

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

**PRODUÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS
RECOMBINANTES SCFV-N E SCFV-S1 E SUAS
APLICAÇÕES NA DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA**

**Aline Gonçalves Caetano
Biomédica**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2009**

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

**PRODUÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS
RECOMBINANTES SCFV-N E SCFV-S1 E SUAS
APLICAÇÕES NA DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO
VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA**

Aline Gonçalves Caetano

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

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

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
JUNHO DE 2009**

Caetano, Aline Gonçalves
C128p Produção dos fragmentos de anticorpos recombinantes scFv-N e scFv-S1 e suas aplicações na detecção e diferenciação do Vírus da Bronquite Infeciosa / Aline Gonçalves Caetano. -- Jaboticabal, 2009 xviii, 78 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Hélio José Montassier
Banca examinadora: João Pessoa Araujo Júnior, Valéria Marçal Félix de Lima, Edison Luiz Durigon, Jesus Aparecido Ferro
Bibliografia

1. Vírus da Bronquite Infeciosa. 2. Fragmentos de anticorpos recombinantes (scFv). 3. Detecção e diferenciação viral. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 616.988

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

ALINE GONÇALVES CAETANO, filha de Odair Santos Caetano e Rosa Gonçalves Caetano, nascida em 17 de Janeiro de 1981, em Jaboticabal, SP. Em 1999 iniciou o curso de Ciências Biológicas – Modalidade Médica na Universidade de Araraquara (UNIARA), concluindo em Julho de 2003, recebendo o título de Biomédica. Estagiou no laboratório de Imunologia e Virologia (Departamento de Microbiologia – UNESP/Jaboticabal) de Agosto a Dezembro de 2003. Em Março de 2004 ingressou no curso Mestrado em Microbiologia oferecido pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, obtendo o título de mestre em Julho de 2005. Em Agosto de 2005 ingressou no curso de Doutorado em Microbiologia oferecido pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, obtendo o título de doutora em Junho de 2009.

A História de uma Tese

Foi a quatro anos que comecei algo... algo que agora apresento a vocês. Nesses quatro anos senti que brinquei com minha imaginação, meu conhecimento, minha capacidade... arrisquei-me em um novo trabalho, novos desafios. O que eu sinto hoje é diferente de antes... Continuo assombrada pelo medo do novo, mas gostei... e muito! Gostei até de aprender que a pesquisa é difícil, mas surpreendente, e, principalmente, que o esforço vale a pena! Hoje eu sei...

Para maior percepção desse sentido devo contar que esta não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas intercorrências, de toda ordem, que me atropelaram. Esses percalços, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-se o brilho. E ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

Se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas as espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia e sofrimento em esperança, cuja base é a fé.

Considero que a elaboração de uma tese de doutorado seja um produto coletivo, embora sua redação, responsabilidade e stress seja, predominantemente, individual e talvez esta tese seja o resultado mais visível desse processo de construção em meio a uma conjuração de afetos e amizades. Dessa forma dando continuidade a história, dedico algumas palavras aqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente ou, ainda pelo fato de simplesmente existirem...

Ofereço e Dedico

Aos meus pais,

Odair e Rosa, pelo exemplo de vida, pelo esforço e incentivo constantes para a minha realização pessoal e profissional.

A minha eterna gratidão, sem eles, certamente esta caminhada teria sido muito mais árdua.

A minha irmã,

Alessandra, pelo carinho, companheirismo e apoio nos momentos difíceis, o meu muito obrigado!!!

Ao Jorge,

Pelo carinho e dedicação. Todos os momentos que tivemos foram muito especiais...

Aos demais familiares, pelo apoio e carinho...

A Deus, pelo dom da vida e oportunidade de ter realizado mais uma conquista... pela presença e proteção constante nos momentos de alegria e nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Hélio Jose Montassier

Pela orientação e ensinamentos transmitidos com segurança, pela dedicação constante ao bom desenvolvimento deste trabalho e pelas experiências acadêmico-científicas que, certamente, serão de grande valia na minha carreira como docente e pesquisadora.

Agradeço a confiança que em mim depositou, a amizade, o estímulo constante e a compreensão nos momentos difíceis.

Aos alunos pós-graduandos, de iniciação científica e demais amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia, pela amizade, colaboração efetiva e pelo gostoso convívio: **Aliandra, Andressa, Camila, Cibele, Cíntia, Daniel, Denise, Igor, Mariana, Fátima, Nicole, Telma, Tyta, Vanessa** e em especial, à técnica **Maria de Lourdes Tamanine**, pela amizade, dedicação e auxílios prestados.

À minha amiga **Jack**, pelo apoio e incentivo em todos os momentos durante esses anos.

À Coordenação do Programa de **Pós-graduação em Microbiologia 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.

À todos os funcionários do departamento de Microbiologia, e em especial a **Edna e Rosangela**, agradeço o carinho e atenção que vocês sempre me ofereceram.

Ao **Prof. Jesus, Profa. Maria Inês e Prof. Alessi**, obrigado pela confiança, apoio, e pela gentil permissão da realização de alguns experimentos em seus laboratórios.

À **CAPES** pela concessão de bolsa, que permitiu minha total dedicação a este trabalho. E à **FAPESP e CNPq** pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

E a todos aqueles que de uma forma ou de outra participaram de minha formação, aqui omitidos, mas não esquecidos, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELA.....	xvi
RESUMO.....	xvii
SUMMARY.....	xviii
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. A Bronquite infecciosa (BI).....	04
2.1.1. Características genéticas e estruturais do VBI.....	04
2.1.2. Variabilidade genética e antigênica do VBI.....	08
2.1.3. Patogenia e Sinais clínicos.....	09
2.1.4. Epidemiologia.....	09
2.1.5. Medidas de controle.....	12
2.1.6. Métodos de Diagnóstico.....	13
2.2. Tecnologia do DNA recombinante para a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpos funcionais.....	14
2.2.1. Técnica de <i>Phage display</i>	15
III. OBJETIVOS.....	21
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	22

4.1. Oligonucleotídeos iniciadores.....	22
4.2. Extração do RNA total do baço de galinhas imunizadas com a estirpe vacinal H120 do VBI.....	22
4.3. Obtenção do gene artificial VH-linker-VL codificador do fragmento de anticorpo scFv de galinha	24
4.3.1. Reação de transcrição reversa (RT).....	24
4.3.2. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para obtenção das cadeias variáveis leve (VL) e pesada (VH) de imunoglobulina de galinha.....	24
4.3.3. Análise eletroforética em gel de agarose.....	25
4.3.4. Construção do gene artificial VH-linker-VL.....	25
4.3.5. Purificação e quantificação do produto gênico VH-linker-VL.....	26
4.4. Clonagem do gene artificial VH-linker-VL em fagomídeo pCANTAB 5E e obtenção da biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv) em fagos.....	26
4.4.1. Digestão do gene artificial VH-linker-VL com as enzimas de restrição <i>NotI</i> e <i>SfiI</i>	26
4.4.2. Preparação e manutenção de estoque da bactéria <i>E. coli</i> linhagem TG1.....	27
4.4.3. Preparação de células de <i>E. coli</i> TG1 eletrocompetentes.....	28
4.4.4. Ligação do gene artificial VH-linker-VL ao vetor pCANTAB 5E e limpeza do material ligado.....	29
4.4.5. Eletroporação.....	30
4.4.6. Recuperação da biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv) com a utilização do fago auxiliar <i>M13K07</i>	30
4.4.7. Seleção dos fragmentos de anticorpos (scFv) apresentados em fagos contra a estirpe vacinal H120 do VBI (<i>Panning</i>).....	31
4.4.8. Preparação da placa mãe <i>E. coli</i> TG1.....	33
4.4.9. Avaliação dos fragmentos de anticorpos (scFv) apresentados em fagos contra a estirpe vacinal H120 do VBI.....	34
4.4.10. Avaliação pela técnica de Western blotting da especificidade dos fragmentos de anticorpos (scFv) apresentados em fagos contra as proteínas	

estruturais da estirpe vacinal H120 do VBI.....	35
4.5. Subclonagem do gene artificial VH-linker-VL em vetor pET 28a e expressão dos fragmentos de anticorpos (scFv) solúveis por células de <i>E. coli</i> linhagem BL21.....	36
4.5.1. Subclonagem em vetor pET 28a	36
4.5.2. Oligonucleotídeos utilizados.....	37
4.5.3. Extração plasmideal dos clones selecionados A6P1 e D2P4.....	38
4.5.4. Amplificação dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1 e VH-linker-VL-D2P4 para clonagem em vetor pET 28a	38
4.5.5. Digestão dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1 e VH-linker-VL-D2P4 e do vetor pET 28a.....	38
4.5.6. Preparação de células de <i>E. coli</i> BL21 eletrocompetentes.....	39
4.5.7. Ligação dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1 e VH-linker-VL-D2P4 ao vetor pET 28a	39
4.5.8. Transformação das células competentes de <i>E. coli</i> BL21.....	39
4.5.9. Seleção dos clones transformantes <i>E. coli</i> BL21.....	40
4.5.10. Seqüenciamento de nucleotídeos dos clones A6P1H11 e D2P4F7.....	40
4.5.11. Indução e expressão em pequena escala dos fragmentos de anticorpos solúveis pelos clones transformantes A6P1H11(scFv-N) e D2P4F7 (scFv-S1) de <i>E. coli</i> BL21.....	41
4.5.12. Análise pela técnica de SDS-PAGE e Western blotting da expressão dos fragmentos de anticorpos solúveis.....	41
4.5.13. Indução e expressão em média escala dos fragmentos de anticorpos solúveis pelos clones transformantes A6P1H11 (scFv-N) e D2P4F7 (scFv-S1) de <i>E. coli</i> BL21.....	42
4.6. Aplicação dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1 em ensaios de detecção e diferenciação de estirpes do VBI.....	42
4.6.1. Avaliação pela técnica de Western blotting da atividade funcional dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1.....	42

4.6.2. Titulação pela técnica de ELISA indireto dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1.....	43
4.6.3. Avaliação pela técnica de ELISA indireto da especificidade dos fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 frente a estirpes de referência e isolados brasileiros do VBI.....	43
4.6.4. Avaliação da atividade neutralizante em ovos embrionados do fragmento de anticorpo scFv-S1.....	44
4.6.5. Detecção pela técnica de imunohistoquímica da estirpe viral M41 do VBI em cortes de traquéia de aves infectadas experimentalmente utilizando os fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1.....	45
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1. Clonagem em fagomídeo pCANTAB 5E e seleção da biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv) em fagos.....	47
5.1.1. Construção do gene artificial VH-linker-VL e clonagem em fagomídeo pCANTAB 5E.....	47
5.1.2. Seleção da biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv) em fagos contra a estirpe vacinal H120 do VBI.....	48
5.2. Subclonagem do gene artificial VH-linker-VL em vetor pET 28a e produção dos fragmentos de anticorpos solúveis por células de <i>E. coli</i> BL21.....	51
5.2.1. Subclonagem dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1 e VH-linker-VL-D2P4 em vetor pET 28a e transformação de células de <i>E. coli</i> BL21.....	51
5.2.2. Sequenciamento de nucleotídeos dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1H11 e VH-linker-VL-D2P4F7.....	52
5.2.3. Produção dos fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 solúveis por células de <i>E. coli</i> BL21.....	54
5.3. Avaliação da atividade funcional dos fragmentos de anticorpos solúveis	

scFv-N e scFv-S1.....	56
5.3.1. Determinação da atividade funcional dos fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 frente as proteínas virais estruturais da estirpe H120 do VBI através do ensaio de Western blotting.....	56
5.3.2. Titulação dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1 pelo método de ELISA indireto.....	57
5.3.3. Avaliação da especificidade dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1 frente a estirpes de referência e isolados brasileiros do VBI pela técnica de ELISA indireto.....	58
5.3.4. Avaliação da atividade vírus-neutralizante do fragmento de anticorpo solúvel scFv-S1.....	60
5.3.5. Aplicação dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1 na detecção da estirpe viral M41 do VBI em amostras de tecido de aves infectadas experimentalmente.....	61
VI. CONCLUSÕES.....	65
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema contendo a organização estrutural do VBI e as quatro proteínas estruturais principais: a proteína de nucleocapsídeo (N), a glicoproteína da matriz (membrana) (M), a proteína pequena não-glicosilada (E) e as glicoproteínas das espículas de superfície (S) (www.cell_research.com/20033/20033COVER.htm)..... 07
- Figura 2.** Representação esquemática do genoma do VBI e localização dos principais sítios antigênicos da glicoproteína S (Modelo elaborado por Furuyama, 2005)..... 07
- Figura 3.** Esquema da estrutura do bacteriófago: bacteriófagos, ou simplesmente fagos, pertence a um grupo de vírus bacterianos com fita única de DNA envolta de um longo capsídeo proteico cilíndrico. A proteína pVIII é a principal formadora do capsídeo proteico e a proteína pIII é a que utilizamos para a apresentação dos fragmentos de anticorpos (scFv) no presente estudo. pVI, pVII e pXIX representam outras proteínas formadoras da partícula viral..... 16
- Figura 4.** Esquema da estrutura do bacteriófago *M13* carreando o fragmento de anticorpo scFv..... 18
- Figura 5.** O vetor fornecido no Módulo de Expressão é o fagomídeo pCANTAB 5E. Este fagomídeo é desenhado de tal forma que os genes da região variável do anticorpo possam ser clonados entre a seqüência líder e o gene da proteína pIII do fago *M13*. A proteína de fusão resultante retém as funções de ambas as proteínas que a originam. Além disso, o fagomídeo possui a origem de replicação do plasmídeo pUC19 e também do fago *M13*,

o que permite que seja cultivado como plasmídeo ou empacotado como um fago *M13* recombinante na presença do fago auxiliar *M13K07* (*phage rescue* ou recuperação por fago)..... 27

Figura 6. O vetor de expressão em *E. coli* pET 28a (Novagen) possui a marca de seleção KAN, 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 poli-histidina na extremidade carboxi-terminal e/ou na extremidade 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 agarose combinadas ao níquel..... 37

Figura 7. Eletroforograma do material genético amplificado e purificado. Canaletas (1) tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen Corp.), (2) fragmento amplificado do gene codificador da cadeia variável pesada (VHF e VHR), (3) fragmento amplificado do gene codificador da cadeia variável leve (VLF e VLR), (4) fragmento amplificado do gene codificador do polipeptídeo scFv (linker1, linker2, VHF e VLR)..... 48

Figura 8. Análise dos fragmentos scFv expressos em fagos. (A) Utilização dos fagos expressos pelo clone D2P4. Linha (1) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (2) Vírus H120. (B) Utilização dos fagos expressos pelo clone A6P1. Linha (1) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (2) Vírus H120.. 50

Figura 9. Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes das regiões variável de cadeia pesada (VH) e variável de cadeia leve (VL) presentes nos clones A6P1H1 (scFv-N) e D2P4F7 (scFv-S1) em relação a sequência de nucleotídeos do gene sintético scFv do clone CRAb21 (*Gene*

Bank nº AF506502) correspondente a codificação de um dos fragmentos de anticorpos monoclonais específicos para o Vírus da Doença Infecciosa da Bursa (SAPATS et al., 2003). Somente os nucleotídeos que apresentaram diferenças com relação à sequência de consenso é que foram destacados, sendo que os resíduos idênticos foram apresentados sob a forma de pontos e as deleções sob a forma de traços..... 53

Figura 10. Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos deduzidas dos genes das regiões variável de cadeia pesada (VH) e variável de cadeia leve (VL) presentes nos clones A6P1H1 (scFv-N) e D2P4F7 (scFv-S1) em relação a sequência de resíduos de aminoácidos deduzidos do gene sintético scFv do clone CRAb21 (Gene Bank nº AF506502) correspondente a um dos fragmentos de anticorpos monoclonais específicos para o Vírus da Doença Infecciosa da Bursa (SAPATS et al., 2003). Somente os resíduos de aminoácidos que apresentaram diferenças da sequência de consenso é que foram destacados, sendo que os resíduos idênticos foram apresentados sob a forma de pontos e as deleções sob a forma de traços. As regiões determinantes de complementariedade (CDRs) 1, 2 e 3 de VH e de VL foram também delimitadas por caixas, tendo sido destacadas também as regiões de *framework* (FR) 1, 2, 3 e 4 e a sequência de aminoácidos *linker*..... 54

Figura 11. Análise da expressão dos fragmentos de anticorpos scFv solúveis em amostras de extrato celular bruto e sobrenadante das culturas de *E. coli* BL21 submetidas a indução e lise. SDS-PAGE (A) Western Blotting (B). Linha: (1) Marcado de peso molecular (Bench Marck – Invitrogen Corp.), (2) controle negativo (3) sobrenadante clone A6P1H11, (4) Extrato celular bruto clone A6P1H11, (5) sobrenadante clone D2P4F7, (6) Extrato celular bruto clone D2P4F7..... 55

Figura 12. Análise da afinidade dos fragmentos de anticorpos scFv solúveis. Membrana A - Linha (1) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (2) Vírus H120 concentrado e purificado detectado com a utilização de pool de soro policlonal de galinha hiperimunizada, (3) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (4) LCA – controle negativo da reação com fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N, (5) Vírus H120 concentrado e purificado detectado com a utilização do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N. Membrana B - Linha (1) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (2) Vírus H120 concentrado e purificado detectado com a utilização de pool de soro policlonal de galinha hiperimunizada, (3) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (4) LCA – controle negativo da reação com fragmento de anticorpo monoclonal scFv-S1, (5) Vírus H120 concentrado e purificado detectado com a utilização do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-S1..... 57

Figura 13. Resultados do método de ELISA indireto realizado com diferentes diluições dos fragmentos de anticorpos scFv-S1 e scFv-N frente ao vírus H120..... 58

Figura 14. Reatividade dos fragmentos de anticorpos monoclonais contra a proteína N (A) e contra a proteína S1 (B) do VBI com estirpes homólogas e heterólogas do VBI nos testes de ELISA..... 60

Figura 15. (A) Utilização do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-S1 na detecção viral em corte de traquéia de ave experimentalmente infectada com a estirpe M41 do VBI. (B) Controle negativo: corte de traquéia de ave não infectada..... 62

Figura 16. (A) Utilização do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N na detecção viral em corte de traquéia de ave experimentalmente infectada com

a estirpe M41 do VBI. (B) Controle negativo: corte de traquéia de ave não infectada..... 63

Figura 17. (A) Controle positivo: Utilização dos anticorpos policlonais contidos no anti-soro de galinhas hiperimunizadas com a estirpe H120 na detecção viral em corte de traquéia proveniente de ave infectada experimentalmente com a estirpe M41 do VBI. (B) Controle negativo: corte de traquéia de ave não infectada..... 63

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR e respectiva localização do inserto gênico.....	22
--	----

Produção dos fragmentos de anticorpos recombinantes scFv-N e scFv-S1 e suas aplicações na detecção e diferenciação do vírus da Bronquite infecciosa

RESUMO

O vírus da Bronquite infecciosa (VBI) é um Coronavírus aviário que infecta aves domésticas de corte e postura, ocasionando grandes perdas econômicas na indústria avícola. Dada a natureza altamente contagiosa e aguda da doença, há uma grande necessidade do desenvolvimento de métodos diagnósticos que possam ajudar na detecção e/ou caracterização de estirpes variantes do VBI. Sendo assim, para auxiliar no diagnóstico laboratorial da infecção, foi construída uma biblioteca de fragmentos de anticorpos monoclonais pela técnica de *Phage-display*. Para tanto, após a imunização de galinhas com a estirpe vacinal H120, foi extraído o RNA total do baço das aves imunizadas e amplificadas as cadeias variáveis leve e pesada que foram unidas por *linker*, originando o fragmento gênico de cadeia única scFv. Após a realização de três ciclos de seleção foram obtidos 400 clones que foram avaliados em ensaios de ELISA e Western blotting para averiguação da especificidade dos mesmos frente às proteínas da estirpe H120. Após realização dos testes foram selecionados dois clones, um que apresentou grande reatividade para com a proteína de nucleocapsídeo (N) (scFv-N) e o outro com reatividade para com a subunidade 1 da glicoproteína de superfície (S) (scFv-S1). O anticorpo scFv-S1 quando utilizado em ensaio de vírus-neutralização em ovos embrionados mostrou título significativo de proteção. Já em testes de ELISA utilizando estirpes de referência e isolados brasileiros de campo do VBI, o anticorpo scFv-N foi capaz de detectar todas as estirpes (H120, M41, Arkansas, IBVPR05, IBVPR02, IBVPR01, IBVSC01), enquanto que o scFv-S1 pode discriminar as estirpes pertencentes ao sorotipo Massachusetts (H120, M41 e IBVSC01) das demais estirpes variantes avaliadas. Os fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 também mostraram bons resultados quando utilizados na técnica de imunohistoquímica indireta para a detecção do VBI em anéis traqueais fixados em formol. Sendo assim, todos os resultados obtidos demonstraram que os anticorpos scFv-N e scFv-S1 podem ser usados para a detecção e diferenciação de estirpes do VBI.

Palavras-chave: vírus da Bronquite infecciosa, anticorpos monoclonais recombinantes, detecção viral.

Production recombinant fragment antibodies to scFv-N and scFv-S1 and application in detection and differentiation of Infectious bronchitis virus

SUMMARY

Infectious bronchitis virus (IBV), the coronavirus of the chicken, is one of the main causes of economic loss within the poultry industry, affecting the performance of meat-type and egg-laying domestic fowls. Given the highly contagious and acute nature of the disease, there is an urgent need for the development of diagnostic assays that can detect and/or characterize IBV strains. In order to improve the laboratory diagnosis of IBV infection, phage-displayed recombinant antibody library derived from splenic mRNA of chickens immunized with H120 vaccine strain of infectious bronchitis virus (IBV) was constructed as single chain variable fragments (scFv) by overlap extension polymerase chain reaction (PCR) of the individual heavy (VH) and light (VL) chain variable gene segments. After three rounds of panning selection, ten scFv phage display antibodies of 400 randomly chosen clones were demonstrated to react with IBV antigens by ELISA. The western blot analysis selected two scFv antibodies reacting strongly with nucleocapsid (N) (scFv-N) protein or subunit 1 of spike glycoprotein (S1) (scFv-S1) of IBV. The anti-S1 scFv antibody showed a significant neutralization titre in embryonating chicken egg test. In ELISA analysis using reference IBV strains and Brazilian field isolates, the anti-N scFv antibody was able to detect all strains (H120, M41, ARKANSAS, IBVPR05, IBVPR02, IBVPR01, IBVSC01), while the anti-S1 could discriminate Massachusetts serotype (H120, M41 and IBVSC01) between variant strains. A scFv-based indirect immunoperoxidase (IP) procedure was also applied to detect infectious bronchitis virus (IBV) antigens in formalin-fixed tracheal tissue sections. Thus, the results showed that scFv-N and scFv-S1 antibodies can be used for the detection and differentiation of IBV strains.

Key-words: Infectious bronchitis virus, recombinant monoclonal antibodies, viral detection.

I- INTRODUÇÃO

O vírus da Bronquite infecciosa (VBI) é o agente etiológico de uma importante doença infecciosa das aves, a Bronquite infecciosa (BI), que ocorre com elevada frequência em galinhas, frangos de corte e reprodutores dessas linhagens de aves. Esse vírus pertence à ordem *Nidovirales*, à 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 III, sendo tais resultados posteriormente confirmados pelo sequenciamento genômico dos sorotipos mais relevantes do vírus.

O VBI é constituído por quatro proteínas estruturais, que foram identificadas como 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 mutações e alterações podem ocorrer nessas proteínas, sendo esses eventos responsáveis pela elevada variabilidade genética e antigênica do vírus, onde a glicoproteína S1 se constitui na mais diversificada quando comparada as outras proteínas estruturais. Na natureza, a consequência disso é o isolamento contínuo de novas estirpes variantes do VBI, que causam a quebra da imunidade conferida pelas estirpes vacinais. Tal situação enfatiza a importância de se buscar diagnósticos laboratoriais mais efetivos para a detecção de isolados desse patógeno viral.

Vários métodos têm sido usados para uma identificação mais rápida de estirpes variantes do VBI, incluindo os procedimentos de biologia molecular como RT-PCR, realizada na maioria das vezes, com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene codificador da subunidade S1, seguindo-se da técnica de RFLP, ou

alternativamente, os testes de imunodiagnóstico, como inibição da hemaglutinação, vírus-neutralização e ELISA, 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 mono-específicos traz uma contribuição relevante ao estudo da BI. Diversas formas de se produzir anticorpos monoclonais são descritas, sendo de maior destaque o hibridoma e a técnica de *Phage display*. Esta última se trata de um procedimento alternativo, onde é criada uma biblioteca de apresentação de fragmentos de anticorpos monoclonais (scFv - *single chain Fv*) em bacteriófagos, a fim de se selecionar clones relevantes, produtores de anticorpos (scFv) para o antígeno desejado. Em resumo, nesse sistema, a partir do RNA extraído de células B imunes provenientes de órgãos linfóides, 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 sequência *linker* para reconstituir um gene artificial (VH-linker-VL) o qual codifica os diversos fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) de anticorpos monoclonais.

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 pIII 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. 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 bem sucedidos de fragmentos de anticorpos recombinantes.

Com relação a essa técnica de obtenção de anticorpos monoclonais, as aves quando comparadas aos mamíferos apresentam maior facilidade de obtenção das sequências codificadoras das regiões variáveis de anticorpos, pois possuem apenas um

gene VH e um gene VL funcional, que têm alteradas suas sequências internas (CDRs - Regiões Determinantes de Complementariedade) pela inserção de segmentos de pseudogenes. Assim, apenas um par de iniciadores é necessário para a amplificação dos genes codificadores de cada cadeia de imunoglobulina (leve e pesada) e, por conseguinte, a construção da biblioteca de anticorpos se torna relativamente mais simples.

Considerando todas as explicações anteriores, neste trabalho foram utilizadas técnicas de engenharia genética para geração de fragmentos de anticorpos monoclonais a partir de células do baço de aves hiperimunizadas com a estirpe vacinal H120 do VBI. Para tanto, foi criada uma biblioteca de anticorpos apresentados em fagos pela técnica de Phage display, onde foram selecionados dois clones, um deles, com especificidade para a glicoproteína de superfície S1 (scFv-S1) e o outro, para a nucleoproteína N (scFv-N), que tiveram os seus genes codificadores VH-linker-VL extraídos e posteriormente ligados ao vetor pET 28a que foi utilizado na transformação de *E. coli* (BL21) a fim de que fossem expressos os fragmentos de anticorpos sob a forma solúvel e funcional, para que assim, sejam utilizados em ensaios sorológicos de detecção e diferenciação de estirpes virais, auxiliando na pesquisa e evolução do VBI no Brasil.

II- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Bronquite infecciosa

A Bronquite infecciosa (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 Coronavírus aviário é o agente etiológico dessa patologia, uma doença aguda e altamente infecciosa que acomete aves de ambos os sexos e das mais diferentes idades, seja na criação para a produção de frangos de corte, na criação para a produção de ovos ou ainda em aves reprodutoras dessas linhagens. Essa enfermidade ocorre praticamente em todas as regiões do mundo, onde existe avicultura industrial, sendo extremamente difícil seu controle 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).

2.1.1. Características genéticas e estruturais do VBI

O VBI é um membro da ordem *Nidovirales*, da família *Coronaviridae* e do gênero *Coronavirus* (grupo III). O genoma desse vírus possui cerca de 27 Kilobases (Kb) e é constituído por um RNA de fita simples e com polaridade positiva. As partículas virais são pleomórficas, apesar de haver predominância de partículas esféricas, com aproximadamente 120 nanômetros (nm) de diâmetro, o vírion apresenta projeções em sua superfície, as quais conferem um formato de coroa (*Coronavirus*). Ainda, nesse

genoma viral são codificadas quatro proteínas estruturais principais, a proteína de nucleocapsídeo (N), a glicoproteína da matriz (M), a proteína pequena 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) (Figura 1).

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 em pequenas quantidades 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).

Já a proteína do nucleocapsídeo (N) está intimamente relacionada com o RNA genômico e apresenta sequências conservadas, ocorrendo pequenas variações entre as várias estirpes do VBI (BOURSNELL, 1985; BOURSNELL, 1987; CAVANAGH, 1995). Foi demonstrado que a proteína N se constitui na principal proteína do capsídeo, sendo produzida em grande quantidade na infecção viral. Apresenta uma estrutura altamente conservada, com cerca de 94 a 99% de identidade entre as várias estirpes. Segundo RESENDE (2003), grandes mutações na proteína N podem afetar a estabilidade e a viabilidade viral. É uma proteína altamente imunogênica, sendo, por conseguinte, capaz de induzir a produção de anticorpos e de linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica (SEO, 1997). Dessa forma, a proteína N reúne um número significativo de atributos para se constituir no antígeno de eleição para detecção/mensuração da presença do VBI, ou de anticorpos anti-virais específicos, presentes em amostras clínicas colhidas de aves suspeitas de infecção (NDIFUNA, 1998).

A glicoproteína S se encontra 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 é mais externa e 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.

Em vista da relevância da glicoproteína S para a infectividade, foram encontrados, particularmente na subunidade S1, sítios antigênicos indutores de anticorpos vírus-neutralizantes (VN) e de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI), o que levou a associação desta proteína com a principal estrutura antigênica responsável pela indução de respostas protetoras nas aves imunizadas, ou após convalescença de infecção ou naquelas que foram vacinadas, ou ainda pela caracterização dos diferentes sorotipos e subtipos 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 que esses sítios, com exceção de S1-F e S2-H, podem induzir a produção de anticorpos vírus-neutralizantes (CAVANAGH et al., 1984; MOCKETT et al., 1984; KOCH et al., 1990; KOCH et al., 1991). Um outro aspecto interessante a salientar está relacionado ao fato de que ocorre uma grande variabilidade no gene S1, especialmente em determinadas regiões definidas como hipervariáveis (HVRs). Três dessas regiões hipervariáveis já foram mapeadas e denominadas HVR-1, HVR-2 e HVR-3, alguns estudos tem relatado que essas regiões estão diretamente associadas na interação com anticorpos vírus neutralizantes, e por conseguinte, constituem-se em determinantes sorotipos específicos apresentados pelas diversas estirpes variantes do VBI (MOORE et al., 1998) (Figura 2).

Dessa forma, a glicoproteína S constitui-se no principal alvo para se desenvolver métodos de diferenciação desse vírus, seja através de técnicas de biologia molecular, como o RT-PCR e RFLP, ou ainda o sequenciamento de nucleotídeos do genoma viral, seja através de técnicas de imunodiagnóstico (LAI & CAVANAGH, 1997; SONG et al., 1998; WANG et al., 2002).

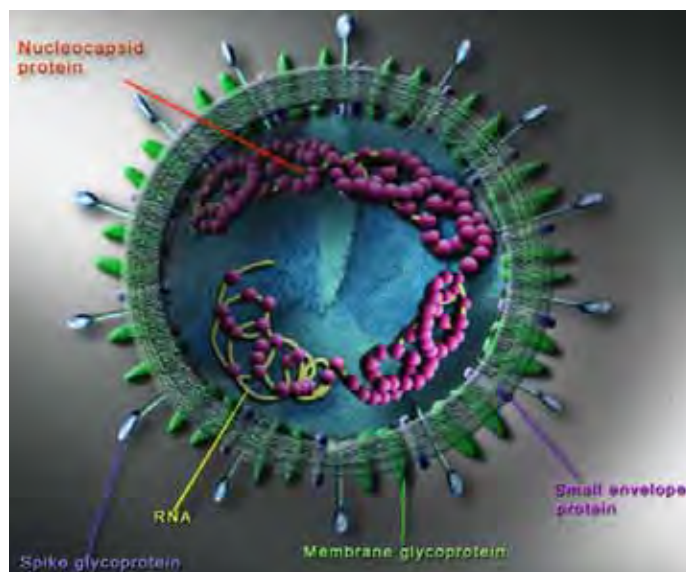


Figura 1. Esquema contendo a organização estrutural do VBI e as quatro proteínas estruturais principais; a proteína de nucleocapsídeo (N), a glicoproteína da matriz (membrana) (M), a proteína pequena não-glicosilada (E) e as glicoproteínas das espículas de superfície (S) (www.cell_research.com/20033/20033COVER.htm).

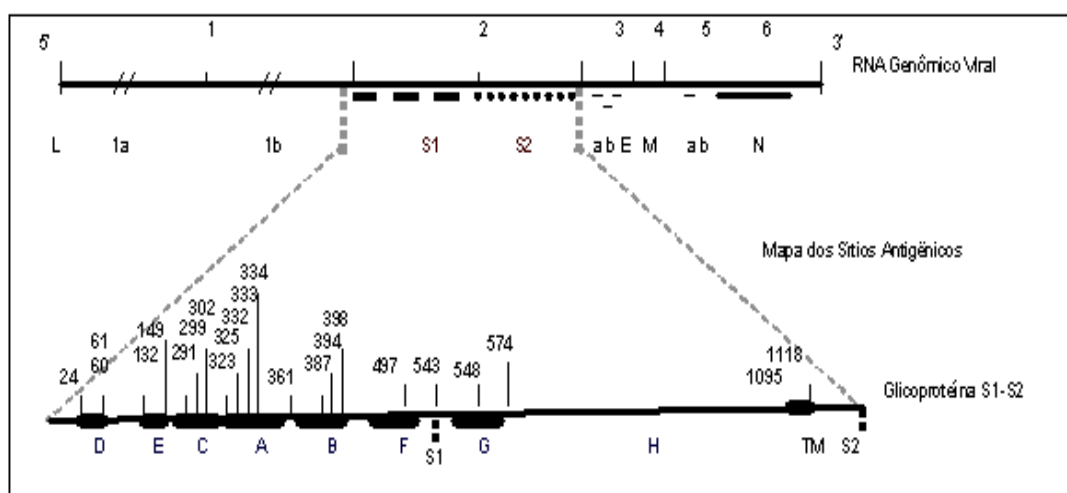


Figura 2. Representação esquemática do genoma do VBI e localização dos principais sítios antigênicos da glicoproteína S (Modelo elaborado por Furuyama, 2005).

2.1.2. Variabilidade genética e antigênica do VBI

As variações genéticas e fenotípicas do VBI são fenômenos relativamente frequentes, resultando no aparecimento de alterações marcantes especialmente no gene codificador da glicoproteína S. Essas alterações genéticas acarretam mudanças relevantes nas propriedades antigênicas e naquelas associadas à virulência e/ou a patogenicidade desse agente infeccioso, sendo descritos em diversas partes do mundo mais que 20 sorotipos desse vírus (CAVANAGH et al., 1992; CAVANAGH & NAQI, 2003)

A existência e mesmo a geração continuada de diferentes estirpes do VBI está diretamente relacionada com a ocorrência de fenômenos de mutação, sendo eles: deleção, inserção e recombinação do RNA genômico viral (KUSTERS, 1989; CAVANAGH et al., 1992; LEE & JACKWOOD, 2000). Há muitas evidências da ocorrência de recombinação natural entre os genomas de diferentes estirpes do VBI (HOPKINS, 1974; DARBYSHIRE, 1978; COOK, 1984; KUSTERS, 1990; WANG et al, 1993; JIA, 1995; CAVANAGH, 2007).

Nesse contexto das consequências da grande variabilidade dos coronavírus aviários, deve ser ressaltado que as perdas econômicas mais significativas por este vírus à produção avícola mundial estão mais diretamente relacionadas ao aparecimento de novos sorotipos ou variantes desse mesmo vírus, que antigênica e geneticamente são distintas das estirpes selvagens e vacinais (GELB et al., 1991). Portanto, diferentes sorotipos e variantes antigênicas são gerados no curso da evolução do VBI e as principais alterações presentes nesse vírus estão associadas principalmente a glicoproteína S1, a qual possui importantes epítomos que são alvos da vírus-neutralização. Tal mecanismo imune se constitui em uma das principais pressões seletivas exercidas pelo hospedeiro e se refletirá em uma maior variação genética e/ou antigênica sobre esse marcador genotípico e fenotípico, de forma que nesse processo evolutivo ocorrem diferenças progressivamente maiores, sendo que os genótipos/sorotipos variantes afastam-se cada vez mais do genótipo/sorotipo parental original.

2.1.3. Patogenia e Sinais Clínicos

O VBI é um patógeno do trato respiratório e urogenital de galinhas, que se reveste de uma grande importância para a indústria avícola em virtude das perdas significativas de produtividade que acarreta nas aves por ele infectadas. A infecção provoca geralmente lesões no trato respiratório superior, atingindo pulmões e sacos aéreos, as quais se associam e são exacerbadas por infecções bacterianas secundárias. Podem ser ainda encontradas, na dependência da estirpe do VBI, lesões produzidas por esse vírus no trato urogenital de aves infectadas (CAVANAGH & NAQI, 1997).

As principais alterações/lesões produzidas pelo VBI nos tecidos do trato respiratório incluem deciliação do epitélio traqueal e bloqueio da produção e da secreção de muco pelas células caliciformes, o que favorece sobremaneira a instalação de infecções secundárias por bactérias, como *E. coli* e/ou micoplasmas.

Estirpes mais virulentas desse vírus podem causar quadros mais graves de pneumonia e, nesse caso, taxas mais elevadas de mortalidade. O VBI pode afetar outros órgãos e tecidos, como o pro-ventrículo, o intestino e as tonsilas cecais, bem como os rins e o oviduto. Nesse último caso, as lesões provocadas nos tecidos do oviduto acarretam não só diminuição na produção de ovos, como o aumento de problemas na qualidade dos ovos produzidos. Esse vírus persiste nas tonsilas cecais de onde é eliminado junto às fezes, por várias semanas ou até mesmo meses após a infecção (GELB et al, 1989; AMBALI & JONES, 1990).

2.1.4. Epidemiologia

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

Embora menos frequente, já foi relatado 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 & ROSSINI, 2000; ABREU et al., 2006).

Desde a descrição do primeiro isolamento do VBI no Brasil por HIPOLITO (1957), este vírus tem sido continuamente isolado em varias regiões do país e tem sido associado a diversos tipos de manifestações patológicas (DI FABIO & ROSSINI, 2000; ITO et al., 2006; VILLARREAL, 2007).

Estudos sistemáticos e abrangentes sobre a detecção e a caracterização de isolados do VBI no Brasil não têm sido conduzidos rotineiramente. Há, no entanto, dados de alguns estudos esparsos, como por exemplo para o estado de Minas Gerais e referente ao período entre 1985 e 1986, obtidos de um levantamento sorológico para diversos agentes infecciosos virais e bacterianos, incluindo o VBI, tendo sido evidenciada a presença de aves soro-positivas a esse vírus, das quais foram isolados algumas amostras com patogenicidade para o trato respiratório, mas não renal em pintinhos e que foram antigenicamente caracterizadas como pertencentes ao sorotipo Massachusetts, embora tivessem sido detectadas algumas amostras com características de patogenicidade semelhantes, mas antigenicamente diferentes e que mais recentemente revelaram diferenças marcantes no sequenciamento de nucleotídeos dos genes S1, S2 e N (RESENDE, 2003, ABREU et al., 2006, MONTASSIER et al., 2006).

Além disso, no final da década de 90, DI FABIO & ROSSINE (2000) isolaram e estudaram, através da técnica de vírus-neutralização cruzada em cultura de anéis traqueais, um grupo de 15 amostras do VBI obtidas de aves apresentando diferentes quadros clínico-patológicos e que eram mantidas em granjas de produção avícola comercial localizadas nos estados do Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro e da Bahia. Os resultados da análise antigênica desses isolados revelaram que,

apenas um desses quinze vírus, apresentava relações mais próximas com o sorotipo Massachusetts, que é homólogo ao da estirpe vacinal contra BI (H120), ao passo que os quatorze vírus restantes foram classificados em no mínimo 4 grupos antigênicos distintos daqueles já descritos em outros países e que constituíam os sorotipos de referência mais conhecidos do VBI (MONTASSIER et al., 2006).

A partir do ano 2000, a BI passou a ser estudada com maior sistematização no Brasil, sendo encontrada a presença de um número significativo de variantes genéticas do VBI, com características distintas das estirpes de referência de outros países da América, Europa, Ásia e Oceania. Nesse sentido, deve-se destacar que MONTASSIER et al. (2006), ao analisar as sequências de nucleotídeos da extremidade 5'-proximal da glicoproteína S1 e 3'-terminal do gene N de amostras isoladas entre 1988 e 2000 de granjas comerciais, localizadas nas regiões sul e sudeste do Brasil, encontraram para o primeiro gene perfis filogenéticos que permitiram a classificação desses vírus em cinco grupos diferentes, sendo alguns deles diferentes inclusive daqueles que agrupavam ou a estirpe de referência vacinal Massachusetts ou de outras estirpes de referência como a Connecticut ou Arkansas, formando assim, um conjunto de estirpes autóctones do Brasil. A análise molecular correspondente ao gene N demonstrou que, apesar de ser uma região reconhecidamente menos variável para as estirpes do VBI, ela apresenta em sua porção C-terminal um certo grau de polimorfismo, sobretudo para as variantes caracterizadas como singulares ou autóctones do Brasil com base na análise do gene S1, pois esta região peptídica exerce um papel biológico relevante (MONTASSIER et al., 2006), uma vez que contém epítomos específicos para o reconhecimento e a ativação de linfócitos T citotóxicos, os quais atuam no sentido de promover a redução da carga viral conferindo, conseqüentemente, imunidade específica protetora mediada por células em aves convalescentes ou vacinadas (SEO, 1997).

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 imunoproliféricos 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 podem ser classificadas 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)

2.1.5. Medidas de controle

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 imunoproliféricos 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 frequente 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 (JIA, 1995; CAPUA, 1999; MONTASSIER et al., 2006; VILLARREAL, 2007).

No Brasil, a vacinação contra a BI tem sido feita desde o início da década de 80, sendo que as estirpes que têm o seu uso liberado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento para entrarem na composição de vacinas, são a H120, H90 e H52 (a letra "H" provem da estirpe Holland e os números representam a quantidade de passagens seriadas em ovos embrionados de galinha) ou alternativamente, estirpes

naturalmente apatogênicas do mesmo sorotipo Massachusetts, como por exemplo a Ma5 (ABREU et al., 2006; MONTASSIER et al., 2006; VILLARREAL, 2007).

2.1.6. Métodos de diagnóstico

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 de 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 da polimerase (PCR) 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 o diagnóstico e diferenciação das estirpes variantes desse vírus, mas que ainda apresentam custos bastante elevados (DE WIT, 2000).

Uma 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, a qual se revelou bastante sensível. Esse método pode ser associado à 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).

Além disso, podem ser empregados métodos indiretos de diagnóstico da infecção pelo VBI, utilizando-se as técnicas sorológicas como os testes de inibição da hemaglutinação (HI), de vírus-neutralização (CAPUA, 1999) e também o ELISA com anticorpos mono ou policlonais (DE WIT, 2000).

Dentro das alternativas de procedimentos de diagnóstico, IGNJATOVIC & ASHTON (1996) demonstraram que anticorpos monoclonais contra importantes

epítomos das proteínas S, N e M do VBI têm sido muito úteis para 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, identificando mutações nas estirpes variantes, bem como diferenciando as diversas amostras, independente se elas eram ou não do mesmo sorotipo. Em outro estudo, KANT (1992) relata que anticorpos monoclonais contra a glicoproteína S1 do VBI permitiram a seleção de mutantes resistentes a neutralização, os quais após a análise da sequência de nucleotídeos do gene da glicoproteína S desses vírus variantes, bem como da sequência deduzida de aminoácidos dessa mesma proteína, mostrou a presença de cinco sítios antigênicos mais relevantes e que estavam diretamente envolvidos na interação com anticorpos vírus-neutralizantes. Dentre estes sítios, três eram similares a sítios antigênicos identificados em outras espécies de coronavírus.

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 de campo da BI (IGNJATOVIC & ASHTON, 1996; CAPUA, 1999).

2.2. Tecnologia do DNA recombinante para a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpos funcionais

Vinte e oito anos após a publicação do artigo original sobre a produção de anticorpos monoclonais através de hibridomas por KÖHLER & MILSTEIN (1975), os métodos e estratégias para a produção desse tipo de anticorpos evoluíram bastante, incorporando a manipulação genética e trazendo os anticorpos ao cenário

biotecnológico. As flexibilidades na manipulação genética de seu arcabouço peptídico 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 (FILPULA, 2007; MARASCO & SUI, 2007).

O avanço das técnicas de 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 contem os domínios variáveis das cadeias leve e pesada, que se encontram unidas 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 a priori se escolher a função e o desenho da molécula a ser sintetizada. A gama de utilização de anticorpos recombinantes vai desde uma abordagem acadêmica de estudos de modelos de interação molecular até a aplicação clínica onde, progressivamente tais anticorpos vêm substituindo os anticorpos monoclonais convencionais obtidos de hibridomas.

2.2.1. Técnica de *Phage Display*

Diversas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para expressar uma grande variedade de polipeptídeos na superfície de bacteriófagos, de bactérias, de

leveduras ou de outros vírus (MARASCO & SUI, 2007). A técnica de expressão de proteínas na superfície de fagos filamentosos é um mecanismo considerado simples e que permite relacionar a proteína selecionada para a característica desejada à sequência 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 à 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 proteica constituída de cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 3) e utiliza a maquinaria de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir.

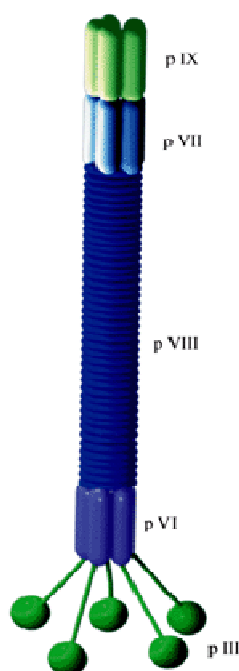


Figura 3. Esquema da estrutura do bacteriófago: bacteriófagos, ou simplesmente fagos, pertence a um grupo de vírus bacterianos com fita única de DNA envolta de um longo capsídeo proteico cilíndrico. A proteína pVIII é a principal formadora do capsídeo proteico e a proteína pIII é a que utilizamos para a apresentação dos fragmentos de anticorpos (scFv) no presente estudo. pVI, pVII e pXIX representam outras proteínas formadoras da partícula viral.

Neste sistema o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes codificadores das proteínas pIII ou pVIII 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 produção e purificação de peptídeos com as características desejadas (SCOTT & SMITH, 1990).

Segundo KICZAK et al. (2001), a grande vantagem deste método é a ligação direta que se tem entre o fenótipo observado e um genótipo encapsidado, o que permite a rápida obtenção da sequência 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 à 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, um imunógeno ou desempenhando qualquer outra função em processos biológicos.

Como em qualquer outra técnica, 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 a estabilidade da partícula viral (RODI & MAKOWSKI, 1999). Outras limitações observadas por ADEY et al. (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. Para evitar ou minimizar estes problemas, os autores sugerem que seja usado uma alta

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 sequências nas regiões codificadoras das 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 varrem 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 (BENHAR, 2001).

Com vistas à produção de anticorpos pela técnica de *phage display*, as aves apresentam diversas vantagens para o desenvolvimento desta metodologia quando comparada aos mamíferos, pois as aves apresentam apenas um gene VH e um gene VL funcionais, e estes genes têm alteradas suas sequências internas (CDRs) pela inserção de segmentos de pseudogenes de VL ou de VH. 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 (ANDRIS-WIDHOPF, 2000).

A construção do fragmento de anticorpo scFv pressupõe que os genes VH e VL amplificados sejam fusionados com o auxílio de uma sequência 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 pIII 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 *E. coli*, que foi desde logo um dos primeiros hospedeiros a fazer parte de sistemas de clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos bem sucedidos, podendo suprir de imediato necessidades da pesquisa básica e também permitir a expressão em grande escala, para fins industriais ou clínicos (WEICKERT, 1996; WALSH, 1998; GUO et al., 2003).

Atualmente são escassos os anticorpos mono e policlonais específicos para agentes infecciosos disponíveis em medicina veterinária, 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. Desenvolver um sistema de clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos monoclonais solúveis contra as proteínas estruturais do VBI utilizando a técnica de *phage display*;

3.2. Utilizar os fragmentos de anticorpos monoclonais obtidos para a detecção do VBI e diferenciação de estirpes variantes desse vírus.

IV- MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Oligonucleotídeos iniciadores

Para o presente estudo foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por SAPATS et al. (2003) que flanqueiam os genes codificadores das cadeias variáveis leve e pesada de imunoglobulina de galinha. As especificações dos iniciadores utilizados nas reações de PCR estão explanadas na tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR e respectiva localização do inserto gênico.

Nomes	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores	Localização	Referência
VLR	5' AGTTACTGGAGCGGCCGACCTAGGACGGTCAGGG 3'	Cadeia leve	Sapats et al., 2003
VLF	5' GGCGGTGGCGGGTCGACAGCGCTACTCAGCCGTCCTCG 3'	Cadeia leve	Sapats et al., 2003
VHR	5' GAACCGCCTCCACCATCTAGAGAGGAGACGATGACTTCGG 3'	Cadeia pesada	Sapats et al., 2003
VHF	5' ATGTCTATGGCCCAGCCGGCCGTGACGTTGGACG 3'	Cadeia pesada	Sapats et al., 2003
Link1	5' GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCT 3'	3' cadeia pesada	Sapats et al., 2003
Link2	5' CGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCTGA 3'	5' cadeia leve	Sapats et al., 2003

4.2. Extração do RNA total do baço de galinhas imunizadas com a estirpe vacinal H120 do VBI

As aves (galinhas da linhagem White Leghorn) foram imunizadas via óculo-nasal com a estirpe vacinal H120 do VBI de acordo com as especificações do fabricante (MASS I – FORT DODGE, Kansas, USA). A cada inoculação foi coletado sangue, sendo avaliado através do método de sanduíche ELISA-Concanavalina A (BRONZONI et al., 2005) o título de anticorpos anti-VBI presentes nos soros. Após o

desenvolvimento da resposta imune humoral, as aves foram sacrificadas através de deslocamento cervical.

O procedimento de extração do RNA total do baço das aves sacrificadas foi realizado com o auxílio do kit comercial Trizol Reagent (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante, com a introdução de algumas modificações, abaixo explanadas.

A extração foi feita a partir de 150 mg de baço, adicionando-se 1,5 mL de Trizol Reagent (Invitrogen Corp.). Em seguida procedeu-se a homogenização do material com auxílio de pistilo de plástico (Eppendorf). Logo após foi adicionado 150 μ L da mistura de clorofórmio com álcool isoamílico, na proporção de 24:1 e, homogeneizou-se intensamente em vórtex. Essas preparações foram deixadas no gelo por 2 minutos e, a seguir, centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa, em volume de aproximadamente 500 μ L, foi transferida para outro microtubo, onde se adicionou 750 μ L de álcool isopropílico. Em seguida, a mistura foi agitada, delicadamente, por inversão 10 vezes e, logo depois, incubou-se por 20 minutos no freezer - 70°C. Ao final dessa etapa, essa mistura foi, então, centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo álcool isopropílico foi descartado e adicionou-se 1,5 mL de etanol a 75%, homogeneizando-se, em seguida a amostra, que foi centrifugada novamente a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. Ao final desse procedimento, o sobrenadante foi descartado e a amostra contendo o RNA total extraído, foi colocada para secar a temperatura ambiente, por 40 minutos. Terminado esse período, foi feita a ressuspensão do material dessecado em 50 μ L de água ultra-pura (Milli-Q) tratada com DEPC (dietil pirocarbonato 0,01% p/v) e adicionando-se 1 μ l de RNAGuard (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA).

4.3. Obtenção do gene artificial VH-linker-VL codificador do fragmento de anticorpo scFv de galinha

4.3.1. Reação de transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada com um volume da amostra de RNA total extraído conforme a descrição anterior, para a obtenção do cDNA. Para tanto, a mistura inicial da reação, constituída por dNTP (0,5 mM), Oligo dT (0,5 ug/ μ L), amostra de RNA total e água tratada com DEPC (0,1%) em quantidade suficiente para completar um volume de 10 μ L foi inicialmente incubada a 65°C por 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se o tampão 1x da enzima transcriptase reversa [Tris-HCl (50 mM, pH 8,3); HCl (75 mM); MgCl₂ (3 mM)] e incubou-se a reação a 50°C por 2 minutos, para depois se acrescentar 200 U da enzima transcriptase reversa (Superscript II - Invitrogen Corp.). A reação foi, então, incubada a 42°C por 1 hora e, no final, a 70°C por 15 minutos, em termociclador TECHNE PROGENE® (Techne Incorporat, Duxford, CAMBRIDGE, UK).

4.3.2. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para obtenção das cadeias variáveis leve (VL) e pesada (VH) de imunoglobulina de galinha

Para a obtenção dos genes codificadores das cadeias leve e pesada de imunoglobulina de galinha, foram realizadas separadamente, dois protocolos de PCR para um volume final de 50 μ L. Para tanto, foram utilizados 0,2 mM de dNTPs, 5 μ L de tampão de PCR (10X), 20 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, VLF e VLR, para a cadeia leve, ou VHF e VHR para a cadeia pesada, 1,5 mM de MgCl₂, 2 U da enzima Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen Corp.), completando-se o volume (q.s.p) com água tratada com DEPC e adicionando-se 1,5 μ L da amostra de cDNA obtido na RT .

As temperaturas e os passos da PCR foram previamente otimizados, em função principalmente das características físico-químicas dos iniciadores utilizados, sendo a

reação realizada em termociclador TECHNE PROGENE® (Techne Incorporat) e ficando o programa de incubação constituído por um primeiro ciclo a 95°C por 5 minutos; seguindo-se de mais 30 ciclos, constituídos por uma etapa de incubação a 94°C por 1 minuto, uma segunda etapa de incubação a 50°C por 45 segundos, e uma terceira etapa a 68°C por 2 minutos, sendo que essa reação foi concluída por um ciclo de extensão final de incubação a 68°C por 10 minutos.

4.3.3. Análise eletroforética em gel de agarose

A análise do produto amplificado pela PCR dos genes codificadores das cadeias leve e pesada de imunoglobulina de galinha foram realizados através da técnica de eletroforese em cuba horizontal, usando-se gel de agarose (1%) imerso em tampão TBE 0,5x [Tris-Borato (0,045 M); EDTA (1 mM)] adicionado de Brometo de Etídeo e sob uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10 V/cm).

Os fragmentos do DNA amplificados foram visualizados em um transluminador de UV (Syngene, Cambridge, Reino Unido), e os géis foram a seguir, fotodocumentados através da utilização de uma câmara digital (Synoptics) e do Software Gene Link (Syngene).

4.3.4. Construção do gene artificial VH-linker-VL

A construção do gene artificial VH-linker-VL foi feita por meio da técnica de PCR *overlapping* para promover a conexão dos genes VH e VL com as sequências codificadoras de um peptídeo sintético (*linker*). Para a reação foram utilizadas as sequências gênicas VH e VL, bem como os oligonucleotídeos iniciadores VHF, VLR, Link1 e Link2 e os demais reagentes nas concentrações descritas no item 4.3.2. As temperaturas foram otimizadas em função principalmente das características físico-químicas desses iniciadores utilizados, sendo a reação realizada em termociclador e ficando o programa de incubação constituído de um primeiro ciclo a 95°C por 5 minutos; seguindo-se de mais 30 ciclos, constituídos por uma etapa de incubação a 94°C por 1

minutos, uma segunda etapa de incubação a 55°C por 1 minutos, e uma terceira etapa a 68°C por 2 minutos, sendo que essa reação foi concluída por um ciclo de extensão final de incubação a 68°C por 10 minutos. A análise do produto amplificado pela PCR do fragmento gênico VH-linker-VL foi realizado através da técnica de eletroforese em cuba horizontal como descrito no item 4.3.3.

4.3.5. Purificação e quantificação do produto gênico VH-linker-VL

O produto de interesse amplificado por PCR foi purificado utilizando-se o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Bioscience), de acordo com as especificações do fabricante.

O produto purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose, nas mesmas condições descritas no item 4.3.3, e quantificado em espectrofotômetro (BECKMAN, modelo DU-640 B), medindo-se a absorbância, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (SAMBROOK et al., 1989).

4.4. Clonagem do gene artificial VH-linker-VL em fagomídeo pCAMTAB 5E e obtenção da biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv) em fagos

4.4.1. Digestão do gene artificial VH-linker-VL com as enzimas de restrição *NotI* e *SfiI*

O vetor pCANTAB 5E (Amersham Bioscience) (Figura 5) é fornecido linearizado, estando digerido com as enzimas *NotI* e *SfiI*, assim é necessário que o inserto também seja digerido com as mesmas enzimas, para que possa acontecer a ligação inserto-vetor.

A digestão foi realizada em duas etapas, na primeira etapa foi adicionando 1 µL do DNA (VH-linker-VL) purificado, 1x do tampão B 10X, 80 U de enzima *SfiI* (New England Biolabs, Canadá, USA), 0,1 µg de BSA (10 µg/µL), sendo o volume da reação de 85 µL completado com água DEPEC. A reação foi incubada durante 4 horas a 50°C

não reconhece o códon âmbar presente no fagomídeo. Desta forma, a expressão do scFv ocorre somente como proteína de fusão na extremidade da proteína pIII do fago.

A bactéria liofilizada foi ressuspensa em 1 mL de meio 2xTY (triptona 1,7 g; extrato de levedura 1,0 g; NaCl 0,5 g; água (q.s.p) 100 mL) e incubada de 14-16 horas a 37°C e 250 rpm de agitação. A cultura foi plaqueada em meio mínimo e incubada a 37°C de 14-16 horas. As células podem ser mantidas em meio mínimo por até 2 semanas a 4°C. Para estoques a longo prazo, é preciso armazenar a cultura de células na fase estacionária em glicerol estéril 80% a uma concentração final de 15-20%. Os tubos de estoque em glicerol são mantidos a -80°C. A manutenção das bactérias em meio mínimo é crucial. Bactérias não estocadas em meio mínimo perdem o plasmídeo *f'* e, conseqüentemente, a habilidade de expressar *pilli f'*, essenciais para a infecção do fago auxiliar *M13K07*.

4.4.3. Preparação de células de *E. coli* TG1 eletrocompetentes

A transformação das bactérias *E. coli* TG1 foi realizada por eletroporação, segundo o método alternativo que é sugerido no protocolo do Módulo de Expressão RPAS. As bactérias foram preparadas conforme a descrição que se segue.

Inoculou-se 10 mL de meio 2xTY com uma colônia de *E. coli* TG1 retirada da placa de meio mínimo, incubando-se de 14-16 horas a 37°C e 250 rpm. No dia seguinte, um litro de meio 2xTY foi inoculado com a cultura de células TG1 e incubado a 37°C e 250 rpm até que a cultura atingisse absorvância de 0,5 - 0,7 a 600 nm, o que demorou aproximadamente 1,5 hora. A $A_{600} \cong 0,6$ indica que as bactérias encontram-se em fase log de crescimento, que é uma condição essencial para se assegurar que as bactérias estejam expressando *pilli f'*. O frasco foi colocado em gelo por 30 minutos e a cultura foi centrifugada a 4.000 g por 20 minutos a 4°C, para sedimentar as células. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1 L de HEPES 1 mM pH 7,0 gelado e estéril. A centrifugação foi repetida e o sobrenadante novamente desprezado. As células foram lavadas com 500 mL de HEPES 1 mM estéril e gelado e posteriormente com 20 mL de HEPES 1 mM pH 7,0 estéril e gelado, contendo 10%

glicerol. Após uma última centrifugação, as células foram ressuspensas em 2,5 mL de glicerol 10% estéril e gelado, sendo posteriormente congeladas e estocadas a -80°C em alíquotas de 50 μL .

4.4.4. Ligação do gene artificial VH-linker-VL ao vetor pCANTAB 5E e limpeza do material ligado

A reação de ligação foi feita utilizando-se 150 ng de VH-linker-VL, 5 μL tampão 10x OPA, 250 ng vetor pCANTAB 5E, 1 mM ATP, 6 U de enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs) e água ultra pura autoclavada para um volume final de 50 μL . A reação foi incubada a 16°C por 1 hora, seguindo-se a inativação da T4 DNA ligase por 10 minutos a 70°C e resfriamento em banho de gelo por 5 minutos.

A reação foi então submetida à extração com fenol:clorofórmio para limpeza do DNA a ser clonado. Essa medida é essencial para eliminação de sais que poderiam ocasionar um curto circuito durante a eletroporação, com consequente mortalidade elevada das bactérias. O produto da reação de ligação foi extraído uma primeira vez com volume igual (50 μL) de fenol:clorofórmio e centrifugada por 15 minutos a 12.000 g, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e submetido ao tratamento com volume igual de clorofórmio. Após nova centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a temperatura ambiente, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Adicionou-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol 100% gelado, calculando-se esse volume após a adição do acetato de sódio. Após 15 minutos de precipitação no freezer -80°C , centrifugou-se por 5 minutos em velocidade máxima. O sobrenadante foi removido, descartado, e o precipitado contendo o DNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% a temperatura ambiente. Foi realizada nova centrifugação a 12.000 g por 10 minutos, a 4°C e o etanol foi descartado. O precipitado foi dessecado e posteriormente ressuspensado com 20 μL de água ultra pura autoclavada.

4.4.5. Eletroporação

As alíquotas de células da linhagem TG1 de *E. coli* eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo, sendo posteriormente transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm pré-resfriada. Adicionou-se 2 μ L de DNA (vetor+VH-linker-VL) livre de sal misturando-o com as células, no fundo da cubeta e incubando-se em gelo por 1 minutos. O eletroporador (BioRad) foi programado para dar um pulso de 25 μ F e 2,5 kV a 200 Ohms. A cubeta foi seca com papel toalha e colocada na câmara de eletroporação, pulsando-a uma vez. O pulso deve apresentar tempo constante de 4,5 a 5 msec. Após o pulso, acrescentou-se 1 mL de meio 2xTYG (triptona 1,7 g; extrato de levedura 1,0 g; NaCl 0,5 g; água (q.s.p) 100 mL, sendo acrescentado 2% de glicose) à cubeta, que foi coberta e invertida para ressuspender as células. O procedimento foi repetido 9 vezes, totalizando 10 amostras. As bactérias transformadas foram incubadas a 37°C e 250 rpm por 1 hora. Posteriormente, a amostra foi plaqueada em meio sólido SOBAG (triptona 2,0 g; extrato de levedura 0,5 g; NaCl 0,05 g; 1,5 g de Agar; água (q.s.p) 100 mL, sendo acrescentado 1 M de MgCl₂, 2 M de glicose e 20 mg/mL de ampicilina), utilizando-se 100 μ L das bactérias transformadas com o vetor+VH-linker-VL. As placas foram incubadas a 30°C durante 20 horas. O restante das bactérias transformadas foram congeladas a -80°C após adição de glicerol 80%.

4.4.6. Recuperação da biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv) com a utilização do fago auxiliar *M13K07*

As colônias bacterianas transformantes que cresceram após a incubação foram removidas da superfície das placas utilizando-se 5 mL de meio 2xTY e alça de Drigalsky estéril. Foi feito um *pool* reunindo todas as colônias crescidas. Foram separados 5 mL do *pool* de bactérias transformadas para a recuperação com fago auxiliar, sendo o restante do material congelado em glicerol 80%. Nessa operação, deve-se evitar o uso de outro tipo de material plástico, que não o polipropileno, pois os fagos podem ligar-se não especificamente à superfície de tais tipos de plásticos.

As células a serem recuperadas foram diluídas com meio 2xTY até A_{600} de 0,3, obtendo-se um volume final de 26 mL. Adicionou-se ampicilina a uma concentração final de $100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e glicose a uma concentração final de 2%. A cultura foi incubada a 37°C e 250 rpm por 1 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 a leitura de $A_{600}=0,34$ e volume final de 26 mL, dever-se-ia adicionar $2,21 \times 10^{10}$ pfu de fago auxiliar. Como este foi fornecido a uma concentração de $5,3 \times 10^{11}$ pfu.mL⁻¹, foram adicionados 41,7 μL de fago auxiliar *M13K07*.

A cultura foi incubada por 1 hora a 37°C e 250 rpm, centrifugando-se posteriormente a 1.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e as células ressuspendidas em 10 mL de 2xTYAK (triptona 1,7 g; extrato de levedura 1,0 g; NaCl 0,5 g; água (q.s.p) 100 mL, sendo acrescentado 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina), transferindo-se para um tubo de polipropileno descartável de 50 mL e incubando-se de 14-16 horas a 37°C e 250 rpm. No dia seguinte, as células foram sedimentadas a 1.000 g por 20 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante, contendo os fagos, foi transferido para um tubo de centrífuga previamente autoclavado. Esse material foi utilizado no procedimento de seleção por meio do *panning*, o qual é descrito abaixo.

4.4.7. Seleção dos fragmentos de anticorpos (scFv) apresentados em fagos contra a estirpe vacinal H120 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*, que devem ser realizados concomitantemente para melhores resultados da seleção.

O frasco de cultura (25 cm²) foi incubado de 14-16 horas com 5 mL de suspensão purificada da estirpe H120 do VBI diluída a 1:5 em PBS (salina tamponada com fosfato; 10 mM tampão fosfato; 2,7 mM KCl₂; 137 mM NaCl; pH 7,4). 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, o frasco de cultura foi lavado três vezes com PBS e adicionou-se tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado (LPD) dissolvido em PBS), incubando-se 1 hora a 37°C. Os fagos presentes no sobrenadante obtido na recuperação da biblioteca (descrito no item anterior) foram então precipitados com 2 mL de solução PEG/NaCl (PEG 8000 20,0 g; NaCl 14,6 g; água (q.s.p) 100 mL) . Após misturar bem, o material foi incubado em banho de gelo por 1 hora. Na sequência, os fagos foram precipitados através de centrifugação a 10.000 g por 20 minutos a 4°C. Após remoção do tampão sobrenadante, o precipitado foi ressuscitado em 16 mL de meio 2xTY contendo 0,1% Triton X-100. A essa suspensão de fagos foi então adicionada ao tampão de bloqueio contendo 0,01% de azida de sódio, sendo a reação incubada por 15 minutos a temperatura ambiente.

Após a lavagem do frasco de reação que estava sendo bloqueado, foram adicionados os fagos recombinantes que haviam sido preparados previamente, sendo a reação incubada durante 2 horas a 37°C. Durante esse intervalo, é preciso preparar as bactérias da cepa TG1 na fase log. Para tanto, foram transferidos 150 µL da cultura incubada para 15 mL de meio 2xTY e incubou-se a 37°C a 250 rpm, até que a A₆₀₀ fosse aproximadamente 0,3. De acordo com a cinética de crescimento desta linhagem de *E. coli* é necessário um intervalo de aproximadamente 1 hora para atingir-se a densidade óptica (DO) desejada.

Após a incubação da suspensão dos fagos recombinantes foram feitas lavagens para a remoção de todos os fagos que não haviam expressado um scFv capaz de reconhecer as proteínas do VBI. Para isso foram feitas 20 lavagens com 50 mL de PBS e 20 lavagens com 50 mL PBS-T (salina tamponada com fosfato; 10 mM tampão fosfato; 2,7 mM KCl₂; 137 mM NaCl; pH 7,4 e 0,02% Tween-20). Ao final das lavagens, foi adicionado ao frasco a cultura de *E. coli* que havia sido previamente preparada na fase log. A cultura foi incubada por 1 hora a 37°C e 250 rpm. Durante essa incubação,

as bactérias foram re-infectadas pelos fagos que estiverem ligados aos antígenos do VBI adsorvidos 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 a uma concentração final de 100 µg/mL e glicose a uma concentração final de 2% ao tubo contendo as células. Foi ainda acrescentado 4×10^{10} pfu de *M13K07* e o tubo foi incubado por 1 hora a 37°C e 250 rpm. Após essa incubação, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 1.000 g durante 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram a seguir ressuspensas com cuidado em 10 mL de 2xTYAK e incubadas de 14-16 horas a 37°C e 250 rpm. 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, sendo no total realizados 3 ciclos. Após o último ciclo de *panning* as bactérias re-infectadas pelos fagos selecionados foram plaqueadas em meio sólido SOBAG. As placas secas foram invertidas e incubadas de 14-16 horas a 30°C.

4.4.8. Preparação da placa mãe *E. coli* TG1

A placa mãe foi preparada colocando-se 400 µL de meio 2xTYAG (triptona 1,7 g; extrato de levedura 1,0 g; NaCl 0,5 g; água (q.s.p) 100 mL, sendo acrescentado 100 µg/mL de ampicilina e 2% de glicose) em cada tubo de uma placa *cluster* (Costar 4410) e transferindo-se colônias isoladas em tubos separados, usando-se, para isso, palitos autoclavados. Foram obtidas quatro placas mãe, que foram incubadas de 14-16 horas a 30°C e 250 rpm, em câmara úmida. Após incubação foi adicionado a cada uma das cavidades glicerol a 80%, sendo as placas estocadas a -80°C.

4.4.9. Avaliação dos fragmentos de anticorpos (scFv) apresentados em fagos contra a estirpe vacinal H120 do VBI

Foram preparados 50 mL de meio 2xTYAG contendo $2,5 \times 10^{10}$ pfu *M13K07*, distribuindo-se 400 μ L em cada tubo de uma placa *cluster* (P1). Transferiu-se 40 μ L da cultura saturada de cada tubo da placa mãe ao tubo correspondente da placa P1 e, incubou-se por 2 horas a 37°C e 150 rpm, em câmara úmida. Após esse período, a placa foi centrifugada a 1.500 g por 20 minutos a temperatura ambiente e os sobrenadantes foram descartados, cuidadosamente. Foram preparados 50 mL de 2xTYAK e distribuiu-se um volume de 400 μ L em cada tubo da placa P1, que foi então incubada de 14-16 horas a 37°C e 250 rpm. Após incubação a placa P1 foi centrifugada (1.500 g por 20 minutos), sendo o sobrenadante transferido para uma microplaca que havia sido anteriormente bloqueada. Antes de serem adicionados à placa de ELISA, os anticorpos recombinantes apresentados em fago foram diluídos 1:2 em tampão de bloqueio (5% LPD dissolvido em PBS-T) para se reduzir as interações não específicas entre os anticorpos e proteínas circundantes do meio, ou mesmo à superfície da microplaca.

Para a realização do ELISA, uma microplaca com 96 cavidades (Costar) foi adsorvida com volumes de 50 μ L/cavidade de uma suspensão purificada da estirpe H120 do VBI diluída a 1:5 em tampão carbonato/bicarbonato (50 mM, pH 9,6). A placa foi então incubada a 4°C, de 14-16 horas e depois lavada três vezes com PBS-T e bloqueada por 45 minutos com 50 μ L por cavidade de tampão de bloqueio (10% LPD diluído em PBS-T). Ao final desta etapa, a placa foi novamente lavada, da mesma forma anteriormente descrita e foram adicionados os anticorpos apresentados em fagos que foram devidamente diluídos como descrito anteriormente, sendo incubados durante 2 horas a 37°C. Foram realizadas novas lavagens como descrito e adicionado o conjugado anti-M13 (Amersham Bioscience) diluído 1:1000 em tampão de bloqueio. A placa foi incubada a 37°C por 1 hora e, ao final desta etapa foi lavada por três vezes, tal como se descreveu anteriormente. Em seguida, foi feita a adição, em volumes de 50 μ L /cavidade, da mistura substrato-cromógeno (peróxido de hidrogênio - H₂O₂ / Orto-

fenileno-diamina-OPD), preparada em tampão citrato-fosfato pH 5,0, deixando-se a reação se desenvolver por 15 minutos a temperatura ambiente, quando foi adicionado HCl 2M em volumes de 50 μ L/cavidade para bloquear a atividade enzimática. As densidades ópticas obtidas foram mensuradas em leitor de placas de ELISA (BIO-RAD - Modelo 550) e no comprimento de onda de 492 nm.

4.4.10. Avaliação pela técnica de Western blotting da especificidade dos fragmentos de anticorpos (scFv) apresentados em fagos contra as proteínas estruturais da estirpe vacinal H120 do VBI

Os clones que apresentaram os maiores valores de DOs foram selecionados e avaliados em ensaio de Western blotting para a determinação da especificidade dos mesmos. Para isso, a amostra do vírus H120 concentrado foi misturada em um tampão contendo 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 1% SDS; 10% de glicerol; 0,001% azul de bromofenol e 1% 2-mercaptoetanol. A amostra assim preparada foi fervida por 2 minutos e aplicada em dois geis de poliacrilamida, sendo usado o gel de empilhamento na concentração de 3% e o gel de separação na concentração de 15%. 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 no outro gel de poliacrilamida com SDS foram eletrotransferidos em cuba de transferência úmida para uma membrana de polivinilideno difluoreto (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 minutos 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 (5% LPD diluído em PBS-T), sob agitação suave por 1 hora, a temperatura ambiente. Procedeu-se, na fase seguinte, a reação utilizando-se os fragmentos de anticorpos

monoclonais apresentados em fagos (diluídos 1:2 em tampão de bloqueio) que foram preparados como descrito no item anterior sendo incubados por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação leve. Após a incubação, a membrana foi lavada com PBS-T e adicionado a reação o conjugado anti-M13 (Amersham Bioscience) diluído 1:500 em tampão bloqueio, sendo incubado por 1 hora. Procedeu-se novas lavagens com PBS-T e PBS e a reação de desenvolvimento da cor se processou com a mistura do cromógeno mais substrato específico (FAST DAB - Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) contendo dietil-amino-etil-benzidina (DAB) (0,7 mg) e peróxido de hidrogênio - uréia (1,6 mg). Para interrupção da reação de degradação enzimática, a membrana foi lavada com água deionizada e posteriormente dessecada em temperatura ambiente e, ao final, guardada ao abrigo da luz (TOWBIN et al., 1979).

4.5. Subclonagem do gene artificial VH-linker-VL em vetor pET 28a e expressão dos fragmentos de anticorpos (scFv) solúveis por células de *E. coli* linhagem BL21

4.5.1. Subclonagem em vetor pET 28a

Para a expressão dos fragmentos de anticorpos solúveis foi utilizado o sistema de expressão pET 28a (Figura 6) (Novagen, Darmstadt, Germany) e a bactéria *E. coli* linhagem BL21.

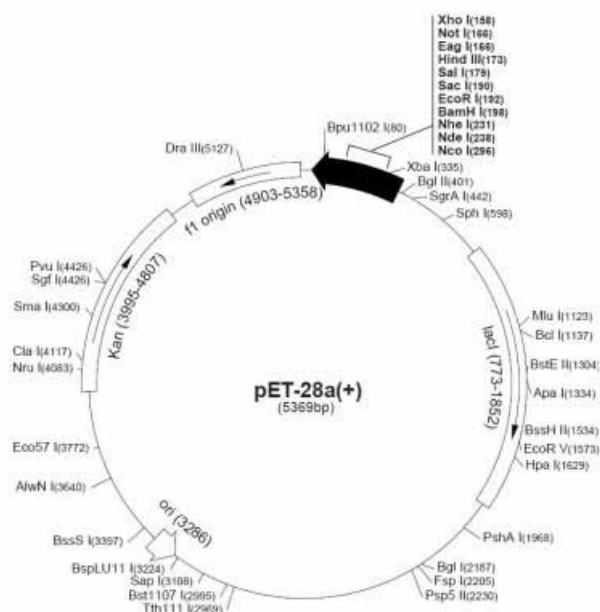


Figura 6. O vetor de expressão em *E. coli* pET 28a (Novagen) possui a marca de seleção KAN, sendo a expressão do DNA controlada pelo promotor induzível T7, o qual permite a produção da proteína recombinante em altos níveis em meio contendo IPTG. Adicionalmente, este vetor carrega uma cauda poli-histidina na extremidade carboxi-terminal e/ou na extremidade 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 agarose combinadas ao níquel.

4.5.2. Oligonucleotídeos utilizados

Para que os genes artificiais (VH-linker-VL) dos clones que apresentaram melhores resultados no Western blotting pudessem ser clonados no vetor pET 28a, foi necessário a mudança da extremidade 5' dos fragmentos gênicos, com isso foi desenhado um novo oligonucleotídeo VHF-Nde 5'-GAATCCCATATGGTGACGTTGGACG-3'.

4.5.3. Extração plasmideal dos clones selecionados A6P1 e D2P4

Os clones selecionados foram submetidos à extração de DNA plasmideal utilizando o Kit de Extração PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen Corp.), de acordo com as especificações do fabricante. A quantificação foi realizada como descrito no item 4.3.5.

4.5.4. Amplificação dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1 e VH-linker-VL-D2P4 para clonagem em vetor pET 28a

As reações de PCR para amplificação dos genes extraídos dos clones A6P1 e D2P4 utilizou o novo oligonucleotídeo VHF-Nde e o oligonucleotídeo VLR-Not utilizado na construção anterior. As temperaturas utilizadas na amplificação foram as mesmas utilizadas na PCR descrita no item 4.3.2.

A análise dos produtos amplificados pela PCR foram realizadas através de eletroforese como descrito no item 4.3.3.

A purificação do produto de PCR foi realizada conforme descrito no item 4.3.5.

4.5.5. Digestão dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1 e VH-linker-VL-D2P4 e do vetor pET 28a

Para a digestão dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1, VH-linker-VL-D2P4 e do vetor pET 28a foi adicionado a reação, 1 ug de DNA, 1x de tampão 3, 20 U da enzima *NdeI* (New England Biolabs), 10 U da enzima *NotI* (New England Biolabs), 0,1 µg de BSA (10µg/µL) completando o volume final da reação com 20 µL com água DEPEC. A reação foi incubada a 37°C de 14-16 horas e posteriormente a enzima foi inativada a 70°C por 20 minutos.

Os materiais digeridos foram purificados como descrito no item 4.3.5.

4.5.6. Preparação de células de *E. coli* BL21 eletrocompetentes

As células de *E.coli* BL21 foram crescidas em 1 mL de meio 2xTY de 14-16 horas a 250 rpm e 37°C. No dia seguinte 100 mL de 2xTY foram adicionados a cultura e incubados sob agitação de 200 rpm a 37°C até atingir $DO_{600} \cong 0,7$. A cultura foi centrifugada a 4.000 g durante 15 minutos 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 a 4.000 g durante 15 minutos a 4°C, a lavagem repetiu-se por mais 1 vez nas mesmas condições descritas. 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 200 μ L que foram armazenadas em freezer -80°C.

4.5.7. Ligação dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1 e VH-linker-VL-D2P4 ao vetor pET 28a

A reação de ligação dos produtos digeridos foi feita utilizando-se 50 ng/ μ L de DNA, 2 μ L tampão 10x T4 DNA Ligase, 100 ng/ μ L vetor pET 28a, 10 mM ATP, 6 U de enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs) e água tratada para um volume final de 20 μ L. A reação foi incubada a 16°C de 14-16 horas.

4.5.8. Transformação das células competentes de *E. coli* BL21

Na transformação, as células competentes foram descongeladas em banho de gelo e a elas foi adicionado o volume total da reação de ligação. Foi feita uma agitação suave e as células incubadas em banho de gelo durante 30 minutos. Após esse tempo foi feito o choque térmico transferindo as células para banho maria a 42°C durante 2 minutos. As células foram colocadas novamente em banho de gelo e adicionado 200 μ L de 2xTY (0,2% glicose) e incubadas por 1 hora a 37°C sem agitação. Posteriormente as

células foram plaqueadas em meio sólido 2xTY (0,2% glicose; 30 µg/mL Kanamicina) e incubadas a 37°C.

A placa mãe *E. coli* BL21 foi preparada como descrito no item 4.4.8. Foram colhidas 96 colônias transformantes.

4.5.9. Seleção dos clones transformantes *E. coli* BL21

Foram selecionados dois clones provenientes da transformação utilizando o material gênico dos clones A6P1 e D2P4 fago positivos, que são: A6P1H11 e D2P4F7.

O DNA plasmideal desses clones foi extraído e com esse material foi realizado um PCR para verificação da presença do inserto gênico utilizando o jogo de oligonucleotídeos VHF-Nde e VLR-Not seguindo o mesmo programa descrito no item 4.3.2.

4.5.10. Sequenciamento de nucleotídeos dos clones A6P1H11 e D2P4F7

As amostras de DNA plasmideal obtidas de dois clones bacterianos foram quantificadas e, depois submetidas à reação de sequenciamento, utilizando-se 2 µL de Big Dye Terminator (Perkin Elmer), 2 µL de tampão 2,5X (Tris-HCl 200 mM, pH 9,0; MgCl₂ 5 mM), 10 pmoles/ul de cada um dos iniciadores (T7 Promoter primer e T7 Terminator primer – pET System), 100 ng de DNA e água destilada Milli-Q, previamente esterilizada (q.s.p) 10 µL. As amplificações foram realizadas em placas de 96 poços conforme o programa recomendado pelo fabricante

Após a reação de sequenciamento, o produto obtido foi purificado por meio da adição de isopropanol. Ao final, as placas foram mantidas a temperatura ambiente, por 20 minutos, para a secagem das amostras. Na etapa seguinte, as amostras foram submetidas à desnaturação por 2 minutos a 96°C e colocadas no gelo. Foi então aplicado 1 µL de cada amostra nas canaletas ímpares com multipipetador (Kloehn 8 ganged Syringe Gel Loader) em um gel denaturante Long Ranger 5% (BMA) de 96 canaletas montado em uma placa de 36 cm no sequenciador ABI PRISM 377 DNA

Sequencing Analysis (Perkin - Elmer Corp.). Foi utilizado, como tampão de corrida na eletroforese, o TBE 1X (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM; EDTA 2,5 mM, pH 8,3) e a separação eletroforética foi feita durante 10 horas a 51°C.

4.5.11. Indução e expressão em pequena escala dos fragmentos de anticorpos solúveis pelos clones transformantes A6P1H11 (scFv-N) e D2P4F7 (scFv-S1) de *E. coli* BL21

Os clones foram incubados em 10 mL de meio 2xTY com agitação de 250 rpm a 37°C de 14-16 horas. Após a incubação foi transferido 1 mL das culturas para 50 mL de meio 2xTY e incubados a 37° com agitação de 200 rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0,6 - 0,8, nesse momento foi adicionado IPTG para uma concentração final de 0,2 mM, sendo as culturas incubadas a 30°C durante 4 horas com agitação de 200 rpm. As células foram centrifugadas 12.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspendidas em 3 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA, pH 8,0). A lise celular foi realizada em sonicador de células (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500), Timer Hold, Duty cycle 10%, Out put control 5, permanecendo 4 ciclos de 1 minutos cada. Foram guardadas alíquotas do lisado celular para testes e o restante do material centrifugado a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante guardado para análise.

4.5.12. Análise pela técnica de SDS-PAGE e Western blotting da expressão dos fragmentos de anticorpos solúveis

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 4.4.10., sendo utilizado gel descontínuo de poliacrilamida para a separação das proteínas presentes nos lisados celulares obtidos. Após a separação as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF. Para a detecção da expressão dos fragmentos de anticorpos recombinantes scFv-S1 (A6P1H11) e scFv-N (D2P4F7) foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina (Sigma Aldrich) na diluição de 1:500, sendo também utilizado o conjugado

peroxidase anti-IgG de camundongo (Bethyl Laboratories Inc. – Montgomery, TX, USA) na diluição de 1:1000.

4.5.13. Indução e expressão em média escala dos fragmentos de anticorpos solúveis pelos clones transformantes A6P1H11 (scFv-N) e D2P4F7 (scFv-S1) de *E. coli* BL21

Os clones foram incubados em 10 mL de meio 2xTY com agitação de 250 rpm a 37°C de 14-16 horas. Após a incubação todo o volume das culturas foram transferidos para 1000 mL de meio 2xTY e incubados a 37° com agitação de 200 rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0,6 - 0,8, nesse momento foi adicionado 0,2 mM IPTG, sendo as culturas incubadas a 30°C durante 4 horas com agitação de 200 rpm. As células foram centrifugadas 12.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspendidas em 100 mL de tampão de lise. A lise celular foi realizada em sonicador de células (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500), Timer Hold, Duty cycle 10%, Out put control 5, permanecendo 4 ciclos de 1 minutos cada. O material lisado foi centrifugado a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante concentrado com PEG/NaCl.

4.6. Aplicação dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1 em ensaios de detecção e diferenciação de estirpes do VBI

4.6.1. Avaliação pela técnica de Western blotting da atividade funcional dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1

Para a caracterização dos fragmentos scFv-N e scFv-S1, as proteínas virais da estirpe H120 foram separadas por SDS-PAGE como descrito no item 4.4.10. Os fragmentos scFv-N e scFv-S1 foram diluídos 1:5 em tampão de bloqueio e incubados durante 1 hora a temperatura ambiente em agitação leve. Foi adicionado o anti-poli-histidina (Sigma Aldrich) diluído 1:500 em tampão de bloqueio que foi incubado durante

1 hora a temperatura ambiente em agitação leve, sendo também utilizado o conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (Bethyl) na diluição de 1:1000.

4.6.2. Titulação pela técnica de ELISA indireto dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1

A titulação dos fragmentos de anticorpos monoclonais scFv-S1 e scFv-N foi realizado através do método indireto de ELISA como descrito no item 4.4.9. Os fragmentos de anticorpos monoclonais foram diluídos de 1:5 a 1:160, em tampão de bloqueio (5% LPD diluído em PBS-T) sendo incubados durante 2 horas a 37°C. Ao final dessa etapa, as cavidades da microplaca foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com tampão bloqueio por 40 minutos a 37°C, para que, em seguida, fosse adicionado anticorpo monoclonal anti-poli-histidina (Sigma Aldrich) diluído 1:1000 em tampão de bloqueio. A placa foi então incubada a 37°C por 1 hora, sendo realizada um novo ciclo de lavagens e, depois, foi adicionado o conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (Bethyl) na diluição de 1:5000, sendo a reação incubada por 1 hora a 37°C. Ao final foi feita a adição da mistura substrato-cromógeno (H_2O_2 – OPD), deixando-se a reação enzimática prosseguir por 15 minutos, ocasião em que atividade enzimática foi bloqueada pela adição de HCl (1 N), para que fossem realizadas as leituras das DOs no comprimento de onda de 490 nm.

4.6.3. Avaliação pela técnica de ELISA indireto da especificidade dos fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 frente a estirpes de referência e isolados brasileiros do VBI

A avaliação da especificidade dos fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 foi realizada através do método de sanduíche ELISA-Concanavalina A (BRONZONI et al., 2005), utilizando as estirpes de referência H120, M41 e ARKANSAS, bem como mais quatro estirpes isoladas de campo no Brasil IBVPR05, IBVPR02, IBVPR01, IBVSC01. Em síntese, na primeira fase da reação foi feita a adsorção do reagente de

captura; a lectina concanavalina (Con A) à superfície das cavidades da microplaca, na sua concentração ideal de uso previamente determinada por titulação em bloco e que correspondeu a 0,5 mg/mL em tampão PBS. O bloqueio da reação foi feito com tampão (5% LPD dissolvido em PBS), tendo sido acrescentados as suspensões antigênicas das diferentes estirpes do VBI na diluição de 1:2 em tampão de bloqueio. Os fragmentos de anticorpos monoclonais scFv-N e scFv-S1 foram então diluídos 1:20 e 1:40 em tampão de bloqueio, tendo sido também utilizado, como controle positivo da reação imunoenzimática, o anti-soro de galinhas hiperimunizadas com a estirpe H120 do VBI e contendo, portanto, anticorpos policlonais contra essa estirpe viral, diluído 1:100 em tampão de bloqueio. As preparações desses anticorpos foram acrescentadas às cavidades da microplaca contendo as diferentes estirpes do VBI capturadas pela Con A, incubando-se essa fase da reação a 37°C durante 2 horas. A seguir, foram feitas lavagens como descrito anteriormente para depois acrescentar-se os conjugados imunoenzimáticos anti-poli-histidina (Sigma Aldrich) e anti-IgG de galinha (Bethyl), respectivamente para as cavidades contendo ou os fragmentos de anticorpos scFv ou as cavidades contendo os anticorpos policlonais de galinha, sendo que ambos conjugados foram diluídos a 1:1000 em tampão de bloqueio. Essa fase da reação foi incubada a 37°C durante 1 hora, sendo ao final feitas as lavagens com PBS-T e, em seguida, adicionada a mistura de substrato-cromógeno (H_2O_2 – OPD), a qual foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. A reação de degradação enzimática foi bloqueada tal como descrito anteriormente, sendo posteriormente feita a leitura das DOs em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

4.6.4. Avaliação da atividade neutralizante em ovos embrionados do fragmento de anticorpo scFv-S1

Para o teste da atividade de vírus-neutralização foi utilizado o monoclonal scFv-S1 e o anti-soro de galinha hiperimunizada com a estirpe vacinal H120 do VBI. O vírus M41 foi utilizado na diluição que contivesse 100 DI₅₀/0,1mL. O anti-soro foi previamente aquecido a 56°C por 30 minutos, para inativação do complemento. O

fragmento de anticorpo monoclonal scFv-S1 e o soro de galinha foram inicialmente diluídos em escala de diluições seriadas de razão constante igual a 2, de 1:5 a 1:320 em meio Eagle (Gibco BRL, EUA), para que em seguida essas diluições fossem adicionadas a um mesmo volume da suspensão virulenta da estirpe (M41), contendo 10^2 DIE_{50}/mL . A mistura foi feita com volumes iguais de vírus e anticorpos, perfazendo um volume final de 2 mL, mantido em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período 0,2 mL de cada mistura foi inoculado em 5 ovos SPF de 9 dias de incubação, por via da cavidade alantóide. Os ovos foram mantidos em incubação, sendo realizado avaliação diária, durante nove dias, da viabilidade embrionária através de ovoscopia e posterior abertura dos ovos para a análise da presença de lesões embrionárias típicas da infecção pelo VBI nos ovos contendo embriões mortos ou sobreviventes, até o 9º dia pós-inoculação. Os títulos vírus-neutralizantes foram calculados pela fórmula de REED & MUENCH (1938), tendo sido expressos como a diluição que proporcionou 50% de proteção aos ovos inoculados.

4.6.5. Detecção pela técnica de imunohistoquímica da estirpe viral M41 do VBI em cortes de traquéia de aves infectadas experimentalmente utilizando os fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1

A técnica de imunohistoquímica foi realizada em cortes de traquéia de aves da linhagem *White Leghorn* obtidos de aves no 3º dia após a infecção experimental com a estirpe M41 do VBI e cortes de traquéia de aves não infectadas. Os cortes de tecido (traquéia) foram fixados em 4% paraformaldeído em PBS pH 7,4 por 24 horas, sendo posteriormente submetidos ao tratamento de desparafinização como descrito por SHI et al. (1991). Foi realizado a recuperação antigênica submetendo os cortes histológicos a fervura em microondas durante 15 minutos (3 vezes de 5 minutos) em tampão TRIS-HCl 1 M, pH 10. Após recuperação antigênica foi realizado bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se um tampão composto de 3% de peróxido de hidrogênio e 7% de etanol, por 30 minutos a temperatura ambiente. A lâmina foi lavada com PBS, sendo realizado o bloqueio de reatividades inespecíficas com soro albumina bovina a 1%

diluída em PBS. As lâminas passaram novamente por lavagem, sendo posteriormente adicionado o soro hiperimune de galinha diluído 1:80, ou os fragmentos de anticorpos monoclonais scFv-S1 e scFv-N diluídos a 1:5 em tampão de bloqueio, sendo a reação incubada de 14-16 horas em câmara úmida a 4°C. Após incubação foram realizadas novas lavagens e adicionado os conjugados peroxidase anti-IgG de galinha (Bethyl) e o anti-poli-histidina (Sigma Aldrich) ambos na diluição de 1:200, sendo incubados durante 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente. Foram realizadas novas lavagens sendo posteriormente acrescentado a mistura substrato-cromógeno constituída por (H_2O_2 + Dietil-amino-benzidina - DAB), seguindo as recomendações do fabricante. As células foram posteriormente coradas utilizando a hematoxilina de Mayer's.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Clonagem em fagomídeo pCANTAB 5E e seleção da biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv) em fagos

5.1.1. Construção do gene artificial VH-linker-VL e clonagem em fagomídeo pCANTAB 5E

Atualmente existem duas maneiras de se obter bibliotecas de fragmentos de anticorpos monoclonais, sendo elas, a biblioteca *naive* onde o animal doador das sequências codificadoras de anticorpos não é sensibilizado com o antígeno de interesse; e a biblioteca imune, que possibilita a obtenção de clones específicos para o antígeno inoculado, onde linfócitos B específicos são enriquecidos e passam pelo processo de maturação *in vivo* no sistema imune do animal (BENHAR, 2001; WILLATS, 2002). Sendo assim, para se obter uma biblioteca de anticorpos imune foi necessário estabelecer um esquema apropriado de hiperimunização das aves e monitoramento da resposta imune humoral, a fim de se certificar do desenvolvimento de uma produção de anticorpos anti-virais específicos em concentrações adequadas para com antígenos da estirpe H120 do VBI.

Uma vez alcançado um bom título de anticorpos, foram obtidos a partir da extração do RNA total do baço das aves hiperimunizadas, os produtos gênicos amplificados referentes às porções variáveis das cadeias leve e pesada de imunoglobulinas com os tamanhos de aproximadamente 350bp e 390bp, respectivamente, os quais foram unidos através de uma sequência de nucleotídeos

codificadora de um peptídeo *linker*, dando origem à construção do segmento gênico sintético VH-linker-VL (scFv) de aproximadamente 750bp (Figura 7).

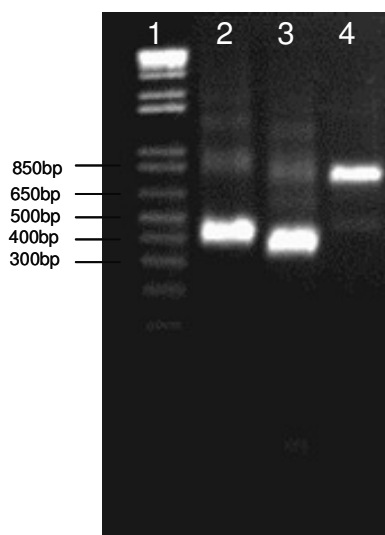


Figura 7. Eletroforograma do material genético amplificado e purificado. Canaletas (1) tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen Corp.), (2) fragmento amplificado do gene codificador da cadeia variável pesada (VHF e VHR), (3) fragmento amplificado do gene codificador da cadeia variável leve (VLF e VLR), (4) fragmento amplificado do gene codificador do polipeptídeo scFv (linker1, linker2, VHF e VLR).

5.1.2. Seleção da biblioteca de fragmentos de anticorpos (scFv) em fagos contra a estirpe vacinal H120 do VBI

Os segmentos gênicos VH-linker-VL, codificadores dos fragmentos de anticorpos monoclonais scFv foram clonados em fagomídeo pCANTAB 5E fornecido no Módulo de Expressão RPAS, o qual foi posteriormente inserido através do processo de eletroporação em células de *E. coli* linhagem TG1. Os fagos *M13* foram expressos carregando os fragmentos scFvs, submetidos a três ciclos de seleção com a estirpe H120, resultando em uma biblioteca de aproximadamente 10^5 clones, a partir da qual foram selecionados 400 clones. Na literatura alguns autores chegaram a descrever 10^7

clones em suas bibliotecas, especialmente aquelas provindas de imunoglobulinas de mamíferos (DAI et al., 2003; FOORD et al., 2007).

Os clones selecionados a partir da biblioteca de fragmentos de anticorpos monoclonais obtida contra o VBI foram posteriormente avaliados através do método indireto de ELISA, usando-se a suspensão purificada da estirpe H120 do VBI. Essa análise inicial permitiu que fossem selecionados 10 clones (A6P1; A7P1; A4P2; A3P3; F3P3; C11P4; D2P4; G2P4; H5P4; F11P4), que apresentaram maior reatividade para com os antígenos do VBI, isto é, para os quais foram obtidos valores de DO > 0,5. Cerca de 42% dos clones obtidos apresentaram DO > 0,2 e podem ser considerados positivos segundo o manual do módulo de expressão RPAS, mas não foram utilizados por apresentarem uma marcação de baixa intensidade quando avaliados pelo ensaio de Western blotting para avaliação da especificidade. Em um trabalho relacionado de obtenção de fragmentos de anticorpos scFv de aves, SAPATS et al. (2003), observaram 210 clones positivos de um total de 300 clones testados contra o vírus da Doença Infecciosa da Bursa, após modificações no vetor pCANTAB 5E. Em outro trabalho SAPATS et al. (2006), utilizando o mesmo vetor reconstruído, testaram 400 clones, encontrando 48,5% de ligantes para o antígeno inoculado.

Como já referido, os clones anti-VBI selecionados com base nos resultados do teste de ELISA foram submetidos ao ensaio de Western blotting para avaliação da especificidade dos monoclonais scFv, sendo selecionados os clones A6P1, que marcou mais intensamente uma banda de aproximadamente 52 KDa correspondente à proteína N (Figura 8B) e o clone D2P4 que apresentou uma maior marcação com uma banda de aproximadamente 92 DKa, correspondente à glicoproteína S1 (Figura 8A). Os demais clones testados apresentaram reações mais fracas com essas proteínas estruturais do VBI, sendo que a maioria deles apresentou reatividade contra a proteína N. Dados semelhantes foram encontrados por IGNJATOVIC & ASHTON (1996) na produção de anticorpos monoclonais pela técnica de hibridoma, onde foram obtidos uma maior quantidade de clones direcionados para a proteína N do que para as demais proteínas estruturais (S e M) do VBI. Tais resultados também são mostrados por vários outros

autores na produção de anticorpos monoclonais contra o VBI utilizando a técnica de hibridoma (MOCKETT et al., 1984; KOCH et al., 1986).

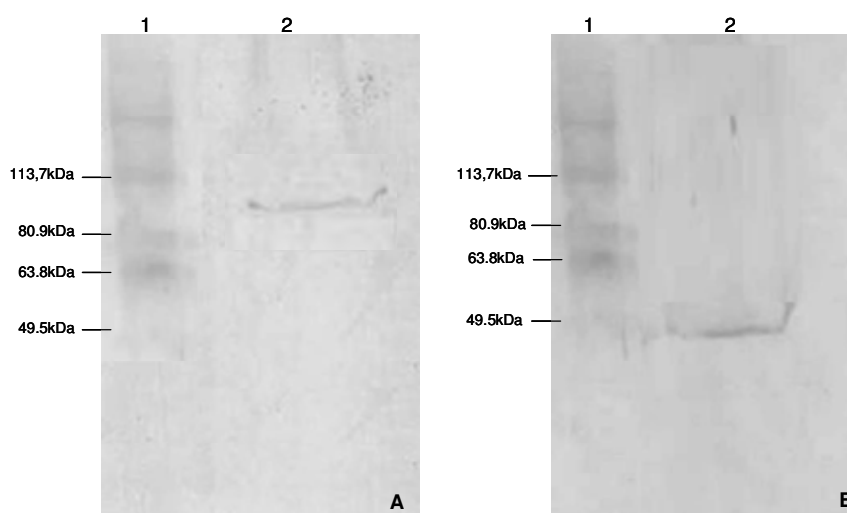


Figura 8. Análise da afinidade dos fragmentos scFv expressos em fagos frente as proteínas estruturais da estirpe vacinal H120 do VBI. (A) Fagos expressos pelo clone D2P4. Linha (1) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (2) Vírus H120. (B) Fagos expressos pelo clone A6P1. Linha (1) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (2) Vírus H120.

A escolha de se criar uma biblioteca imune de fragmentos de anticorpos monoclonais contra o VBI pode ser justificada por diversas razões. Uma delas diz respeito aos grandes prejuízos ocasionados por esse vírus em plantéis avícolas no Brasil e no mundo (VILLARREAL, 2007), e o outro à capacidade mutagênica do mesmo, que pode ser considerado um importante modelo de evolução viral, sendo a substituição de seus nucleotídeos similar a de alguns RNA vírus altamente mutáveis. Essas mutações que ocorrem no gene determinam o surgimento de novas variantes e até mesmo sorotipos do vírus, sendo que a diferenciação das estirpes fundamenta-se principalmente na identificação da região variável da glicoproteína S, no que concerne tanto sua caracterização genética como antigênica (KANT, 1992; CAVANAGH, 2007).

5.2. Subclonagem do gene artificial VH-linker-VL em vetor pET 28a e produção dos fragmentos de anticorpos solúveis por células de *E. coli* BL21

5.2.1. Subclonagem dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1 e VH-linker-VL-D2P4 em vetor pET 28a e transformação de células de *E. coli* BL21

Algumas limitações são observadas no sistema RPAS para a expressão de fragmentos de anticorpos solúveis. Assim como ocorreu nesse trabalho, alguns outros autores encontraram dificuldades na expressão dos fragmentos solúveis, seja na ausência total de expressão, na quantidade ínfima de produto expresso ou mesmo na formação de corpúsculos de inclusão que inviabilizam de certa forma a obtenção de anticorpos monoclonais viáveis (KRAMER et al., 2002; GUO et al., 2003). Sendo assim, foi necessário a busca de um novo sistema de expressão para a obtenção dos fragmentos scFv solúveis. Após a avaliação dos sistemas de expressão disponíveis, foi escolhido o sistema pET de expressão de proteínas heterólogas, sendo ele o mais utilizado atualmente para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. O vetor pET 28a permite a expressão da proteína recombinante fusionada a 6 resíduos de histidina na extremidade amino e/ou carboxi-terminal, o que facilita a purificação e 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 plasmídeos 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 DNA clonado (STUDIER et al., 1990; GUO et al., 2003).

Por ser necessária a mudança do vetor para a expressão dos fragmentos solúveis, a priori optou-se por não processar todos os clones positivos avaliados no

ensaio de Western blotting. Sendo assim, foram extraídos as amostras de DNAs plasmídeos dos clones A6P1 e D2P4 e inserido o sítio de restrição (*NdeI*) nos segmentos gênicos VH-linker-VL através de reações de PCR com um novo par de oligonucleotídeos iniciadores, resultando em dois novos segmentos gênicos que mantiveram o tamanho aproximado de 750bp, sendo clonados em preparações do vetor pET 28a, as quais foram utilizadas na transformação de células de *E. coli* BL21 através de eletroporação.

5.2.2. Sequenciamento de nucleotídeos dos genes artificiais VH-linker-VL-A6P1H11 e VH-linker-VL-D2P4F7

Foram selecionados os clones A6P1H11 (scFv-N) e o D2P4F7(scFv-S1), que passaram pelo sequenciamento de nucleotídeos, seguido do alinhamento pelo programa Clustal W e análise de suas sequências deduzidas de aminoácidos pelo programa Bioedit, usando-se para comparação e como consenso a sequência de nucleotídeos do gene artificial VH-linker-VL do clone CRAB21 produzido contra antígeno do Vírus da Doença Infecciosa da Bursa no trabalho de SAPATS et al. (2003), e depositada no *genbank* sob nº AF506502. Através da análise realizada foi obtida uma homologia de 87% e 86%, respectivamente para os clones A6P1H11-N e D2P4F7-S1 (figura 9).

Segundo ANDRIS-WIDHOPF (2000) as aves possuem aproximadamente 25 pseudogenes codificadores de VL e 100 pseudogenes codificadores de VH, o que confere a variabilidade das moléculas de anticorpos. Através do programa Bioedit foi realizada a avaliação e confirmação das regiões de *framework* e CDRs, sendo possível observar a existência de sequências com elevada homologia na sua composição de resíduos de aminoácidos, especialmente os pertencentes à maioria das regiões de *framework* juntamente com outras sequências com maior variabilidade e que estão situadas principalmente nas regiões CDRs de VH e de VL e também nas *frameworks* 2 e 3 de VL. Essas alterações nas sequências de aminoácidos que ocorrem principalmente na região VL se deve segundo alguns autores, a influência direta dessa

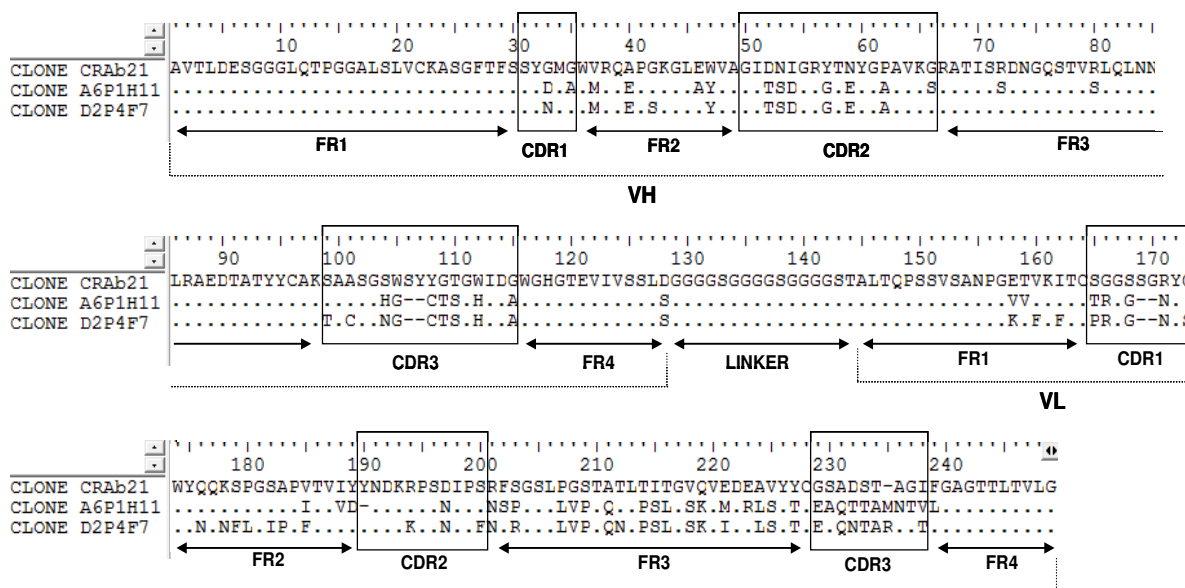


Figura 10. Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos deduzidas dos genes das regiões variável de cadeia pesada (VH) e variável de cadeia leve (VL) presentes nos clones A6P1H1 (scFv-N) e D2P4F7 (scFv-S1) em relação à seqüência de resíduos de aminoácidos deduzidos do gene sintético scFv do clone CRAb21 (Gene Bank nº AF506502) correspondente a um dos fragmentos de anticorpos monoclonais específicos para o Vírus da Doença Infecciosa da Bursa (SAPATS et al., 2003). Somente os resíduos de aminoácidos que apresentaram diferenças da seqüência de consenso é que foram destacados, sendo que os resíduos idênticos foram apresentados sob a forma de pontos e as deleções sob a forma de traços. As regiões determinantes de complementariedade (CDRs) 1, 2 e 3 de VH e de VL foram também delimitadas por caixas vermelhas, tendo sido destacadas também as regiões de *framework* (FR) 1, 2, 3 e 4 e a seqüência de aminoácidos *linker*.

5.2.3. Produção dos fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 solúveis por células de *E. coli* BL21

Embora os sistemas de clonagem e expressão sejam bem conhecidos, alguns problemas podem ocorrer ocasionando a expressão de baixos níveis de proteína recombinante ou ainda a expressão de proteínas na forma insolúvel formando agregados no citoplasma da célula hospedeira. Tais problemas podem ser contornados pelo uso de diferentes concentrações do indutor ou do meio de cultura, uso de mutantes

de célula hospedeira e/ou diferentes temperaturas de indução (BANEYX & MUJACIC, 2004; SORENSE & MORTENSEN, 2005).

Tendo conhecimento destes fatos os, clones A6P1H11-N e D2P4F7-S foram submetidos à indução em meio de cultura com adição mínima (0,2 mM) de IPTG, agitação lenta e temperatura de 30°C. As células foram lisadas por sonicação, sendo o extrato celular bruto e 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 correspondem aos fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 que foram expressos com uma cauda de poli-histidina fusionada, sendo facilmente detectáveis com o uso do anticorpo monoclonal anti-poli-histidina (Figura 11).

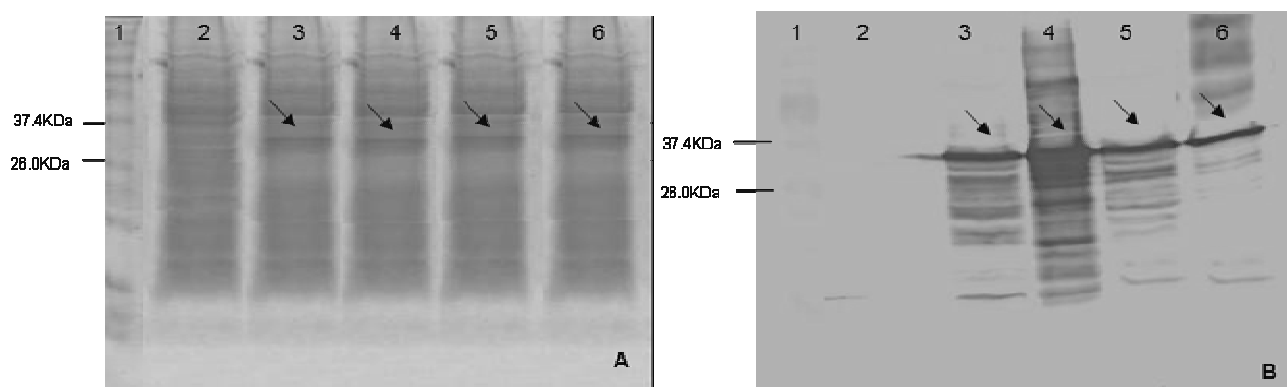


Figura 11. Análise da expressão dos fragmentos de anticorpos scFv solúveis em amostras de extrato celular bruto e sobrenadante das culturas de *E. coli* BL21 submetidas à indução e lise. SDS-PAGE (A) e Western Blotting (B). Linha: (1) Marcado de peso molecular (Bench Marck – Invitrogen Corp.), (2) controle negativo (3) sobrenadante clone A6P1H11, (4) Extrato celular bruto clone A6P1H11, (5) sobrenadante clone D2P4F7, (6) Extrato celular bruto clone D2P4F7.

5.3. Avaliação da atividade funcional dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1

5.3.1. Determinação da atividade funcional dos fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 frente às proteínas virais estruturais da estirpe H120 do VBI através do ensaio de Western blotting

Nos ensaios de western blotting com os fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 ficou evidenciado que tais anticorpos possuem uma boa reatividade com as proteínas N e S1 da estirpe H120 do VBI. Na membrana em que foi utilizado para a detecção o fragmento de anticorpo scFv-S1 observou-se a marcação de uma proteína de tamanho aproximado de 92 KDa, o que corresponde ao tamanho molecular da glicoproteína S1 (Figura 12B). Já na membrana que foi utilizado o fragmento anticorpo scFv-N observou-se a marcação de uma proteína de tamanho aproximado de 52 KDa, o que corresponde ao tamanho da proteína N do VBI (Figura 12A).

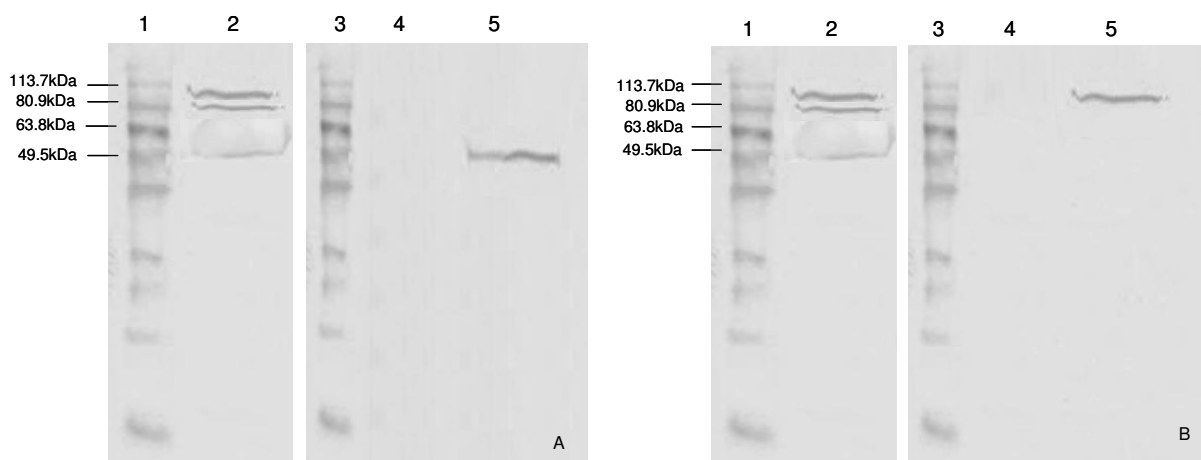


Figura 12. Análise da afinidade dos fragmentos de anticorpos scFv solúveis. Membrana A - Linha (1) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (2) Vírus H120 concentrado e purificado detectado com a utilização de pool de soro policlonal de galinha hiperimunizada, (3) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (4) LCA – controle negativo da reação com fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N, (5) Vírus H120 concentrado e purificado detectado com a utilização do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N. Membrana B - Linha (1) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (2) Vírus H120 concentrado e purificado detectado com a utilização de pool de soro policlonal de galinha hiperimunizada, (3) Marcador de peso molecular (Bench Marck), (4) LCA – controle negativo da reação com fragmento de anticorpo monoclonal scFv-S1, (5) Vírus H120 concentrado e purificado detectado com a utilização do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-S1.

5.3.2. Titulação dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1 pelo método de ELISA indireto

Com relação aos resultados da titulação dos fragmentos de anticorpos scFv-N e scFv-S1 pelo método indireto de ELISA, frente a suspensões homólogas e purificadas da estirpe H120 do VBI ou a suspensões antigênicas controles negativos de líquido córion-lantóide (LCA), observou-se o desenvolvimento de reatividades específicas e com magnitudes que variaram de forma proporcional as diluições utilizadas desses anticorpos, conforme revelam as DOs obtidas no ensaio de titulação em bloco. Além disso, nenhuma reação significativa foi detectada com esses mesmos anticorpos e a suspensão antigênica controle negativo de LCA, utilizado como controle negativo da reação (Figura 13).

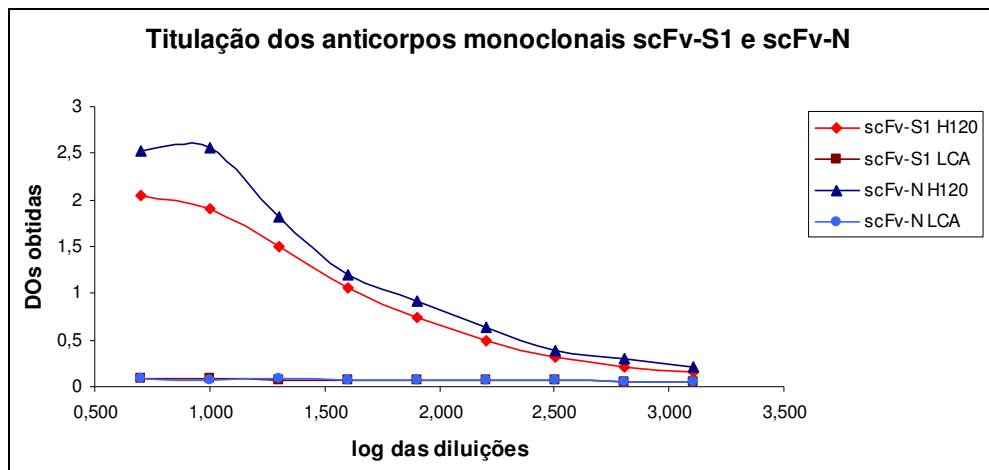


Figura 13. Resultados do método de ELISA indireto realizado com diferentes diluições dos fragmentos de anticorpos scFv-S1 e scFv-N frente ao vírus H120.

5.3.3. Avaliação da especificidade dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1 frente a estirpes de referencia e isolados brasileiros do VBI pela técnica de ELISA indireto

Através do ensaio ELISA Concanavalina-A foi possível observar as interações entre o anticorpo scFv-N com as sete estirpes avaliadas (H120, M41 e Arkansas; e os isolados brasileiros IBVPR05, IBVPR02, IBVPR01, IBVSC01), apresentando um comportamento similar ao dos anticorpos policlonais presentes no soro de galinhas hiperimunizadas com o VBI utilizado como controle positivo (Figura 14A). Já quando observamos o perfil produzido pelos fragmentos de anticorpos scFv-S1 torna-se claro a diferença do padrão encontrado entre os resultados obtidos com tais anticorpos em relação aos obtidos com o uso dos anticorpos policlonais utilizados, havendo detecção somente das estirpes homólogas pertencentes ao sorotipo Massachusetts que são H120, M41 e IBVSC01 (isolado brasileiro) (Figura 14B). Os resultados apresentados podem ser explicados levando em consideração três hipóteses: a primeira, seria que o

epítipo de reconhecimento do anticorpo scFv-S1 nas estirpes em questão não tenha sofrido alterações, ou que possa ter havido alterações a nível de bases nitrogenadas, mas que não necessariamente tenha causado modificações na sequência final de aminoácidos, ou ainda que possa ter ocorrido mudanças nos aminoácidos, mas sendo eles do mesmo grupo, teria sido mantido um epítipo semelhante para o reconhecimento do anticorpo scFv-S1.

MONTASSIER et al. (2006) ao analisar algumas amostras de campo, inclusive as que foram utilizadas, encontrou perfis filogenéticos que permitiram a classificação desses vírus em cinco grupos diferentes. O primeiro desses grupos reuniu cinco dos isolados ao genótipo Massachusetts. Foram também identificados dois isolados com características do genótipo Arkansas/Jilin e outro similar ao genótipo Connecticut. O mais interessante, entretanto, é que dos quatro vírus remanescentes analisados, dois deles formaram um isolado distinto sem relação com nenhum outro genótipo conhecido do VBI, enquanto que dois outros isolados não compartilham características gênicas com as estirpes de referencia de outras partes do mundo, mas sim elas constituíram um grupo junto com amostras brasileiras do VBI descritas por VILLARREAL (2007), formando assim um conjunto de estirpes autóctones do Brasil.

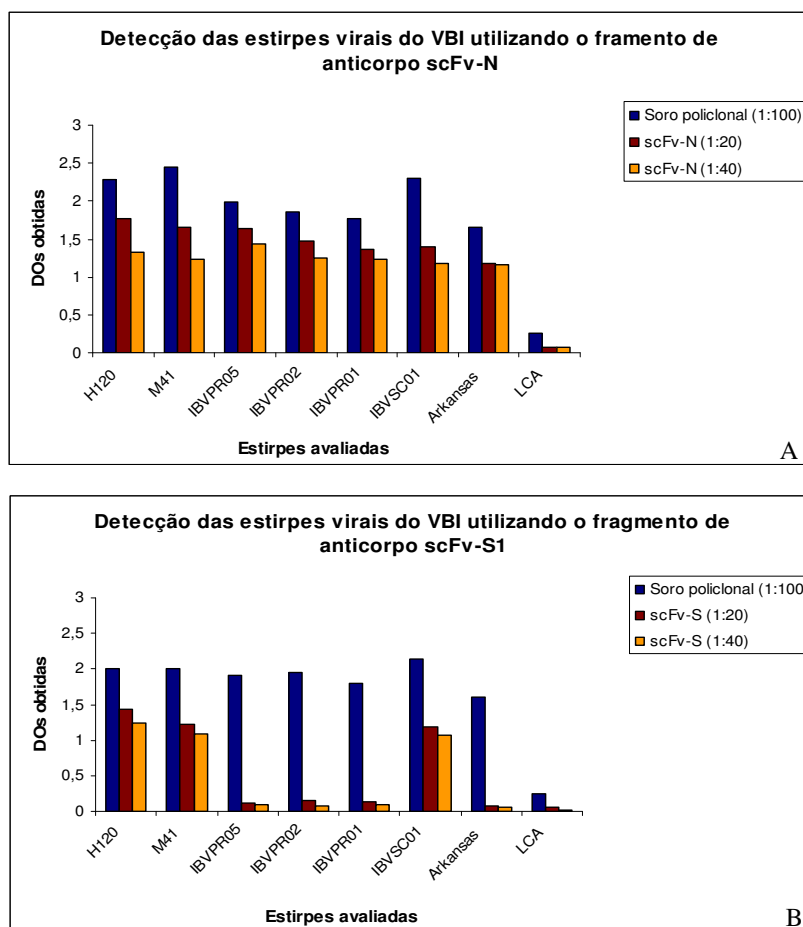


Figura 14. Reatividade dos fragmentos de anticorpos monoclonais contra a proteína N (A) e contra a proteína S1 (B) do VBI com estirpes homólogas e heterólogas do VBI nos testes de ELISA.

5.3.4. Avaliação da atividade vírus-neutralizante do fragmento de anticorpo solúvel scFv-S1

Foi observado que o fragmento de anticorpo monoclonal scFv-S1 apresentou atividade vírus-neutralizante contra a infecção pela estirpe homóloga M41 do VBI inoculada em ovos embrionados SPF, tendo proporcionado um título vírus-neutralizante 50% (VNT₅₀) correspondente ao título de 1:40. Para efeito de comparação, o anti-soro homólogo contra essa mesma estirpe viral apresentou um título vírus-neutralizante 50% igual a título 1:320

Sabe-se que por muitos anos as técnicas de vírus-neutralização cruzada (COWEN & HITCHNER, 1975; JOHNSON & MARQUADT, 1975; HOFSTADT, 1981; COOK, 1997) foram utilizadas como meio de definir a relação antigênica entre cepas vacinais e amostras isoladas de campo, de modo a prever e avaliar a capacidade de estirpes vacinais do VBI em conferir proteção contra novos isolados de campo do vírus. Os vírus que não produzem reações recíprocas de títulos neutralizantes são considerados diferentes sorotipos, já aqueles que produzem uma relação cruzada (diferenças em menor grau) são conhecidos como variantes, sendo assim, com os resultados obtidos o anticorpo scFv-S1 poderá ser utilizado em ensaios de vírus-neutralização para diferenciar variantes e sorotipos, já que apresenta atividade neutralizante para a estirpe homóloga M41.

5.3.5. Aplicação dos fragmentos de anticorpos solúveis scFv-N e scFv-S1 na detecção da estirpe viral M41 do VBI em amostras de tecido de aves infectadas experimentalmente

O processo infeccioso ocasionado pelo VBI inicialmente se reflete no trato respiratório superior e preferencialmente nas células ciliadas e secretoras de muco desse sistema (DHINAKAR RAJ & JONES, 1996). O título infectante viral atinge valores máximos nas mucosas do nariz e traquéia após três dias do início da infecção, permanecendo nesses patamares por mais dois a cinco dias (HOFSTAD & YODER, 1996). Sendo assim, fragmentos de traquéia e pulmão se constituem no material de eleição para a detecção da maioria das estirpes do VBI, que podem ser detectadas por técnicas de imunohistoquímica, reação de imunofluorescência ou de imunoperoxidase (HIPOLITO, 1957; DHINAKAR RAJ & JONES, 1996; DE WIT, 2000).

Os fragmentos de anticorpos monoclonais foram utilizados em ensaios de imunohistoquímica para a detecção da estirpe homóloga M41 do VBI em cortes de traquéia de aves infectadas experimentalmente. Os principais resultados revelaram que tanto os anticorpos scFv-S1 (Figura 15A), como o scFv-N (Figura 16A) apresentaram reatividade para os respectivos antígenos do VBI que estão sendo produzidos no curso

da infecção por esse vírus, resultando assim, na marcação de várias das células epiteliais da traquéia infectadas. Com a finalidade de investigar de forma comparativa essa reatividade com antígenos do VBI *in situ*, os anticorpos policlonais presentes nos anti-soros contra a estirpe H120 foram também testados em cortes similares de traquéia (Figura 17A), tendo sido demonstrado marcações dos mesmos tipos celulares que haviam sido marcados pelos fragmentos de anticorpos monoclonais scFv-S1 e scFv-N. Nos cortes de traquéia de aves não infectadas, não foi observada nenhuma reatividade ou marcação inespecífica (Figura 15B; 16B e 17B). Resultados semelhantes a esse foram demonstrados por NAQI (1990), que utilizando anticorpos monoclonais produzidos por hibridoma encontrou o mesmo perfil de marcação na detecção da estirpe M41 em células do epitélio traqueal em corte histológico. Em outro trabalho, YAGYU & OHTA (1990), utilizando o anticorpo monoclonal Y-0-1 (MAb-IFA), também produzidos por hibridoma, detectou a estirpe M41 em células renais e no epitélio traqueal de aves infectadas utilizando a técnica de imunofluorescência.

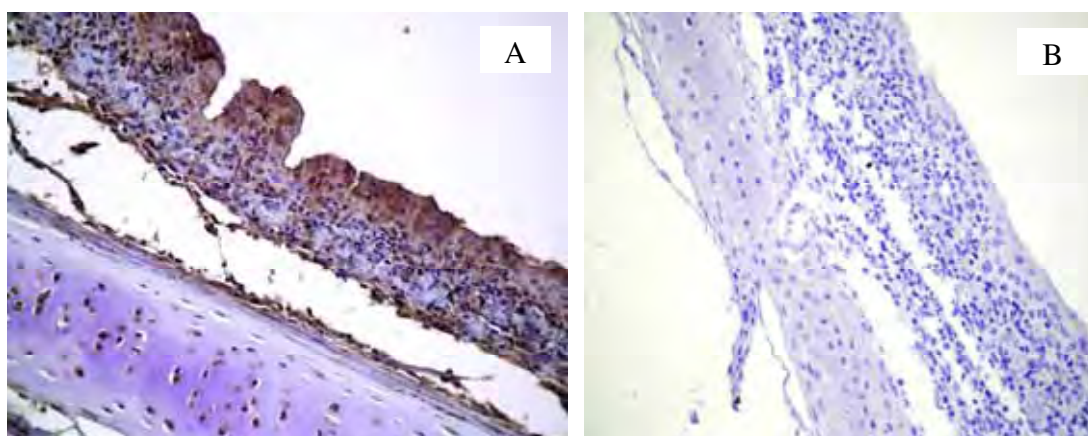


Figura 15. (A) Utilização do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-S1 na detecção viral em corte de traquéia de ave experimentalmente infectada com a estirpe M41 do VBI. (B) Controle negativo: corte de traquéia de ave não infectada.

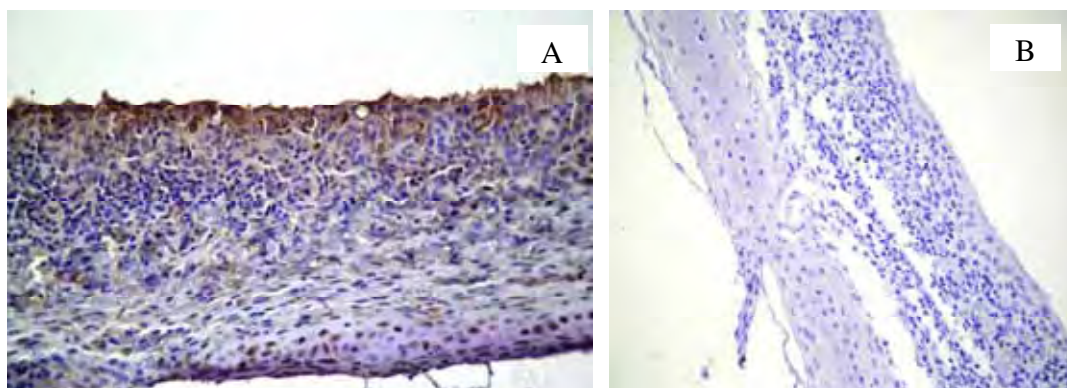


Figura 16. (A) Utilização do fragmento de anticorpo monoclonal scFv-N na detecção viral em corte de traquéia de ave experimentalmente infectada com a estirpe M41 do VBI. (B) Controle negativo: corte de traquéia de ave não infectada.

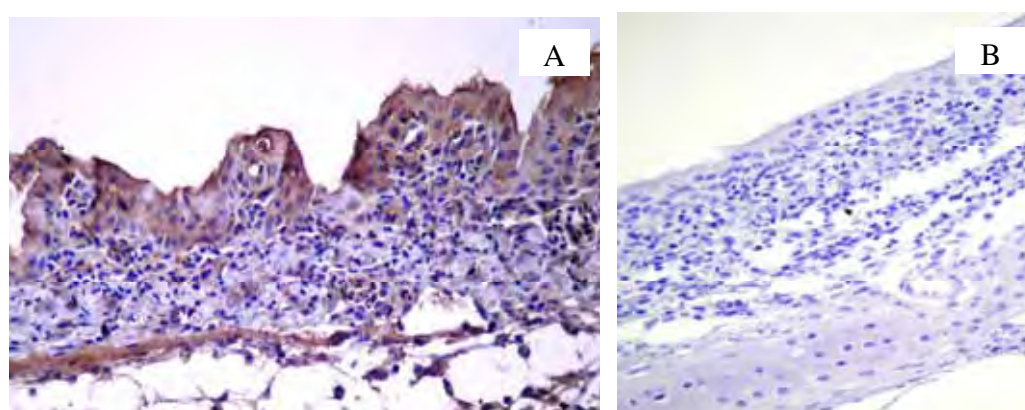


Figura 17. (A) Controle positivo: Utilização dos anticorpos policlonais contidos no anti-soro de galinhas hiperimunizadas com a estirpe H120 na detecção viral em corte de traquéia proveniente de ave infectada experimentalmente com a estirpe M41 do VBI. (B) Controle negativo: corte de traquéia de ave não infectada.

De acordo com o exposto acima, torna-se claro que o desenvolvimento de painéis de anticorpos monoclonais são fundamentais para a detecção e diferenciação das muitas estirpes virais que se originam continuamente, já que muitas destas mutações ocorrem justamente em sítios importantes de reconhecimento de anticorpo (KANT, 1992; IGNJATOVIC & GALLI, 1994; CAVANAGH & NAQI, 2003).

Diversos autores têm descrito com sucesso o uso da apresentação de anticorpos em fagos contra agentes infecciosos virais em várias áreas, como medicina humana e veterinária. Recentemente, um estudo utilizando *phage display* produziu anticorpos fita simples (scFv) contra o vírus da febre aftosa (FOORD et al., 2007). SAPATS et al. (2003; 2006) já produziram sinteticamente fragmentos de anticorpos contra a doença de Gumboro. Em outro trabalho relacionado, OZAWA et al. (2005) detectaram em uma biblioteca de scFv três clones reativos para o vírus da doença de Newcastle.

Os fragmentos de anticorpos monoclonais criados por engenharia genética atualmente estão sendo utilizados para execução de inúmeras investigações, como por exemplo, o mapeamento de epítomos, nos avanços na tecnologia de produção de vacinas, no *screening* de receptores celulares, além do uso cada vez maior de tais moléculas pela indústria farmacológica.

Com isso, aventou-se a possibilidade, em nosso estudo, do uso bem sucedido do fragmento de anticorpo scFv-S1 em diferenciar estirpes que possuam variações fenotípicas importantes na glicoproteína S1 já que se trata de uma proteína altamente mutável, enquanto que o fragmento de anticorpo scFv-N pode ser utilizado na detecção de múltiplos isolados do VBI em materiais biológicos, já que se trata de uma proteína altamente conservada.

VI. CONCLUSÕES

6.1. A técnica de *Phage display* realizada com base no fagomídeo pCANTAB 5E foi empregada com sucesso para a seleção de dois fragmentos de anticorpos monoclonais contra as proteínas S1 e N do VBI.

6.2. A subclonagem em vetor pET 28a dos genes codificadores dos fragmentos de anticorpos contra o VBI foi realizada de forma bem sucedida, sendo a expressão na forma solúvel realizada com sucesso por células de *E. coli* BL21.

6.3. Os fragmentos scFv-S1 e scFv-N apresentam boa atividade na detecção do VBI em todos os ensaios realizados.

6.4. A realização deste estudo levou a produção de fragmentos de anticorpos monoclonais solúveis que podem ser utilizados na detecção e diferenciação do VBI, já que ainda não são encontrados na literatura relatos de anticorpos monoclonais produzidos por essa técnica contra este vírus. Sendo assim, tais anticorpos podem ser empregados colaborando no diagnóstico e estudo da evolução desse vírus no Brasil.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Revista Brasileira de Ciências avícolas**, Campinas, suplemento 8, p. 210-216, 2006.

ADEY, N. B.; NATARAGNON, A. H.; RIDER, J. E. Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptides libraries. **Gene**, Amsterdam, v. 56, p. 27-31, 1995.

AMBALI, A. G.; JONES, R. C. Early pathogenesis in chicks of infectious with an enteric strain of infectious bronchitis virus. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 34, p. 809-817, 1990.

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. **Journal Biochemistry**, Amsterdam, v. 128, p. 891-895, 2000.

ANDRIS-WIDHOPF, J. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. **Journal Immunological Methods**, New York, v. 242, p. 155-159, 2000.

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, London, v. 22, p. 1399-1410, 2004.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, 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 Pathology**, Cambs, v. 23, p. 471-480, 1994.

BOURSNELL, M. E. G.; BROWN, T. D. K.; BINNS, M. M. Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. **Virus Research**, Amsterdam, v. 1, p. 303-313, 1984.

BOURSNELL, M. E. G. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. **Journal of General Virology**, Reading, v.66, p.573-580, 1985.

BOURSNELL, M. E. G. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Journal of General Virology**, Reading, v.68, p.57-77, 1987.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO A. Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biociencia em Desenvolvimento**, São Paulo, v. 26, p. 44-51, 2002

BRONZONI, R. V. M.; MONTASSIER, M. F. S.; PEREIRA, G. T.; GAMA, N. M. S. Q.; SAKAI, V.; MONTASSIER, H. J. Detection of infectious bronchitis virus and specific anti-viral antibodies using a Concanavalin A-Sandwich-ELISA. **Viral Immunology**, London, v. 18, p. 569-578, 2005.

CAPUA, I. A 'novel' infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 41, p.83-89, 1999.

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

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 Pathology**, 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 Pathology**, Cambs, v.21, p.401-408, 1992.

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

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. Infectious Bronchitis. In: BARNES, H. J. BEARD, C. W. **Diseases of poultry**, 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003, p. 101-119.

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathology**, Cambs, v. 34, p. 439- 447, 2005

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 38, p. 281-290, 2007.

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

COOK, J. Bronquite infecciosa aviária: situação mundial e distribuição desorotipos. In: Simpósio Sobre Sanidade Avícola, 1997, São Paulo. **Anais...** São Paulo: FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), 1997. p. 13.

COWEN, B. S.; HITCHNER, S. B. Serotyping of avian infectious bronchitis virus by the virus neutralization test. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 19, p. 583-595, 1975.

CUPIT, P. M.; LORENZEN, N.; STRACHAN, G.; KEMP, G. J.; SECOMBES, C. J.; CUNNINGHAM, C. Neutralisation and binding of VHS virus by monovalent antibody fragments. **Virus Research**, Amsterdam, v. 81, p. 47-56, 2001.

DAI, H.; GAO, H.; ZHAO, X. Construction and characterization of a novel recombinant single-chain variable fragment antibody against White Spot Syndrome Virus from shrimp. **Journal of Immunological Methods**, New York, v. 279, p. 267- 273, 2003.

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

DE WIT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, Cambs, v. 29, 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 Pathology**, Cambs, v.25, p. 481-501, 1996.

DI FABIO, J.; ROSSINI, L. I. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 44, p. 582-589, 2000.

FILPULA, D. Antibody engineering and modification technologies. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 24, 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. **Journal of Immunology Methods**, New York, v. 321, p. 142-150, 2007.

FURUYAMA, C. R. A. G. **Clonagem e expressão do gene da proteína S do vírus da Bronquite infecciosa em levedura**. Jaboticabal, 2005, 98p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005

GELB, J. Jr.; ROSENBERGER, J. K.; FRIES, P. A. Protection afforded infectious bronchitis virus – vaccinated sentinel chickens raised in a comercial environment. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 33, 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 Disease**, Kennet Square, v. 35, p. 82-87, 1991.

GELB, J. Jr.; 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 Disease**, Kennet Square, v.41, p. 661-669, 1997.

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*. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, v.102, p. 177-186, 2003.

HANDBERG, K. J. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. **Avian Pathology**, Cambs, v. 28, p. 327-335, 1999;

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da Bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arquivos da Escola Superior de Medicina Veterinária da Universidade Rural do Estado de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 10, p. 131-151, 1957.

HOFSTADT, M. S. Cross immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 25, p. 650-654, 1981.

HOFSTADT, M. S.; YODER, H. W. Avian infectious bronchitis virus distribution in tissues of chicks. **Avian Disease**, Kennet Square, v.10, p. 230-239, 1996

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

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

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

ITO, N. M. K.; MIYAGI, C. I.; OKABAYACHI, S. Controle de variantes do vírus da Bronquite infecciosa das galinhas. In: Conferencia Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 2006, Santos, **Anais...** Santos: FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), 2006. p.75.

JIA, W. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. **Archives of Virology**, Vienna, v. 140, p. 259-265, 1995.

JOHNSON, B. B.; MARQUADT, W. W. The neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measured by the constant-virus variable-serum method in chicken tracheal cultures. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 19, p. 82-90, 1975.

KANT, A. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. **Journal of General Virology**, Reading, v. 73, p. 591-596, 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). **Biochimica et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology**, Philadelphia, v. 1550, p. 153-163, 2001.

KOCH, G.; HARTOG, L.; KANT, A.; VAN ROOZELAAR, D. J.; DE BOER, G. F. Antigenic differentiation of avian infectious bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. **Journal of Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 42, p. 89-97, 1986.

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. **Journal of General Virology**, Reading, v. 71, 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: Proceedings of the Second International Symposium on Infectious bronchitis virus, 1991, Rauschhol/hausen, Germany. **Anais...** p. 154.

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

KRAMER, K.; FIEDLER, M.; SKERRA, A.; HOCK, B. A generic strategy for subcloning antibody variable regions from the scFv phage display vector pCANTAB 5 E into pASK85 permits the economical production of Fab fragments and leads to improved recombinant immunoglobulin stability. **Biosensors & Bioelectronics**, London, v. 17, p. 305-313.

KRETZSCHMAR, T.; VON RUDEN, T. Antibody discovery: phage display. **Current Opinion in Biotechnology**, Schaumburg, v. 13, p. 595-598, 2002.

KUSTERS, J. G. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. **Virology**, New York, v. 196, p. 217-221, 1989.

KUSTERS, J. G. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Vaccine**, London, v. 8, p. 605-608, 1990.

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

LAI, M. M. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advanced Virus Research**, Amsterdam, v. 48, p. 1-100, 1997.

LEE, C. W.; JACKWOOD, M. W. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. **Archives of Virology**, Vienna, v. 145, p. 2135-2148, 2000.

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

MAKOWSKI, L. Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage *M13*. **Current Opinion in Structural Biology**, Stoneham, v. 4, p 225-230, 1994.

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

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. **Journal of General Virology**, Reading, 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, Germany. **Anais...** p. 119.

MOORE, K. M.; BENOIRETT, 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 Gene**, Norwell, v.17, p. 63-83, 1998.

NAQI, S. A. A Monoclonal Antibody-Based Immunoperoxidase Procedure for Rapid Detection of Infectious Bronchitis Virus in Infected Tissues. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 34, p. 893-898, 1990.

NDIFUNA, A. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 70, p. 37-44, 1998.

OZAWA, M.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Identification and characterization of peptides binding to Newcastle disease virus by Phage display. **Journal of Veterinary Medical Science**, Schaumburg, v. 67, p. 1237-1243, 2005.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per-cent end points. **American Journal of Hygiene**, Baltimor, v. 27, p. 493-497, 1938.

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**. Belo Horizonte, 2003, 111p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2003.

RODI, D. J.; MAKONSKI, R. Phage display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. **Current Opinion in Biotechnology**, Schaumburg, v. 10, p. 87-93, 1999.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor, 1989. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

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). **Archives of Virology**, Vienna, v. 148, p. 495-497, 2003.

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

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C. An apparently new respiratory disease of chicks. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.78, p. 413-22, 1931.

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

SEO, H. S. The carboxyl-terminal 120 residue polypeptide of infectious bronchitis virus, nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chicken from acute infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, p. 7889-7894, 1997.

SHI, S. R.; KEY, M. C.; KALRA, K. L. Antigen Retrieval in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating Tissues. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Amsterdam, v. 39, p. 741-748, 1991.

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

SONG, C. S.; LEE Y. J.; LEE C. W. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. **Journal of General Virology**, Reading, v. 79, p. 719-723, 1998.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, v. 115, p. 113-120, 2005.

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

TOWBIN, J.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Eletroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York , v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VILLARREAL, L. Y. B. Bronquite infecciosa das galinhas: Diagnostico, tipos patogenicos e classificação no Brasil. In: Conferencia Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 2007, Santos. **Anais...** Santos: FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), 2007. p. 237.

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**, New York, v. 192, 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. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 85, p. 333-342, 2002.

WEICKERT, M. J. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, Schaumburg, v.7, p.494-499, 1996.

WILLATS, W. G. T. Phage display: practicalities and prospects. **Plant of Molecular Biology**, Philadelphia, v. 50, p. 837-843, 2002.

WILSON, D. R.; FINLAY, B. B. Phage display: application, innovations and issues in phage and host biology. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 313-329, 1998.

WITTRUP, K. D. Phage on display. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, p. 423-424, 1999.

YAGYU, K; OHTA, S. Detection of Infectious Bronchitis Virus Antigen from Experimentally Infected Chickens by Indirect Immunofluorescent Assay with Monoclonal Antibody. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 34, p. 246-252, 1990.