante do VBI, (4) IBVPR05, (5) IBVPR01, (6) SE-17, (7) LCA negativo.

A proteína N apresenta aproximadamente 51kDa e está intimamente relacionada com o RNA genômico sendo produzida em grande quantidade na infecção viral. Além disso, apresenta uma estrutura altamente conservada, com cerca de 94 a 99% de identidade entre diferentes estirpes do VBI (WILLIAMS et al., 1992, CAVANAGH, 2007). Segundo RESENDE (2003). Uma hipótese plausível para este grau de conservação é que grandes mutações na proteína N poderiam afetar a estabilidade e a viabilidade viral. Ainda, foi demonstrado que é uma proteína altamente imunogênica, sendo, por conseguinte capaz de induzir tanto a produção de anticorpos, como de linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica (SEO et al., 1997). Dessa forma, a proteína N do VBI reúne um número significativo de atributos para se constituir no antígeno de eleição a ser usado na detecção/mensuração da presença do VBI, ou de anticorpos anti-virais específicos, presentes em amostras clínicas colhidas de aves suspeitas de infecção pelo VBI (NDIFUNA et al., 1998).

5.2. Sequenciamento de nucleotídeos do gene VH-linker-VL presente no clone C5P1

Após seleção e caracterização imunoquímica do fragmento de anticorpo monoclonal recombinante scFv produzido pelo clone C5P1 expresso em fago, este último foi submetido ao sequenciamento de nucleotídeos do inserto gênico VH-linker-VL.

A análise da seqüência deduzida de aminoácidos foi feita através do programa BioEdit e comparada com a seqüência nº AY255649 (CRAB35) (SAPATS et al., 2006) depositada no “Genebank” que pelo programa BLAST revelou maior similaridade. Três regiões determinantes de complementariedade (CDRs) e quatro regiões de framework (FR) foram identificadas em cada um dos segmentos gênicos de VH e VL.

No alinhamento entre o crab35 e o clone C5P1 foi possível observar que ocorreram algumas trocas de aminoácidos, nas regiões CDRs, principalmente nas CDR2 e CDR3 do fragmento VH; 9 e 14 aminoácidos respectivamente foram modificados, além da inserção de 3 aminoácidos na CDR3, a mesma modificação ocorreu na CDR1 do fragmento VL, três aminoácidos foram inseridos e trocas foram observadas nas CDR2 e CDR3. Nas regiões de “framework” (FR) também existem alterações, contudo em menor proporção se comparada com as regiões de CDRs. Essas alterações também foram encontradas em trabalhos relacionados (SAPATS et al., 2003; SAPATS et al., 2006; FOORD et al., 2007) que construíram bibliotecas de apresentação em fagos a partir de fragmentos de imunoglobulinas de aves, e isto acontece devido aos pseudogenes que conferem variabilidade as imunoglobulinas em aves. Segundo alguns autores existem cerca de aproximadamente 25 pseudogenes codificadores de VL e 100 pseudogenes codificadores de VH (DAVIES et al., 1995; YAMANAKA et al., 1996; ANDRIS-WIDHOPF et al., 2000) (Figura 7).

São muito interessantes os achados de uma outra análise da seqüência deduzida de aminoácidos do clone scFv-N3 produzido em nosso estudo e o clone scFv-N obtido no trabalho de CAETANO et al. (2009), pois ocorreram alterações significativas, principalmente nas regiões CDRs de VH e de VL, no alinhamento

comparativo desses dois clones. Deve-se considerar nesse caso que, apesar de ambos serem provenientes da mesma biblioteca de cDNA e apresentarem o mesmo inserto gênico básico VH-linker-VL. Esses clones foram selecionados para diferentes estirpes do VBI. Em adição a isso, como esses dois fragmentos de anticorpos monoclonais gerados por esses clones tem reatividade para a proteína N do VBI, sendo contudo bastante diferentes quanto a sua seqüência deduzida de aminoácidos e, levando-se em conta que a proteína N é altamente conservada, pode-se aventar a hipótese de que estes scFvs foram selecionados para diferentes epítomos desta proteína, com isso identificando diferentes regiões da mesma, e assim em conjunto podem contribuir de diferentes maneiras na identificação das diferentes estirpes do VBI (Figura 7).

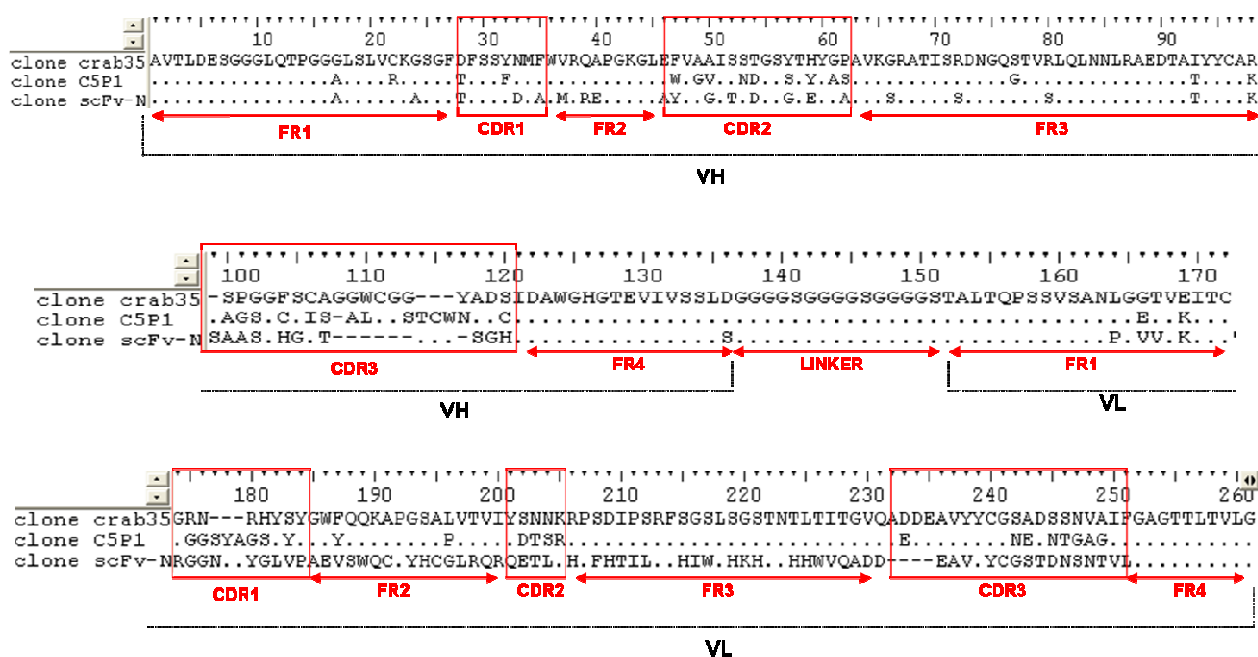


Figura 7. Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácido das regiões variáveis das cadeias pesada e leve do gene scFv do clone C5P1 frente à seqüência de referência CRAB35 (SAPATS et al., 2006) e o clone scFv-N (CAETANO et al., 2009)

É interessante destacar que os fragmentos de anticorpos monoclonais recombinantes obtidos nesse estudo demonstraram a sua capacidade de reagir com a nucleoproteína de 3 diferentes estirpes do VBI, tal como ocorreu com um outro conjunto

de fragmentos de anticorpos monoclonais obtidos na construção da biblioteca originalmente preparada contra a estirpe H120 do VBI (CAETANO, 2009). Não foi, possível, no entanto, caracterizar exatamente para qual sítio ou epítopo eles estão direcionados, apenas se supõe que não se tratem dos mesmos epítopos já que a análise de alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos revelou grandes diferenças entre cada um desses anticorpos recombinantes. Com respeito aos epítopos imunodominantes da nucleoproteína N do VBI, sabe-se que eles estão agrupados em 3 regiões principais compreendidas entre os resíduos de aminoácidos 1 a 50, 175 a 240 e 310 a 409, sendo que os mais imunogênicos, independentemente da origem geográfica do estirpe do VBI, estão mapeados nas regiões delimitadas pelos resíduos de aminoácidos 175 a 209, 310 a 370 e 360 a 409 (SEAH et al., 2000). Pode-se supor, assim, que o fragmento de anticorpo monoclonal scFv produzido nesse estudo estaria direcionados para uma dessas regiões e aquele obtido no trabalho de Caetano et al. (2009) para uma das duas outras regiões mapeadas acima.

5.3. Subclonagem em vetor pET28a e expressão do fragmento scFv solúvel em *E. coli*

5.3.1. Subclonagem do segmento gênico VH-linker-VL em vetor pET28a e transformação de *Escherichia coli* ER2566

Após a confirmação da seqüência dos nucleotídeos do fragmento gênico do clone C5P1, o DNA plasmidial deste foi extraído, e inserido o sítio de restrição (*Nde*I) no segmento gênico VH-linker-VL através da reação de PCR, com um novo par de oligonucleotídeos iniciadores, resultando num novo segmento gênico que manteve o tamanho aproximado de 750bp, e com aproximadamente 40ng/μL de DNA, sendo clonado em vetor pET28a que foi digerido e utilizado na transformação de células de *E. coli* da linhagem ER2566 através de choque térmico (Figura 8).

Algumas características importantes motivaram a escolha desse sistema de expressão, sendo ele utilizado atualmente para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli*.

O vetor pET28a permite a expressão da proteína recombinante fusionada a 6 resíduos de histidina na extremidade amino e/ou carboxi-terminal, o que facilita a detecção da proteína expressa. Além disso, a expressão do gene que é inserido nesse vetor está sob controle do promotor do fago T7, o qual promove a expressão gênica pela indução com IPTG, com a vantagem de que os vetores do sistema de plasmídios para expressão com T7 RNA polimerase (pET) utilizam um promotor do fago T7 que é reconhecido pela RNA polimerase do fago, mas não pela RNA polimerase da *E. coli*. Assim a transcrição do RNA clonado, necessária para a síntese da proteína heteróloga, só ocorre após a expressão da T7 RNA polimerase na bactéria hospedeira. Além disso, a velocidade de transcrição da T7 RNA polimerase é cinco vezes maior do que a da RNA polimerase de *E. coli*, conferindo ao sistema pET altos níveis de transcrição do gene clonado (STUDIER et al., 1990).

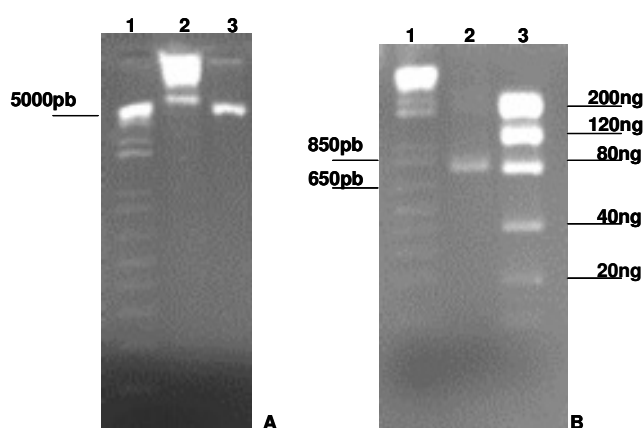


Figura 8. Eletroforograma do vetor pET28a digerido e da purificação do fragmento gênico VH-linker-VL do clone C5P1. Canaletas: (1A e 1B) Marcador de tamanho molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA), (2A) vetor pET28a não digerido, (3A) vetor pET28a digerido, (2B) fragmento gênico VH-linker-VL purificado, (3B) Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA).

5.3.2. Identificação dos clones bacterianos portadores do fragmento gênico VH-linker-VL

Após ter sido feita a ligação do produto da PCR no vetor pET28a e transformação do mesmo em células competentes de *E. coli* linhagem ER2566, foram obtidos 96 clones transformantes, que cresceram em meio seletivo. Quatro desses clones transformantes foram selecionados, para se pesquisar a presença do vetor contendo o inserto gênico de interesse. Duas técnicas diferentes foram utilizadas, amplificação de fragmentos gênicos através de PCR com a combinação de iniciadores específicos para o gene de interesse e para o vetor pET28a e seqüenciamento de nucleotídeos, em amostras de DNA plasmidial extraído destes mesmos clones.

Inicialmente, foi verificado que, na reação de PCR realizada com os iniciadores T7promoter e VLR-NotI sobre as amostras de DNA plasmidial dos clones bacterianos transformantes, houve a amplificação de toda a região gênica codificadora do fragmento VH-linker-VL, gerando um fragmento com o tamanho esperado, isto é, 1034pb (canaleta 2, 4, 6 e 8 da Figura 9). Além disso, os ensaios de PCR realizados com os iniciadores VHF-Nde e T7r, também levaram a amplificação de produtos gênicos com tamanho esperado, 889pb (canaleta 3, 5, 7 e 9 da Figura 9).

Depois das análises por meio das técnicas de PCR, as amostras de DNA plasmidial extraídas dos clones bacterianos transformados foram submetidas à técnica de sequenciamento de nucleotídeos. A análise das seqüências deduzidas de aminoácidos foi feita através do programa BioEdit e comparada pelo programa BLAST com seqüências depositada no "Genebank", em tais seqüências podemos observar a presença do promotor T7, do operador *lac*, dos 6 resíduos de histidina localizados nas extremidades amino e carboxi-terminal do vetor e o fragmento gênico VH-linker-VL. Estes resultados confirmaram desta forma, que o inserto gênico de interesse está na orientação correta para ser transcrito e traduzido, ou seja, "in frame" dentro do vetor de expressão para *E. coli*, neste caso, pET28a (Novagen).

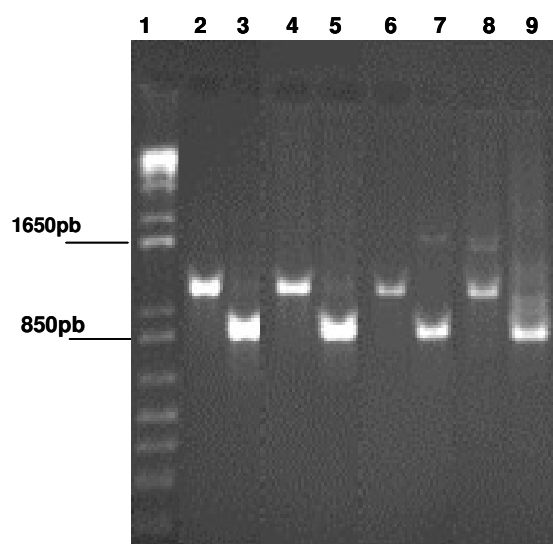


Figura 9. Eletroforograma do DNA plasmidial extraído dos clones A8C5P1, C3C5P1, D4C5P1 e G12C5P1 amplificados por PCR, com combinação de oligonucleotídeos. Canaletas: (1) Marcador de tamanho molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA), (2) clone A8C5P1 (T7 promoter e VLR-Not), (3) clone A8C5P1 (VHF-Nde e T7r), (4) clone C3C5P1 (T7 promoter e VLR-Not), (5) clone C3C5P1 (VHF-Nde e T7r), (6) clone D4C5P1 (T7 promoter e VLR-Not), (7) clone D4C5P1 (VHF-Nde e T7r), (8) clone G12C5P1 (T7 promoter e VLR-Not), (9) clone G12C5P1 (VHF-Nde e T7r).

5.3.3. Produção do fragmento de anticorpo scFv-N3

Embora os sistemas de clonagem e expressão sejam bem conhecidos, alguns problemas podem ocorrer sendo eles, a expressão de baixos níveis de proteína recombinante ou ainda a expressão de proteínas na forma insolúvel formando agregados extremamente insolúveis, conhecidos como corpúsculos de inclusão, que na presença de SDS/mercaptoetanol, podem recuperar sua atividade biológica plenamente

ou ainda manter-se inativa (WEICKERT et al., 1996; WALSH, 1998). Tais problemas podem ser contornados pelo uso de diferentes concentrações do indutor no meio de cultura, uso de mutantes da célula hospedeira e/ou diferentes temperaturas de indução (BANEYX & MUJACIC, 2004; SORENSE & MORTENSEN, 2005).

Neste sistema de expressão construído nesse estudo, o fragmento de anticorpo recombinante foi expresso através do promotor T7 e a redução na temperatura e o uso de diferentes concentrações do indutor no meio de cultura apresentou efeitos positivos durante a expressão, para a não produção de agregados insolúveis, denominados corpúsculos de inclusão.

Tendo conhecimento destes fatos o clone G12C5P1 foi submetido à indução em meio de cultura com adição mínima (0,2mM) de IPTG, agitação moderada de 200rpm e temperatura de 30°C. As células foram lisadas por sonicação, sendo o sobrenadante submetidos à avaliação em ensaio de Western blotting onde ficou caracterizado a presença de bandas com tamanho molecular estimado de 31 KDa, o que corresponde ao fragmento de anticorpo scFv-N3 que foi expresso com uma cauda de poli-histidina fusionada, sendo facilmente detectáveis com o uso do anticorpo monoclonal anti-histidina (Figura 10).

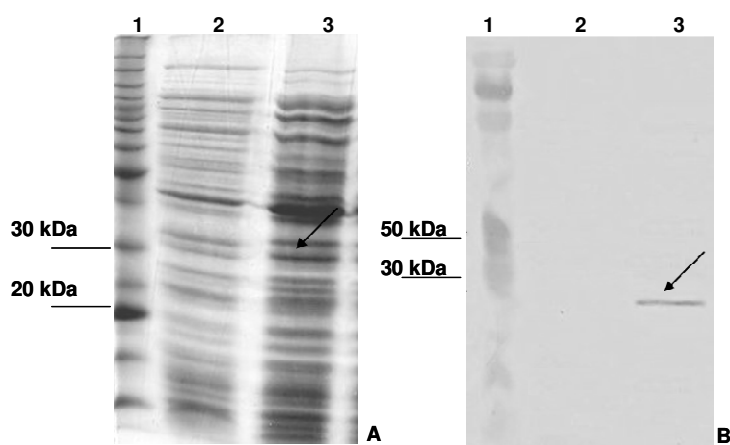


Figura 10. Análise da produção do fragmento de anticorpo scFv-N3. (A) Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE e (B) Membrana de Western blotting. Canaletas (1) Marcador de peso molecular (A) Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen) (B) Marcador Kaleidoscope prestained Standards (Bio-Rad), (2) Cultura não-induzida do clone G12, (3) Cultura induzida e concentrada do clone G12.

A produção de fragmentos de anticorpos monoclonais ativos usando a tecnologia do DNA recombinante e bactérias, em especial a *E. coli*, como sistema de expressão é um método muito atrativo se comparado com a produção de anticorpos monoclonais pela técnica convencional de hibridoma. Fragmentos de anticorpos recombinantes tais como, Fab e scFv tem tamanho menor quando comparados aos anticorpos completos, e ainda conservam sua atividade ligante ao antígeno de interesse. Além disso, esses pequenos fragmentos de anticorpos podem ser efetivamente utilizados em medicina humana e veterinária para o diagnóstico e aplicações terapêuticas porque apresentam menor imunogenicidade e melhor penetração nos tecidos (YOKOTA et al. 1992)

Frente a todos os nossos resultados, constata-se que a construção de bibliotecas de fragmentos de anticorpos recombinantes a partir de linfócitos B de aves imunizadas com uma determinada estirpe do VBI, utilizando a técnica de “phage display”, oferece um método alternativo e eficaz na produção de fragmentos de anticorpos monoclonais recombinantes scFv contra esse mesmo vírus, que podem ser muito úteis para o desenvolvimento de métodos mais rápidos de diagnóstico laboratorial do VBI, bem

como em estudos relacionados ao acompanhamento de regiões (epítomos) mais conservados desse vírus durante o seu processo de evolução.

VI. CONCLUSÃO

6.1. A técnica de “Phage display”, realizada com base em uma biblioteca previamente preparada contra a estirpe vacinal H120 do VBI e utilizando o fagomídeo pCANTAB 5E, foi empregada, nesse estudo, para a seleção de fragmentos de anticorpos monoclonais de cadeia única (scFv) contra três estirpes heterólogas desse vírus derivadas de isolados de campo do Brasil e dos Estados Unidos, possibilitando a geração de fragmentos de anticorpos recombinantes com ampla reatividade cruzada para diferentes estirpes do VBI.

6.2. Os fragmentos scFv de anticorpos monoclonais expressos em fagos demonstram a sua capacidade de interagir nas técnicas de ELISA e no Western blotting especificamente com a nucleoproteína N das três estirpes do VBI usadas no processo de seleção e também com a forma recombinante dessa mesma proteína, permitindo inferir que o epítipo alvo desses anticorpos monoclonais recombinantes são mais conservados e estão presentes em estirpes geneticamente e antigenicamente tão diferentes quanto às usadas nesse estudo.

6.3. Pode-se também inferir que os fragmentos scFv de anticorpos monoclonais ora produzidos tem um grande potencial de serem aplicados na detecção e acompanhamento da evolução de estirpes variantes do VBI quanto a persistência ou não de epítipos mais conservados como estes aqui identificados na nucleoproteína N desse vírus.

VII. REFERÊNCIAS

- ABREU, J. T.; RESENDE, J. S.; FLATSCHARTA, A. V.F.; MENDES, A.C.R.; MARTINS, N. R. S.; SILVA, C. B. A. Genotipificação de isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) pelo sequenciamento direto de parte do gene S2 e do sequenciamento do gene S1. **Rev. Brás. Ciênc. Avic.**, Suplemento 8, p. 210, 2006.
- ADEY, N.B.; NATARAGNON, A. H.; RIDER, J. E. Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptides libraries. **Gene**, v. 56, p. 27-31, 1995.
- ANDRADE, E.V.; ALBUQUERQUE, F.C.; MORAES, L.M.P. Single-Chain Fv with Fc fragment of the Human IgG1 Tag: Construction, *Pichia pastoris* Expression and Antigen Binding Characterization. **J. Biochem.**, v. 128, p. 891-895, 2000.
- ANDRIS-WIDHOPF, J.; RADER, C.; STEINBERGER, P.; FULLER, R.; BARBAS III, C.F. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. **J. Immunol. Methods**, v. 242, p. 155-159, 2000.
- AZZAZY, H. M. E., HIGHSMITH JR, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin. Biochem.**, v. 35, p. 425-445, 2002.
- BANEYX, F., MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nat. Biotechnol.**, v. 22, p. 1399-1410, 2004.
- BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotech Adv.**, v. 19, p. 1-8, 2001.

BHATTARCHARJEE, P. S.; NAYLOR, C. J.; JONES, R. C. A simple method for Immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 23, p. 471-480, 1994.

BOURSNELL, M. E. G. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, Great Britain, v. 66, p. 573-580, 1985.

BOURSNELL, M. E. G. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, Great Britain, v. 68, p.57-77, 1987.

BRANDEN, R. C.; SILVA, C. M. Ocorrência de novos serotipos de Bronquite infecciosa em Brasil. In: Seminário Internacional de Patologia Avícola, 6, 1986.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO A.Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biotecnologia e Ciência em Desenvolvimento**, v. 26, p. 44-51, 2002.

CABEZAS, S.; ROJAS, G.; PAVON, A.; ALVAREZ, M.; PUPO, M.; GUILLEN, G.; GUSMAN, M. G. Selection of phage-displayed human antibody fragments on *Dengue virus* particles captured by a monoclonal antibody: Application to the four serotypes. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 147, n. 2, p. 235-243, 2008.

CAETANO, A. G.; GIBERTONI, A. M.; GONÇALVES, M. C. M.; MONTASSIER, H. J. Construction and expression of scFv antibody fragment specific for infectious bronchitis virus in *Escherichia coli*. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, v. 128, p. 245, 2009.

CAETANO, A.G. Produção de anticorpos monoclonais contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas pela técnica de phage display. 2009. 115f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2009.

CAPUA, I. A 'novel' infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. **J. Vet. Med. B.**, v. 41, p.83-89, 1994.

CAPUA, I. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). **Avian Pathol.**, Cambs, v. 28, p. 587-592, 1999.

CARDOSO, T. C.; MONTASSIER, H. J.; GALLETTI, M. C. M.; PINTO, A. A. (1996) Evaluation of an indirect ELISA method for the detection of chicken antibodies against infectious bronchitis virus. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 64-69, 1996.

CAVANAGH, D. The coronavirus surface glycoprotein. In: SIDDELL, S. G. The coronaviridae. New York: Plenum Press, 1995. p. 73-113.

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 34, n. 6, p. 439- 448, 2005.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis vírus. **Vet. Res.**, Les Ulis, v. 38, p. 281-297, 2007.

CAVANAGH, D.; GELB, J. Infectious bronchitis. In: SAIF, L. J. (Ed.). Diseases of poultry. Ames: Blackwell Publishing, 2008. p. 117-135.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W. Diseases of poultry, 10th .ed. Ames: Iowa University Press, 1997. p. 511-526.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious Bronchitis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. Diseases of poultry. 11 ed. Ames: Iowa State University Press Ames, 2003. p. 101-119.

CAVANAGH, D.; DARBYSHIRE, J. H.; DAVIS, P. Induction of humoral neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 13, p. 573-583, 1984.

CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J.; COOK, J. K. A. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 21, n. 3, p. 401-408, 1992.

COOK, J. K. A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 13, n. 4, p. 733-741, 1984.

DARBYSHIRE, J. H. Organ culture in avian virology: a review. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 7, n. 3, p. 321-335, 1978.

DAVIES, E.L.; SMITH, J.S.; BIRKETT, C.R.; MANSER, J.M.; ANDERSON-DEAR, D.V.; JOUNG, J.R. Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. **J. Immunol Methods**, v 186, n.1, p. 125–135, 1995.

DE WIT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 29, n. 2, p. 71-77, 2000.

DHINAKAR RAJ G.; JONES, R.C.; Immunopathogenesis of infection in SPF chicks and commercial broiler chickens of a variant infectious bronchitis virus of economic importance. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 25, n. 3, p. 481-501, 1996.

DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR. A.; MACARI, M. Doença das aves. Campinas: FACTA, 2000. p. 293-300.

DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I.; ORBELL, S. J.; PAUL, G.; HUGGINS, M. B.; MALO, A.; SILVA, B. G. M; COOK, J. K. A. Characterization of Infectious Bronchitis Virus isolates from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 44, n. 3, p. 582-589, 2000.

FILPULA, D. Antibody engineering and modification technologies. **Biomol. Engineering**, v. 24, n.2, p. 201-215, 2007.

FOORD, A. J.; MULLER, J. D.; YU, M. Production and application and recombinant antibodies to foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3ABC. **J. Immunol. Methods**, v. 321, p. 142-150, 2007.

GELB, Jr, J.; ROSENBERGER, J. K.; FRIES, P. A. Protection afforded infectious bronchitis virus – vaccinated sentinel chickens raised in a comercial environment. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 33, n. 4, p.764-769, 1989.

GELB, Jr, J.; WOLFF, J. B.; MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 35, n.1, p. 82-87, 1991.

GELB, Jr, J.; KEELER, C. L. JR; NIX, W. A.; ROSENBERGER, J. K., CLOUD, S. S. Antigenic and S-1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.41, n. 3, p. 661-669, 1997.

GELB, Jr, J.; JACKWOOD, M. W. Infectious bronchitis. In: SWAYNE, D. E. (ed) A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Kennett Square, 1998, pp. 169-174.

GIBERTONI, A. M.; FERNANDES, C. C.; MONTASSIER, M. F. S.; MONTASSIER, H. J. Cloning, expression and characterization of nucleocapsid protein from infectious

bronchitis vírus in *Escherichia coli*. **Vet. Immunol. and Immunophatol.**, v. 128, p. 243, 2009.

GUO, J. Q.; YOU, S.Y.; LI, L.; ZHANG, C. Y. Construction and high-level expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for acidic isoferritin in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v.102, n. 2, p. 177-186, 2003.

HANDBERG, K. J. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis vírus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparason with a immunohistochemical technique. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 28, n. 4, p. 327-335, 1999

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arq. Esc. Sup. Vet. MG**, Belo Horizonte, v.10, p.131-63, 1957.

HOPKINS, S. R. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolants. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.18, n.2, p.231-239, 1974.

IGNJATOVIC, J.; ASHTON, F. Detection and differentiation of avian infectious bronchitis viruses using antibody-based ELISA. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 25, n. 4, p. 721-736, 1996.

IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The S1 glicoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Arch. Virol.**, Vienna, v.138, n.1, p.117-134, 1994.

IGNJATOVIC, J.; McWATERS, P. G. Monoclonal antibodies to three structural proteins of avian infectious bronchitis virus: characterization of epitopes and antigenic differentiation of Australian strains. **J. Gen. Virol.**, Great Britain, v. 72, p. 2915-2922, 1991.

IGNJATOVIC, J; SAPATS, S. Confirmation of the existence of two distinct genetic groups of infectious bursal disease virus in Austrália. **Aust. Vet. J.**, Blackwell, v. 80, n.11, p. 689-694, 2001.

ITO, N. K. ; MIYAJI, C.; OKABAYASHI, S. Controle de variantes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. In: CONFERÊNCIA APINCO, 2006, Santos, **Anais...** p.75-99.

JIA, W.; KARACA, K.; PARRISH, C. R.; NAQI, S. A. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. **Arch. Virol.**, Vienna, v. 140, n. 2, p. 259-265, 1995.

KANT, A.; KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D. J.; KUSTERS, J. G.; POELWIJK, F. A. J.; VAN DER ZEIJST, B. A. M. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 73, n. 3, p. 591-596, 1992.

KARACA, K.; NAQI, S.; GELB, Jr., J. Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 36, n.4, p. 903-915, 1992.

KICZAK, L.; KASZTURA, M.; KOSCIELSKA-KASPRZAK, K. Selection of potent chymotrypsin and elastase inhibitors from M13 phage display library of basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). **Bioch. Bioph. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.**, v. 1550, n.2, p. 153-163, 2001.

KING, D. J.; CAVANAGH, D. Infectious bronchitis. In: In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, J. R. **Diseases of poultry**. 9 ed. Ames: Iowa University Press, 1991. p. 471-484.

KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A.; VAN ROOZELAAR, D.J. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 71, n. 9, p. 1929-1935, 1990.

KOCH, G.; KANT, A.; COOK, J. K. A.; CAVANAGH, D. Epitopes of neutralizing antibodies are localized within three regions of the S1 spike protein of infectious bronchitis virus. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS, 2., 1991 Rauschhol/hausen, Germany. **Proceedings...**, p. 154-160.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.

KRETZSCHMAR, T.; VON RUDEN, T. Antibody discovery: phage display. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, n. 6, p. 595-598, 2002.

KUSTERS, J. G.; NIESTERS, H. G. M.; LENSTRA, J.A.; HORZINEK, M. C.; VAN DER ZEIJST, B. A. M. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. **Virology**, Duluth, v.196, n.1, p.217-221, 1989.

KUSTERS, J. G.; JAGER E. J.; NIESTERS, H. G.; VAN DER ZEIJST. Sequence evidence for RNA recombination in fields isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Vaccine**, London, v. 8, n.6, p. 605-608, 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T₄ bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680-681, 1970.

LAI, M. M. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, San Diego, v. 48, n.1, p. 1-100, 1997.

LEE, C. W.; JACKWOOD, M. W. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. **Arch. Virol.**, Austria, v. 145, n. 10, p. 2135-2148, 2000.

LOA, C.C.; LIN, T. L.; WU, C. C.; BRYAN, T. A.; HOOPER, T.; SCHRADER, D. Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli*. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 2, n. 116, p. 161-167, 2004.

McCAFFERTY, J.; GRIFFITHS, A.D.; WINTER, G.; CHISWELL, D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v. 348, p. 552-554, 1990.

McCOMARCK, W. T.; TJOELKER, L. W.; THOMPSON, C. B. Immunoglobulin gene diversification by gene conversion. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v. 45, p. 27-25, 1993.

MAKOWSKI, L. Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 4, n.2, p 225-230, 1994.

MARASCO, W. A.; SUI, J. The growth and potencial of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. **Nature Biotechnol.**, v. 25, p.1421-1433, 2007.

MEIR, R.; ROSENBLUT, E.; PERL, S.; KASS, N.; AYALI, G.; HEMSANI, E.; PERK, S.; Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. **Avian Dis.**, Kennet Square, n. 48, n. 3, p. 635-641, 2004.

MEIR, R.; MAHARAT, O.; FARNUSHI, Y.; SIMANOV, L. Development of a TaqMan RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus in chickens, and comparison of RT-PCR and virus isolation. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, 2009. in press

MOCKETT, A. P. A.; CAVANAGH, D.; BROWN, T. D. K. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. **J. Gen. Virol.**, Great Britain, v. 65, p. 2281-2286, 1984.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L. J.; MONTASSIER, H. J. Genetic diversity on S1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONAVIRUS, 2006, Rauschholzhausen, Germany. **Proceedings...** p. 119-131.

MOORE, K.M.; BENNETT, J. D.; SEAL, B.S.; JACKWOOD, M.W. Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variantisolate from Georgia and California. **Virus Genes**, Netherlands, v.17, n.1, p. 63-83, 1998.

NDIFUNA, A.; WATERS, A. K.; ZHOU, M.; COLLISSON, E. W. Recombinant nucleocapsid protein is potentially a inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 37-44, 1998.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. (OIE). Avian infectious bronchitis. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 2000. Disponível em:
<http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/ancien_manuel/A_00092.htm> Acesso em: 21 ago. 2007.

OZAWA, M.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Identification and characterization of peptides binding to Newcastle disease virus by Phage display. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 67, n.12, p. 1237-1241, 2005.

PARK, K. J.; PARK, D. W.; KIM, C.H.; HAN, B. K.; PARK, T. S.; HAN, J. Y.; LILLEHOJ, H. S.; KIM, J-K. Development and characterization of a recombinant chicken single-

chain Fv antibody detecting *Eimeria acervulina* sporozoite antigen. **Biotechnol. Lett.**, Netherlands, v. 5, n. 27, p. 289-295, 2005.

POUNGPAIR, O.; CHAICUMPA, W.; KULKEAW, K.; MANEEWATCH, S.; THUENG-IN, K.; SRIMANOTE, P.; TONGTAWA, P.; SONGSERM, T.; LEKCHAROENSUK, P.; TAPCHAISRI, P. Human single chain monoclonal antibody that recognizes matrix protein of heterologous influenza A virus subtypes. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 1, n. 159, p. 105-111, 2009.

RESENDE, J. S. Genotipificação de isolados de vírus da bronquite infecciosa das galinhas em surtos ocorridos na avicultura industrial de Minas Gerais, Brasil, de 1972 a 1989. 2003. 111f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2003.

REYNAUD, C. A.; ANQUEZ, V.; GRIMAL, H.; WEILL, J. C. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. **Cell**, v. 48, n. 3, p. 379-388, 1987.

REYNAUD, C. A.; DAHAN, A.; ANQUEZ, V.; WEILL, J. C. Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region. **Cell**, v. 59, n.1, p. 171-183, 1989.

RODI, D. J.; MAKONSKI, R. Phage display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. **Curr. Opp. Biotechnol.**, v. 10, n.1, p. 87-93, 1999.

RUSSEL, M.; LOWMAN, H.B.; CLACKSON, T. Introduction to phage biology and phage display. In: CLACKSON, T.; LOWMAN, H.B. (Ed.). Phage display: a practical approach. Oxford: Oxford University Press; 2004. p. 1-26.

SAPATS, S. I.; HEINE, H. G.; TRINIDADE, L. Generation of chicken single chain antibody variable fragments (scFv) that differentiate and neutralize infectious bursal disease virus (IBDV). **Arch Virol.**, Austria, v. 148, p. 495-497, 2003.

SAPATS, S. I.; TRINIDADE, L.; GOULD, G. Chicken recombinant antibodies specific for very virulent infectious bursal disease virus. **Arch. Virol.**, Austria, v.151, p. 1548-1551, 2006.

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C. An apparently new respiratory disease of chicks. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.78, p. 413-22, 1931.

SCHMITZ, U.; VERSMOLD, A.; KAUFFMANN, P.; FRANK, H.G. Phage display: A molecular tool for the generation of antibodies – A Review. **Placenta**, v. 21, p. 106-112, 2000.

SCOTT, J. K.; SMITH, G.P. Searching for peptide ligands with on epitope library. **Science**, v. 249, p. 386-390, 1990.

SEO, H. S.; WANG L, SMITH R, COLLISSON E W. The carboxyl-terminal 120 residue polypeptide of infectious bronchitis virus, nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chicken from acute infection. **J. Virol.**, v. 71, n. 10, p. 7889-7894, 1997.

SEAH, J. N.; YU, L.; KWANG, J. Localization of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. **Vet. Microbiol.**, v. 75, p. 11-16, 2000.

SILVA, J. M. L. Bronquite infecciosa das galinhas: como e quando introduzir novas vacinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1989, São Paulo. **Anais...** Campinas : FACTA, 1989. p. 145-150.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, 1985.

SONG, C. S.; LEE Y. J.; LEE C. W.; SUNG, H-W.; KIM, J-H.; MO, I-P.; IZUMIYA, Y.; JANG, H-K.; MIKAMI, T. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. **J. Gen. Virol.**, Great Britain, v. 79, p. 719-723, 1998

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v. 115, p. 113-128, 2005.

SOUSA, R. L. M.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.. Detection and quantification of antibodies to Newcastle disease virus in ostrich and rhea sera using a liquid phase blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Clin. Diagn. Labor. Immunol.**, v. 7, p. 940-944, 2000.

STUDIER, F. W.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J.J.; DUBENDORF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol.**, v. 185, p. 60-68, 1990.

TOWBIN, H.; STAELHETIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 76, n.9, p. 4350-4354, 1979.

VILLARREAL, L. Y.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN J. L.; SAIDENBERG, A. B. S.; ASSAYAG, M. S.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying and broilers. **Avian dis.**, Kennet Square, v. 51, n. 4, p. 974-978, 2007.

WALSH, G. Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology. London: Wiley, 1998, p. 2-94.

WANG, L.; JUNKER, D.; COLLISON, E. W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virology**, Duluth, v. 192, n. 2, p.710-716, 1993.

WANG, C. H.; HONG, C. C.; SEAK, J. C. H. An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using an S1 spike polypeptide. **Vet. Microbiol.**, v. 85, n. 4, p. 333-342, 2002.

WEICKERT, M. J.; DOHERTY, D. H.; BEST, E. A.; OLINS, P. O. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.7, n. 5, p. 494-499, 1996.

WENTZ, E. Bronquite infecciosa – Que cepa vacinal usar? In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1992, Santos. **Anais...** p. 165-168.

WILLATS, W. G. T. Phage display: practicalities and prospects. **Plant Mol. Biol.**, Netherlands, v. 50, n. 6, p. 837-843, 2002.

WILLIAMS, A.K.; WANG, L.; SNEED, L. W.; COLLISON, E. W. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of Infectious Bronchitis viruses and other coronaviruses. **Virus Res.**, v. 25, n. 3, p. 213-222, 1992.

WILSON, D. R.; FINLAY, B. B. Phage display: application, innovations and issues in phage and host biology. **Can. J. Microbiol.**, Canada, v. 44, n.4, p. 313-329, 1998.

WITTRUP, K. D. Phage on display. **Trends in Biotechnol.**, v. 17, n.11, p. 423-424, 1999.

YAMANAKA, H.I.; INOUE, T.; IKEDA-TANAKA, O. Chicken Monoclonal Antibody Isolated by a Phage Display System. **J. Immunol.**, v. 157, n. 3, p. 1156–1162, 1996.

YOKOTA, T.; MILENIC, D. E.; WITHLOW, M.; SCHLOM, J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. **Cancer Res.**, v. 52, n.12, p. 3402-3408, 1992.

ZHAO, A.; QIN, W.; HAN, Y.; WEN, W.; ZHANG, W.; LIAN, Z.; CHEN, G.; ZHANG, Z.; PENG, J.; WANG, H.; GUO, Y. Isolation and identification of an scFv antibody against nucleocapsid protein of SARS-CoV. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 9, p.1026-1033, 2007.