

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Clonagem e expressão de fragmentos funcionais (scFv)
de anticorpo contra o Parvovírus canino-2 com a
técnica de *Phage Display***

THIAGO NEVES BATISTA

Botucatu – SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Clonagem e expressão de fragmentos funcionais (scFv)
de anticorpo contra o Parvovírus canino-2 com a
técnica de *Phage Display***

THIAGO NEVES BATISTA

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Batista, Thiago Neves.

Clonagem e expressão de fragmentos funcionais de anticorpo (*scFv*) contra o Parvovírus canino-2 com a técnica de *Phage Display* / Thiago Neves Batista. – Botucatu [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: João Pessoa Araújo Junior

Assunto CAPES: 20804008

1. Cão - Doenças 2. Virologia animal 3. Biologia molecular

CDD 636.70896

CDD 574.8

Palavras-chave: Fragmento de Anticorpo; Bacteriófagos; Expressão; Parvovírus canino-2; Phage-display

Nome do autor: Thiago Neves Batista

Título: “Clonagem e expressão de fragmentos funcionais (scFv) de anticorpo contra o Parvovírus canino-2 com a técnica de *Phage display*”

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior
Presidente e Orientador
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Ramon Kaneno
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Hélio José Montassier
Membro
Departamento de Patologia Veterinária
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP

Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri
Membro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Data da defesa: 22 de fevereiro de 2008.

Dedicatória

Dedico esta tese a minha esposa Keila. Grande parte deste trabalho só foi possível porque você esteve ao meu lado em todos os momentos. Meu amor por você é algo transcendente e com certeza nunca vai acabar. Que esse ano chegue logo no final.

Dedico a minha família. Sinônimo de união, amor e paz. Meu exemplo de honra. Tenho-lhes eterna gratidão e amor.

A Tina e ao Purguento, dois pequenos representantes dentro de um enorme universo, da razão de todo esse esforço.

Agradecimentos

São muitas pessoas para agradecer em um trabalho tão longo. E na verdade com a atual mudança de ares, os agradecimentos deveriam ser a todos aqueles que participaram em algum momento destes 6 anos aqui em Botucatu.

Gostaria inicialmente de agradecer a minha família, pelo apoio em todos os momentos, e em todos os sentidos. Agradeço, e muito, ao meu pai e minha mãe, amo muito vocês. Minhas irmãs e cunhados, pelo apoio moral, sentimental e por ajudar nas milhares de pegadinhas que aprontamos com D. Raimunda e seu João Batista, e também claro pelos queridos sobrinhos que alegam todas os encontros familiares. E minha Tia Leta, que me mima de acordo com o manual.

A minha futura esposa Keila. A pessoa que me completa. Todos os momentos que tivemos foram muito especiais. Sou muito feliz ao seu lado, e espero que essa felicidade possa prosseguir por diversas vidas.

Ao meu amigo e por sorte também meu orientador João. Por todos os ensinamentos, profissionais e também pessoais. Poucas pessoas sabem tão bem separar o lado profissional e pessoal, dando medidas equivalentes aos dois. Agradeço também por todos os momentos onde você me acolheu na sua casa, em churrascos, festas, almoços de domingo e three day party. Agradeço também a Fá, uma pessoa que tenho profunda admiração, carinho e amizade, e aos guris também por me deixarem voltar a ser moleque.

Agradeço meus “co’s” Paulo e Débora. O apoio sempre gentil em todos os momentos desde o início do projeto até os últimos pontos finais. Mas o maior agradecimento é pela amizade dispensada, em diversos momentos passando pelos jogos do Corinthians (e São Paulo ta, Dé), do Brasil regados a pizza comprada, massas a la Ribolla e rodadas de poker, até a excelente evolução para as pizzas “manufaturadas”.

Aos grandes amigos Smurf e Gyraya que Botucatu me deu de presente. Sempre me ajudaram muito dentro e fora do lab. A amizade de vocês me deu sustento e força nesse período todo que estive aqui. Muito obrigado. E claro o

último adendo do grupo Renato Cabeça, cuja circunferência da lata não passa no triângulo da mesa de sinuca. São todos meus irmãos.

Aos também irmãos e grandes parceiros agora um pouco distantes, Kazuo e Guiga. Tipo de amizade que apesar da distância nunca se afasta.

À uma das responsáveis por estar aqui, minha amigona de coração Bel. A quem devo grande parte da minha formação profissional e de caráter.

Uma grande amiga Dóris, pessoa extremamente importante, pois me levou a um dos lugares mais maravilhosos que já estive. Amiga, conselheira que me ajudou a manter as estribeiras. Obrigado de coração.

Agradeço também a umas das amigas mais fiéis que já tive, Xá, vulgo Carol. Apesar de reclamar, sempre se fez presente como amiga.

À todos os queridos amigos do “Centro Espírita Irmã Zilda”, Geraldo, Rosa, Seu Mário, Chico, Lurdinha, Pedras, Vitor e Claudinez, Márcia, Dona Serafina, ao pessoal do grupo de estudos e é claro a Irmã Zilda e todos os amigos de lá.

À grande amiga Marcela, por todos os bons momentos dispensados, seja com papos alternativos ou com inúmeras idas a Pardinho. Muito obrigado por toda a ajuda.

À galera do laboratório, Andreza e Flávio Paz, sempre atenciosos e descontraídos, pelos inúmeros episódios cômicos e pela lista de recordes. Em especial a Taís, Sueli e Zé Augusto, por diversos momentos non-sense de muito riso.

Ao pessoal do departamento, Nice, Sônia, Lula, Luis, que sempre foram atenciosos, amigos e indispensáveis para uma centena de teses.

Ao pessoal recém formado, Docinho, Jú Vela e Heverton, por diversos momentos de descontração (Hum?)

Grande amiga e sempre risonha, Karina Santos, meio doidinha desenhando os parasitas.

A Maria Tereza e Edmárcia, pelos preciosos minutos do tempo que desprenderam para me ajudar, muitas vezes deixando os próprios afazeres de lado. Muito obrigado.

A Professora Alice Alfieri, sempre gentil em todos os momentos que recorri, por ter fornecido a nossa estirpe de CPV.

À Professora Renate Krause por toda ajuda com o processo de eletroporação.

Ao pessoal do lab de biologia de fungos, Sandra e Raquel por terem sempre recepcionado tão bem.

Ao Merla e a Virginia, sempre muito bons anfitriões, a ajuda de vocês foi essencial, muito obrigado.

Aos professores, funcionários e colegas da Pós graduação da Vet.

Aos bons amigos de Botucatu, Wilson Colombo, Florisvaldo, Dú e Norberto, Dona Dirce, que fazem dessa cidade um exemplo de receptividade. E Eric Rossi pela aulas-papo de violão.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Esquema representativo do delineamento experimental realizado.....	13
FIGURA 2:	Esquema do fagomídeo pak 100.....	22
FIGURA 3:	Esquema de <i>panning</i> realizado.....	27
FIGURA 4:	Gráfico da leitura a 280 nm das frações do CPV-2 purificado.....	32
FIGURA 5:	Gráfico da leitura a 260 nm das frações do CPV-2 purificado.....	33
FIGURA 6:	Eletroforese em gel de agarose 1,5%. A seta indica o resultado do PCR (681 bp) para o CPV-2. O marcador de tamanho molecular utilizado (coluna1) foi o de 1kb (Promega®).....	33
FIGURA 7:	Reação de amplificação das cadeias leve (VL) e pesada (VH) em gel de agarose a 1,5%. Coluna 1: é referente ao marcador de peso molecular de 100 bp (GE Healthcare®). As colunas 2 e 3 indicam a amplificação da cadeia leve, enquanto a 4 e 5 da cadeia pesada da região variável (seta).....	34
FIGURA 8:	Reações de “SOE-PCR” observadas em gel de agarose 1,5%. Na coluna 1 se observa o marcador de tamanho molecular de 100bp (GE Healthcare®). As colunas 2, 3, 4 e 5 são duplicatas das reações realizadas.....	35
FIGURA 9:	Reações de “SOE-PCR” após purificação. As colunas 1, 2 e 3 são referentes às reações purificadas. Na coluna 4 se observa o DNA Mass ladder (Invitrogen®).....	35

- FIGURA 10: Gel de agarose a 1% com o fagomídeo pAK 100 digerido. A seta indica o fragmento de 4200bp, que foi recortado para posterior ligação. O marcador de tamanho molecular utilizado é de 1 kb (Promega®).....36
- FIGURA 11: Gráfico do primeiro *Phage-ELISA* realizado. O gráfico da esquerda é relativo à sensibilização da microplaca com CPV-2, e o da direita com a célula CRFK. Nesta reação utilizou-se diluição seriada na base 10 (1/5 a 1/50000) dos fagos P-0 (sem *panning*) e os fagos originados do primeiro *panning* P-1A e P-1B. A presença de ruído (placa sem sensibilização) é destacada nas diluições de 1/5 no gráfico da esquerda, e 1/50 no gráfico da direita.....37
- FIGURA 12: Gráfico relativo ao *Phage-ELISA* realizado para determinação do grupo com maior afinidade. A microplaca foi sensibilizada com 1µg/ml de CPV-2 purificado, utilizando-se diferentes concentrações dos grupos de fagos.....38
- FIGURA 13: Gráfico da reação de *Phage-ELISA*. Três diferentes concentrações de CPV-2, diluídas em PBS, foram testadas, assim como diferentes concentrações (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6) do grupo P-3C.....39
- FIGURA 14: Gráfico de reação de *Phage-ELISA* dos 10 fagos selecionados, na concentração de 10^6 fagos/mL.....40
- FIGURA 15: Produtos de amplificação observados na PCR para avaliação do inserto dos clones. A seta indica um produto de aproximadamente 2000 bp, que pode ser observado em todos os 10 clones testados. Na coluna 1 se observa o marcador de tamanho molecular de 100bp (GE Healthcare®).....41

- FIGURA16: Gel de agarose a 1,5%. As setas indicam os 2 clones amplificados de aproximadamente 820 bp. O marcador de tamanho molecular (indicado com setas verticais) utilizado foi o de 200bp (Promega®).....41
- FIGURA 17. Digestão realizada com o clone 32. Dois fragmentos são observados sendo um pertencente ao pAK 100 (4200bp) e o menor (750bp) referente ao inserto *scFv*.....42
- FIGURA 18: Alinhamento de aminoácidos realizado com o clone 32 e a sequência da cadeia leve depositada no *GenBank*.....43
- FIGURA 19: Gráfico da reação de *Phage-ELISA* com os clones 2 e 32. Duas concentrações diferentes de cada clone foram testadas (10^9 e 10^8), sendo testados com CPV-2 purificado, CPV em cultivo com a CRFK (CPV+CRFK) e apenas com CRFK. Por último, observa-se o ruído da reação.....43

LISTA DE QUADROS E TABELA

QUADRO 1:	Sequência de <i>primers</i> utilizados para amplificar 681bp do CPV-2.....	16
TABELA 1:	Titulação dos grupos de fagos.....	37

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	3
1.1. Parvovírus canino-2.....	3
1.2. Técnica de <i>Phage Display</i>	8
2. OBJETIVO.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Diagrama representativo do delineamento experimental.....	13
3.2. Cultivo viral e titulação do Parvovírus canino-2 (CPV-2).....	14
3.3. Purificação do Parvovírus canino-2.....	15
3.4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para o CPV-2.....	16
3.5. Inoculação em camundongos (<i>Mus musculus</i>).....	17
3.6. Amplificação e ligação das cadeias leve e pesada (VH e VL).....	18
3.6.1. Extração de RNA total e transcrição reversa (produção de cDNA).....	18
3.6.2. Amplificação da cadeia leve (VL) e pesada (VH) da região variável dos anticorpos pela técnica de PCR.....	19
3.6.3. Reação de junção dos fragmentos da cadeia leve e pesada – “SOE (<i>splicing by overlap extension</i>) - PCR”.....	20
3.7. Preparação e clonagem do fragmento <i>scFv</i>	21
3.7.1. Digestão com a enzima de restrição <i>Sfi</i> I.....	21
3.7.2. Amplificação e digestão do fagomídeo pAK 100.....	21
3.7.3. Ligação do <i>scFv</i> ao pAK 100.....	23
3.7.4. Transformação da <i>E.coli</i> XL-1 blue (eletroporação).....	24
3.8. Expressão e seleção dos fagomídeos.....	25
3.8.1. Expressão dos fagomídeos.....	25

3.8.2. Seleção dos fagos expressando o scFv anti-CPV-2 (<i>biopanning</i>).....	26
3.8.3. Titulação dos fagos expressando o scFv anti-CPV-2.....	27
3.9. Padronização do <i>Phage</i> - <i>ELISA</i> (bacteriófago como anticorpo primário).....	28
3.9.1. Teste inicial.....	28
3.9.2. Teste do bloqueio e da microplaca.....	29
3.9.3. Teste dos grupos de fagos do terceiro <i>panning</i>	29
3.9.4. Teste da concentração de CPV e diluente do mesmo.....	29
3.10. Seleção ou <i>screening</i> e avaliação de clones.....	30
3.10.1. Seleção dos clones por <i>Phage-ELISA</i>	30
3.10.2. Avaliação dos clones selecionados por <i>Phage-ELISA</i>	31
3.10.3. Seleção dos clones por PCR.....	31
3.10.4. <i>Phage-ELISA</i> com os clones selecionados.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Cultivo viral e titulação do Parvovírus canino-2 (CPV-2).....	32
4.2. Purificação do Parvovírus canino-2.....	32
4.3. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para o CPV-2.....	33
4.4. Inoculação em camundongos (<i>Mus musculus</i>).....	34
4.5. Amplificação da cadeia leve (VL) e pesada (VH) da região variável dos anticorpos pela técnica de PCR.....	34
4.6. Reação de junção dos fragmentos da cadeia leve e pesada – “SOE (<i>splicing by overlap extension</i>) – PCR.....	35
4.7. Preparação e clonagem do fragmento scFv.....	36
4.7.1. Amplificação e digestão do fagomídeo pAK 100.....	36
4.7.2. Transformação da <i>E.coli</i> XL-1 blue (eletroporação).....	36
4.8. Expressão e seleção dos fagomídeos.....	36
4.8.1. Titulação dos fagos expressando o scFv anti-CPV-2.....	36
4.9. Padronização do <i>Phage</i> - <i>ELISA</i> (bacteriófago como anticorpo primário).....	37
4.9.1. Teste inicial.....	37
4.9.2. Teste do bloqueio e da microplaca.....	38
4.9.3. Teste dos grupos de fagos do terceiro <i>panning</i>	38

4.9.4. Teste da concentração de CPV e diluente do mesmo.....	39
4.10. Seleção ou <i>screening</i> e avaliação dos clones.....	40
4.10.1. Seleção dos clones por <i>Phage-ELISA</i>	40
4.10.2. Avaliação dos clones selecionados por <i>Phage-ELISA</i>	40
4.10.3. Seleção dos clones por PCR.....	41
4.10.4. <i>Phage-ELISA</i> com os clones.....	43
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
Anexos.....	61

Batista, T.N. **Clonagem e Expressão de fragmentos de anticorpos recombinantes (scfv) contra o Parvovírus canino 2 pela técnica de *Phage Display*. Botucatu 2008. 61p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.**

A parvovirose canina, uma das principais doenças infecto-contagiosas que acomete cães, é causada pelo Parvovírus canino-2 (CPV-2). Desde sua descrição importantes mutações ocorreram originando três tipos: CPV-2a e 2b, comumente detectados no Brasil, e o CPV-2c. Essas alterações antigênicas caracterizam o CPV como um dos principais modelos de evolução viral, sendo detectáveis com painéis de anticorpos monoclonais em técnicas simples como hemaglutinação e neutralização *in vitro*. A tecnologia de apresentação de proteínas em bacteriófagos (*Phage display*) tem diversas aplicações, dentre elas a apresentação de fragmentos recombinantes de anticorpos funcionais (scFv), que podem ser produzidos em grande quantidade. Este trabalho utilizou *Phage Display* para expressar fragmentos scFv contra o CPV-2, com uma metodologia descrita (Krebber, 1997). Após o cultivo e purificação do vírus, camundongos da linhagem High seleção IV A foram imunizados com o CPV-2, sendo em seguida extraído RNA total do baço. A amplificação das cadeias leve e pesada, e sua ligação por SOE-PCR, permitiu a clonagem do scFv no fagomídeo pAK 100. Após a transformação da *E.coli* XL-1 blue, bacteriófagos M13 foram expressos apresentando o fragmento scFv. Três processos de seleção foram realizados, e após o *Phage-ELISA*, um grupo de fagos foi selecionado. A partir deste um *screening* foi realizado por PCR sendo dois clones detectados. Após nova expressão de ambos uma nova reação de *Phage-ELISA* foi realizada e demonstrou a especificidade destes clones com o CPV-2. Até o presente momento esta é a primeira descrição da técnica de *Phage display* apresentando fragmentos de anticorpo anti-CPV-2.

Palavras-chave: Fragmento de Anticorpo; Bacteriófagos; Expressão; Parvovírus canino-2; Phage-display

Batista, T.N. **Recombinant antibody single chain variable fragments cloning and expression (scfv) against canine parvovirus by Phage display**. Botucatu 2008. 61p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Canine parvoviral disease, one of the most common infectious disorders of dogs, is caused by canine parvovirus (CPV-2). Several mutations have occurred since it was described in the late 1970s, originating three antigenic types: CPV-2a and 2b, most commonly found in Brazil, and the CPV-2c. These antigenic differences characterize CPV-2 as an important model of virus evolution, and could be detected by monoclonal antibody panel in hemmagglutination and *in vitro* neutralization. Phage display has many applications and have been used displaying functional antibodies fragments (scFv), which can be produced in large amount. The technology described here is the expression of antibody recombinant fragments - scFv - against CPV-2, with the methodology previously described (Krebber, 1997). After cultivation and purification of virus, High IV A mice were immunized with CPV-2, total RNA was extracted from spleen cells. Light and heavy chains were amplified, and then linked by SOE-PCR; and the product was cloned into a phagemid (pAK 100). After the transformation on *E. coli* XL-1 blue, M13 bacteriophages were expressed presenting the scFv fragment. Series of 3 rounds of panning was carried out, and after a Phage-ELISA a group of phage was selected. A PCR screening was conducted and two clones detected. After new expression a Phage-ELISA was performed and demonstrated the specificity of these clones against the CPV-2. Until the moment this is the first description of the use of the Phage display, producing antibody fragments against CPV-2.

Keywords: Antibody fragment; Bacteriophages; Expression; Canine Parvovirus-2; Phage-display

1. Introdução e Revisão da literatura

1.3. Parvovírus canino-2

A parvovirose canina é uma doença infecto-contagiosa causada pelo parvovírus (CPV-2), que determina um grave quadro de enterite hemorrágica em animais jovens, e é, notoriamente, uma das mais importantes doenças infecciosas do cão, sendo rotineiramente diagnosticada na clínica veterinária.

A primeira descrição sobre uma possível infecção por parvovírus em cães foi em 1970 na Alemanha, quando Binn e colaboradores (1970) isolaram de animais sadios um vírus pequeno e antigenicamente relacionado ao grupo parvovírus, sendo denominado *Minute virus of canines* (MVC). Este vírus é atualmente conhecido como CPV-1, e é bastante distinto do CPV-2 e de parvovírus de outras espécies, sendo mais geneticamente relacionado ao parvovírus bovino (BPV) (Carmichael, 2005).

No fim da década de 70 foi observada, praticamente de forma simultânea por diversos pesquisadores, uma doença “nova” que ocasionava miocardite aguda ou crônica em filhotes de cães e também vômitos, diarreia mucóide, às vezes sanguinolenta, e hipertermia (Appel *et al.*, 1978; Eugster *et al.*, 1978; Bourtonboy *et al.*, 1979). Após as primeiras descrições da doença, amostras biológicas de animais com a forma entérica foram analisadas por microscopia eletrônica e foi observado um agente semelhante ao vírus da panleucopenia felina, sendo este rapidamente isolado em linhagens de células felinas (Carmichael, 2005). Exames histopatológicos evidenciaram necrose na região de criptas em epitélio intestinal, perda da estrutura das vilosidades no intestino delgado e depleção de linfócitos em tecidos linfóides (Robinson *et al.*, 1979, 1980). Houve uma rápida disseminação intercontinental do parvovírus, devido principalmente a trânsito de animais e pessoas, e por fômites, grande resistência no meio ambiente e aos altos títulos de vírus eliminados em fezes de animais infectados (Carmichael *et al.*, 1981; 2005; Pollock, 1982; Meunier *et al.*, 1985). No Brasil, Hagiwara e colaboradores (1980) realizaram os primeiros estudos

onde foram relacionados achados clínicos e anatomopatológicos à observação de estruturas virais semelhante ao parvovírus.

Entre 1980 e 1981, houve um declínio do número de casos, provavelmente devido à imunidade naturalmente adquirida e pelo desenvolvimento de vacinas. Pouco tempo depois foi descrito uma doença grave, caracterizada por enterite extremamente hemorrágica em cães vacinados e não vacinados. O agente etológico desta patologia foi mais tarde identificado como CPV-2. Posteriormente uma importante mutação foi observada, com o uso de painéis de anticorpos monoclonais, originando então a estirpe denominada de CPV-2a (Carmichael, 2005). Essa alteração foi confirmada com a detecção de uma mutação em cinco aminoácidos informativos na proteína do capsídeo (VP2), que acarretou mudanças antigênicas e biológicas (Parrish *et al.*, 1991). Por volta de 1984, outra importante alteração foi observada sendo descrito o CPV-2b. Essa diferença foi mais tarde confirmada pela substituição de um nucleotídeo na posição 4062, que ocasionou uma mudança antigênica. Atualmente, o CPV-2a e 2b são as principais estirpes virais correlacionadas doença em cães e também em felinos (Steinel *et al.*, 2001; Truyen, 2006).

Apesar da diferença antigênica, poucos estudos ainda correlacionam a variação da doença causada pelo CPV-2a e 2b, sendo que grande parte dos estudos de patogenia foram baseados na patologia causada pelo CPV-2 (Truyen, 2006). Em 2001, Buonavoglia e colaboradores descreveram uma nova estirpe, com uma mutação antigênica importante, originando diferenças em testes com painéis de anticorpos monoclonais e em testes de inibição da hemaglutinação. Essa nova estirpe foi então denominada CPV-2c e está co-circulando na Itália com os tipos 2a e 2b, e aparentemente substitui a ambos na população canina daquele país (Martella *et al.*, 2005). Atualmente o CPV-2c já foi detectado em vários países da Europa, nos Estados Unidos e também na América do Sul (Pérez *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2007). No Brasil, ambas as estirpes 2a e 2b já foram detectadas, sendo que um estudo detectou mais o tipo 2b (Costa *et al.*, 2005), e outro o tipo 2a (Pereira *et al.*, 2000). Devido a importantes mutações com alterações antigênicas, atualmente o parvovírus canino é descrito como modelo de estudo de evolução viral (Martella *et al.*, 2006).

O parvovírus canino tipo 2 (CPV-2a, 2b e 2c), é um vírus pertencente a família Parvoviridae, pequeno (18-26nm), não envelopado e com capsídeo de formato icosaédrico contendo 60 capsômeros. A partícula infecciosa viral é resistente, sendo estável à inativação a 56°C por 1 hora, tratamento com solventes orgânicos e pH entre 3 e 9. O parvovírus é extremamente estável e resistente às condições adversas do ambiente, podendo permanecer em objetos, roupas, potes de alimentação e no piso, por até cinco meses (McCaw e Hoskins, 2006). A partícula viral pode ser inativada com o uso hipoclorito de sódio, na diluição de 1:30, ou quando submetida a radiações gama e tratamento com agentes oxidantes como formalina e propionolactona (Murphy *et al.*, 1995; McCaw e Hoskins, 2006).

O genoma do CPV-2 é pequeno, linear, composto de DNA fita simples de aproximadamente 5,2 kilobases (kb), sendo que nas extremidades 3' e 5' há regiões palindrômicas de aproximadamente 115 nucleotídeos, que são essenciais na replicação atuando como *primers*. Esta depende exclusivamente do maquinário molecular de células com alto poder de divisão, sendo as células do epitélio intestinal seu principal alvo (Christensen *et al.*, 1993). Para sua replicação necessita de células na fase S de divisão mitótica, tendo preferência por tecidos de animais jovens ou recém-nascidos, ou tecidos em intensa proliferação de animais adultos, como o tecido linfóide (Tsao *et al.*, 1991). Esta replicação acontece no núcleo celular e normalmente depende do estado fisiológico das células (Murphy *et al.*, 1995).

O CPV-2 é composto por três proteínas de capsídeo (VP1, VP2 e VP3), que lhe conferem um formato icosaédrico, sendo que a VP2 constitui cerca de 90% do capsídeo viral. A superfície do capsídeo tem um canal cilíndrico rodeado por estreitas depressões do tipo *canyon*, pequenas espículas e projeções tipo *dimple* (Tsao *et al.*, 1991). Estas depressões tipo *canyons* são provavelmente sítios de ligação para receptores celulares, e como podem também impedir a ligação de anticorpos, o vírus mantém os domínios desta região extremamente conservados, diferentemente de outros que podem mudar para evadir da resposta imune do hospedeiro. Já as espículas e projeções *dimple* estão associadas às propriedades antigênicas de seleção do hospedeiro e de hemaglutinação (Tsao *et al.*, 1991; Chapman e Rossman, 1993). Existem dois

sítios antigênicos neutralizantes (A e B) na superfície do CPV-2. Alterações ocasionadas no sítio antigênico B podem causar perda da capacidade de replicação em células caninas *in vitro* (López de Turiso *et al.*, 1991; Llamas-Saiz *et al.*, 1996). A estrutura do parvovírus também já foi descrita quando de sua associação com um fragmento neutralizante de anticorpo (Fab A3B10), sendo obtido a partir de hibridoma (Wikkoff *et al.*, 1994). Neste estudo foi determinada a estrutura do complexo CPV: Fab com a resolução de 23 Å, onde foi observado cerca de 60 fragmentos do anticorpo, complexados com o parvovírus. Os autores observaram que este anticorpo foi capaz de precipitar e também neutralizar o vírus, sendo que os mecanismos de neutralização como interferência na adsorção celular, entrada celular e desnudamento, devem ser funcionais.

A infecção ocorre naturalmente por via oronasal, sendo que o período de incubação pode variar de 6 a 14 dias (McCaw e Hoskins, 2006). Após um período de replicação em tonsilas e nódulos mesentéricos, o CPV pode ser isolado em tecidos e fezes de animais infectados, de 10 a 14 dias pós-infecção (Macartney *et al.*, 1984). A replicação viral tem como alvo as células da cripta intestinal, levando a perda do epitélio e consequente encurtamento das vilosidades intestinais (McCaw e Hoskins, 2006). Os sinais clínicos observados geralmente são graves e incluem anorexia, hipertermia, vômitos, diarreia sanguinolenta e desidratação. Óbitos podem ocorrer rapidamente após o início da doença, normalmente associados à septicemia ou coagulação intravascular disseminada. Miocardite também pode ocorrer em filhotes de até oito semanas ou em casos de infecção *in útero* (McCaw e Hoskins, 2006).

O diagnóstico da infecção por CPV-2 pode ser realizado com os sinais clínicos supracitados associado ao diagnóstico laboratorial, uma vez que existem diversas outras infecções com sinais semelhantes. Este pode ser realizado com a detecção do vírus em fezes e em tecidos para exames *post-mortem*. Diversas técnicas são descritas para o diagnóstico da parvovirose, podendo ser divididas em detecção direta do agente, onde se enquadram: microscopia eletrônica, imunofluorescência direta, isolamento viral, teste de hemaglutinação (H.A.), ELISA, coaglutinação e técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e algumas variações como *Touch-*

down PCR e *Nested*-PCR e indiretamente pelo sorodiagnóstico como a inibição da hemaglutinação, neutralização viral, ELISA e imunofluorescência indireta (Carmichael, 2005; McCaw e Hoskins, 2006).

A proteção contra o CPV-2 é em grande parte derivada de anticorpos maternos provenientes do colostro, e é tão eficiente que pode até impedir a viremia (Elia, 2005). Após a infecção, o filhote pode ser considerado imune por 20 meses e possivelmente por toda a vida (McCaw e Hoskins, 2006). Mas mesmo com títulos de proteção adequados, os animais podem desenvolver doença subclínica e se tornarem disseminadores da doença (Decaro *et al.*, 2005). Atualmente existem vários tipos de vacina disponíveis (McCaw e Hoskins, 2006), sendo que no Brasil pode-se encontrar contra o CPV-2, 2a e 2b (Costa *et al.*, 2005). Falhas vacinais podem ocorrer, e as principais causas para isso são os níveis de anticorpos maternos e a falha em soroconversão (McCaw e Hoskins, 2006).

Os principais objetivos do tratamento da parvovirose canina são a hidratação, manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico e antibioticoterapia profilática (McCaw e Hoskins, 2006).

Pela alta capacidade de mutação, que se assemelha a dos vírus RNA, a evolução viral do parvovírus canino tem sido amplamente estudada (Pereira *et al.*, 2007; Martella *et al.*, 2005; Nakamura *et al.* 2003). Essas mutações são observadas principalmente na região que codifica a proteína VP2, onde estão situados os principais sítios neutralizantes e de hemaglutinação do parvovírus canino (Tsao *et al.*, 1991; López de Turiso *et al.*, 1991). Com isso a utilização de painéis de anticorpos monoclonais em técnicas mais simples e mais baratas, como a inibição da hemaglutinação e a neutralização *in vitro*, são comumente aplicadas no estudo da variação antigênica do Parvovírus canino.

Diversas formas de se produzir anticorpos monoclonais são descritas, sendo de maior destaque o hibridoma e a técnica de apresentação de anticorpos na superfícies de bacteriófagos (*Phage display*). Diversas limitações como o custo elevado na manutenção de células expressando os anticorpos e o baixo número de clones (de 500 a 2000) produzidos na técnica de hibridoma em comparação ao *Phage display* que é de fácil realização e permite grande

(mais de 10^9 clones), levou esta última a um grande desenvolvimento e aceitação científica.

1.4. Técnica de *Phage Display*

Diversas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para expressar uma grande variedade de polipeptídios na superfície de bacteriófagos, bactérias, leveduras e vírus (Marasco e Sui, 2007). *Phage display*, descrita em 1985(a) por Smith, é uma técnica molecular na qual proteínas recombinantes ou peptídeos não pertencentes ao bacteriófago (fago) são expressas na superfície protéica deste. Nesta metodologia, a informação genética responsável pela codificação da molécula a ser apresentada está ligada diretamente ao seu fenótipo experimental, sendo que uma grande diversidade de moléculas biologicamente ativas como citocinas, enzimas, substratos, receptores, inibidores enzimáticos, proteínas ligantes a DNA e anticorpos podem ser expressas. Esta técnica é excelente para a criação de bibliotecas contendo milhões ou até mesmo bilhões de proteínas ou peptídeos (Benhar, 2001; Russel *et al.*, 2004; Paschke, 2006; Brissette e Goldstein, 2007).

A metodologia de biblioteca de peptídeos mais amplamente usada é baseada em fagos filamentosos (M13, f1, fd - os mais utilizados para apresentação de bibliotecas), que infectam bactérias Gram negativas (Brígido e Maranhão, 2002; Russel *et al.*, 2004). Estes vírus apresentam como material genético DNA fita simples pequeno e circular. As partículas destes fagos são compostas por cinco proteínas estruturais (p3, p6, p7, p8 e p9). As cópias da proteína p8 (2700 aproximadamente) formam o corpo do capsídeo, sendo que na extremidade distal se encontram as proteínas estruturais p7 e p9, e na extremidade proximal encontra-se p3 (3 a 5 cópias). A inclusão de proteínas exógenas na superfície destes fagos ocorre pela fusão destas às proteínas estruturais do fago, sendo utilizadas a p8 e principalmente a p3. Esta última é responsável pela adesão da partícula viral ao pili sexual da bactéria (Brígido e Maranhão, 2002). Uma das características mais importantes destes bacteriófagos filamentosos é que eles são montados pela extrusão do seu material genético, sem que ocorra lise da célula.

Nas bibliotecas de fagos filamentosos, um grande número de proteínas relevantes podem ser selecionadas e separadas. Para isso, dois passos são essenciais: o *panning* ou *bio-panning* (seleção por afinidade) e o chamado *screening* (triagem) (Kretzchmar e von Rüden, 2002). No processo de *panning*, a biblioteca de fagos produzida é incubada com o antígeno de escolha, para que ocorra uma interação com este. Em seguida, uma série de lavagens é procedida para remover os fagos não aderidos, ou seja, aqueles que não codificaram a sequência alvo desejada, sem que haja interferência na interação fago-antígeno. Logo após, os fagos selecionados (ligantes) podem ser obtidos, com o uso de condições que desfavoreçam a ligação desses com a molécula alvo. A aplicação de gradientes de pH, reações proteolíticas e eluições competitivas podem ser realizadas sem que haja, no entanto, um comprometimento da infectividade do fago (Benhar, 2001; Brígido e Maranhão, 2002; Kretzchmar e von Rüden, 2002). Os fagos recuperados são então amplificados por infecções sequenciais em bactérias, sendo realizadas novas etapas de *panning* (de três a cinco, em média). No final é gerado um misto policlonal, porém enriquecido com ligante antígeno-específico. Em seguida, no processo de *screening*, há uma conversão deste misto policlonal em anticorpos monoclonais, com infecção da bactéria alvo do fago, cultivo em meios seletivos e seleção de colônias únicas (Kretzchmar e von Rüden, 2002).

Diferentes sistemas de vetores de *Phage display* têm sido descritos, sendo que são classificados como vetores de fago e fagomídeos (Russel *et al.* 2004). Atualmente o uso de fagomídeos tem sido difundido. Estes são plasmídeos que possuem a origem de replicação ativa em *E.coli* e também em fagos filamentosos, com todas as informações para a síntese da fita complementar, de replicação viral e empacotamento do DNA. O fagomídeo utilizado para apresentação de bibliotecas na superfície de fagos filamentosos, é manipulado para que possa expressar as proteínas desejadas fusionadas ao gene III ou VIII. Para que isso ocorra é utilizado um fago auxiliar, que infecta a célula transformada com o fagomídeo e possui todos os genes dos fagos filamentosos permitindo o resgate do fagomídeo como partícula viral. Uma alternativa ao fago auxiliar foi descrita por Chasteen e colaboradores (2006), que produziram células com um plasmídeo codificante de proteínas de

empacotamento do fago M13. De maneira geral, o fagomídeo apresenta a origem de replicação da *E.coli* e de fagos, o gene de resistência a antibiótico, o promotor de transcrição do gene de fusão e a sequência líder responsável pela localização do produto de fusão (Brígido e Maranhão, 2002).

É de grande destaque dentro da tecnologia de *phage display* a expressão de fragmentos funcionais de anticorpos que, após sua apresentação pelo fago, podem ser selecionados de acordo com sua afinidade de ligação e especificidade para testes diagnósticos *in vitro* e *in vivo* (identificação massiva de alvos – antígenos e até proteínas, no caso de proteomas), e também imunoterapia para uma grande diversidade de patologias (Benhar, 2001; Kretzchmar e Von Rüden, 2002). Este tipo de expressão foi realizado inicialmente na forma de fragmentos recombinantes de anticorpos. Isso foi alcançado com a fusão das regiões codificadoras da porção variável do anticorpo (Fv) na porção aminoterminal do gene III do fago M13, que codificou um fragmento de cadeia única desta porção (*scFv*, *single chain Fv*) (McCafferty et al, 1990).

Para a geração de uma biblioteca imunológica de anticorpos ampla e altamente específica, animais “doadores” podem ser imunizados com um determinado antígeno. Os genes responsáveis pela codificação de anticorpos, podem ser amplificados e clonados, sendo mais expressos após a exposição inicial ao agente inoculado. Os fragmentos funcionais que são produzidos por este método são numerosos, podem ser especificamente selecionados e tem uma grande vantagem, pois foram sujeitos a uma maturação *in vivo* no sistema imune do hospedeiro (Schmitz *et al.*, 2000; Benhar, 2001).

Em 1997, Krebber e colaboradores descreveram um sistema interessante de expressão de *scFv* funcional com o uso do fagomídeo pAK 100, partindo de hibridomas ou repertórios imunes, com uma clonagem segura de genes funcionais de imunoglobulinas. Os autores apresentaram um *set* de *primers* para a amplificação da região variável de anticorpos, uma estratégia de montagem de *scFv* e um sistema direcional de clonagem com uma enzima de restrição (*Sfi* I) que contém um sítio de digestão raro entre sequências de anticorpos. Também descrevem diversas outras características de seu sistema, que garantem um sucesso adequado da técnica descrita.

Atualmente, são escassos os anticorpos mono e policlonais específicos para agentes infecciosos em Medicina Veterinária disponíveis, o que limita a realização de pesquisas e também a aplicação de métodos diagnósticos. Com a evolução das técnicas de produção sintética de fragmentos de anticorpos funcionais, a possibilidade na ampliação de seu uso é uma realidade.

Como agente de uma das principais doenças em Medicina Veterinária, o parvovírus canino apresenta uma série de características interessantes. Uma delas é ser um excelente modelo de pesquisa para evolução viral, devido sua alta capacidade de mutação (Badget, 2002; Martella, 2006). Uma das formas de se detectar essas mutações é com o uso de painéis de anticorpos monoclonais que pode ser utilizado em técnicas de simples realização, como a inibição de hemaglutinação e a neutralização viral (Carmichael, 2005). Outra importante utilização de anticorpos funcionais é a aplicação em técnicas imunoenzimáticas, que são utilizadas em diagnóstico ou em pesquisas direcionadas ao CPV-2. Um terceiro ponto relevante, e com crescente interesse dentre diversos grupos de pesquisa, é a terapia com anticorpos monoclonais, principalmente na medicina humana, onde se observam grandes avanços em doenças autoimunes e inflamatórias, câncer, e doenças infecciosas (Brekke e Loset, 2003). Este tipo de pesquisa, que se divide em terapias profiláticas e tratamentos propriamente ditos, envolve atualmente diversos grupos, sendo que alguns já em fase avançada de pesquisa (Marasco e Sui, 2007).

A realização da técnica de *Phage display* de fragmentos funcionais de anticorpo contra o CPV-2, com a geração de fragmentos de anticorpos monoclonais específicos, permite a utilização destes em diversas metodologias que podem auxiliar da pesquisa da evolução do vírus no Brasil.

2. Objetivo

- Clonar e expressar em bacteriófagos M13 fragmentos funcionais (scFv) de anticorpos contra o parvovírus canino-2.

3. Material e métodos

3.1. Diagrama representativo do delineamento experimental

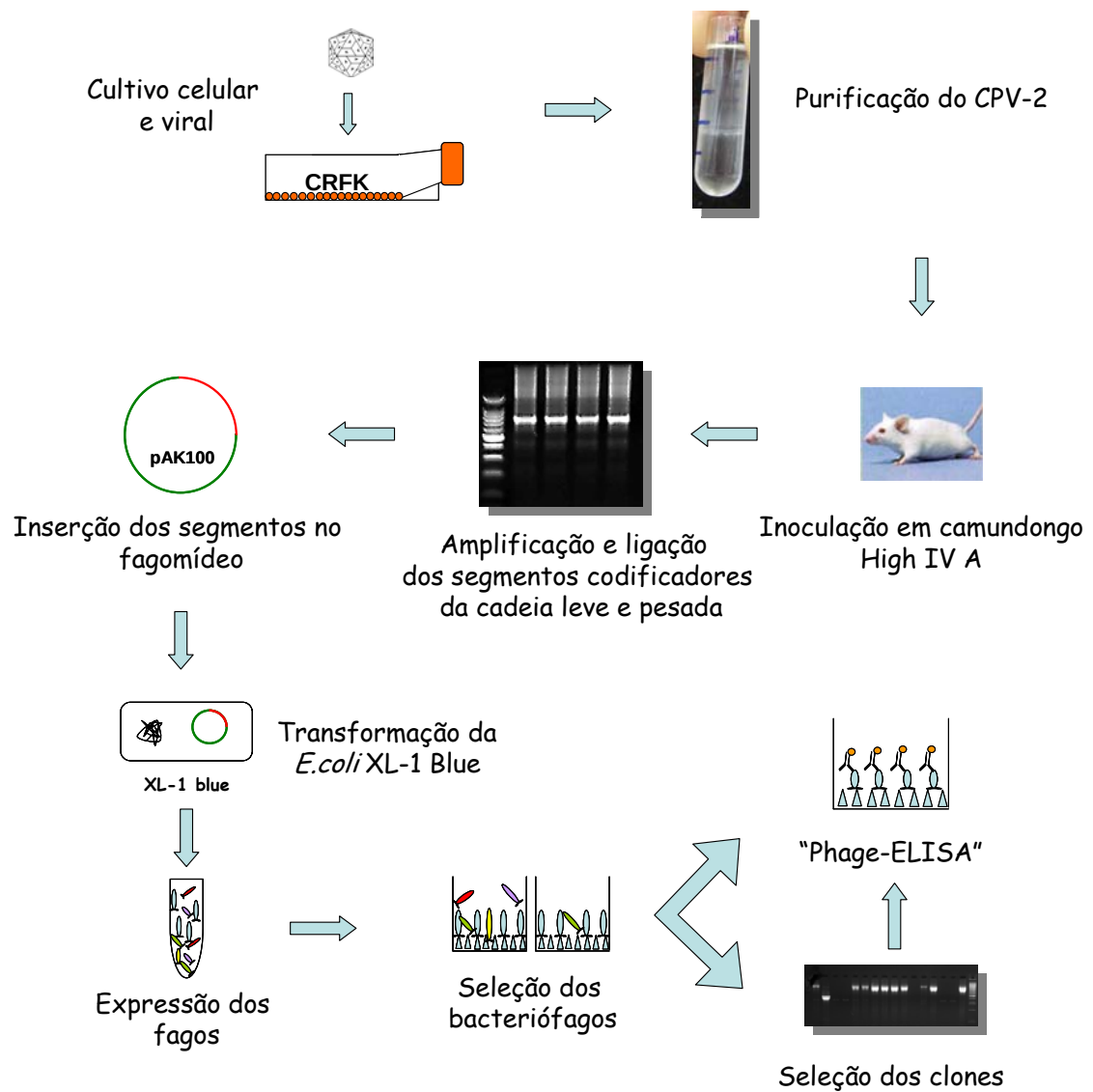


FIGURA 1. Esquema representativo do delineamento experimental realizado.

3.2. Cultivo viral e titulação do Parvovírus canino-2 (CPV-2)

Foi realizado o cultivo celular da linhagem CRFK¹ (Crandell Feline Kidney). Foram produzidas 3 garrafas de 25cm², contendo: 9 mL de M.E.M. (*Minimum Essential Medium* – Invitrogen[®]) com 10% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen[®]). Quando a monocamada celular apresentou de 60% a 70% de confluência, duas garrafas foram inoculadas com 0,8 mL do CPV-2¹, e uma garrafa com o mesmo volume de M.E.M (controle de célula). Para melhor adsorção do vírus, as garrafas foram deixadas em agitação orbital a 40 r.p.m. durante uma hora e meia a 37°C. Em seguida, foram adicionados em cada garrafa 8,0 mL do meio MEM com 10% SFB, sendo estas mantidas a 37°C por 5 dias para observação de efeito citopático (E.C.P.). A amplificação do vírus foi realizada em duas etapas. Inicialmente foram utilizadas garrafas 75 cm², e em seguida em garrafas tipo *Rollers* de 490 cm², todas apresentando uma monocamada celular. O inoculo foi preparado com 1,0 mL de vírus produzido anteriormente, diluído 1:4 em MEM, e mantido nas mesmas condições acima descritas. Após a observação do E.C.P. as foram congeladas (-70°C) e descongeladas duas vezes. O lisado celular obtido foi fracionado e guardado a -70°C, reservando uma alíquota das garrafas infectadas e controle-negativo para a realização da PCR.

A titulação do vírus foi realizada por DICT₅₀, sendo utilizada uma das alíquotas previamente congelada.

1- Gentilmente cedida pela Profa. Dra. Alice F. Alfieri

3.3. Purificação do Parvovírus canino-2

Para a purificação viral foram utilizados 350mL do lisado celular previamente inoculado com o CPV-2. Inicialmente, a suspensão foi tratada com 10% de vertrel (Dupont®) para lise celular e o sobrenadante foi recolhido em um béquer. À essa solução foi adicionado em gotas, com auxílio de uma bomba peristáltica, o mesmo volume de sulfato de amônio 100% saturado. Em seguida, o material foi centrifugado a 3100g/45 min à 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em tampão fosfato PBS (0,01 M PO_4^{3-} 0,14 M NaCl pH 7,4).

A clarificação foi realizada com duas centrifugações consecutivas a 3100g/30 min 4°C. Em seguida, as amostras foram depositadas em um colchão de sacarose a 30% e ultracentrifugadas em rotor angular a 104.000g/6h30min, sendo o sedimento ressuspensionado novamente em PBS e submetido à sonicação por três ciclos de 10 segundos a 40% de amplitude.

Em seguida foi realizada uma nova etapa de purificação. O sedimento obtido foi novamente ultracentrifugado em gradiente de cloreto de cério a 1,42g/cm³, na velocidade 82000g/30h. A amostra foi fracionada e de cada fração foi realizada a espectrofotometria, pela leitura de comprimento de onda a 260 nm e 280 nm. As frações contendo os picos de leitura, sendo correspondentes à densidade de 1,42g/cm³ foram separadas e armazenadas a temperatura de -70°C para posterior quantificação protéica. Para tal realizou-se a determinação da concentração de proteínas virais pelo método de quantificação por B.C.A. (Smith, 1985).

Com as frações obtidas após a purificação, foi realizada a titulação pela técnica de hemaglutinação (H.A.) em microplacas com fundo em U. Todas as cavidades foram preenchidas com 50 µL de diluente tampão fosfato - PBS. Na primeira cavidade de cada fileira foram adicionados 50 µl das frações, homogeneizados e diluídos na base 2 até a 11ª cavidade, sendo desprezada a última diluição. Na sequência, em todas as cavidades foram adicionados 50 µl de hemácias de suíno a 1% (diluídas em PBS e albumina sérica bovina a 0,01%). A placa foi mantida em câmara úmida a 4°C por um período de 3 horas. (Carmichael *et al.*, 1981)

3.4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para o CPV-2

Cinco alíquotas selecionadas durante os repiques e duas amostras obtidas após a purificação, assim como o controle de células, foram submetidas a extração de DNA com reagente DNAzol® (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante. A técnica de PCR foi utilizada como descrita por Pereira e colaboradores (2000). Foram utilizados dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (Tabela 1) capazes de amplificar fragmentos de 681 pares de bases (bp) (posição 3025-3685), do gene que codifica a região estrutural VP1 e VP2 do CPV-2.

QUADRO 1 – Sequência de *primers* utilizados para amplificar 681bp do CPV-2

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')
P2 S	GAAGAGTGGTTGTAAATAATA
P2 AS	CTATATCACCAAAGTTAGTAG

A reação foi realizada para um volume final de 25 µL contendo 0.5 unidade de *Tth* DNA Polimerase (Biotools®), tampão de PCR 10X, contendo 75 mM de Tris-HCl (pH 9,0), 50mM de KCl, 2mM de MgCl₂ e 20mM (NH₄)₂SO₄ (Biotools®). Completaram os componentes da reação 10 µmoles de cada *primer*, 0,2mM de deoxinucleotídeos (dNTPs) (Invitrogen®) e água ultrapura autoclavada (MilliQ®) q.s.p.. Foram utilizados 5,0 µL de DNA extraído para a reação de PCR. A amplificação foi realizada em termociclador automático (Mastercycler Eppendorf®) e consistiu em uma etapa inicial a 94° por cinco min, 34 ciclos repetidos de 94°C por 30 segundos, seguido de 55°C por dois min e 72°C também por dois min. Um ciclo final de 72°C por cinco min foi utilizado para a extensão final.

Os produtos obtidos na amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5%, com brometo de etídio (0,5µg/mL). E em seguida examinados comparativamente com marcadores de DNA de 100 bp (GE Healthcare®), com auxílio de transiluminador UV. As imagens foram visualizadas sob luz ultravioleta e em seguida realizado foto documentação.

3.5. Inoculação em camundongos (*Mus musculus*)

Quatro camundongos da linhagem *High Responder* de Biozzi seleção IV-A foram inoculados por via intraperitoneal com 200 µg de proteína viral obtida após a purificação, sendo que para uma melhor imunização foi preparada uma emulsão com adjuvante completo de Freund (v/v) (Invitrogen®). Após um período de 15 dias uma nova inoculação foi realizada por via subcutânea (SC) com metade da concentração inicial, e na terceira semana tal procedimento foi repetido. Na quarta semana inoculou-se um quarto da dose inicial, ou seja, 50 µg por camundongo no total. A partir da segunda inoculação a emulsão foi preparada com o adjuvante incompleto de Freund. No 30º dia os animais foram anestesiados com acepromazina e quetamina, nas doses de 1 mg/kg e 75 mg/kg respectivamente, para retirada do baço, e em seguida foram eutanasiados com inoculação intra-cardíaca de pentobarbital, segundo orientação do Comitê de ética da FMVZ-UNESP – Botucatu. Do material removido foi retirado um fragmento para extração de RNA, sendo o restante armazenado à -70°C em Trizol reagent (Invitrogen®).

Com o objetivo de se conhecer a resposta do animal à imunização foi procedida a titulação de anticorpos anti-CPV pelo teste de inibição da hemaglutinação. Após a eutanásia, foi colhido um mL de sangue sem anticoagulante, e após um período de inativação por uma hora a 37°C o material foi centrifugado a 400g por 5 min. A técnica foi realizada em microplaca com fundo em U, sendo os poços preenchidos com 25 µL de PBS. No primeiro poço foram adicionados 25 µL de soro, e após homogeneização foi realizada diluição seriada na base 2 até a 10ª cavidade. Na 11ª fileira foi realizado um controle de hemaglutinação, e na 12ª controle de sedimentação da hemácia. Em seguida, foram adicionados 25 µL de amostra de vírus padrão

com 4 unidades hemaglutinantes em todas as cavidades, exceto no controle de hemácias. A placa foi incubada a temperatura ambiente durante uma hora. Após este período 50 μL de hemácias de suíno a 1% foram adicionados em todas as cavidades e a placa foi então incubada a 4°C por 3 horas. Por último foi realizado a leitura visual da ocorrência ou não da inibição da hemaglutinação (Pollock, 1982).

3.6. Amplificação e ligação das cadeias leve e pesada (VH e VL)

3.6.1. Extração de RNA total e transcrição reversa (produção de cDNA)

Com os fragmentos de baço, de cada animal, obtidos foi realizada extração com Trizol reagent (Invitrogen®) de acordo com as recomendações do fabricante. Ao final as amostras foram ressuspensas em 100 μL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC-Sigma®) com 10% de inibidor de Rnase (RNAguard 1 U/mL GE Healthcare®). Após a suspensão o material resultante foi incubado a 56°C por 10 min. Em seguida as amostras foram incubadas com 1 U/ μg da RQ1 RNase-Free DNase, com 1x do tampão da reação, por 30 min a 37°C, em seguida foi adicionado 1 μL da RQ1 *stop solution*, seguido de nova incubação de 10 min a 65°C (RQ1 RNase-Free DNase, Promega®).

A transcrição reversa foi feita em duas fases. Na fase de pré-transcrição, foi feito um *master mix* composto de: 1 μL de *random primer* (250 ng/ μL - Invitrogen®), cerca de 1 μg de RNA total e de água Milli-Q® tratada com DEPC (Sigma®) q.s.p. para 5 μL . Em seguida incubou-se o material a 70°C durante cinco min e um resfriamento imediato em gelo. Na fase de transcrição, foi utilizado um novo *master mix* com volume total de 15 μL por reação, sendo este: 4 μL de ImProm II 5x *reaction buffer* (Promega®), 2,4 μL (25 mM) de MgCl_2 , e 0,5 μL de dNTP mix 20mM (Invitrogen®), 1,0 μL ImProm II RT(Promega®) e 6,1 μL de água MilliQ com DEPC (Sigma®). Uma segunda incubação foi realizada a 25°C durante cinco min, 42°C durante 60 min, 70°C durante 15 min. Todos os ciclos foram realizados em termociclador automático (Mastercycler Eppendorf®).

3.6.2. Amplificação da cadeia leve (VL) e pesada (VH) da região variável dos anticorpos pela técnica de PCR

A amplificação dos fragmentos da cadeia leve e pesada foi realizada com *primers* descritos por Krebber e colaboradores (1997). A descrição destes encontra-se no Anexo 1. Para realizarmos a reação os *primers* foram diluídos para uma concentração de 100 pmol/μL (solução mãe), e em seguida foi feita a mistura dos *primers*, segundo descrito pelo autor, para uma concentração final de 20 pmol/μL (solução de uso). Para facilitar a compreensão, consideramos o pool de *primers* VH reverse como sendo o *primer* VH reverse, o pool de *primers* VH forward como o *primer* VH forward, a mesma consideração deve ser feita com os *primers* da cadeia leve (VL).

As reações de PCR para VL e VH, foram realizadas utilizando-se uma solução de reagentes “pronta para uso” (GoTaq® Green Master Mix, Promega®) contendo o tampão de reação, os DNTPS, MgCl₂ e a enzima Taq DNA Polimerase, sendo preparadas para um volume final de 100 μL. A esta solução foi adicionado, 200 pmol de cada *primer* e 20 μL de cDNA e água ultrapura autoclavada (MilliQ®) q.s.p.. A amplificação foi realizada em termociclador automático (Mastercycler Eppendorf®), de acordo com o trabalho de Deng e colaboradores (2003), com pequenas alterações e consistiu em uma etapa inicial a 92°C por cinco min, sete ciclos repetidos de 92°C por um minuto, seguido de 63°C por 30 segundos, 58°C por 50 segundos e 72°C por um minuto. Uma segunda ciclagem foi realizada da seguinte forma: 23 ciclos de 92°C por 30 segundos, 63 °C por 30 segundos e 72 °C por um minuto. Um ciclo final de 72°C por cinco min foi utilizado para a extensão final. Os produtos obtidos na amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio conforme descrito anteriormente no item 3.3.

Os fragmentos amplificados foram purificados por meio de filtração em coluna utilizando kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®) segundo as recomendações do fabricante. Em seguida quantificados de maneira comparativa, após nova corrida em gel de agarose, sendo realizada com base no padrão de quantidade de DNA (*DNA Mass ladder* Invitrogen®).

3.6.3. Reação de junção dos fragmentos da cadeia leve e pesada – “SOE (*splicing by overlap extension*) - PCR”

A reação de “SOE” - PCR foi realizada com o intuito de unificar os fragmentos da cadeia leve (VL) e pesada (VH) previamente amplificados e formar então um fragmento único, ou *scFv*. Para tal foi adicionado a 30 ng de cada fragmento da VL e da VH, 2,5 unidades de Platinum taq DNA polimerase (Invitrogen[®]), tampão de PCR 10x contendo 200 mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM KCl (Invitrogen[®]) e 2,0 mM de MgCl₂ (Invitrogen[®]) e água ultrapura autoclavada (MilliQ[®]) q.s.p. para 100 µL. Desta forma a reação foi levada ao termociclador automático (Mastercycler Eppendorf[®]), onde se realizou os ciclos: 95°C por cinco min seguido de cinco ciclos de 95°C por um min, 63°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por três min. Foi realizada então uma pausa na reação para a adição de 20 pmoles dos *primers* Sc *back* (TTA CTC gCg gCC CAg CCg gCC ATg gCg gAC TAC AAA g) e Sc *forward* (ggA ATT Cgg CCC CCg Ag).

Após a adição dos *primers* externos, foram realizados os seguintes ciclos: 95°C por cinco min, seguido de cinco ciclos de 95°C por um minuto, 63°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por três min, e mais 35 ciclos de 95°C por cinco, 95°C por um minuto, 55°C por um minuto e 72°C por três min, sendo então observado uma extensão final de 72°C por sete min. Para se obter uma maior concentração de produto, um total de oito reações foram feitas sendo em seguida precipitadas com etanol absoluto sendo todas ressuspendidas em 50 µL de água ultrapura autoclavada (MilliQ[®]). Após verificação da banda específica em gel de agarose, o produto foi purificado kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega[®])

3.7. Preparação e clonagem do fragmento *scFv*

3.7.1. Digestão com a enzima de restrição *Sfi* I

Em seguida a purificação, que teve como objetivo eliminar o excesso de *primers* e sais da reação anterior, uma digestão do *scFv* foi realizada com o uso da enzima de restrição *Sfi* I. Todas as reações de digestão com a enzima foram realizadas neste trabalho de acordo com as recomendações do fabricante. Tendo sido observada a quantidade de DNA (fagomídeo e produto de PCR) a ser digerida, para 1 µg de material, uma unidade da enzima era adicionada ao tampão NE 1x (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 7,9), juntamente com BSA 100x e água ultrapura autoclavada (MilliQ[®]) q.s.p.. O volume da reação era ajustado de acordo com a quantidade de amostra a ser digerida. Depois de montada a reação era levada ao termociclador por uma hora a 50°C.

3.7.2. Amplificação e digestão do fagomídeo pAK 100

O fagomídeo utilizado neste experimento (pAK 100) foi recebido¹ liofilizado e está representado esquematicamente na figura 2.

1-Gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Plückthun da Universidade de Zurique.

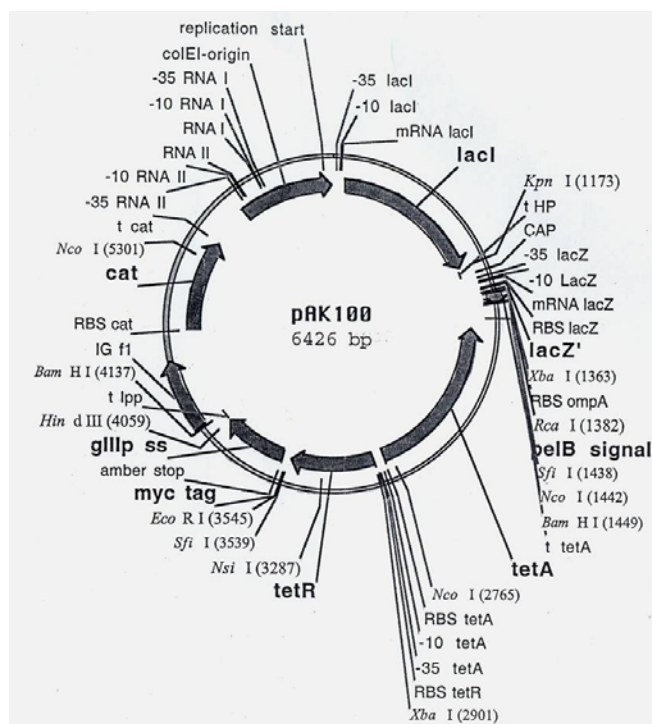


FIGURA 2. Esquema do fagomídeo pAK 100.

O material recebido foi ressuspensionado em 100µl de água ultrapura autoclavada (MilliQ®) armazenado em freezer à -20°C, até o momento de uso. Para realizar a amplificação do fagomídeo utilizou-se bactéria XL-10 Gold® ultracompetent (Stratagene®), após a realização de um protocolo de preparação e congelamento de células competentes, sendo estas inicialmente cultivadas em meio SOB [Tryptona 2% (Oxoid®), extrato de levedura 0,5% (Oxoid®), NaCl 1M (Sigma®), KCl 1M (Sigma®)], a 37°C por 16 horas, sob agitação. Em seguida, foi observada a D.O. (densidade ótica) em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, GE Healthcare®) até atingir valor entre 0,5 e 0,6, na leitura 600 nm. Neste índice, foi adicionado à cultura 1 mL de MgCl₂ (1M), gelado e mantido um repouso de 15 min. Uma centrifugação a 3600g, à 4°C por 12 min foi realizada, o sobrenadante descartado e foi adicionado a solução RF1 pH 5,8 (KCl 1M; MnCl₂ 4xH₂O; KAC 0,5M pH 6,9; CaCl₂ 2xH₂O 1M e glicerol 15%-p/v), sendo o sedimento ressuspensionado nesta. Uma nova centrifugação com as mesmas condições foi repetida e o sedimento foi novamente ressuspensionado, desta vez com a solução RF2 (Na-MOPS 0,5M pH 7, KCl 1M; CaCl₂ 2xH₂O 1M; glicerol), e em seguida o material foi aliquoteado

(cerca de 50 µL) em microtubos. Estes foram congelados por imersão em nitrogênio líquido, e armazenados a -70°C.

Em seguida, foi realizada a transformação com pAK 100. As bactérias foram descongeladas em gelo, sem agitação, e foi adicionado 0,5 µg de pAK 100. Após um repouso de 25 min em gelo, o material foi submetido a um choque de temperatura (37°C por cinco min em banho-maria) e novamente mantido em gelo por dois min. Adicionou-se 50µl do meio LB (Luria-Bertani: triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%) e novamente levado a um banho-maria 37°C. Em seguida o material foi plaqueado em placas com o meio 2-YT (Tryptona 1,6%, extrato de levedura 1% e NaCl 0,5%) com cloranfenicol (25µg/mL) e tetraciclina (10µg/mL). Após um período de 12 horas em estufa à 37°C, foi observado o crescimento pontual de algumas colônias bacterianas, que indicou uma inserção na XL-10 *Gold*[®]. Após a minipreparação do plasmídeo por lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001), foi realizada a digestão com a Sfi I para averiguar a integridade do fagomídeo.

3.7.3. Ligação do scFv ao pAK 100

Em seguida a digestão e purificação do fagomídeo e fragmento scFv digeridos, foi feita a ligação destes com a enzima T4 DNA ligase (Promega[®]). Para realizar a ligação foi adotada uma proporção de 1:3 na relação molar vetor/inserto. A concentração utilizada de cada um foi calculada por uma fórmula recomendada pelo fabricante:

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)}}{\text{tamanho do inserto}} \times \text{relação molar de } \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} = \text{ng de inserto}$$

Com as quantidades adequadas à reação foi acrescido além do produto scFv e do fagomídeo (vetor), tampão 1x contendo 300mM de Tris-HCl pH 7,8, 100mM de MgCl₂, 100mM de DTT, e 10 mM de ATP, além de uma unidade de DNA ligase e água ultrapura autoclavada (MilliQ[®]) q.s.p.. A reação foi mantida em temperatura ambiente durante três horas.

3.7.4. Transformação da *E.coli* XL-1 blue (eletroporação)

A próxima etapa foi realizar a eletroporação, com a cepa *E.coli* XL-1 Blue (Stratagene®)¹ sendo que antes realizou-se a preparação de eletrocompetência.

Após semeadura em placa foi selecionada uma colônia isolada da bactéria, com alça de platina estéril e transferida para um tubo de vidro estéril contendo 1mL de meio SOB (sem Magnésio) e então cultivada a 37°C, sob agitação a 180 rpm/16 horas. Um volume de 2,5 mL desta pré-cultura foram inoculados em erlenmeyer contendo 250 mL de meio SOB, e incubados a 37°C com agitação moderada (200rpm) até atingir uma densidade óptica de 0,75, na leitura 550. A suspensão celular foi coletada em tubo de polipropileno estéril e resfriada por 30 min em gelo. O material foi então centrifugado a 4000g por 12-15 min a 4°C, sendo em seguida o sobrenadante cuidadosamente descartado. As bactérias foram ressuspensas em volume igual ao original (250mL) de água ultrapura autoclavada (MilliQ®) gelada (50 mL por frasco) e novamente centrifugadas (4000g/12-15 min a 4°C). Após o descarte do sobrenadante o sedimento foi ressuspendido em 250 mL de glicerol a 10% gelado e centrifugado com as condições citadas. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e ressuspendeu-se as bactérias com o excesso de líquido que restou no tubo. Alíquotas de 90 µL foram distribuídas por microtubo e postas imediatamente em gelo seco, para estocagem a -80°C.

A eletroporação foi procedida no Laboratório de Fitopatologia². Em 80 µL da célula eletrocompetente (*E.coli* XL-1 blue) adicionou-se de 1 a 2 µL da ligação, o material foi transferido para uma cubeta de eletroporação 0,1 (BTX Harvard Apparatus®) e esta levada ao eletroporador Multipulser (1 pulso com voltagem de 1,8 Kv Biorad®); durante todo procedimento o material foi armazenado em banho de gelo. Ao material eletroporado, foram acrescentados 500 µl de meio SOB e levado ao agitador a 37°C, por 60 min.

1- Gentilmente cedida pela Dra. Débora Colombi, Depto de Genética, Instituto de Biociências UNESP, Botucatu.

2- Departamento da Defesa Fitossanitária FCA/UNESP/Botucatu, com o auxílio da Prof. Dra. Renate Krause

Posteriormente, todo o volume de bactérias eletroporadas foi plaqueado em placas de 530 cm² com meio sólido não indutor ou “NE” [*Non expression medium* que contém o meio 2YT, triptona 1,6% (Oxoid®), extrato de levedura 1% (Oxoid®), NaCl 0,5% (Sigma®), ágar bacteriológico 1% (Oxoid®), 1% de glucose e 25 µg/mL de cloranfenicol] e deixadas a temperatura ambiente por um período de 48-72 horas. Após esse período, observado o crescimento, as colônias foram contadas e raspadas com alça de Drigalski para um tubo tipo Falcon de 10 mL, sendo acrescidas de 5 mL de 2YT e 10% de glicerol autoclavado para armazenagem em freezer -80°C.

3.8. Expressão e seleção dos fagomídeos

3.8.1. Expressão dos fagomídeos

A expressão dos fagomídeos em bacteriófagos carreando a porção *single chain fraction variable* ou *scFv* compreendeu uma indução com isopropil – β – D – thiogalactopiranosídeo (IPTG - Fermentas®), associando-se a uma “co-infecção” com o fago auxiliar ou *Phage helper* M13k07 (GE Health care®).

Da cultura previamente armazenada retirou-se 100 µl que foram homogeneizados com 25 mL do meio N.E., e levados à estufa 37°C sob agitação (220rpm) até atingir uma D.O. entre 0,5 e 1 (600nm). Adicionou-se então 10¹¹ UFP (unidades formadoras de placa) do *Phage helper*, 37,5 µl de IPTG 1M (concentração final de 0,5 mM) e 50 mL do meio N.E., sendo novamente colocada em estufa, desta vez a 26°C, sob agitação. Duas horas após o início da indução acrescentou-se Kanamicina (Invitrogen®) para atingir uma concentração final de 30 µg/mL. Com isso a cultura foi novamente deixada a 26°C, sob a mesma velocidade de agitação por 16 horas.

Posteriormente o material foi dividido em tubos de polipropileno (tipo *Falcon*) e centrifugado a 4000g, por 10 min a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado (cerca de 70 mL) e então precipitado com 20mL de uma solução de PEG-NaCl 5x (20% Polietilenoglicol 8000 p/v, NaCl 2,5M). A mistura foi então deixada por 30 min em gelo e centrifugada a 10000g, por 40 min à 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 30 mL de tampão PBS, onde também se adicionou 5,5 mL da solução de PEG-

NaCl. Após um período de 20 min em gelo, 2 mL de PBS com 10% de glicerol foram utilizados para ressuspender o material.

3.8.2. Seleção dos fagos expressando o *scFv* anti-CPV-2 (*biopanning*)

A seleção dos fagomídeos foi realizada em microplacas rígidas de fundo plano do tipo Maxisorp (Nunc®). Uma linha (12 poços) foi sensibilizada com 200 µL do CPV-2 purificado, diluído a 5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato (T.C.B. 0,05mol/L pH 9,6), em câmara úmida, por 16 horas a 4°C. O bloqueio foi realizado com leite em pó desnatado (L.P.D.) 10% em tampão carbonato-bicarbonato, durante duas horas a 37°C. Cinco procedimentos de lavagens foram realizados com PBS-tween, 300 µL/poço (PBS + 0,05% de Tween 20 - PBST), seguido de outras cinco lavagens com PBS para remover o excesso de detergente.

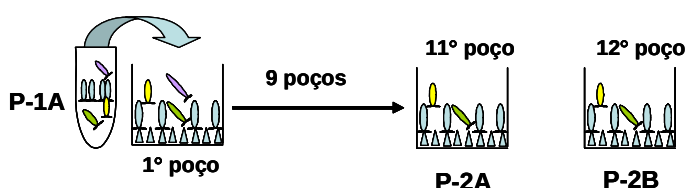
O próximo passo foi diluir os bacteriófagos expressos em L.P.D. 2% (em PBS) e distribuir 200 µL por poço. A placa foi levada à estufa 37°C por uma hora e 30 min. Após esse período o sobrenadante foi removido, e foram realizadas duas séries de 15 lavagens consecutivas, sendo a primeira série com PBST e a segunda apenas com PBS. Para eluição dos bacteriófagos utilizou-se alteração de pH com uma solução ácida de glicina-HCl (0,1M; pH 2,2). Com o objetivo de obter bacteriófagos com maior afinidade 200 µL foram adicionados no primeiro poço e imediatamente transferiu-se 195 µL para o segundo, deste transferiu-se 190 µL para o terceiro, assim sucessivamente até o décimo segundo poço. A solução restante em cada poço foi incubada por 10 min. Novamente um total 200 µL da solução ácida foi aplicado ao primeiro poço, sendo todo o volume aspirado e passado ao segundo poço, desta forma sucessivamente até o décimo primeiro poço. Com isso obteve-se de cada processo de seleção dois grupos de bacteriófagos, um teoricamente com maior afinidade por ter ficado em maior contato com a solução (poço 11) e outro um pouco menos devido à passagem mais rápida (poço 12). Logo após, às soluções obtidas, foi adicionado Tris (2M) para neutralização do pH sendo então os bacteriófagos utilizados para reinfecção em *E.coli* XL-1 blue em fase de crescimento (D.O. entre 0,5 e 1 em leitura de 600 nm). Três seleções (P-1, P-2 e P-3) foram realizadas (figura 3), sendo que antes da realização do

segundo processo um *Phage-ELISA* (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) foi realizado, como citado no item 3.9..

1° panning



2° panning



3° panning

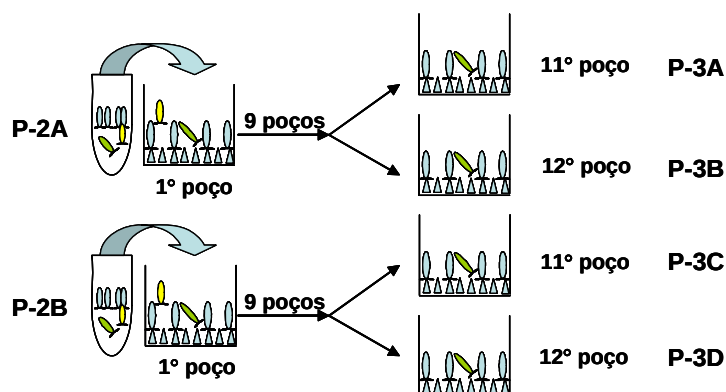


FIGURA 3. Esquema de *panning* realizado.

3.8.3. Titulação dos fagos expressando o scFv anti-CPV-2

A titulação dos bacteriófagos foi realizada por plaqueamento de várias diluições (10^1 até 10^{12}) em meio N.E. após a reinfecção na XL-1 *blue*, sendo esta definida pela contagem de colônias e correções de acordo com a diluição realizada.

3.9. Padronização do *Phage-ELISA* (bacteriófago como anticorpo primário).

3.9.1. Teste inicial

Inicialmente para a padronização do *Phage-ELISA* foi utilizada uma microplaca rígida e de fundo plano MAXISORP (NUNC®) sensibilizada com o 5µg/µL (100 µL/poço) do parvovírus previamente purificado em Tampão Carbonato-Bicarbonato (TCB), e também com a célula CRFK na diluição de 1/10 durante 16 horas a 4 °C em câmara úmida. Posteriormente, a microplaca foi lavada cinco vezes (Elx50™ – BIO-TEK) com PBS pH 7,4 adicionado de 0,05% de Tween 20 (PBST).

A solução de bloqueio foi preparada com 10% de leite em pó desnatado (LPD) em TCB e utilizada no volume de 200 µL/cavidade. A incubação durou uma hora a 37 °C em câmara úmida. Novamente, com o término da incubação, a microplaca foi lavada da mesma forma citada acima.

Em seguida, adicionaram-se à placa três grupos de bacteriófagos expressos: um de fagos antes de realizar *panning* (P-0), e dois grupos obtidos após o segundo processo de seleção (P-2). Os bacteriófagos foram diluídos em PBS, nas diluições de 1/5, 1/50, 1/500, 1/5000, 1/50000 e transferidos para a microplaca no volume de 100 µL/poço. Nesta etapa realizou-se um teste dos mesmos fagos e diluições em poços não sensibilizados, além dos controles de poços sem conjugado e o branco. Após um período de uma hora à 37°C em câmara úmida foi realizado o procedimento de lavagem como descrito acima. Em seguida, utilizou-se um conjugado monoclonal HRP/anti-M13 (GE Healthcare®) conjugado com peroxidase que foi preparado na diluição 1:3000 em PBST com 2% LPD, no volume de 100 µL/cavidade. A microplaca foi mantida a 37 °C durante uma hora em câmara úmida e ao final desse período foi lavada cinco vezes com PBST. Em seguida, 2,5 µL do substrato enzimático peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30% e 100 µL do cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) a 10 mg/mL em dimetil sulfóxido (DMSO) foram diluídos em 10 mL do Tampão Citrato/Acetato 0,01 mol/L pH 6,0 e passados para a microplaca no volume de 100 µL/poço. A incubação durou 15 min em

temperatura ambiente (TA), sob agitação constante. A reação colorimétrica foi bloqueada com a solução de HCl 2 mol/L (50 μ L/cavidade). A leitura foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm (Multiskan EX – Labsystems®).

3.9.2. Teste do bloqueio e da microplaca

Dois grupos (A e D), com as diluições 10^4 e 10^7 , em solução de soro albumina bovina (BSA) 0,5% em PBST, foram testados em microplacas distintas (Maxisorp e Medisorp, Nunc®). Este ELISA envolveu também testes com três soluções de bloqueio: LPD a 2,5%, 5% e 10%, BSA a 0,5%, 1% e 2% e também gelatina incolor a 0,5%, 1% e 2%, todas com volume de 200 μ L por poço. Todas as soluções foram também testadas com dois diluentes: tampão fosfato (PBS) e tampão carbonato-bicarbonato (TCB pH 9,0). Nesta fase as placas não foram sensibilizadas e o restante da reação foi realizado de maneira padrão.

3.9.3. Teste dos grupos de fagos do terceiro *panning*

Com um resultado mais adequado com relação à microplaca e à solução de bloqueio a serem utilizados, buscou-se então qual dos grupos de bacteriófagos teria maior afinidade pelo CPV-2. A microplaca Medisorp foi sensibilizada com 1 μ g/mL do vírus purificado e bloqueada com a solução de BSA a 0,5% em PBS por uma hora à 37°C. Os fagos dos quatro grupos (P-3A, P-3B, P-3C e P-3D), foram diluídos em solução de BSA 0,5% em PBST, nas concentrações de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , e distribuídos na placa que foi mantida em estufa a 37°C por uma hora. Em todas as outras etapas do teste se adotou o que foi citado no primeiro item (3.9.1).

3.9.4. Teste da concentração de CPV e diluente do mesmo

A partir da escolha do grupo de fagos, testou-se a afinidade deste alterando a concentração de vírus, sendo testadas com 1, 2 e 4 μ g/mL, diluído

em PBS e também TCB, com as concentrações de 10^9 , 10^8 , 10^7 e 10^6 fagos/mL do grupo P-3C. O restante da reação obedeceu ao padrão pré-definido.

3.10. Seleção ou *screening* e avaliação de clones

3.10.1. Seleção dos clones por *Phage-ELISA*

Com a microplaca Medisorp (NUNC®) sensibilizada com 4 µg/mL do CPV-2 em câmara úmida, à 4°C, durante 16 horas, adicionamos 92 bacteriófagos, previamente expressos, provenientes do grupo P-3C, diluídos 1/100 em BSA 0,5% em PBST. O bloqueio da reação foi realizado com BSA na concentração de 1% diluído em PBS durante 1 hora e meia. Para o restante da reação foram obedecidos os padrões acima citados.

Após serem escolhidos 10 fagos com maior afinidade, estes foram titulados por plaqueamento e expressos. Uma nova reação foi realizada com a concentração de 10^6 fagos/mL diluídos em BSA 0,5% em PBST. A reação de *Phage-ELISA* foi realizada, também com o objetivo de comparar a capacidade de ligação destes fagos com a célula CRFK, utilizada para o desenvolvimento do CPV-2. Desta forma a microplaca foi sensibilizada com o CPV-2 à 4 µg/mL e também com a CRFK (310 µg/mL) diluídos em PBS, tendo a reação seguido o padrão já mencionado.

3.10.2. Avaliação dos clones selecionados por *Phage-ELISA*

Para a avaliação o inserto dos clones selecionados foi realizado um PCR com um par de *primers* (pAK 100 f: AgA TAA CgA ggg CAA ATC AT e pAK 100 r: CTA CAg gTC TTC TCA gA) que se anelam em região adjacente ao local de inserção do fragmento *scFv*. Estes foram desenhados de acordo com a sequência do pAK 100 fornecida pelo Doutor Plückthun. Este PCR foi também realizado com a solução de reagentes “pronta para uso” (GoTaq® Green Master Mix, Promega®) sendo adicionado 200 pmol de cada Primer e água ultrapura

autoclavada (MilliQ[®]) q.s.p., sendo as colônias aplicadas diretamente no *master mix*. A amplificação foi realizada em termociclador automático (Mastercycler Eppendorf[®]) e consistiu em uma etapa inicial a 95°C por dez min, 34 ciclos repetidos de 95°C por um min, seguido de 58°C por um min e 72°C por dois min, com um ciclo final de 72°C por cinco min. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio (0,5µg/mL) sendo observados em transiluminador UV.

3.10.3. Seleção dos clones por PCR

Com o resultado observado na amplificação das colônias dos clones selecionados, uma nova seleção foi feita desta vez com a técnica de PCR acima descrita. Partindo do mesmo grupo selecionado pelo Phage-ELISA (P-3C) cinquenta colônias foram escolhidas aleatoriamente e diretamente aplicadas no *master mix*.

Para averiguar o inserto amplificado realizou-se uma reação de sequenciamento com os produtos que apresentaram banda específica. Estes foram purificados empregando-se o kit comercial GFX PCR DNA *and gel band* (GE Healthcare[®]). As reações foram realizadas em termociclador, de acordo com as instruções do Kit DYEnamicET Dye Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences[®]), utilizando 2,5µmol do *primers* sense indicado no quadro 3. As reações de sequenciamento foram levadas então ao sequenciador ABI 377 (Applied Biosystems[®]), sendo em seguida analisadas, e traduzidas com as três fases de leitura possíveis, submetidas ao *BLASTp* e comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados.

3.10.4. *Phage-ELISA* com os clones selecionados

Os clones 2 e 32 foram então expressos e titulados como citado nos itens 3.8.1 e 3.8.3.. Uma *Phage-ELISA* foi realizado com a microplaca Medisorp (Nunc[®]) sensibilizada com 4µg/mL do CPV-2 purificado, CPV-2 em cultivo celular (CPV-2+CRFK), e apenas a CRFK. O restante da reação seguiu o padrão pré-definido.

4. Resultados

4.1. Cultivo viral e titulação do Parvovírus canino-2 (CPV-2)

Ao final do processo de cultivo viral, obteve-se cerca de 400 mL de material que foi utilizado para purificação. A titulação realizada forneceu um resultado de $\text{DICT}_{50} = 10^{6,87}/\text{mL}$.

4.2. Purificação do Parvovírus canino-2

O processo de purificação viral realizado nos forneceu frações do CPV-2 purificado que foram selecionadas após pico na espectrofotometria a leitura nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, conforme evidenciado nas figuras 4 e 5. As frações foram agrupadas em 4 sendo as concentrações de proteínas após dosagem pelo método de BCA: 418, 232, 189 e 151 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A primeira fração foi utilizada em todas as etapas de inoculação viral. As frações quando tituladas por hemaglutinação obtiveram um título de: 10240, 5120, 2560 e 160 respectivamente.

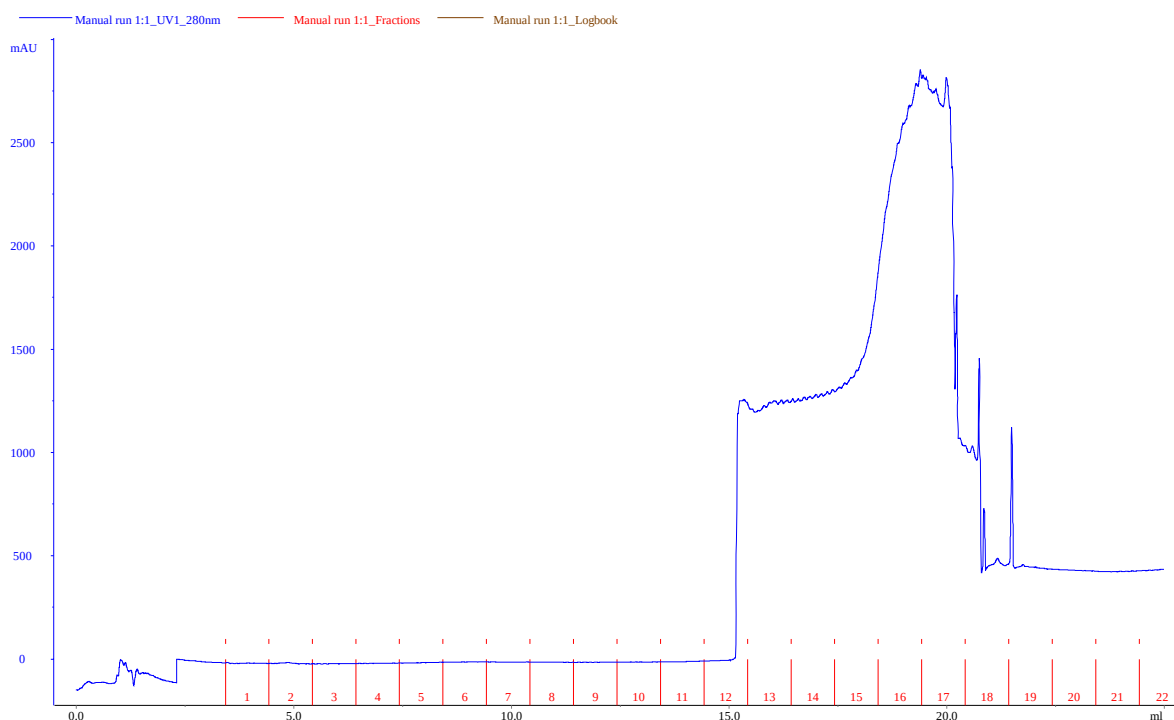


FIGURA 4. Gráfico da leitura a 280 nm das frações do CPV-2 purificado.

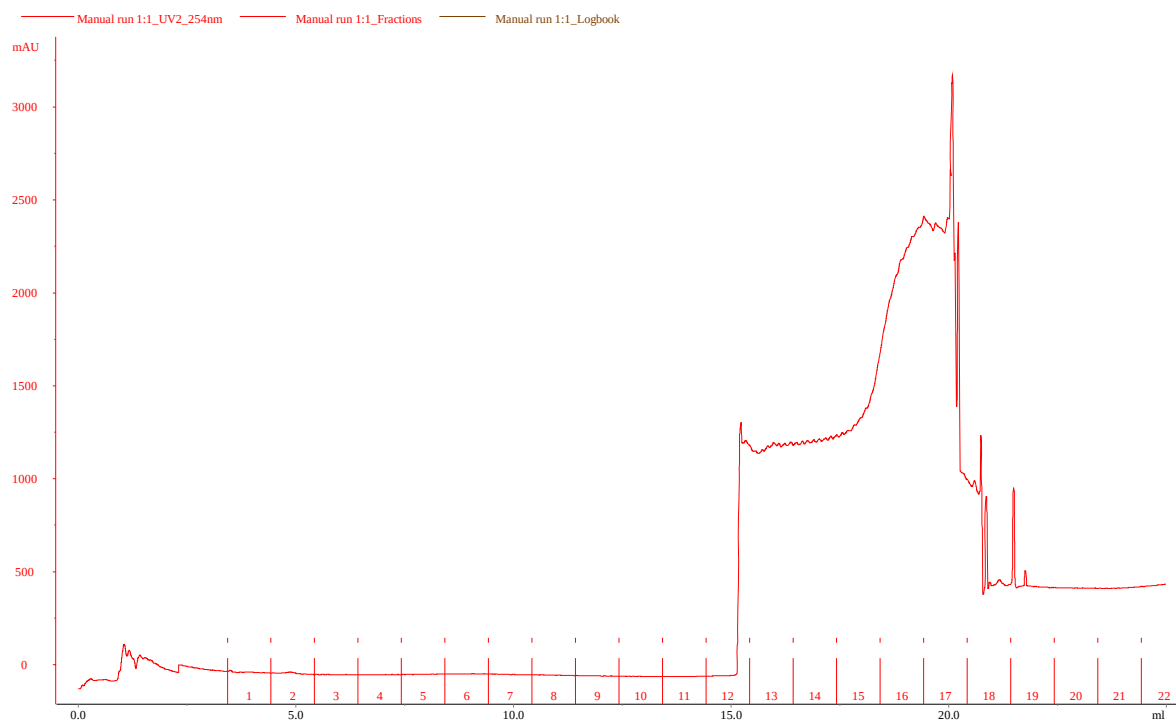


FIGURA 5. Gráfico da leitura a 260 nm das frações do CPV-2 purificado.

4.3. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para o CPV-2

Um total de sete alíquotas obtidas no processo de cultivo viral e após a purificação foram positivas na reação de amplificação do CPV-2, como evidenciado na figura 6.

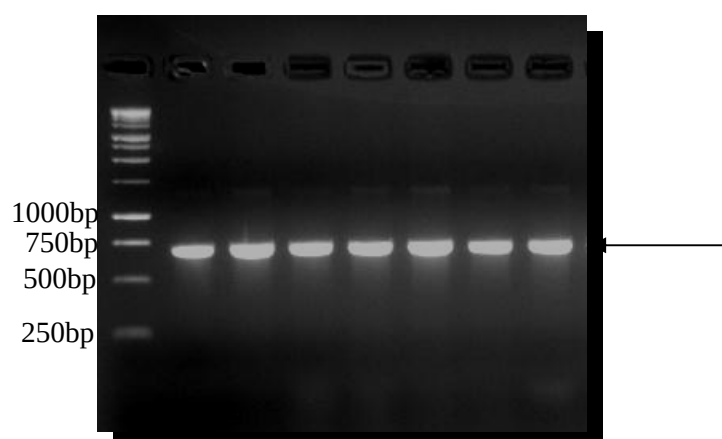


FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. A seta indica o resultado do PCR (681 bp) para o CPV-2. O marcador de tamanho molecular utilizado (coluna 1) foi o de 1kb (Promega®).

4.4. Inoculação em camundongos (*Mus musculus*)

Após a inoculação realizou-se o a titulação dos anticorpos anti-CPV pelo teste de inibição da hemaglutinação. Todos os animais testados apresentaram o mesmo título de 4096.

4.5. Amplificação da cadeia leve (VL) e pesada (VH) da região variável dos anticorpos pela técnica de PCR

A PCR das cadeias leve e pesada amplificou fragmentos de aproximadamente 370 a 400bp como observado na figura 7.

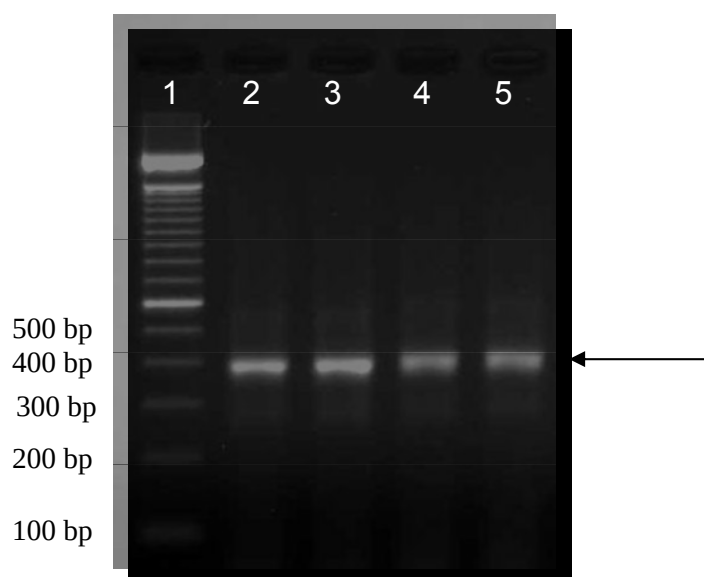


FIGURA 7 – Reação de amplificação das cadeias leve (VL) e pesada (VH) em gel de agarose a 1,5%. Coluna 1: marcador de tamanho molecular de 100 bp (GE Healthcare®). As colunas 2 e 3 indicam a amplificação da cadeia leve, enquanto a 4 e 5 da cadeia pesada da região variável (seta).

4.6. Reação de junção dos fragmentos da cadeia leve e pesada – “SOE (*splicing by overlap extension*) – PCR

Em seguida à amplificação das cadeias leve e pesada foi feita a reação de SOE-PCR, para a obtenção do fragmento *scFv* de aproximadamente 750bp. Na figura 8 se observa a reação de SOE-PCR e na figura 9 a reação após purificação.

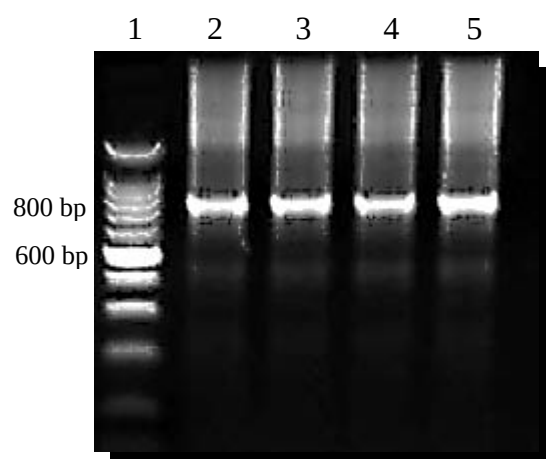


FIGURA 8. Reações de “SOE-PCR” observadas em gel de agarose 1,5%. Na coluna 1 se observa o marcador de tamanho molecular de 100bp (GE Healthcare®). As colunas 2, 3, 4 e 5 são duplicatas das reações realizadas.

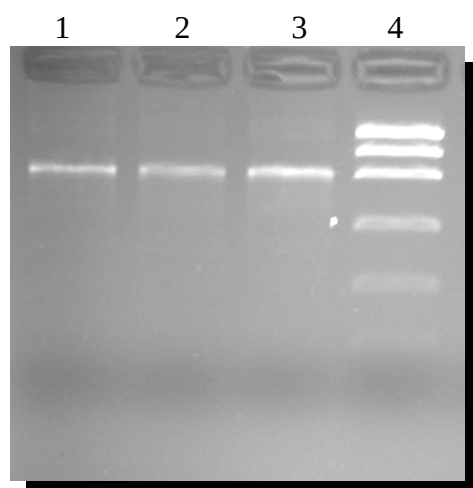


FIGURA 9. Reações de “SOE-PCR” após purificação. A coluna 1, 2 e 3 são referentes às reações purificadas. Na coluna 4 se observa o DNA Mass ladder (Invitrogen®)

4.7. Preparação e clonagem do fragmento *scFv*

4.7.1. Amplificação e digestão do fagomídeo pAK 100

A digestão do fagomídeo pAK 100 originou dois fragmentos distintos de aproximadamente 4200 bp e 2000 bp, como observado na Figura 10.

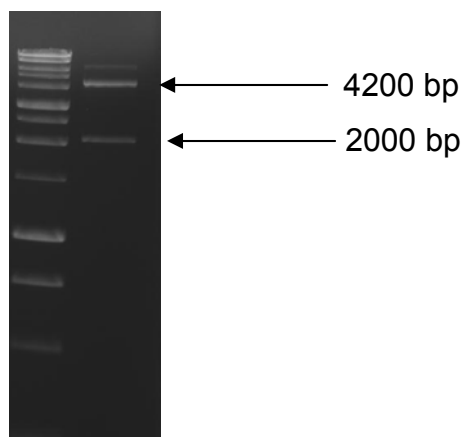


FIGURA 10. Gel de agarose a 1% com o fagomídeo pAK 100 digerido. A seta indica o fragmento de 4200bp, que foi recortado para posterior ligação. O marcador de tamanho molecular utilizado é de 1 kb (Promega®)

4.7.2. Transformação da *E.coli* XL-1 blue (eletroporação)

O processo de eletroporação da *E.coli* XL-1 blue teve um rendimento total de 350 colônias, sendo que estas foram observadas após um período de crescimento de 48-72 horas.

4.8. Expressão e seleção dos fagomídeos

4.8.1. Titulação dos fagos expressando o *scFv* anti-CPV-2

A seleção realizada permitiu a obtenção de quatro diferentes grupos de fagos expressando o fragmento *scFv*. A titulação destes está demonstrada na tabela 1.

TABELA 1. Titulação dos grupos de fagos.

Grupos de fagos	Titulação
P- 3A	4×10^{11} fagos/mL
P- 3B	16×10^{10} fagos/mL
P- 3C	$4,4 \times 10^{10}$ fagos/mL
P- 3D	8×10^{10} fagos/mL

4.9. Padronização do *Phage-ELISA* (bacteriófago como anticorpo primário)

4.9.1. Teste inicial

O primeiro *Phage-ELISA* realizado obteve os resultados visualizados na figura 11.

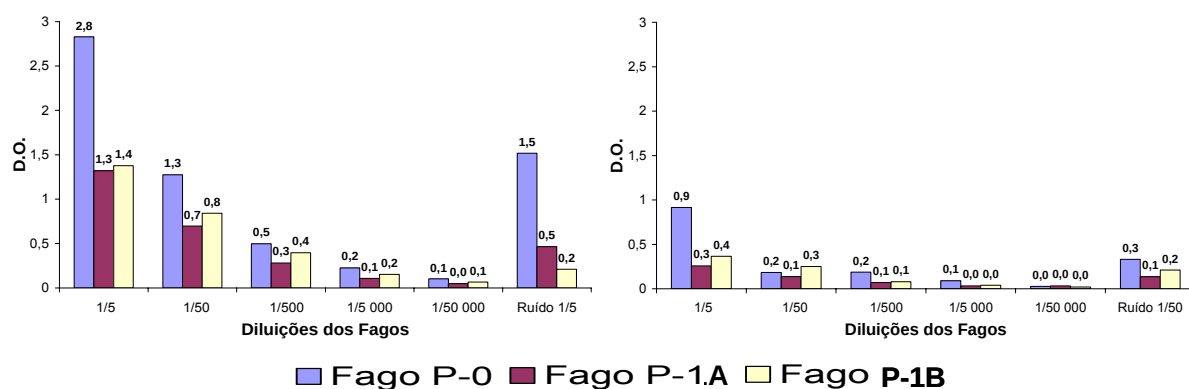


FIGURA 11. Gráfico do primeiro *Phage-ELISA* realizado. O gráfico da esquerda é relativo à sensibilização da microplaca com CPV-2, e o da direita com a célula CRFK. Nesta reação utilizou-se diluição seriada na base 10 (1/5 a 1/50000) dos fagos P-0 (sem *panning*) e os fagos originados do primeiro *panning* P-1A e P-1B. A presença de ruído (placa sem sensibilização) é destacada nas diluições de 1/5 no gráfico da esquerda, e 1/50 no gráfico da direita.

4.9.2. Teste do bloqueio e da microplaca

O teste realizado com as microplacas Maxisorp e Medisorp (Nunc®) sem sensibilização evidenciou uma melhor reação (menor D.O.) quando utilizada a placa Medisorp. Dentre as soluções de bloqueio testadas, a solução de BSA a 0,5%, 1% e 2% foram as que melhor bloquearam as placas, sendo também mais eficientes quando diluídas em PBS. Assim foi adotado então o uso da placa Medisorp e da solução de bloqueio BSA a 0,5% em todas as etapas.

4.9.3. Teste dos grupos de fagos do terceiro *panning*

O *Phage-ELISA* para o teste dos grupos P-3A, P-3B, P-3C e P-3D oriundos do terceiro *panning* está representado no gráfico da figura 12.

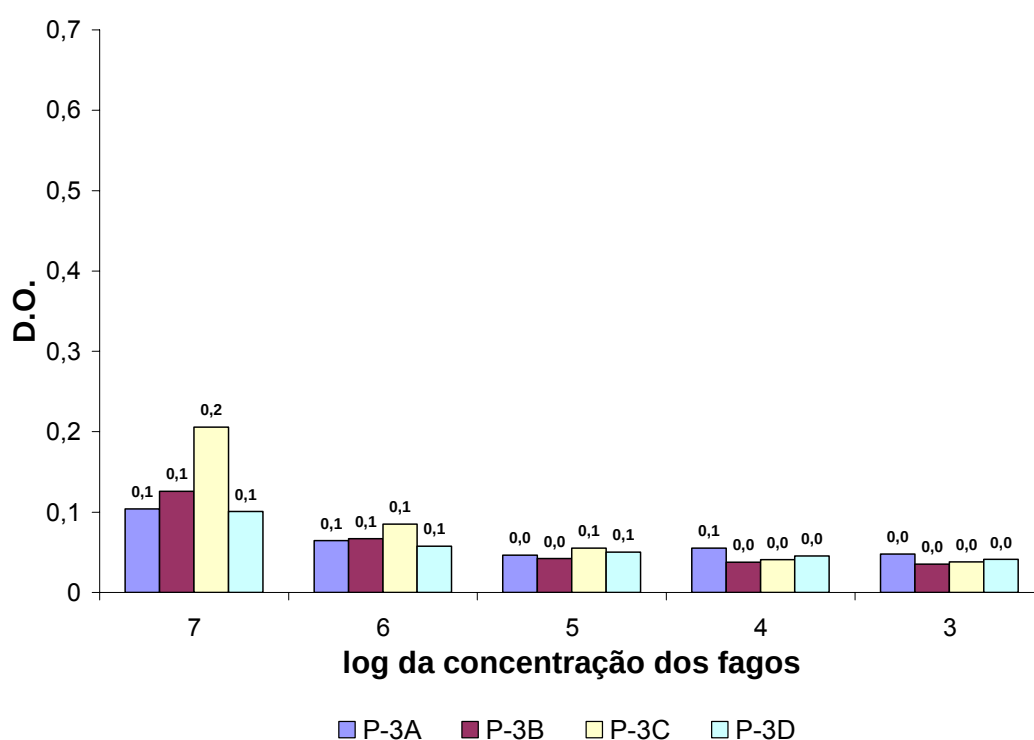


FIGURA 12: Gráfico relativo ao *Phage-ELISA* realizado para determinação do grupo com maior afinidade. A microplaca foi sensibilizada com 1 µg/mL de CPV-2 purificado, utilizando-se diferentes concentrações dos grupos de fagos.

4.9.4. Teste da concentração de CPV e diluente do mesmo

Neste *Phage-ELISA* observou-se que o CPV-2 quando diluído em PBS apresentou maior D.O. em relação à diluição em TCB, não importando a concentração de bacteriófago (P-3C). O resultado deste teste também evidenciou a eficiência da reação de bloqueio, observada com relação aos valores obtidos quando a placa não foi sensibilizada (ruído). A Figura 13 é referente à parte dessa reação com a diluição do CPV-2 em PBS.

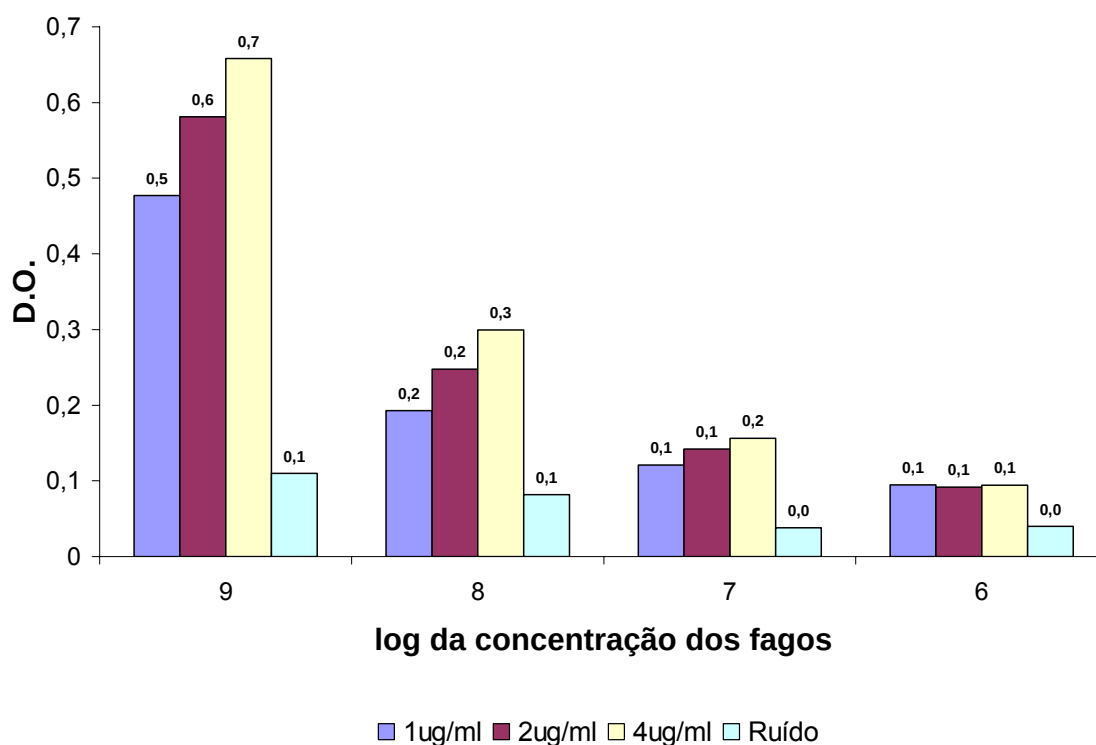


FIGURA 13: Gráfico da reação de *Phage-ELISA*. Três diferentes concentrações de CPV-2, diluídas em PBS, foram testadas, assim como diferentes concentrações (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6) do grupo P-3C.

4.10. Seleção ou *screening* e avaliação dos clones

4.10.1. Seleção dos clones por *Phage-ELISA*

Na figura 14 observa-se o resultado do *Phage-ELISA* com os 10 clones escolhidos após a seleção.

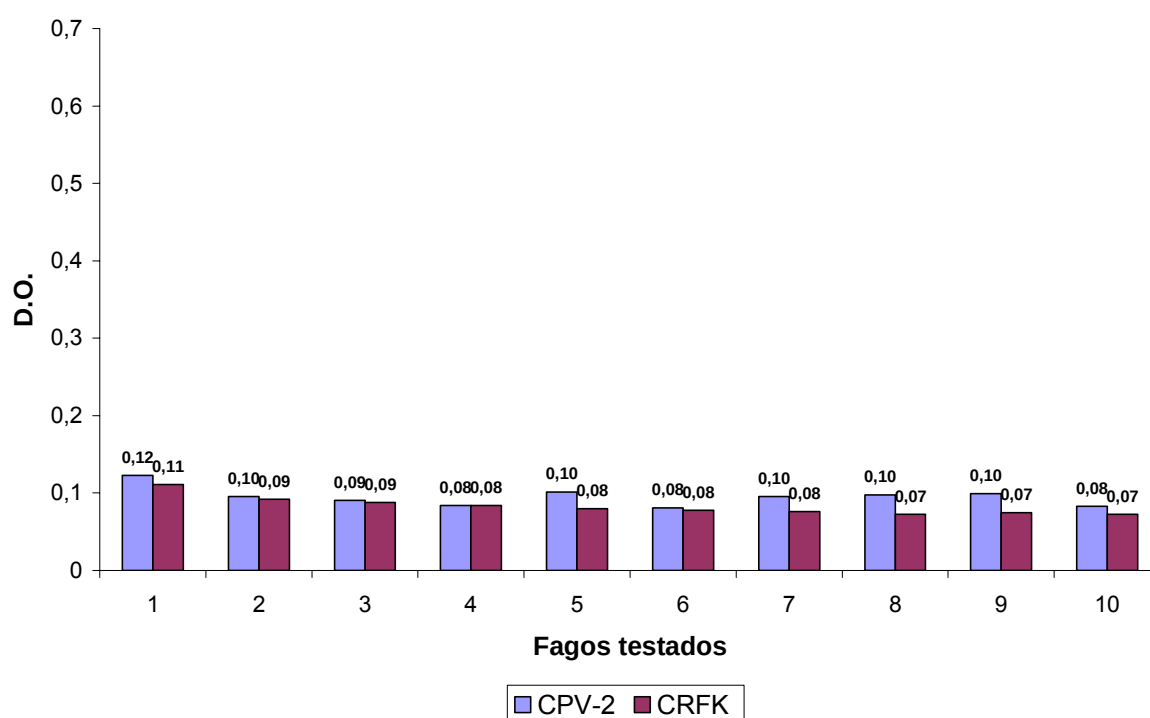


FIGURA 14. Gráfico de reação de *Phage-ELISA* dos 10 fagos selecionados, na concentração de 10^6 fagos/mL.

4.10.2. Avaliação dos clones selecionados por *Phage-ELISA*

Na avaliação do inserto dos clones realizada por PCR um produto de aproximadamente 2000 bp foi observado, como observado na figura 15.

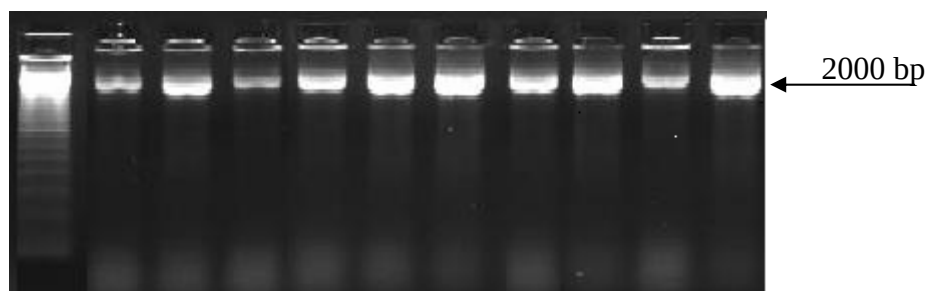


FIGURA 15. Produtos de amplificação observados na PCR para avaliação do inserto dos clones. A seta indica um produto de aproximadamente 2000 bp, que pode ser observado em todos os 10 clones testados. Na coluna 1 se observa o marcador de tamanho molecular de 100bp (GE Healthcare®).

4.10.3. Seleção dos clones por PCR

A PCR foi realizada com os *primers* desenhados para o pAK100, um fragmento com inserto de tamanho esperado (aproximadamente 820 bp), em dois dos 50 clones, como observado na figura 16.

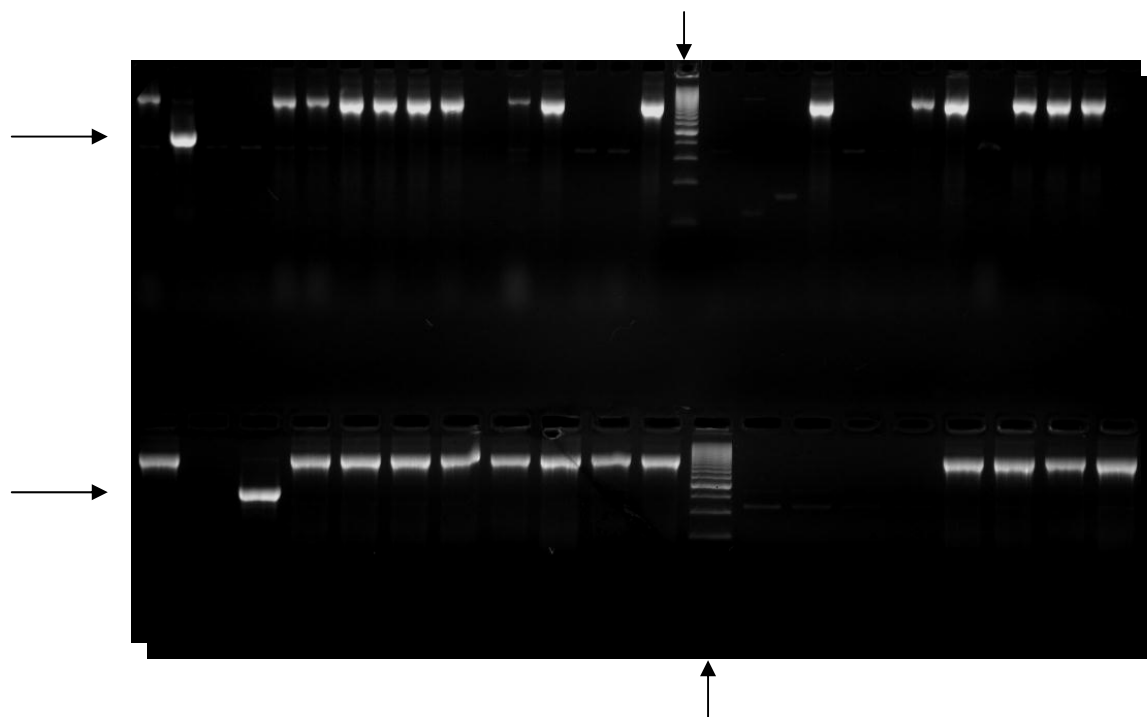


FIGURA 16. Gel de agarose a 1,5%. As setas indicam os 2 clones amplificados de aproximadamente 820 bp. O marcador de tamanho molecular (indicado com setas verticais) utilizado foi o de 200bp (Promega®).

Para verificação do inserto amplificado, a colônia que originou o clone 32 foi submetida a uma minipreparação e digestão com a enzima de restrição *Sfi* I, após crescimento em meio NE. Na figura 17 observa-se a digestão com a presença de 2 fragmentos referentes ao pAK (4200 bp) e ao inserto 750bp.

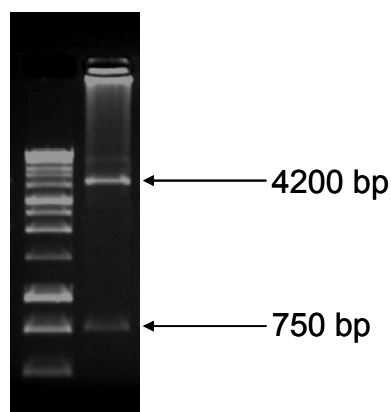


FIGURA 17. Digestão realizada com o clone 32. Dois fragmentos são observados sendo um pertencente ao pAK 100 (4200bp) e o menor (750bp) referente ao inserto *scFv*

O sequenciamento e análise da sequência traduzida proporcionaram a confirmação de que o produto amplificado é relativo à cadeia leve de imunoglobulina de camundongo (*Mus Musculus*), quando submetido a comparação no *Blastp*. Os aminoácidos iniciais correspondem ao domínio constante da cadeia leve tipo *Kappa* da sequência depositada no *GenBank* (AAT40963). Na figura 18 pode se observar o resultado obtido quando realizada a comparação de aminoácidos com auxílio do programa Mega 3.1, com análise no formato tipo NEXUS (PAUP 3.0/ Mac clade).

```
[!Domain=Data;]
Clone 32 DIVMTQAAFS NPVTLGTSAS ISCRSSKSL
AAT40963 .....

Clone 32 HSNIGITYSHW YLQRPQGSPQ LLIYRMSNLA
AAT40963 .....LY. ...K..... ...WQ..KV.

Clone 32 SGVPDRFSSS GSGT
AAT40963 .....GR ....
```

FIGURA 18. Alinhamento de aminoácidos realizado com o clone 32 e a sequência da cadeia leve de imunoglobulina de camundongo depositada no *GenBank*.

4.10.4. *Phage-ELISA* com os clones

Os clones 2 e 32 testados na reação de *Phage-ELISA* apresentaram uma maior afinidade quando a placa foi sensibilizada apenas com o CPV-2 purificado, como visualizado na Figura 19.

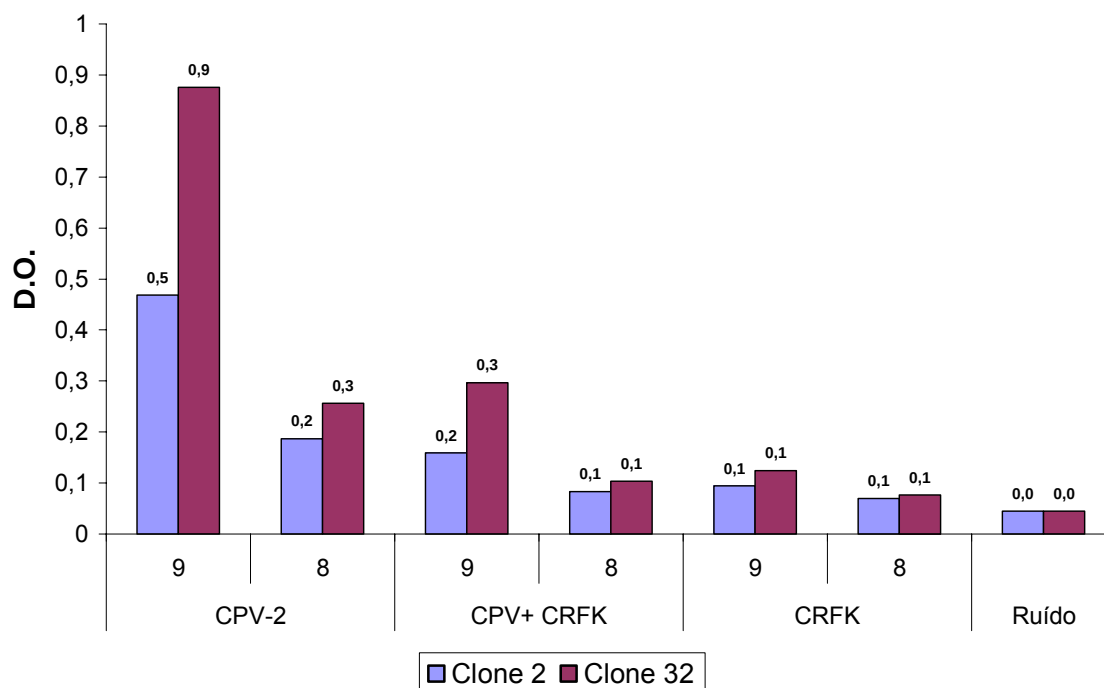


FIGURA 19. Gráfico da reação de *Phage-ELISA* com os clones 2 e 32. Duas concentrações diferentes de cada clone foram testadas (10^9 e 10^8), sendo testados com CPV-2 purificado, CPV em cultivo com a CRFK (CPV+CRFK) e apenas com CRFK. Por último, observa-se o ruído da reação.

5. Discussão

A apresentação em fagos de diversos peptídeos é uma metodologia em franco desenvolvimento. As melhorias nesta tecnologia fizeram da produção de biomoléculas funcionais uma das principais ferramentas em busca de alternativas terapêuticas, técnicas avançadas de diagnóstico e estudos de interações de proteínas. A produção de fragmentos funcionais de anticorpo é um dos destaques desta tecnologia, devido à diversidade de geração de peptídeos que se obtém e a possibilidade de seleção dos anticorpos de interesse. Para a realização deste projeto nós associamos os benefícios desta técnica a uma grande dificuldade ainda existente na Medicina Veterinária, que é a escassez de anticorpos específicos para os patógenos animais.

A escolha em se trabalhar com o CPV-2 (parvovírus canino tipo 2) ocorreu por diversos aspectos. Um deles diz respeito à capacidade mutagênica do vírus, hoje considerado um importante modelo de evolução viral, que é surpreendentemente grande, sendo a substituição de nucleotídeos similar a de alguns vírus RNA (Badget *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2003; Martella *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007). Diversas destas mutações ocasionaram importantes mudanças em aminoácidos, principalmente na proteína VP-2 do capsídeo viral, e geraram as novas variáveis antigênicas 2a, 2b e 2c (Truyen, 2006; Martella *et al.*, 2006). O desenvolvimento de painéis de anticorpos monoclonais é importante para a detecção destas mutações, já que muitas ocorrem justamente em sítios de reconhecimento de anticorpo (Yuan e Parrish, 2000). Além disso, o uso destes painéis pode ser realizado com técnicas simples como a inibição da hemaglutinação e o teste de neutralização viral. Com isso aventamos a possibilidade de se obter um painel de anticorpos monoclonais anti-CPV-2, a possibilidade do uso dos fragmentos de anticorpos no desenvolvimento de técnicas de imunodiagnóstico e com o uso em alternativas terapêuticas. Neste estudo buscamos a produção, por meio de um sistema de *Phage Display*, descrito por Krebber e colaboradores (1997), de fragmentos funcionais de anticorpo (scFv) contra o CPV-2.

Diversos autores têm descrito o uso da apresentação de anticorpos ou peptídeos em fagos contra agentes infecciosos virais veterinários. Recentemente, um estudo utilizando *Phage Display* produziu anticorpos fita simples (*scFv*) contra o vírus da Febre Aftosa (Foord *et al.*, 2007). Sapats e colaboradores (2003; 2005; 2006) já produziram sinteticamente fragmentos de anticorpos contra o vírus da Doença de Gumboro, e vêm conduzindo diversos estudos com esta técnica. Em um trabalho relacionado a um importante patógeno de aves, o vírus da Doença de Newcastle, Ozawa e colaboradores (2005) detectaram em uma biblioteca de peptídeos expressos em fagos, três clones ligantes ao vírus. No Brasil, Givisiez e colaboradores (2004) também utilizaram a apresentação de fagos para produção de *scFv* contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

Com relação ao CPV-2, até o presente momento não foram publicados trabalhos utilizando *Phage display*. Recentemente Nelson e colaboradores (2007) obtiveram fragmentos Fab, por digestão de anticorpos monoclonais com papaína e posterior purificação por cromatografia em gel. Os autores observaram diferenças no padrão de neutralização entre os fragmentos Fab, apesar de todos eles se ligarem ao mesmo local específico no capsídeo viral. As diferenças foram relacionadas a interações específicas entre o Fab e o capsídeo, e não apenas ao fato de ocorrer a ligação entre os dois. Em 2000, Yuan e Parrish expressaram e compararam dois fragmentos *scFv* provenientes de dois anticorpos monoclonais (Mab8 e Mab14) contra o CPV-2 em um vetor de expressão. Os autores observaram por ELISA e pelo teste de neutralização viral, que os *scFv* expressos se ligaram com a mesma especificidade, e ambos neutralizaram o CPV. A única diferença foi uma menor avidéz dos *scFv* observada pelo ELISA, porém essa diferença pode ser explicada pelo fato da IgG ser bivalente em comparação com o *scFv*. A inibição da hemaglutinação (HI) também foi testada sendo que um dos fragmentos não foi capaz de inibir em comparação aos anticorpos, provavelmente devido ao tamanho ou a valência do complexo de ligação.

Nós optamos por sintetizar uma biblioteca de *scFv* proveniente de camundongos imunizados com parvovírus. A opção por se obter uma “biblioteca imune” levou em consideração a possibilidade de se obter clones

específicos ao antígeno inoculado, já que anticorpos específicos estão enriquecidos e passam por um processo de maturação *in vivo* pelo sistema imune do animal. (Benhar, 2001; Willats, 2002). Para isto, foi necessário estabelecermos o cultivo em larga escala e purificação do CPV-2. A purificação deste foi realizada segundo publicado por Teramoto e colaboradores (1984). Nakamura e colaboradores (2003) produziram, com o uso da técnica de hibridoma, uma série de anticorpos monoclonais contra o parvovírus canino. Algumas estirpes de CPV-2 foram produzidas em cultivo celular e antes do processo de imunização realizaram purificação por ultracentrifugação. O processo de purificação para a imunização e obtenção de anticorpos específicos é descrita com outros agentes. Dai e colaboradores (2003) isolaram e purificaram o vírus da Síndrome de Manchas Brancas, para em seguida realizarem o processo de imunização. Outra forma de obtenção de proteínas é a expressão em vetores específicos, com subsequente purificação por cromatografia, que podem ser utilizados tanto para imunização como em seleção de bibliotecas não imunes (Suzuki *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007). Em nosso trabalho as análises de hemaglutinação com hemácias de suíno, PCR com *primers* específicos para o CPV-2, e a espectrofotometria demonstram a presença do CPV-2 nas frações obtidas durante o processo de purificação viral.

A linhagem de camundonos *High* seleção IV-A é considerada de bons produtores de anticorpos como descrito por Ibanez e colaboradores (1988). Um grande número de técnicas pode ser utilizado para averiguar se a imunização foi bem sucedida. Em nosso trabalho, optamos por realizar a inibição da hemaglutinação, uma técnica de simples realização, que nos mostrou uma resposta adequada. McCaw e Hoskins (2006) descrevem a inibição da hemaglutinação como uma boa técnica para se detectar a presença de anticorpos contra o CPV-2. A detecção de uma resposta adequada também pode ser realizada por ELISA (Givisiez *et al.*, 2004) e *dot blot* (Dai *et al.*, 2003).

A construção de nossa biblioteca de fagos gerou um número de $3,5 \times 10^2$ clones. No trabalho de Krebber e colaboradores (1997), os autores descreveram uma biblioteca de 6×10^6 clones obtidos de camundongo inoculado com ampicilina. Outros autores descrevem também um número em torno de

10^7 clones em sua biblioteca (Dai *et al.*, 2003; Sapats *et al.*, 2003; 2005; Foord *et al.*, 2007). O baixo rendimento da biblioteca inicial é um dos problemas mais comuns quando da realização de uma técnica de apresentação em anticorpos (Russel *et al.*, 2004). Brígido e Maranhão (2002), relatam que dentre as estratégias para se ter uma biblioteca inicial igual ou superior ao repertório imune (cerca de 10^7 clones), se destacam a melhor eficiência de transformação e de amplificação dos genes variáveis de anticorpos. O *set* de *primers* proposto por Krebber e colaboradores (1997), e utilizado por nós, é capaz de amplificar todas as seqüências V_H , V_λ e V_κ de camundongo, descritas no Kabat *data base*. A amplificação dos fragmentos da cadeia leve e pesada teve um resultado satisfatório (Figura 7), em todas as reações foi obtido uma quantidade adequada de produto, quando analisado comparativamente, em gel de agarose. Já Deng e colaboradores (2003), que empregaram o mesmo sistema (pAK 100) relataram problemas, tendo que utilizar toda a reação de cDNA para a obtenção de produto de PCR suficiente para continuidade do protocolo. As reações de SOE-PCR realizadas também foram bem sucedidas. Um problema observado, e que pode ter contribuído para o pequeno número de clones gerados em nossa biblioteca, foram as duas etapas de purificação, antes e após a digestão. Mesmo em várias tentativas, a quantidade de DNA observada após as purificações era pequena (5-10 ng/ μ l). Diversas alternativas foram testadas, desde protocolos de precipitação e outros *kits* comerciais, mas sempre com resultado semelhante. A alternativa encontrada por Deng e colaboradores (2003), descrita no item 3.6.3, consistiu na realização de um *pool* de reações, que foram precipitadas e em seguidas ressuspendidas em um único tubo. Mesmo com esse procedimento, uma recuperação inferior a 90% do valor indicado no kit de purificação foi observada. Assim uma baixa quantidade de DNA pode ter interferido na eficiência da transformação realizada ou mesmo a eletroporação não ter sido eficiente, gerando um pequeno número de colônias transformantes.

Outro fator interessante observado em algumas etapas foi o tempo de crescimento da *E.coli* XL-1 blue (Stratagene®) após plaqueamento. Diversos autores descrevem o procedimento de coleta das colônias para armazenamento após um período de crescimento *overnight* em temperatura

ambiente (Krebber *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 2003). Em nosso estudo a visualização das colônias em temperatura ambiente ocorreu após um período mínimo de 48 horas. A possível inconstância de temperatura em nosso ambiente não climatizado foi aventada e testamos o crescimento em estufa com três temperaturas diferentes: 22, 25 e 28 °C. Apenas nesta última o crescimento foi um pouco mais rápido (cerca 36 horas). Foord e colaboradores (2007), apesar de utilizarem um sistema diferente de *Phage display* também observaram crescimento adequado da mesma cepa (*E.coli* XL-1 blue) à 30°C. Outros autores também relataram crescimento a esta temperatura, porém com cepas diferentes de *E.coli* (Sapats *et al.*, 2006).

Após a padronização o *Phage – ELISA* evidenciou qual grupo de fagos havia sido mais eficiente após o terceiro *panning*. Os fagos do grupo P-3C foram então escolhidos e submetidos a um *screening* por *Phage-ELISA* e em seguida por PCR. Da seleção realizada com o primeiro foi possível a escolha de 10 clones com uma maior densidade ótica. Porém quando se amplificou os clones foi observado que todos eles apresentaram um tamanho não esperado de inserto (cerca de 2000bp, quando o esperado era de cerca de 800bp) além do resultado do *Phage- ELISA* com o fagos expressos a partir desses clones não foram satisfatórios apresentando baixos valores de densidade ótica. Com isso optou-se pela seleção dos clones com a PCR descrita a partir de 50 colônias escolhidas aleatoriamente.

Foi observada então a amplificação de dois clones, com o tamanho da banda esperada. O resultado do sequenciamento foi adequado para o clone (32), sendo que a sequencia do clone 2 apresentou um *background*, e mesmo obtendo um pequeno trecho de seqüência que foi compatível com a cadeia leve de imunoglobulina, optamos por não analisá-la. A sequência do clone 32, apresentou similaridade a uma sequencia de anticorpo monoclonal depositada no *GenBank* (Figura 16). Nesta reação também foram observados produtos com tamanho não condizente ao esperado, possivelmente os mesmos da primeira reação, sendo que estes também serão sequenciados para que seja possível uma identificação. A porcentagem de clones específicos para o CPV-2 obtidos a partir de colônias escolhidas aleatoriamente (4%), foi inferior ao demonstrado por Foord e colaboradores (2007), que após 4 ciclos de *panning*

obteve 33 clones em 96 colônias (34,3%) testadas por ELISA. Sapats e colaboradores (2003) observaram 210 clones de um total de 300 testados. Em outro trabalho, Sapats e colaboradores (2006) testaram 400 clones, encontrando 48,5% de ligantes ao antígeno inoculado. Em ambos os trabalhos, os autores realizaram 3 ciclos de *panning*. Dai e colaboradores (2003) detectaram 40% de colônias positivas por ELISA após ter realizado 3 seleções com o antígeno viral. Apesar de serem diferentes sistemas de expressão, e termos realizado o teste *screening* por PCR, a maior diferença observada entre o nosso estudo e os acima citados foi o rendimento da biblioteca inicialmente alcançados.

Os estudos envolvendo o emprego de anticorpos apresentados em bacteriófagos vêm ganhando destaque a cada dia, e abrange diversas áreas da ciência. A possibilidade em se obter biomoléculas com certa facilidade, no que diz respeito à realização da técnica, impulsiona diversos estudos. Alternativas terapêuticas com o uso destas moléculas têm grande perspectiva, e fazem parte de diversos estudos (mais de 300 programas atualmente) (Filpula, 2007; Marasco e Sui, 2007). O fato de um fragmento de anticorpo (*scFv*) expresso em bacteriófago ser recombinado para o formato de uma IgG1k humana e ser aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em terapia anti-reumática, levou a uma validação das tecnologias de apresentação em fago (Filpula, 2007). Os maiores avanços nos mecanismos de neutralização viral, inclusive relativos ao CPV-2, levam a crer que a terapia com anticorpos monoclonais recombinados provenientes de técnicas de apresentação como o *Phage display*, também possa alcançar uma realidade buscada. A utilização destes fragmentos tem outras indicações como o mapeamento de epítomos, avanços nas tecnologias de produção de vacinas, o *screening* de receptores celulares, também são importantes linhas de pesquisa com a metodologia. Além disso, atualmente o conhecimento da farmacocinética dos fragmentos *scFv* está bem avançada. Vias de administração e de eliminação, e melhorias na resistência dessas proteínas no organismo estão sendo bem definidas. Os avanços na Medicina Humana podem ser estendidos para a Medicina Veterinária, que ainda apresenta, por exemplo, carência de anticorpos

específicos para determinados agentes microbiológicos e proteínas diversas, o que é um fator limitante para o desenvolvimento de pesquisas.

Essas probabilidades de evolução na pesquisa de anticorpos recombinantes nos levou a produção de clones de *scFv* expressos em fagos. Alguns passos serão ainda buscados, como a expressão destes fragmentos de forma solúvel, a utilização deste em algumas técnicas de imunodiagnóstico e futuramente terapia específica para o CPV-2

Frente a essas observações a realização deste estudo visou a produção de clones específicos de fragmentos de anticorpo anti-CPV-2, obtendo 2 clones com fenótipo e genótipo característicos.

6. Conclusão

A técnica de *Phage Display* realizada com base no fagomídeo pAK100 foi empregada com sucesso para a expressão de 2 fragmentos de anticorpos contra o Parvovírus canino-2.

7. Referências bibliográficas

Appel MJG, Cooper BJ, Greisen H, Carmichael LE. Status of canine viral enteritis. J Am Vet Med Assoc. 1978; 173: 1516-8.

Badgett MR, Auer A, Carmichael LE, Parrish CR, Bull JJ. Evolutionary dynamics of viral attenuation. J Virology. 2002; 76: 10524-9.

Benhar I. Biotechnological applications of phage and cell display. Biotech Adv. 2001; 19: 1-33.

Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, Kajima M. Recovery and characterization of a minute virus of canides. Infect Immun. 1970; 1: 503-8.

Bourtonboy G, Coignoul F, Delferriere N, Patoret, PP. Canine hemorrhagic enteritis: detection of viral particles by electron microscopy. Arch Virol. 1979; 61: 1-11.

Brekke OH, Loset GA. New technologies in therapeutic antibody development. Curr Opin Pharmacol. 2003, 3: 544-50.

Brígido MM, Maranhão AQ. Bibliotecas apresentadas em fagos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 2002; 26: 44-51

Brissette R, Goldstein NI. The use of phage display peptide libraries for basic and translational research. Methods Mol Biol. 2007; 383: 203-13.

Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. J Gen Virol. 2001; 82: 3021-5.

Carmen S, Jermutus L. Concepts in antibody phage display. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2002; 1: 189-203.

Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RVH. A modified live canine parvovirus strain with novel plaque characteristics. I. Viral attenuation and dog response. *Cornell Vet*. 1981; 71: 408-27.

Carmichael LE. An annotated historical account of canine parvovirus. *J Vet Med*. 2005; 52: 303-11.

Chapman MS, Rossman MG. Structure, sequence and function correlations among parvoviruses. *Virology*. 1993; 194: 491-508.

Chasteen L, Ayriss J, Pavlik P, Bradbury ARM. Eliminating helper phage from phage display. *Nucl Ac Res*. 2006; 34:1-11.

Christensen J, Storgaard T, Viuff B, Aasted B, Alexandersen S. Comparison of promoter activity in aleutian mink disease parvovirus, minute virus of mice and canine parvovirus: possible role of weak promoters in the pathogenesis of aleutian mink disease parvovirus. *J Virol*. 1993; 67: 1877-86.

Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*. 1991; 352: 624-8.

Costa AP, Leite JPG, Labarthe NV, Cubel Garcia RCN. Genomic typing of canine parvovirus circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 using polymerase chain reaction assay. *Vet Res Com*. 2005; 29: 735-43.

Dai H, Gao H, Zhao X, Dai L, Zhang X, Xiao N, et al. Construction and characterization of a novel recombinant single-chain variable fragment antibody against White Spot Syndrome Virus from shrimp. *J Immunol Methods*. 2003; 279: 267-75.

Decaro N, Campolo M, Desario C, Elia G, Martella V, Lorusso E, et al. Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals*. 2005; 33: 261-7.

Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira MJ, Elia G, et al. The study molecular epidemiology of canine parvovirus. *Europe Emerg Infect Dis*. 2007; 13: 1222-4.

Deng XK, Nesbit LA, John Morrow Jr. K. Recombinant single-chain variable fragment antibodies directed against *Clostridium difficile* toxin B produced by use of an optimized phage display system. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003; 10: 587-95.

Elia G, Cavalli A, Cirone F, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia D, et al. Antibody levels and protection to canine parvovirus type 2. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005; 52: 320-2.

Eugster AK, Bendele RA, Jones LP. Parvovirus infections in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1978; 173: 1340-1.

Filpula D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomol Engineering*. 2007; 24: 201-15.

Foord AJ, Muller JD, Yu M, Wang LF, Heine HG. Production and application of recombinant antibodies to foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3ABC. *J Immunol Methods*. 2007; 321: 142-51.

Givisiez PEN, Caetano AG, Furuyama CRAG, Montassier HJ. Expressão de anticorpos monoclonais em fagomídeos contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas pela técnica de Phage Display. *Arq Inst Biol*. 2004; 71: 502-5.

Hagiwara MK, July JR, Baccaro MR, Angelo MJO. Enterite hemorrágica em cães associada à infecção por um parvovírus. Arq. Inst. Biol. São Paulo. 1980, 47: 47-9.

Hong C, Decaro N, Desario C, Tanner P, Pardo MC, Sanchez S, et al. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. J Vet Diagn Invest. 2007; 19: 535-9.

Hoskins J. Canine viral enteritis. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998. p. 40-9.

Hoskins J. Canine viral diseases. In: Ettinger SJ, Feldman EC. Textbook of Veterinary Internal Medicine. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2002. p. 418-23.

Ibanez OM, Mouton D, Oliveira SL, Ribeiro Filho OG, Piatti RM, Sant'Anna AO, et al. Polygenic controlo f quantitative antibody responsiveness: restrictions of the multispecific effect related to the selection antigen. Immunogenetics. 1988; 28: 6-12.

Karber G. 50% end-point calculation. Arch Exp Pathol Pharmacol, 1931, 162: 480-3.

Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, et al. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. J Immunol Methods 1997; 201: 35-55.

Kretzschmar T, Von Rüden T. Antibody discovery: phage display. Curr Opin Biotechnol. 2002; 13: 598-602.

Llamas-Saiz AL, Agbandje-Mckenna M, Parker JSL, Wahid ATM, Parrish CR, Rossman MG. Structural analysis of a mutation in canine parvovirus which controls antigenicity and host range. *Virology*. 1996; 225: 65-71.

López de Turiso JA, Cortes E, Ranz A, Garcia J, Sanz A, Vela C, et al. Fine mapping of canine parvovirus B cell epitopes. *J Gen Virol*. 1991; 72: 2445-56.

Macartney L, McCandlish IAP, Thompson H, Cornwell HJC. Canine parvovirus enteritis 3: scanning electron microscopical features of experimental infection. *Vet Rec*. 1984; 115: 533-7.

McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990; 348: 552-4.

Mccaw DL, Hoskins JD. Canine viral enteritis. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2006. p. 63-73.

Marasco WA, Sui J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nature Biotechnol*. 2007; 25: 1421-33.

Martella V, Decaro N, Elia G, Buonavoglia C. Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005 Sep-Oct;52(7-8):312-5.

Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. Evolution of CPV-2 and importance for antigenic/genetic characterization. *Virus genes*. 2006; 33: 11-3.

Meunier PC, Cooper BJ, Appel, MJG, Slauson DO. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. *Vet Pathol.* 1985; 22: 617-24.

Murphy FA, Taura Y, Une S, Yoshitake M, Nakama S, Watanabe S. Changes in blastogenic responses of lymphocytes and delayed type hypersensitivity responses after vaccinations in dogs. *J Vet Med Sci.* 1995; 54: 945-50.

Nakamura M, Nakamura K, Miyazawa T, Tohya Y, Mochizuki M, Akashi H. Monoclonal antibodies that distinguish antigenic variants of canine parvovirus. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10: 1085-9.

Nelson CDS, Palermo LM, Hafenstein SL, Parrish CR. Different mechanisms of antibody-mediated neutralization of parvoviruses revealed using the Fab fragments of monoclonal antibodies. *Virology.* 2007; 361: 283-93.

Ozawa M, Ohashi K, Onuma M. Identification and characterization of peptides binding to Newcastle disease virus by Phage Display. *J Vet Med Sci.* 2005; 67: 1237-41.

Parrish CR, Oliver RE, McNiven R. Canine parvovirus infections in a colony of dogs. *Vet Microbiol.* 1982, 7: 317-24.

Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammed HO. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virology.* 1991; 65:6544-6552.

Paschke M. Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 70: 2-11.

Pereira CA, Monezi TA, Mehnert DU, D'Angelo M, Durigon EL. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol.* 2000; 75: 127-33.

Pereira CA, Leal ES, Durigon EL. Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus. *Infect Genet Evol.* 2007; 7: 399-409.

Pérez R, Francia L, Romero V, Maya L, López I, Hernández M. First detection of canine parvovirus type 2c in South América. *Vet Microbiol.* 2007; 124: 147-52.

Pollock RVH. Experimental canine parvoviral infection in dogs. *Cornell Vet.* 1982; 72: 103-19.

Pollock RV, Carmichael LE. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *J Am Vet Med Assoc.* 1982; 180: 37-42.

Robinson WF, Wilcox GE, Flower RLP, Smith JR. Evidence of a Parvovirus as the etiological agent in myocarditis in puppies. *Aust Vet. J* 1979; 55: 294-5.

Robinson WF, Wilcox GE, Flower RLP. Canine parvoviral disease: experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. *Vet Pathol.* 1980; 17: 589-99.

Russel M, Lowman HB, Clackson T. Introduction to phage biology and phage display. In: Clackson T, Lowman HB, editors. *Phage display: a practical approach.* Oxford: Oxford University Press; 2004. p. 1-26.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd ed. New York: CSHL Press, 2001.

Sapats SI, Heine HG, Trinidad L, Gould GJ, Foord AJ, Doolan SG, et al. Generation of chicken single chain antibody variable fragments (scFv) that

differentiate and neutralize infectious bursal disease virus (IBDV). Arch Virol. 2003;148: 497-515.

Sapats S, Gould G, Trinidad L, Parede LH, David C, Ignjatovic J. An ELISA for detection of infectious bursal disease virus and differentiation of very virulent strains based on single chain recombinant chicken antibodies. Avian Pathol. 2005; 34: 449-55.

Sapats SI, Trinidad L, Gould G, Heine HG, van den Berg TP, Eterradosi N, et al. Chicken recombinant antibodies specific for very virulent infectious bursal disease virus. Arch Virol. 2006; 151: 1551-66.

Schmitz U, Versmold A, Kauffmann P, Frank H-G. Phage display: A molecular tool for the generation of antibodies - A review. Placenta. 2000; 21: 106-12.

Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science. 1985a, 228: 1315-1317.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985b, 150: 76-85.

Steinel A, Parrish CR, Bloom ME, Truyen U. Parvovirus infections in wild carnivores. J Wildl Dis. 2001; 37: 594-607.

Strassheim ML, Gruenberg A, Veijalainen P, Sgro JY, Parrish, C. Two dominant neutralizing determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. Virology. 1994; 198: 175-84.

Suzuki K, Akahori Y, Asano Y, Kurosawa Y, Shiraki K. Isolation of therapeutic human monoclonal antibodies for varicella-zoster virus and the effect of Light chains on the neutralizing activity. J Med Virol. 2007; 79: 852-62.

Teramoto YA, Mildbrand MM, Carlson J, Collins JK, Winston S. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, DNA hybridization, hemagglutination and electron microscopy for detection of canine parvovirus infections. *J Clin Microbiol.* 1984; 20: 373-8.

Truyen U. Evolution of canine parvovirus – A need for new vaccines? *Vet Microbiol.* 2006; 117: 9-13.

Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, et al. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science.* 1991; 251: 1454-64.

Williams JV, Chen Z, Cseke G, Wright DW, Keefer CJ, Tollefson SJ, et al. A recombinant human monoclonal antibody to human metapneumovirus fusion protein that neutralizes virus in vitro and is effective therapeutically in vivo. *J Virol.* 2007; 81: 8315-24.

Willats WGT. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molec Biol.* 2002; 50: 837-54.

Wikkoff WR, Wang G, Parrish CR, Cheng RH, Strassheim ML, Baker TS, et al. The structure of a neutralized virus: canine parvovirus complexed with neutralizing antibody fragment. *Structure.* 1994; 2: 595-607.

Yuan W, Parrish CR. Comparison of two-chain antibodies that neutralize canine parvovirus: analysis of an antibody-combining site and mechanisms of neutralization. *Virology.* 2000; 269: 471-80.

ANEXO I

Oligonucleotídeos (“primers”) utilizados para a amplificação da cadeia leve (VL) e pesada (VH) da região variável dos anticorpos

Sequência dos primers que constituem o pool que cadeia leve (reverse):

- LB1 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATC Cag CTg ACT CAg CC 3'
- LB2 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT gTT CTC WCC CAg TC 3'
- LB3 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT gTg MTM ACT CAg TC 3'
- LB4 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT gTg YTR ACA CAg TC 3'
- LB5 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT gTR ATg ACM CAg TC 3'
- LB6 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT MAg ATR AMC CAg TC 3'
- LB7 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT CAg ATg AYD CAg TC 3'
- LB8 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATY CAg ATg ACA CAg AC 3'
- LB9 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT gTT CTC AWC CAg TC 3'
- LB10 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT gWg CTS ACC CAA TC 3'
- LB11 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT STR ATg ACC CAR TC 3'
- LB12 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY RTT KTg ATg ACC CAR AC 3'
- LB13 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT gTg ATg ACB CAg KC 3'
- LB14 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT gTg ATA ACY CAg gA 3'
- LB15 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT gTg ATg ACC CAg WT 3'
- LB16 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT gTg ATg ACA CAA CC 3'
- LB17 – 5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAY ATT TTg CTg ACT CAg TC 3'
- LBλ -5' gCC ATg gCg gAC TAC AAA gAT gCT gTT gTg ACT CAg gAA TC 3'

Seqüência dos *primers* que constituem o *pool* que amplificam a cadeia leve forward:

LF1- 5' ggA gCC gCC gCC gCC AgA ACC ACC ACC ACC AgA ACC ACC ACC ACC ACg TTT gAT TTC CAg CTT gg 3'

LF2- 5' ggA gCC gCC gCC gCC AgA ACC ACC ACC ACC AgA ACC ACC ACC ACC ACg TTT TAT TTC CAg CTT gg 3'

LF4 – 5' ggA gCC gCC gCC gCC AgA ACC ACC ACC ACC AgA ACC ACC ACC ACC ACg TTT TAT TTC CAA CTT Tg 3'

LF5 – 5' ggA gCC gCC gCC gCC AgA ACC ACC ACC ACC AgA ACC ACC ACC ACC ACg TTT CAg CTC CAg CTT gg 3'

LF λ - 5' ggA gCC gCC gCC gCC AgA ACC ACC ACC ACC AgA ACC ACC ACC ACC ACg TAg gAC AgT CAg TTT gg 3'

Seqüência dos *primers* que constituem o *pool* que amplificam a cadeia pesada reverse:

HB1 – 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAK gTR MAg CTT CAg gAg TC 3'

HB2 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAg gTB CAg CTB CAg CAg TC 3'

HB3 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC CAg gTg CAg CTg AAg SAS TC 3'

HB4 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAg gTC CAR CTg CAA CAR TC 3'

HB5 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC CAg gTY CAg CTB CAg CAR TC 3'

HB6 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC CAg gTY CAR CTg CAg CAg TC 3'

HB7 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC CAg gTC CAC gTg AAg CAg TC 3'

HB8 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAg gTg AAS STg gTg gAA TC 3'

HB9 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAV gTg AWg YTg gTg gAg TC 3'

HB10 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAg gTg CAg SKg
gTg gAg TC 3'

HB11 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAK gTg CAM CTg
gTg gAg TC 3'

HB12 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAg gTg AAg CTg
ATg gAR TC 3'

HB13 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAg gTg CAR CTT
gTT gAg TC 3'

HB14 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAR gTR AAg CTT
CTC gAg TC 3'

HB15 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAA gTg AAR STT
gAg gAg TC 3'

HB16 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC CAg gTT ACT CTR
AAA gWg TST g 3'

HB17 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC CAC CTC CAA CTV
CAg CAR CC 3'

HB18 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAT gTg AAC TTg
gAA gTg TC 3'

HB19 - 5' ggC ggC ggC ggC TCC ggT ggT ggT ggA TCC gAg gTg AAg gTC
ATC gAg TC 3'

Seqüência dos *primers* que constituem o *pool* que amplificam a cadeia pesada forward:

HF1 – 5' ggA ATT Cgg CCC CCg Agg CCg Agg AAA Cgg TgA CCg Tgg T 3'

HF2 - 5' ggA ATT Cgg CCC CCg Agg CCg Agg AgA CTg TgA gAg Tgg T 3'

HF3 - 5' ggA ATT Cgg CCC CCg Agg CCg CAg AgA CAg TgA CCA gAg T 3'

HF4 - 5' ggA ATT Cgg CCC CCg Agg CCg Agg AgA Cgg TgA CTg Agg T 3'