



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Produção de *Virus Like Particles* de Norovírus GII.4
para seleção de anticorpos monoclonais humanos a
partir de biblioteca apresentada em fagos**

Thaís Alves da Costa Lamounier

Orientador: Prof. PhD. Tatsuya Nagata

Co-Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Brasília, 2013

**Produção de *Virus Like Particles* de Norovírus GII.4
para seleção de anticorpos monoclonais humanos a
partir de biblioteca apresentada em fagos**

Thaís Alves da Costa Lamounier

Orientador: Prof. PhD. Tatsuya Nagata

Co-Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Tese apresentada ao Departamento de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de Doutora em Patologia Molecular.

Brasília, 2013



**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Tese de Doutorado de autoria de Thaís Alves da Costa Lamounier, intitulada “**Produção de *Virus Like Particles* de Norovírus GII.4 para seleção de anticorpos monoclonais humanos a partir de biblioteca apresentada em fagos**” apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em 29 de julho de 2013, aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Banca Examinadora:

Presidente: Prof. PhD. Tatsuya Nagata - UnB

Avaliadora Externa: Profª. PhD. Virgínia Carla de Oliveira- UFT

Avaliadora Externa: Profª. PhD. Paula Andréia Silva – UCB

Avaliadora Interna: Profª. PhD. Anamélia Lorenzetti Bocca – UnB

Avaliador Interno: Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares- UnB

Suplente: Dr. Cícero Nicolini - UnB

Dedico essa Tese ao meu Senhor Jesus Cristo, amigo, companheiro e PAI. Senhor obrigada por me fortalecer a cada dia e eu te louvo pelas minhas vitórias.

Aos meus amados e eternos José Afonso, Marlene, Cristiane, Tatiane, Caio Alexandre e Maria Joana e aos meus companheiros Michel, Lucas e Luana.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Tatsuya Nagata, por sua competência e inteligência. Muito obrigada pelos ensinamentos em Biologia Molecular e pelos vários momentos de compreensão. A minha admiração pelo senhor estará comigo aonde eu for.

À minha co-orientadora Andréa Maranhão, por sua disponibilidade, paciência e carinho. A cada encontro eu me sentia mais segura com os seus ensinamentos e não vou me esquecer da sua força e incentivo.

Ao professor Bergmann por me atender em todos os momentos em que necessitei.

À professora Anamélia que me apoiou tanto no Mestrado como neste momento importante da minha vida.

Aos meus queridos amigos de Laboratório que me acompanharam nesta caminhada com contribuições pessoais e intelectuais. Em especial a minha companheira de todas as horas Karoline dos Anjos. O seu sobrenome faz jus à pessoa iluminada que você é. Um anjinho que conheci ainda com asas pequenas e que hoje voa tão longe que não é possível determinar até aonde poderá chegar.

À Franciele Maldaner, você me inspirou, pois no início de tudo só achei que seria possível ao ver o seu trabalho e dedicação.

À Kelly Barreto, querida, com toda sua paciência e carinho sempre está pronta a ajudar. Obrigada por cada sorriso.

À Ana Cláudia, companheira de Doutorado. Juntas iniciamos esse trajeto em nossas vidas e aqui estamos. Aninha, você é muito especial.

À Raquel Vasques Bonnet. Bá, tu és maravilha! Chegou de mansinho com esse seu jeitinho que me conquistou. Uma amiga que quero para sempre.

Ao Dr. Cícero Nicolini que me ensinou muito com a sua postura íntegra e reservada. Mais vale ouvir do que falar, pois precisamos ser assertivos naquilo que dizemos.

Ao Dr. Câmara Filho pelos ótimos momentos e por todo o apoio. Você tem um potencial enorme e cada conquista sua também minha também será.

À Bruna, Layssa e Rayssa, por compartilhar a bancada e projeto. Parabéns pela dedicação continuem na caminhada e buscando os seus objetivos. Que Deus as abençoe!

Ao Daniel Ardisson, você é um ser humano incrível que além da inteligência consegue colocar em prática a vivência de ser cristão. Obrigada por me ajudar e pela torcida.

Ao André Bertran, obrigada pelo apoio e saiba que admiro demais sua inteligência e os seus dons artísticos. O seu futuro com a minha amiga será brilhante!

À Dra. Virgínia Carla de Oliveira, humana, dedicada, sorridente e sempre disposta a ajudar. Muito obrigada e lhe desejo todo o sucesso na sua nova caminhada, pois, você merece.

Ao grupo de pesquisa da Dra. Sônia Bao, pela presteza na utilização do MET.

À Brenda pelo carinho no momento da cromatografia.

À Fabiana Nunes de Carvalho, obrigada por TUDO, você entende que o meu carinho e gratidão serão eternos, não apenas por essa conquista, mas pelos anos que passamos juntas.

Ao Dr. Ricardo Spindola, que me inspira na vida acadêmica.

Aos queridos Flávia Ikeda, Fábio de França e Maria Clara. Vocês são abençoados e acompanham a minha caminhada. Obrigada por todo o incentivo e ajuda.

Aos amigos da Biomedicina, Douglas, Juliana, Simone e Wislon. Muito obrigada pela ajuda no momento mais complicado da minha vida e vocês estiveram lá sempre dispostos e de coração.

À amada Lídia Maria Pinto de Lima. Costumo dizer que tudo isso foi possível por você! Lembro-me como hoje de nós duas conversando no auditório da Universidade Católica e eu mencionei que a minha vontade era fazer Doutorado. Mais do que

depressa você me apresentou ao Prof. Tatsuya e iniciamos o nosso caminho. Muito, mas muito obrigada por cada telefonema, palavra de conforto e por seu carinho.

À Dra. Paula Andréia pela força e pelo sorriso de incentivo a cada momento que eu falava sobre o projeto. Obrigada por tudo.

À Ruth Losada, companheira de batalhas e incentivadora das minhas conquistas.

Ao meu herói, guerreiro e amigo. Meu PAI! Lembro-me do dia que fiz uma oração para que eu pudesse terminar os meus estudos e passar no vestibular para poder lhe proporcionar esta alegria. Hoje estamos juntos no aqui e agora. Somos amados por Deus e eternos no amor. Para sempre as minhas conquistas serão suas.

Mamãe foi naquele dia em que eu estava muito mal descobri que a senhora é a minha Maria aqui na Terra. Obrigada mãe por tanto amor e carinho, você hoje é a minha melhor amiga e companheira. Obrigada por cada oração e dedico a minha vida à Senhora.

À minha irmã Cristiane, pelo infinito apoio. Você torce por mim como uma mãe. Obrigada por me presentear com o docinho mais gostoso da minha vida: Maria Joana. A madrinha te deseja toda a felicidade do mundo!

À minha irmã Tatiane que nos momentos difíceis sempre está ao meu lado. Você também me concedeu um presente divino: Caio Alexandre. A tia deseja que você busque os seus ideais e nunca se esqueça do que eu te digo: você só irá conquista-los com os estudos.

Aos meus enteados Lucas e Luana pelo simples fato de fazerem parte da minha vida. Luana não sei por que, mas acredito que um dia estarei na defesa do seu Doutorado.

Ao meu amor, companheiro e amigo Michel. Você é o homem de Deus sonhado e esperado. Obrigada por me fazer acreditar que tudo vale a pena e que juntos sempre alcançaremos o que for da vontade de Deus.

Amo cada um de vocês. Com muito carinho OBRIGADA!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE TABELAS	XVI
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	XVII
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Norovírus: Aspectos Epidemiológicos e Patológicos	1
1.2 – Estrutura genômica dos Norovírus.....	5
1.3 - <i>Virus Like Particles</i> de Norovírus	7
1.4 – Produção de VLP de NV pelo sistema de baculovírus	8
1.5 - Fatores imunológicos das VLPs.....	10
1.6 – Estrutura dos anticorpos.....	13
1.7 – Seleção de anticorpos monoclonais humanos por <i>Phage Display</i>	17
1.7.1 - Fagos filamentosos.....	19
1.7.2 – Fagomídeos	19
1.7.3 – Utilização de Bibliotecas de anticorpos.....	20
1.8 - Antigenicidade dos Norovírus	21
1.9 – Diagnóstico dos Norovírus	23
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27

3.1 - Extração de RNA	27
3.2 - Transcrição Reversa	28
3.3 - Amplificação gênica	28
3.4 - Preparo das células eletrocompetentes DH5 α	30
3.5 - Transformação em <i>E.coli</i> DH5 α	31
3.6 - Subclonagem em pFASTBac1	32
3.7 - Preparo das células termocompetentes DH10Bac.....	32
3.8 - Transformação em DH10Bac e Sistema Bac-to-Bac.....	34
3.9 - Confirmação dos bacmídeos	35
3.10 - Transfecção em células de inseto	36
3.11 - Cinética de proteínas.....	37
3.12 - Multiplicidade de Infecção (MOI).....	38
3.13 - Purificação da VLP com Cloreto de Césio (CsCl) e por <i>Íon Exchange</i>	39
3.13.1 – Cloreto de Césio	40
3.13.2 – Cromatografia por troca iônica	41
3.14 - Quantificação da proteína.....	42
3.15 - SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i>	43
3.16 - Visualização das VLPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	44
3.17 - Imunização de Ratos	44
3.18 - <i>Phage Display</i>	45
3.18.1 - Preparação de células XL1-Blue eletrocompetentes.....	47

3.18.2	- Teste de eficiência da célula XL1-Blue.....	48
3.18.3	- Preparação do Fago Auxiliar (adaptado de Rader et al., 2000).	48
3.18.4	- Amplificação das placas de lise	49
3.18.5	- Determinação do título da preparação de fagos auxiliares	50
3.18.6	- Reamplificação da Biblioteca	50
3.18.7	- Seleção da Biblioteca de Fab utilizando VLP de Norovírus como antígeno	51
3.18.8	- Preparo para os cálculos dos títulos de entrada e saída dos fagos	54
3.18.8.1	- Título de Entrada.....	54
3.18.8.2	- Título de Saída	54
3.18.9	- Análise de clones individuais por <i>Phage</i> ELISA.....	55
3.18.10	- Miniprep clones selecionados	56
3.18.11	- Análise dos clones selecionados com a enzima de restrição <i>Sfi I</i>	57
3.18.12	- Análise dos clones selecionados com a enzima de restrição <i>BstO I</i>	57
4.	RESULTADOS.....	58
5.	DISCUSSÃO.....	75
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	85
7.	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	86
8.	ANEXOS	99

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo do genoma viral do NV humano. Adaptado de TAN & JIANG (2012) e KARST (2010)..... 6
- Figura 2.** Esquema representativo da molécula de anticorpo. Adaptado: Invitrogen™ (Antibody Structure and Classification)..... 14
- Figura 3.** Sistema Bac-to-Bac de expressão. Figura representativa da transformação de bactérias DH10Bac que possuem o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de bacmídeo, o plasmídeo pFASTBac1 e o inserto de interesse (1). A transposição (2) permite a inserção do gene selecionado no bacmídeo que posteriormente é selecionado pelo antibiótico canamicina, seguido da extração do DNA do bacmídeo (3). Transfecção do bacmídeo nas células de inseto (4). Pode ser realizada a titulação viral para infectar novas células e a posterior produção da proteína recombinante (5). Fonte: Bac-to-bac Baculovirus Expression System Manual – Invitrogen™ 34
- Figura 4.** Representação esquemática do PCR de fusão dos 3 ciclos para a obtenção do Fab e posterior clonagem em pComb3XSS. Tamanho esperado entre 1500 a 1600 pb. 45
- Figura 5.** Representação esquemática do vetor pComb3XSS. Este vetor possui cerca de 4,5 kb e os promotores *plac*, *ori ColE1*, *ori fl*, *Ap^R*. Imediatamente após a região de clonagem do gene do anticorpo, uma região com seis histidinas (H6) pode ser utilizada para purificação em coluna de níquel ou para detecção com anticorpo monoclonal anti-His Tag. Uma outra região codificando os resíduos que constituem o epítipo de hemaglutinina (HA) possibilitam a detecção do Fab com a utilização de um anticorpo anti-hemaglutinina. A presença do códon (TAG) não reconhecido eficientemente por linhagens supressoras (Sup E44), como por exemplo, a XL 1 – Blue ou TG1, permite a expressão de proteínas de fusão ou a produção do anticorpo livre da proteína III, na forma solúvel, em algumas linhagens bacterianas não supressoras (HB2151). A sequência codificadora para parte da proteína III de bacteriófagos filamentosos (aminoácidos 230 a 406) também é constituinte do plasmídeo (SCOTT & BARBAS, 2000). 46
- Figura 6.** Ciclos do *Phage Display*. Uma população de fagos exibindo proteínas-alvo

na sua superfície, no caso Fabs e expostos a uma molécula alvo (VLP de NV). Após a seleção por afinidade, os fagos com maior ligação são eluídos e amplificados. No último ciclo os anticorpos monoclonais expostos nos fagos que obtiveram maior afinidade serão analisados. Adaptado de TERSTAPPEN et al. (2007). 47

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1%. Poço 1 – marcador 1 Kb Plus Ladder™ (Invitrogen™); poço 2 – fragmento de PCR de NoroII/4 *BamH I* For e M10 *Sac Pst I* Rev. 58

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando no poço 1 o marcador 1 Kb Plus Ladder™ (Invitrogen™); no poços 2 e 3 os fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pGEM-T Easy (Promega®) com a enzima *EcoR I* e o poço 4 não foi considerado como clone positivo por não apresentar o perfil de digestão esperado. 59

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando no poço 1 o marcador 1 Kb Plus Ladder™ (Invitrogen™); nos poços 2 e 3 os fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pGEM-T Easy (Promega®) digerido com as enzimas *BamH I* e *Pst I*. 59

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando no poço 1 o marcador 1 Kb Plus Ladder™ (Invitrogen™), os poços 2, 4, 6, 8, 9, 10 e 11 (D) representam os fragmentos gerados do plasmídeo pFASTBac1 e os insertos após digestão com as enzimas *BamH I* e *Pst I* e os poços 3, 5 e 7 (N.D) não foram digeridos. 60

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose confirmando a transposição do gene VP1+VP2+3'UTR para o genoma do baculovírus. O poço 1 representa o marcador 1 Kb Plus Ladder™ (Invitrogen™), os poços 2 a 10 (amostras 1 a 9) representam os fragmentos gerados por PCR utilizando os *primers* M13 For e M10 *Sac Pst I* Rev e poços 11 a 17 (amostras 10 a 16) representam os fragmentos gerados por PCR utilizando os *primers* NoroII/4 *BamH I* For e M13 Rev. 61

Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando a expressão de proteínas em células de inseto BTI-Tn5B1-4 após 24, 48, 72 e 120 h.p.i. A) SDS-PAGE e B) *Western Blotting* utilizando o anticorpo anti-NoroII.4. A amostra 1 representa tempo zero ou Mock (células de inseto não infectadas), as amostras 2 e 3 (24 h.p.i), amostras 4 e 5 (48 h.p.i), amostras 6 e 7 (72 h.p.i) e amostras 8 e 9 (120 h.p.i), sendo que as amostras 2, 4, 6 e 8 representam o sobrenadante das células após os períodos de

infecção e as amostras 3, 5, 7 e 9 os *pellets* após centrifugação. As setas indicam a expressão da proteína após 48 e 120 h.p.i no sobrenadante analisado. 62

Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise por *Western blotting*. Em (A) SDS-PAGE: observa-se o gel corado com *comassie blue* e em (B) *Western Blotting*: membrana de nitrocelulose revelada demonstrando as fases recolhidas após purificação com CsCl e diálise em PBS 0,5x pH 5.5. O número 1 representa o controle negativo Mock, o número 2 representa a fase superior ou leve coletada após purificação com CsCl, o número 3 evidencia a fase média coletada após purificação com CsCl e o número 4 a fase inferior ou pesada coletada após purificação com CsCl. As setas indicam as proteínas (VP1+VP2) purificadas..... 63

Figura 14. Cromatograma da purificação de VLPs de NV pela técnica de *Íon Exchange*. O eixo X corresponde ao volume por mL de tampão A (Fosfato de Sódio 50 mM (pH 7,0) sem sal) e o eixo Y determina a absorvância da luz Ultravioleta (UV) a 280 nm em mAU. Os picos das proteínas eluídas estão demonstrados em azul e a concentração do tampão salino B (Fosfato de Sódio 50 mM (pH 7,0) com NaCl 1M está representada em vermelho..... 64

Figura 15. Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando as proteínas dos capsídeos de NV purificadas pelo método de *Íon Exchange*. Em (A) observa-se o gel de SDS-PAGE corado por nitrato de prata e em (B) *Western Blotting* utilizando o anticorpo primário anti NoroII.4 e o secundário anti-IgG de coelho-AP. Nas duas figuras o poço 1 representa o marcador Novex® Sharp *Unstained Protein Standard* (Invitrogen™), os poços 2, 3 e 4 evidenciam a amostra ou pico de 14 mL representada no cromatograma da Figura 14 após as corridas 1, 2 e 3 respectivamente e os poços 5, 6 e 7 revelam a amostra ou pico de 15mL representada no mesmo cromatograma após as corridas 1, 2 e 3 respectivamente. O poço 8 representa o controle negativo Mock. A seta indica as proteínas do capsídeo de NV purificadas. 66

Figura 16. Microscopia eletrônica evidenciando a expressão das *Virus like particles* (VLPs) de norovírus com tamanho aproximado de 40 nm pelo sistema de baculovírus. A e B representam as partículas purificadas com CsCl e C e D demonstram as partículas após a purificação por cromatografia por troca iônica..... 68

Figura 17. Análise dos anticorpos policlonais dos ratos após imunização com VLP de NV purificados por cromatografia. (A) SDS-PAGE; (B) *Western blotting* com soro do rato 1 e (C) *Western blotting* com soro do rato 2. O poço 1 corresponde o controle negativo Mock e o poço 2 a VLP purificada por cromatografia e o poço 3 a VLP purificada por CsCl. As setas indicam a reação dos soros dos ratos com a VLP..... 69

Figura 18. Análise dos clones individuais por Phage ELISA. O número 1 representa o controle negativo (fago M13) com absorbância de 0,201 a 405nm; de 2 a 14 estão representados os clones selecionados do ciclo 1; de 15 a 20 os clones selecionados do ciclo 2; de 21 a 47 os clones selecionados do ciclo 3 e 48 a 87 os clones selecionados do ciclo 4. Os clones escolhidos para a extração do DNA plasmidial estão descritos no Anexo 1. 72

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando o produto da digestão com *Sfi I* dos DNAs plasmidiais dos clones dos fagos após a seleção da biblioteca frente a VLP de NV. O poço 1 representa o marcador 1 Kb Plus Ladder™ (Invitrogen™) e os poços 2 a 17 representam os clones selecionados dos ciclos 1, 3 e 4. 73

Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 3% demonstrando o produto da digestão com a enzima *BstO I* dos DNAs plasmidiais após a seleção da biblioteca frente a VLP de NV. O poço 1 representa o marcador de massa molecular 100bp ladder (Amershan Pharmacia Biotech) e os poços 2 a 17 os clones selecionados dos ciclos 1, 3 e 4 após a análise da diversidade dos clones pela digestão com a enzima *Sfi I*..... 74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR	29
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para confirmação do bacmídeo.....	35
Tabela 3. Quantificação das VLPs purificadas por CsCl e cromatografia utilizando o protocolo NanoDrop 3300 Quant-iT Protein Assay (Thermo Scientific) para quantificação das proteínas. A quantidade média foi obtida pelo <i>Hight Range</i> em $\mu\text{g/mL}$	67
Tabela 4. Resultados obtidos após a seleção dos fagos utilizando a VLP de NV como antígeno.....	70

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Amp ^R	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
APS	Persulfato de amônio
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato
BSA	Albumina bovina sérica
BV	do inglês, <i>budded virus</i>
°C	Graus Celsius
CH	Domínio constante da cadeia pesada de um anticorpo
CL	Domínio constante da cadeia leve de um anticorpo
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDR	Região determinante de complementaridade
C-terminal	Extremidade carboxi - terminal
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fab	Fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante)
Fd	Parte do anticorpo formada pela porção variável e primeiro domínio da porção constante da cadeia pesada
For	<i>Primer Forward</i>
Fv	Fragmento variável do anticorpo
g	Gramas
g	Gravidade
h	Hora
h. p. i.	Horas pós-infecção
Ig	Imunoglobulina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Litro

LB	Meio de cultura Luria-Bertani
M	Molar
MOI	Multiplicidade de Infecção
mA	Miliamper
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Militro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NBT	Nitro Blue Tetrazole
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
ng	Nanograma
NV	Norovírus
OD ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
ORF	Janela aberta de leitura
p/v	Peso/volume
pb	Pares de base
PBS	Tampão Fosfato - Salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomoles
pNPP	para-nitro-fenil-fosfato
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
Rev	<i>Primer Reverse</i>
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _{sm}	RNA _m subgenômico
RdRp	RNA dependente de RNA polimerase
scFv	Fragmento variável de anticorpo cadeia única (<i>Single chain Fragment Variable</i>)
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante (com SDS)
TCA	Ácido tricloro acético

TEMED	N',N',N',N'- tetrametil etilenodimetilamina
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
TRL	Receptores tipo Toll
U	Unidade enzimática
UV	Raios ultravioleta
V	Volume
v/v	Volume/volume
VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo
VLP	<i>Virus Like Particles</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar

RESUMO

Os Norovírus (NV) são responsáveis pela maioria das gastroenterites humanas não bacterianas em todo o mundo. Devido ao fato das estirpes de NV humanos não possuírem a capacidade de replicação em culturas celulares, a utilização de *Virus like particles* (VLPs) na compreensão dos fatores imunológicos e físico-químicos torna-se uma boa alternativa para o estudo do genogrupo II genótipo 4 que é considerado o mais prevalente e está associado à epidemia global. O objetivo deste estudo foi produzir VLP de NV variante 2006b e selecionar anticorpos monoclonais humanos a partir de biblioteca apresentada em fagos após a purificação das proteínas. A maior vantagem em utilizar a técnica de *Phage Display* é a possibilidade da seleção de fragmentos de anticorpos monoclonais totalmente humanos que podem ser utilizados em ensaios clínicos. Foram comparados os métodos de purificação de cloreto de cério (CsCl) e cromatografia de troca iônica, sendo que esta última apresentou um melhor rendimento no que diz respeito à quantidade e pureza das proteínas de capsídeo obtidas. Dos 58 clones analisados após 4 ciclos de seleção utilizando VLP de NV como antígeno, dez foram analisados com *Sfi I* e *BstO I* com relação ao perfil e diversidade. Porém, as possíveis recombinações existentes determinaram a esperada diminuição da diversidade da biblioteca ao longo dos ciclos de seleção apesar dos Fabs reconhecerem especificamente o antígeno diferentemente da diversidade inicial, ou seja, na construção da biblioteca.

Palavras-chave: VLP, Norovírus, *Phage Display* e anticorpos monoclonais.

ABSTRACT

The Norovirus (NV) are responsible for most human nonbacterial gastroenterites worldwide. Because human strains of NV do not have the ability to replicate in cell cultures, the use of virus-like particles (VLPs) in understanding the immunological and physicochemical aspects becomes a good alternative for the study of genogroup II genotype 4, which is considered the most prevalent and is associated with the global epidemic. The aim of this study was to produce VLPs NV 2006b variant and select human monoclonal antibodies from phage-displayed library after purification of proteins. The major advantage in using the technique of phage display is the possibility of selecting fragments of fully human monoclonal antibodies that can be used in clinical trials. The methods of purification of cesium chloride (CsCl) and ion exchange chromatography were compared and the latter had a better performance as regards the amount and purity of the capsid proteins obtained. Of the 58 clones analyzed after 4 cycles of selection using the NV VLP as antigen, ten were analyzed with *Sfi I* and *BstO I* with respect to the profile and diversity. However, the possible existing recombinations led to an expected decrease of the library's diversity during the selection cycles, though Fabs specifically recognized the antigen differently from the initial variety, that is on the construction of the library.

Keywords: VLP, Norovirus, Phage Display and monoclonal antibodies.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Norovírus: Aspectos Epidemiológicos e Patológicos

A diarreia é um sintoma comum de gastroenterite e sua etiologia pode estar relacionada com agentes diversos como vírus, bactérias e parasitas. Os agentes bacterianos são relativamente mais importantes nos países em desenvolvimento e os vírus são mais prevalentes em países industrializados. A importância de cada agente está diretamente relacionada com aspectos de higiene e saneamento básico (UNICEF & WHO, 2009; MORILLO & TIMENETSKY, 2011).

As gastroenterites podem ser manifestadas com diarreia branda, mas também podem causar formas graves com sintomas característicos de náuseas, vômitos, desidratação e até mesmo óbito. O rotavírus é responsável por cerca de 40% das internações hospitalares em crianças menores de 5 anos e bactérias como *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter* e *Salmonella* estão relacionadas aos períodos de epidemia, caracterizando a taxa de mortalidade em torno de quatro a seis milhões de pessoas em todo mundo. Por este motivo, o número de agentes virais associados às gastroenterites vem aumentando, sendo identificados principalmente os rotavírus, norovírus, sapovírus e astrovírus (KAPLAN et al., 1982; MORILLO & TIMENETSKY, 2011).

Os Norovírus (NV) são responsáveis pela maioria das gastroenterites humanas não bacterianas em todo o mundo e estima-se que 218.000 mortes ocorram anualmente em crianças menores de 5 anos com 1,1 milhões de internações decorrentes da infecção viral. Estes vírus são considerados altamente infecciosos relacionados a uma baixa dose infectante (cerca de 10 partículas virais podem causar a infecção), elevado nível de excreção viral e os vírions que são resistentes como, por exemplo, a meios ácidos após a passagem pelo estômago, ou permanecem viáveis no meio ambiente principalmente em água (KAGEYAMA et al., 2004; TU et al, 2008; JUNG et al., 2012).

No período do outono do ano de 1968, um surto de gastroenterite aguda acometeu estudantes e professores de uma escola primária em Norwalk, Ohio, EUA. Os sintomas permaneceram por um período de 12 a 24 horas, porém, nenhum paciente foi

hospitalizado. Casos considerados secundários (32,2%) atingiram os familiares dos pacientes envolvidos no surto e outros casos com características epidemiológicas semelhantes ocorreram na Flórida em 1967 e em Columbus, Ohio em 1968 (KAPIKIAN et al., 1972; MADELEY & COSGROVE, 1976).

Análises laboratoriais não identificaram o agente etiológico causador destes surtos. Em 1971, Dolin e colaboradores selecionaram amostras fecais de pacientes de quatro surtos ocorridos nos Estados Unidos: no ano de 1966 em um navio; 1968 em Norwalk; 1969 em Bethesda e 1970 em New Britain. Filtrados das fezes isentos de bactérias foram preparados e administrados via oral em voluntários prisioneiros da Casa de Correção de Maryland e do Centro Clínico de NIH em Bethesda. Antes da administração, os voluntários eram isolados por um ou dois dias e após a infecção foram observados os sintomas, sendo que somente os filtrados do surto de Norwalk induziram a doença (KAPIKIAN, 1996; DOLIN et al., 2004).

Para verificar o agente etiológico viral responsável pelo surto de Norwalk foi realizada a imunomicroscopia eletrônica (IME) dos filtrados administrados aos voluntários para observação das partículas semelhantes a picornavírus e parvovírus. Entre os anos de 1970 e 1980 foram catalogadas inúmeras descrições de vírus pequenos de estrutura arredondada e não cultiváveis *in vitro*. Dentre eles surgiu o subgrupo dos vírus Norwalk e somente em 1990 com a realização de clonagem e caracterização genômica, estes vírus foram caracterizados como membros da família *Caliciviridae* (DOLIN et al., 2004; MORILLO & TIMENETSKY, 2011).

A família *Caliciviridae* é composta por quatro gêneros: *Sapovirus*, *Logovirus*, *Vesivirus* e *Norovirus*, os quais infectam uma gama de hospedeiros, incluindo seres humanos e animais. Tais vírus podem causar uma variedade de doenças e desordens como gastroenterites, lesões vesiculares, infecções respiratórias, insuficiência reprodutiva e doença hemorrágica em diferentes animais (OKA et al., 2007).

Durante os últimos 20 anos a caracterização epidemiológica das noroviroses foi permitida devido à realização da técnica de transcriptase reversa-PCR (RT-PCR) em que foi estabelecido que as gastroenterites causadas por NV poderiam ocorrer em quatro aspectos distintos: (1) Epidemia de origem alimentar, aonde a infecção ocorre pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados, bem como contato interpessoal ou oro-

fecal. Neste caso os adultos saudáveis são os mais atingidos e apresentam sintomas em um curto período, podendo variar de 1 a 3 dias (KAGEYAMA et al., 2004); (2) Infecções que ocorrem em locais fechados com um curso clínico mais prolongado de 4 a 6 dias; (3) Gastroenterite em crianças que muitas vezes requer hospitalização e (4) Gastroenterite esporádica aguda em adultos imunossuprimidos (TRAN et al., 2012).

O sequenciamento para a caracterização genômica destes vírus é uma importante ferramenta para estudos e análises, visto que os NV não possuem um modelo animal ou capacidade de replicação *in vitro* (KAGEYAMA et al., 2004). Os NVs foram classificados em cinco genogrupos distintos (GI a GV) com base na caracterização molecular das sequências gênicas, principalmente da proteína de capsídeo. O genogrupo GI está dividido em oito genótipos distintos e o GII em 17 genótipos, sendo que os genótipos podem ser classificados em variantes. Os genogrupos, GI, GII e GIV são encontrados em humanos e o genogrupo GII genótipo 4 é detectado em mais de 90% dos casos da doença (SHIRASAKI et al., 2010; LEE, JUNG, & LEE, 2012).

De acordo com TRAN et al. (2012), o GII é o genogrupo mais prevalente em todo o mundo com uma média de 96% dos casos de norovirose, enquanto o GI apresenta uma média de 3,6%. Todavia, baseado na análise de genótipos do capsídeo e da RNA polimerase é possível observar uma variação de genogrupos em diferentes países. No Japão, China e Jordânia foi possível observar que o GII.3 é o segundo genogrupo com maior frequência de infecções e na África do Sul, Brasil e Finlândia o GII.6 é o segundo em frequência de acordo com a sazonalidade, após o GII.4 (TRAN et al., 2012).

As variantes GII.4 são observadas quando ocorrem mutações nas janelas de leitura (ORF1/ORF2) e estão associadas aos quadros de gastroenterites esporádicas relacionadas aos surtos de NV. Assim, a circulação global do vírus inclui as variantes GII.4/2002 (2002 a 2006), GII.4/2004 (2003 a 2008), GII.4/2006a (2006 a 2009), GII.4/2006b (2006 a 2010), GII.4/2008 (2008 a 2010) e variantes com circulação geográfica limitada como GII.4/2003 e GII.4/2007 que foram encontradas principalmente em países asiáticos. A variante GII.4/2006b tornou-se a cepa dominante de circulação em muitos países (TRAN et al., 2012).

No Brasil, o sistema de vigilância de diarreia aguda do Ministério da Saúde não inclui o diagnóstico de norovírus e este fato não permite a sua avaliação no impacto da saúde pública. Como o genogrupo II genótipo 4 é o mais prevalente e está associado à epidemia global desde meados de 1990, novas variantes são observadas em intervalos de 2 a 4 anos. Contudo, os dados epidemiológicos das noroviroses no Brasil são subestimados se comparado com os dados mundiais, sendo que o diagnóstico e levantamentos epidemiológicos são realizados basicamente por grupos de pesquisa (FIORETTI et al., 2011) do Instituto Aldof Lutz em São Paulo, da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, do Instituto Evandro Chagas no Pará e da Universidade de Brasília.

Em 1995, no estado de São Paulo, ocorreu um surto de gastroenterite que acometeu 3.500 pessoas e análises fecais por microscopia eletrônica e sequenciamento detectaram partículas virais identificadas como NV GII.4. Num estudo realizado no Rio de Janeiro entre os anos de 2005 e 2008, de 1.087 amostras de fezes cerca de 35% foram positivas para NV, com 96% para GII e 80% para GII.4, determinando a necessidade de implementar o diagnóstico de NV nos laboratórios de vigilância (CASTILHO et al., 2006; FERREIRA et al., 2010).

No estudo de BORGES et al. (2006) foram avaliadas amostras fecais na região central do Brasil, nas cidades de Brasília e Goiânia, evidenciando positividade geral de 8,6% das amostras fecais analisadas para calicivírus (BORGES et al., 2006).

O sítio inicial de replicação do vírus no ser humano ainda não está bem definido, todavia, admite-se que a porção do jejuno no intestino delgado sofre desorganização celular, achatamento das vilosidades, presença de vacúolos citoplasmáticos e infiltração de células mononucleares na lâmina própria (AGUS et al., 1973).

Com relação aos aspectos clínicos e patológicos relacionados às infecções por NV existem três períodos que podem ser evidenciados: (1) curto período de incubação considerado prodromico (antes dos sinais ou sintomas característicos que podem ser de 10 a 72 horas), embora as infecções assintomáticas sejam comuns; (2) período agudo e auto-limitado da infecção, porém com níveis elevados de eliminação da partícula viral nas fezes e (3) período considerado linfocítico com enterite atrófica, que é o mais grave

e pode causar a morte, principalmente de indivíduos imunossuprimidos (MENEZES et al., 2010).

1.2 – Estrutura genômica dos Norovírus

Os NV são vírus que apresentam o genoma constituído de RNA que possuem replicases e sintetizam moléculas de RNA a partir de moldes de RNA. Estes vírus de polaridade positiva, em que a molécula de RNA mensageiro é o próprio genoma, não empacotam a replicase viral (RNA dependente RNA polimerase - RdRp) pois quando entram na célula hospedeira, no próprio citoplasma, já iniciam a síntese das proteínas virais (KOO et al., 2010).

O primeiro passo da replicação do NV é a tradução da poliproteína precursora contendo apenas as proteínas virais não estruturais. Em seguida ocorre o processamento do precursor não estrutural pela protease viral e a transcrição da fita de RNA polaridade negativa pela RdRp. Também ocorre a transcrição do RNA subgenômico (RNAsg) pela RdRp a partir da fita de RNA de polaridade negativa. O RNAsg servirá de molde para a tradução das proteínas estruturais do vírus e por fim ocorre a replicação do RNA genômico completo a partir da fita de RNA de polaridade negativa pela RdRp. Os RNAsg dos calicivírus possuem a extremidade 3' idêntica ao RNA genômico e a extremidade 5' é reduzida, o que a leva para próximo do códon AUG inicial da ORF das proteínas estruturais (Figura 1) (GREEN, CHANOCK & KAPIKIAN, 2001; VICTORIA et al., 2009).

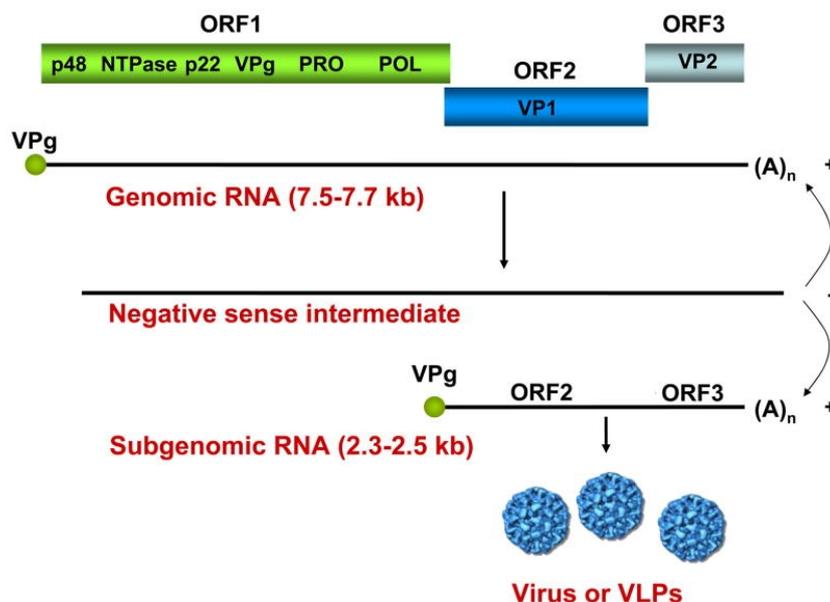


Figura 1. Esquema representativo do genoma viral do NV humano. Adaptado de TAN & JIANG (2012) e KARST (2010).

O genoma dos NV corresponde a cerca de 7,5 kb, constituído por três janelas abertas de leitura (ORFs) com uma cauda de poli-A na extremidade 3' e a região não traduzida na extremidade 5'. A estrutura icosaédrica e não envelopada, configura à partícula viral um diâmetro de aproximadamente 40 nm (LEE, JUNG & LEE, 2012; DONALDSON et al., 2010).

A ORF1 codifica uma poliproteína precursora de seis proteínas não estruturais, incluindo NTPase, proteinase e RdRp. A ligação da VPg ocorre durante a replicação do genoma viral sendo anexada como um iniciador de replicação para a extremidade 5' dos RNAs genômicos. Dados bioquímicos evidenciam que a capacidade da RdRp de transferir nucleotídeos para VPg na extremidade 5' do RNA de NV parece ser essencial para a infectividade do vírus (SUBBA-REDDY, GOODFELLOW & KAO, 2011). A ORF2 codifica a proteína de capsídeo VP1 e a ORF3 a proteína estrutural menor (VP2) e estudos relatam a importância da VP2 para a estabilidade na montagem da partícula viral (KAGEYAMA et al., 2004).

A proteína de capsídeo VP1 é sintetizada a partir do RNA subgenômico que contém as ORFs 2 e 3 e uma região não traduzida na extremidade 3' UTR. No estudo de BERTOLOTTI-CIARLET et al.(2003) evidenciou-se que a expressão da proteína VP1 que corresponde à ORF2 foi aumentada devido a presença da ORF3 com a região 3'UTR no sistema de expressão heterólogo de baculovírus. A hipótese é que a

sequência final no sentido 3'UTR contém elementos reguladores *cis-acting* necessários para a expressão do gene ou para a regulação da tradução, portanto, a presença da VP2 estabiliza a expressão da proteína de capsídeo VP1 (BERTOLOTTI-CIARLET et al., 2003).

A proteína VP1 é formada por 180 moléculas que estão organizadas em 90 dímeros com uma simetria icosaédrica $T = 3$ (onde T é o número de triangulações). Esta proteína é dividida em três domínios baseados em sua estrutura terciária. Estes domínios são representados por S, que corresponde ao domínio mais interno e é composto por 225 resíduos iniciais da proteína do capsídeo; e o domínio P (subdividido em P1 e P2). O subdomínio P1 (resíduos 226-278 e 406-520) é mais conservado se comparado com o subdomínio P2 (resíduos 279-405), considerado mais variável e localizado na superfície do capsídeo, o qual desempenha um importante papel para o reconhecimento imunológico. A variabilidade gênica presente no subdomínio P2 dos NV resulta em novas estirpes ou variantes epidêmicas com alteração de proteínas ligadas à propriedade e antigenicidade viral (DONALDSON et al., 2010; LINDESMITH et al., 2012).

1.3 - *Virus Like Particles* de Norovírus

As *Virus like particles* (VLPs) são antígenicamente semelhantes aos vírions e consideradas como complexos proteicos multiméricos imitando a organização e conformação do vírus nativo, porém não possuem o genoma viral. As estirpes de NV humanos não possuem a capacidade de replicação em culturas celulares, assim, a utilização de VLPs nos estudos imunológicos e físico-químicos das partículas virais torna-se uma boa ferramenta de estudos (HANSMAN et al., 2006).

A expressão da proteína de capsídeo em células de inseto resulta na formação de partículas semelhantes ao vírus nativo ou VLPs. As primeiras VLPs recombinantes foram obtidas de genes do vírus da hepatite B (HBV) visualizadas por microscopia eletrônica em 1982, do papiloma vírus humano (HPV) e do vírus do mosaico do tabaco (TMV) (HAYNES et al., 1986). Desde o início de 1980 mais de 100 tipos de VLPs foram originadas a partir de sistemas diferentes de expressão como bactérias, plantas,

células de inseto e mamíferos obtidas a partir das proteínas de capsídeo (ZELTINS, 2013).

Existem algumas considerações básicas para a construção de VLPs recombinantes: (1) a realização de uma vasta pesquisa sobre o vírus selecionado para a construção das partículas semelhantes aos vírus nativos; (2) codificação dos ácidos nucleicos e a correta seleção dos *primers*; (3) clonagem e utilização de sistemas heterólogos de expressão proteica; (4) obtenção da proteína estrutural do vírus e purificação; e (5) após a construção das VLPs existem vantagens significativas sobre o vírus nativo como a disponibilidade de uma grande quantidade de proteína e até mesmo melhores propriedades funcionais (VICENTE et al., 2011; ZELTINS, 2013).

A primeira etapa de construção da VLP de interesse é realizada por clonagem após a extração do genoma viral de um tipo de amostra infectada ou com a utilização de gene sintético. No caso dos NVs apresentados neste trabalho, as amostras de fezes de pacientes sintomáticos e a escolha do sistema de expressão em baculovírus foram de fundamental importância para a expressão das partículas.

1.4 – Produção de VLP de NV pelo sistema de baculovírus

O sistema de expressão de NV em células de inseto por baculovírus recombinantes tem sido útil para o estudo da sua biologia, incluindo a montagem de VLPs (NICOLLIER-JAMOT et al., 2004; LOBUE et al., 2006; TAN et al., 2011).

As células de inseto possuem uma taxa de crescimento rápido em cultura e são bem adaptadas às condições que permitem a expressão em larga escala quando bem monitoradas e controladas. Apesar de outros sistemas de produção tais como bactérias ou leveduras também obterem rendimentos elevados de expressão proteica, estes não coincidem com o grau de complexidade e eficiência da expressão de VLPs em baculovírus. Este fato é explicado porque os baculovírus possuem a capacidade de se desligar da transcrição dos genes das células hospedeiras e alocarem sua maquinaria com elevada transcrição e tradução dos genes heterólogos (VICENTE et al., 2011).

Com relação ao processo de infecção celular, os baculovírus podem desenvolver três estágios de replicação, o primeiro considerado o estágio preparatório para a replicação viral (fase inicial ou *early*), o segundo considerado pós-replicação viral (fase tardia ou *late*) e outra fase muito tardia (*very late*) (O REILLY & MILLER, 1991). Entre as fases inicial e tardia ocorre o desligamento das proteínas do hospedeiro e a célula trabalha para a produção de novos vírus pela expressão dos genes de interesse, que sob o comando de um promotor forte ocorre o reconhecimento pela DNA polimerase II da célula (HOOPES & ROHRMANN, 1991).

O gene da poliedrina que não é essencial para a replicação do baculovírus em células de inseto é trocado pelo gene heterólogo de interesse sob o controle do promotor da poliedrina. Quando utilizado como ferramenta para expressão de proteína heteróloga em células de inseto, o vírus servirá como vetor de expressão do gene de interesse e a célula infectada fornecerá os subsídios necessários para a expressão proteica (MILLER, 1997; HITCHMAN, POSSEE & KING, 2009).

Dentre os sistemas disponíveis, o baculovírus mais utilizado é *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), pertencente ao gênero *Alphabaculovirus* da família *Baculoviridae*. As células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) e BTI-TN-5B1-4 (*Trichoplusiani-High Five*) são os tipos celulares mais comuns, sendo que BTI-TN-5B1-4 é uma linhagem celular que apresenta taxas de infecção superiores a 90% após 48 horas após a infecção (HANSMAN et al., 2006).

As principais vantagens da utilização do sistema de baculovírus para a expressão proteica é que existe um elevado potencial de expressão das proteínas de interesse podendo chegar a 100 mg de proteína por litro de cultura. Ainda, a utilização de células eucarióticas fornece condições necessárias para modificações pós-traducionais semelhantes ao que ocorre em células de mamíferos. O nucleocapsídeo deste vírus consegue acoplar genomas virais maiores que o genoma selvagem e um outro ponto é a fácil manutenção das células de inseto (O REILLY, MILLER & LUCKOW, 1994; CASTRO et al., 1999).

Porém, algumas desvantagens podem ser citadas e a principal está relacionada com a ação lítica de proteases nos estágios avançados da infecção. Por este motivo, a determinação do tempo de infecção é importante principalmente para avaliar o

momento correto de coletar o material com as partículas montadas. Este tempo influencia na montagem da partícula, pois no caso das VLPs de NV, a expressão ocorre na fase muito tardia devido ao uso do promotor da poliedrina e neste momento as células estão estacionárias ou no período de morte, as quais poderão sofrer a ação de proteases e possível degradação da partícula viral montada. Mesmo assim, as desvantagens não superam as vantagens de escolher este sistema de expressão de proteínas heterólogas (NICOLLIER-JAMOT et al., 2004; OKA et al., 2007).

Como já relatado, o estudo da biologia dos norovírus é complicado devido a incapacidade do vírus crescer em sistemas de cultura *in vitro*. No entanto, a capacidade para purificar VLPs a partir de células de inseto infectadas com os baculovírus recombinantes que expressam VP1 e VP2 conduziu importantes descobertas relacionadas com a estrutura dos NV e as interações com as células hospedeiras (BERTOLOTTI-CIARLET et al., 2003, JIANG et al., 1992; PRASAD et al., 1999).

1.5 - Fatores imunológicos das VLPs

A importância de compreender a imunogenicidade dos NV utilizando VLPs está diretamente relacionada a uma abordagem segura e eficaz para a indução de anticorpos neutralizantes para as proteínas de superfície, ou domínio P (NICOLLIER-JAMOT et al., 2004; HANSMAN et al., 2006; VICENTE et al., 2011; LINDESMITH et al., 2012).

Estudos mostram que o domínio P2 da proteína de capsídeo liga-se ao HBGA (Histo-Blood Group Antigens) ou antígenos sanguíneos que constituem uma família diversa de hidratos de carbono expressos na superfície de mucosas, os quais servem como ligantes ou receptores para os NV sendo que as VLPs também possuem esta capacidade (DEBBINK et al., 2012; TAMMINEN et al., 2012).

A expressão do receptor HBGA está ligada ao gene FUT2. Cerca de 20% das pessoas não expressam este gene e por isso são consideradas não secretoras e resistentes ao NV GI.1, por exemplo. O gene FUT2 localizado no cromossomo 19 codifica a enzima $\alpha(1,2)$ fucosiltransferase responsável pela expressão do antígeno H a partir do precursor de cadeia por adição de um grupo de fucose. O antígeno H serve como

substrato para glicosiltransferases A e B que determinam o fenótipo do grupo sanguíneo ABO nos fluidos corporais e mucosa intestinal. Indivíduos que não expressam os alelos do FUT2 são considerados nulos ou não secretores (ROCKX et al., 2005; SMYTH et al., 2011). No entanto, outras estirpes de NV podem infectar indivíduos considerados não secretores devido à ligação do vírus em carboidratos do antígeno sanguíneo Lewis (DEBBINK et al., 2012).

Os NV GII.4 reconhecem como receptores os antígenos do sistema ABO, o que representa mais de 80% dos indivíduos secretores da população mundial e por este motivo é considerado o principal causador de norovirose. O que tem mais estabelecido na literatura com relação à resposta imune humoral de NV é sobre o NV GI.1 que exibe padrões muito complexos de respostas imunes heterotípicas após infecção e muitos indivíduos são suscetíveis à reinfeção. A infecção por GI pode induzir células B de memória pré-existentes que secretam anticorpos com baixa afinidade para outros genogrupos, porém, com alta afinidade para outras estirpes de GI. Ainda, uma região conservada exposta na superfície da proteína de capsídeo pode proporcionar reação cruzada dos anticorpos. Todavia, a resposta para GII.4 ainda não está muito bem compreendida (LINDESMITH et al., 2010; DEBBINK et al., 2012).

Uma variedade de estudos utilizando camundongos que produziram anticorpos monoclonais (mAbs), suportam a hipótese que o norovírus GII.4 possui uma variação antigênica principalmente da proteína P2, que contribui para o surgimento de novas estirpes e conseqüentemente novos surtos. Para isso, o ideal seria o estudo de um anticorpo monoclonal sensível que pudesse distinguir estirpes de NV GII.4 sem que houvesse a reação cruzada entre outros genogrupos. Resíduos estudados como 296 a 298, 393 a 395, 333, 340, 356, 368, 372, 407, 412 a 413 foram preditos como potenciais epítomos para anticorpos, pois estes aminoácidos tendem a se agrupar em *loops* no subdomínio P2, local em que a interação com o anticorpo seria mais susceptível (LINDESMITH et al., 2012).

Por mais que a infecção seja normalmente auto-limitada, a doença pode ser fatal e grave em pacientes imunossuprimidos, crianças menores de 5 anos e idosos. A base molecular para a compreensão da imunidade protetora diferencial dos NV apesar de ainda não ser bem elucidada, evidencia-se que a proteção está associada a produção de

IgA na fase inicial após a produção de IgM e elevados níveis de secreção de interferon γ (IFN- γ) por linfócitos TCD4 na resposta tardia (LINDESMITH et al., 2010).

A infecção por NV é caracterizada pela indução de resposta imune mediada por células (Th1) e resposta humoral (Th2). A resposta humoral nos seres humanos tem sido descrita para um número limitado de estirpes e após a produção de anticorpos específicos desenvolvidos por um genogrupo infectante por meios dos epítipo da proteína de capsídeo, ocorre reação cruzada destes anticorpos com outros genogrupos, o que ainda não está muito bem compreendido (LOBUE, LINDESMITH & BARIC, 2010).

Subtipos de imunoglobulinas IgG obtidos após imunização de camundongos com partículas virais apenas do domínio P de NV demonstraram a presença do isotipo IgG1, o que indica uma resposta imune do tipo Th2, enquanto que a imunização com VLP resulta numa potente indução dos isotipos IgG1 e IgG2a, o que indica uma resposta mista Th1 e Th2. Assim, as VLPs são capazes de ativar células T e estimular a imunidade mediada por células além da resposta humoral. Esta diferença de resposta pelo tipo de partículas testadas indica que pode haver diferentes mecanismos imunológicos envolvidos no processamento antigênico (TAN et al., 2008; 2011; TAMMINEN et al., 2012).

A resposta Th1 caracterizada pela secreção de interferon gama (IFN- γ), interleucina dois (IL-2), ativação de macrófagos e células T auxiliares (linfócitos TCD4) proporciona uma proteção eficaz contra agentes patogênicos intracelulares como os vírus. A utilização de adjuvantes que estimulam os receptores PRR e os receptores TLR, induzem uma maior ativação das células apresentadoras de antígenos e aumentam a estimulação antígeno-específica para as células da resposta Th1 (LOBUE, LINDESMITH & BARIC, 2010; VELASQUEZ et al., 2010).

Possivelmente a estrutura macromolecular da VLP induz o processo de endocitose das células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente macrófagos e células dendríticas, induzindo a resposta das células TCD4 e TCD8. Enquanto que outro tipo de célula apresentadora de antígeno como o linfócito B, pode estar envolvido na apresentação antigênica das partículas menores do domínio P, o que leva a polarização da resposta Th2 (JEGERLEHNER et al., 2007; TAMMINEN et al., 2012).

Portanto, as VLPs podem ser capazes de induzir respostas humorais e celulares mesmo na ausência de adjuvantes frequentemente utilizados (ZELTINS, 2013).

O interesse na formação de VLPs está diretamente relacionado à produção de vacinas, visto que no mercado já estão disponíveis vacinas para hepatite B e contra o papiloma vírus humano (HPV) desenvolvidas com a utilização de VLPs produzidas pelo sistema de baculovírus recombinantes (ZELTINS, 2013) e além das aplicabilidades já citadas, a VLP é uma importante ferramenta para a produção de anticorpos policlonais e monoclonais para o desenvolvimento de *kits* diagnósticos.

1.6 – Estrutura dos anticorpos

Os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas produzidas por animais vertebrados e podem ser encontradas de forma solúvel ou transmembrana (BURNET, 1959) (Figura 2). A estrutura básica dos anticorpos é semelhante a um “Y” e é constituída por duas cadeias polipeptídicas pesadas e idênticas (H) entre 55 a 70 kDa, unidas por pontes dissulfeto e duas cadeias leves (L) entre 24 a 25 kDa que se unem às cadeias pesadas por interações covalentes e não covalentes (JANEWAY et al., 2001; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008).

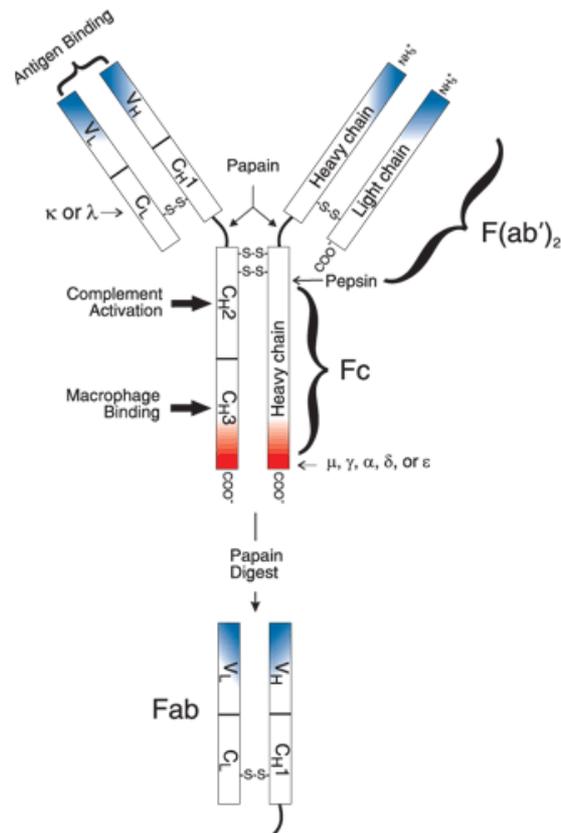


Figura 2. Esquema representativo da molécula de anticorpo. Adaptado: Invitrogen™ (Antibody Structure and Classification)

Tanto a cadeia pesada (H) quanto a cadeia leve (L) encontram-se dispostas em unidades funcionais sendo que duas destas unidades são denominadas de Fab (*Fragment antigen binding*) a que possui a função de ligação ao antígeno e Fc (*Fragment crystalline*) a qual possui funções efetoras dos anticorpos (WINTER & MILSTEIN, 1991).

Ainda, ambas as cadeias apresentam regiões amino terminais variáveis ou domínios de aproximadamente 110 aminoácidos denominados domínio variável leve (VL) e domínio variável pesado (VH). A cadeia leve possui um domínio constante (CL) único e a cadeia pesada possui três ou quatro domínios constantes que podem variar de acordo com o tipo de imunoglobulina em CH1, CH2, CH3 e CH4. Assim, VL e VH juntos constituem o Fab e CH2 e CH3 constituem o Fc (JANEWAY et al., 2001).

Ao se comparar as sequências de aminoácidos dos domínios constantes é possível determinar dois isotipos de cadeias leves nos seres humanos (*kappa* e *lambda*) e cinco tipos de cadeias pesadas (*mu*, *delta*, *gamma*, *alfa* e *épsilon*) dando origem as

cinco classes conhecidas de imunoglobulinas: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008).

Os genes envolvidos na codificação das cadeias pesadas e leves estão organizados em segmentos gênicos, ou seja, as imunoglobulinas possuem sequências genéticas diferentes que codificam regiões variáveis e constantes. Assim, o segmento gênico (VDJ) codifica a região variável da cadeia pesada e os segmentos (VJ) codificam a região variável para a cadeia leve (TONEGAWA et al., 1974, 1983).

Na cadeia pesada o primeiro segmento (V) codifica os resíduos iniciais de 97 aminoácidos. O segmento (D) possui sequências diferentes que codificam de 3 a 14 aminoácidos e o (J) codifica os 15 a 17 resíduos de aminoácidos da região variável. Após a recombinação gênica o próximo segmento a ser codificado é a região constante (C) o que propicia a inserção da imunoglobulina na membrana celular. Nos seres humanos, o *locus* gênico para a cadeia pesada está situado no cromossomo 14 envolvendo aproximadamente 51 genes funcionais (MATSUDA et al., 1993).

Já na cadeia leve o segmento (V) codifica os primeiros resíduos de 97 aminoácidos da região variável e o (J) codifica os últimos 15 a 17 resíduos de aminoácidos da região variável e o segmento constante (C) codifica a região constante da cadeia leve. Na medula óssea para a formação do linfócito B *naive* ocorre a recombinação entre os segmentos (V) e (J) para posterior formação da região variável da imunoglobulina (TONEGAWA et al., 1974, 1983). As cadeias leves *kappa* (κ) e *lambda* (λ) são codificadas nos cromossomos 2 e 22 respectivamente (ERMERT et al., 1995).

Para que ocorra a formação das imunoglobulinas, durante o processo de maturação dos linfócitos B, ocorre um rearranjo gênico entre os *locus* das cadeias leves e pesadas para gerar uma maior variabilidade e reconhecimento de inúmeros antígenos. O primeiro passo é a união entre fragmentos DH com JH formando DHJH e em seguida a união destes dois fragmentos com o VH. O segundo passo é a união dos fragmentos (VJ) da cadeia leve o que gera um linfócito B capaz de produzir anticorpos com especificidade antigênica determinada. Caso não ocorra uma formação adequada de uma imunoglobulina funcional, o linfócito B é ativado para apoptose após o rearranjo do segundo alelo (COLECLOUGH et al., 1981; FUGMANN et al., 2000).

As enzimas responsáveis por este processo de recombinação são denominadas RAG1 e 2 que são capazes de reconhecer regiões sinalizadoras no DNA com o início da quebra da fita dupla. Os genes ativos para estas enzimas estão presentes apenas em linfócitos pré-B e pré-T (SCHWARZ et al., 1996; AGRAWAL, EASTMAN & SCHATZ, 1998).

Existem mecanismos diversos que explicam a grande variabilidade dos anticorpos independente do contato com o antígeno como: o diferente número de genes em indivíduos que codificam as regiões (VDJ); combinações variadas das cadeias pesadas e leves; combinações diferentes na região (VDJ); eliminação de nucleotídeos por exonucleases celulares nas extremidades (VDJ); adição de nucleotídeos nos fragmentos após a recombinação e tradução em diferentes zonas de leitura (MAX, 1998).

As Regiões Determinantes de Complementariedade (CDR) constituem três regiões em cada cadeia variável (leve e pesada) com maior variabilidade. Esta variabilidade está relacionada com a posição dos resíduos nas extremidades ou alças e as três CDRs de cada cadeia são definidas como CDR1, CDR2 e CDR3 ou L1 a L3 para a cadeia leve e H1 a H3 para a cadeia pesada. Esta estrutura tridimensional formada por estas regiões é que permite a ligação do antígeno com o anticorpo (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008).

A partir de ferramentas de biologia molecular para a manipulação de DNA é possível amplificar sequências que codificam fragmentos de anticorpos que podem ser úteis para o diagnóstico de diversas patologias. Um modelo bem utilizado é o scFv que consiste na ligação entre VH e VL por um peptídeo com o objetivo de mimetizar a porção Fv do anticorpo. Trata-se de uma construção recombinante monocistônica, em que as duas cadeias variáveis (leve e pesada) são fusionadas por uma sequência de nucleotídeos codificadora de um peptídeo conector constituído por resíduos de aminoácidos hidrofílicos (MAX, 1998).

Portanto, os estudos relacionados aos anticorpos e a interação com antígenos foram estimulados pelas técnicas *in vivo* e *in vitro* para a produção destas moléculas, bem como a aplicabilidade em diagnóstico e terapia. Um avanço revolucionário para esta tecnologia foi a produção do hibridoma desenvolvido em 1975 por Georges Köhler

e Cesar Milstein para a produção de anticorpos monoclonais capazes de interagir com apenas um epítopo aonde ocorre a fusão de linfócitos B com células de mieloma (KOHLENER & MILSTEIN, 1975).

Outras possibilidades são as ferramentas de expressão de anticorpos em bactérias e leveduras realizando a clonagem do gene que codifica a imunoglobulina. Os anticorpos inteiros expressos por estes sistemas apresentam baixa eficiência e reduzida atividade, porém, a expressão das cadeias variáveis como scFv ou Fab em fagos possuem maior eficiência. Em imunoenaios sorológicos, a substituição de anticorpos originados em hibridomas por moléculas recombinantes pode reduzir o custo e aumentar a reatividade (ARNDT, MULLER & PLUCKTHUN, 1998; WORN & PLUCKTHUN, 2001).

Ao comparar anticorpos policlonais, os quais detectam uma multiplicidade de epítomos, com os anticorpos monoclonais, no que diz respeito à produção de anticorpos, os primeiros são produzidos de forma simples e barata, contudo, pode haver diferenças de reatividade e títulos devido à heterogeneidade deste tipo de imunoglobulina (NELSON et al., 2000).

1.7 – Seleção de anticorpos monoclonais humanos por *Phage Display*

A técnica de *Phage Display* foi descrita por Smith (1985) e o termo se refere às biomoléculas expostas na superfície de bacteriófagos filamentosos e posterior seleção de acordo com a afinidade por uma molécula alvo (BENHAR, 2001). A construção de bibliotecas de anticorpos com o objetivo de selecionar os fagos que se ligam fortemente a antígenos específicos faz com que o *Phage Display* seja uma importante ferramenta de estudo (BRIGIDO & MARANHÃO, 2002).

Na técnica de *Phage Display*, são utilizados bacteriófagos do gênero *Inovirus* que infectam bactérias como *Escherichia coli*. (BARBAS et al., 2001; MCAULIFFE, ROSS & FITZGERALD, 2007). Fragmentos de DNA que irão codificar milhões de proteínas como, por exemplo, os anticorpos, são expostos na superfície dos fagos gerando a biblioteca. Quanto maior a variabilidade da biblioteca, maior será a

possibilidade de selecionar fagos que interajam com o alvo exposto (POSNER et al., 1994; AZZAZY & HIGHSMITH, 2002).

Uma vantagem a ser evidenciada é que os fagos filamentosos não causam infecção lítica, ou seja, a bactéria infectada produz e secreta fagos sem sofrer lise e este processo mostra a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas (AZZAZY & HIGHSMITH, 2002).

A estratégia de seleção deve ser realizada com ciclos sucessivos com o antígeno de interesse e cada ciclo corresponde a uma etapa de ligação do fago ao antígeno, com a captura dos fagos ligados, eluição e amplificação. Este processo é denominado *biopanning* ou *panning* (PARMLEY & SMITH, 1988; MARKS et al., 1991).

A molécula alvo é imobilizada em uma fase sólida que pode ser placas de imunoensaio, microesferas magnéticas, resinas ou membranas, células procarióticas fixadas e células de mamíferos. Após a seleção, os fagos que não se ligam com maior afinidade são eliminados por lavagens sucessivas e aqueles que permanecem ligados às moléculas alvo, são posteriormente eluídos (HOOGENBOOM et al., 1998).

Normalmente após 3 ou 4 ciclos de infecção e reinfeção já é possível obter populações de fagos que expressam a melhor combinação dos anticorpos de interesse contra os antígenos estudados. Portanto, a apresentação de fragmentos de anticorpos scFv ou Fab humanos na superfície de fagos pode mimetizar a randomização dos anticorpos, visto que o sucesso da seleção depende da complexidade da biblioteca, pois quanto maior for a diversidade dos clones, maior será a probabilidade de ligação de um determinado alvo com maior afinidade (CLEMENTI et al., 2012).

É importante ressaltar que os ciclos devem ser monitorados por meio da titulação dos fagos adicionados e dos fagos recuperados ou eluídos. Após o último ciclo, clones são selecionados, sequenciados e analisados com relação à especificidade e ainda é possível a obtenção da forma solúvel, ou seja, não ligada ao fago para diversas aplicações e no caso de anticorpos, estes podem ser utilizados para *kit* diagnóstico (BARBAS et al., 2001).

1.7.1 - Fagos filamentosos

Os principais fagos filamentosos como os vírus fl, fd e M13, são constituídos por DNA circular de fita simples com aproximadamente 6400 pb e envoltos por proteínas do capsídeo que incluem a pIII, pVI, pVIII e pIX (RUSSEL, LOWMAN & CLACKSON, 2004).

A proteína de capsídeo pIII presente de três a cinco cópias por fago possui a vantagem de acoplar proteínas grandes como no caso dos anticorpos, porém, a infectividade do fago pode ficar comprometida. Já a proteína pVIII, presente em milhares de cópia por vírion, permite a inserção apenas de sequencias menores de até 8 aminoácidos pois a partícula pode desestabilizar-se (RUSSEL, LOWMAN & CLACKSON, 2004).

Ao infectar a *Escherichia coli*, o fago filamentoso realiza a interação entre a pIII do seu capsídeo com o *pilus* sexual da bactéria. Em seguida ocorre a despolimerização do capsídeo por um complexo bacteriano e então o genoma do fago é inserido no citoplasma da célula e convertido em DNA fita dupla que servirá de molde para a replicação e tradução das proteínas do vírus. A tiorredoxina (proteína bacteriana) em conjunto com as proteínas pI, pIV e pXI participam do empacotamento viral e a pV é substituída pelas proteínas de capsídeo que se encontram ancoradas na membrana da célula para a secreção de novas partículas virais (BARBAS et al., 2001; RUSSEL, LOWMAN & CLACKSON, 2004).

1.7.2 – Fagomídeos

Os fagomídeos são vetores que codificam apenas uma proteína do capsídeo viral aonde o gene de interesse é inserido próximo ao sítio de clonagem. A utilização de fagomídeos aumenta a diversidade da biblioteca, visto que não se faz necessário a utilização de bacteriófagos contendo a informação genética completa do vírus. Todavia, para a amplificação dos fagomídeos é necessário a utilização de um fago auxiliar (*Helper Phage*) em culturas bacterianas que realizará a codificação das outras proteínas

indispensáveis para a replicação viral. (VIEIRA & MESSING, 1987; HOOGENBOOM et al., 2002).

Um exemplo de fagomídeo é o vetor pCOMB3X. Como os fagos auxiliares codificam todas as proteínas virais, ocorre no momento da amplificação, a formação de capsídeos das proteínas nativas provenientes do fago auxiliar, bem como a geração de capsídeos recombinantes provenientes do fagomídeo, sem que a infectividade viral fique comprometida (RUSSEL, LOWMAN & CLACKSON, 2004).

1.7.3 – Utilização de Bibliotecas de anticorpos

Os anticorpos foram as primeiras proteínas a serem expressas na superfície de fagos com a fusão da sequência gênica das regiões variáveis (V) com a proteína pIII do bacteriófago e atualmente é frequente a construção de bibliotecas de anticorpos recombinantes na forma scFV ou Fab (MCCAFFERTY & GRIFFITHS, 1996, HOOGENBOOM et al., 2002). A biblioteca é criada com a extração de RNAs codificadores de imunoglobulinas em camundongos, galinhas, coelhos e humanos. (DOUGUCHI, HASHIUCHI & SAKAMOTO, 2009). As amostras biológicas como células do baço, medula e sangue periférico que contêm linfócitos B são utilizadas para a extração dos transcritos (CHEN et al., 2008).

Os seres humanos possuem uma variabilidade gênica de anticorpos a nível cromossomal ligados a três *loci* de cadeia pesada (VH, D e JH) e dois *loci* de cadeia leve (VL e JL) (POSNER et al., 1994; ZACHAU, 1995; DANTAS-BARBOSA, BRÍGIDO & MARANHÃO, 2005). Assim, a utilização de uma biblioteca de anticorpos humanos para a seleção de anticorpos monoclonais, utilizando VLP de norovírus como molécula alvo, pode fornecer ferramentas importantes com relação ao diagnóstico destes vírus.

No estudo de LOCHRIDGE et al. (2005) foi utilizada uma biblioteca de oligopeptídeos aleatória expressa em fagos reconhecida por anticorpos monoclonais anti-VLP de NV produzidos em camundongos para identificar regiões do capsídeo viral. E com a mesma biblioteca LOCHRIDGE & HARDY (2007) realizaram a comparação de resíduos de aminoácidos presentes na proteína de capsídeo de murino norovírus

(MNV-1) com anticorpos monoclonais que reconhecem resíduos de aminoácidos de norovírus humano.

1.8 - Antigenicidade dos Norovírus

Devido à diversidade genética dos NVs, cerca de 30 genótipos podem infectar os seres humanos, por isso, o desafio para a avaliação da diversidade e antigenicidade das estirpes variáveis é de extrema importância com relação aos diversos tipos de anticorpos anti-NV existentes (GREEN, 2007).

O genótipo GII.4 tem circulado e evoluído por pelo menos quarenta anos (BOK et al., 2009). Existe uma certa preocupação com relação à imunidade pré-existente que pode prejudicar a resposta imune a novas estirpes, pois a susceptibilidade genética variável de indivíduos infectados por NV permite a infecção por estirpes diferentes como por exemplo os genótipos GI e GII (DONALDSON et al., 2010; LINDESMITH et al., 2012).

O aparecimento de novas variantes de NV GII.4 está correlacionada com o aumento do número de pandemias que levanta a proposta que estas variantes podem evoluir de forma semelhante ao vírus Influenza A (BOK et al., 2009 e 14). Na tentativa de superar a proteção heterotípica entre GI e GII é interessante estudar epítomos multivalentes (LOBUE et al., 2006; LINDESMITH et al., 2008).

O desenvolvimento do diagnóstico imunológico para NV tem sido dificultado pela especificidade dos antígenos reconhecidos pelos anticorpos policlonais. Assim, a importância do desenvolvimento de anticorpos monoclonais que reconhecem os genogrupos específicos reduz a possibilidade de reação cruzada (SHIOTA et al., 2007).

Vários laboratórios já produziram anticorpos policlonais de NV utilizando VLP produzida a partir do gene que codifica a proteína VP1. Os anticorpos policlonais de coelho foram altamente específicos para os genótipos utilizados como antígenos (KAMATA et al., 2005). Porém, esta especificidade a um determinado genótipo tem impedido o desenvolvimento de um bom *kit* diagnóstico, o qual idealmente deveria identificar epítomos entre genótipos distintos.

Os anticorpos monoclonais são considerados as melhores ferramentas para a detecção de diferentes estirpes de NV. Quando utilizados em testes de imunocromatografia, por exemplo, os anticorpos monoclonais são considerados mais estáveis que os anticorpos policlonais (YODA et al., 2003).

Alguns anticorpos monoclonais anti-NV já existentes podem ser classificados em dois grupos: um primeiro grupo que reconhece epítomos lineares intergenogrupos reativos aos domínios S ou P1 e outro grupo que reconhece epítomos intragenogrupos. Para tanto, a obtenção de informações sobre a localização dos epítomos específicos de NV é essencial para a construção de uma ferramenta diagnóstica (YODA et al., 2003; PARKER et al., 2005).

No estudo de SHIOTA et al. (2007) foi desenvolvido um anticorpo monoclonal em linhagem de células de mieloma P363-Ag-U que foi altamente reativo reconhecendo os genótipos 1, 4, 8 e 11 do GI e os genótipos de 1 a 7 e 12 a 15 do GII, com uma fraca afinidade para GI-3 (SHIOTA et al., 2007).

Em análises antigênicas já pode ser observado que a posição específica de aminoácidos pode ser determinante. Um resíduo de leucina na posição 526 é conservado entre os calicivírus (CHEN et al., 2004). A fenilalanina na posição 425 é conservada nos NV GII (CHAKRAVARTY et al., 2005). E o resíduo de glicina (G530) é um componente crítico quando ocorre a mudança de glicina para alanina, pois gera um efeito moderado de reatividade quando a glicina é o componente do epítomo (PARKER et al., 2005).

A utilização de anticorpos monoclonais produzidos em camundongos deixa claramente identificada que os aminoácidos 294, 296, 297, 298, 368 e 372 compreendem epítomos de bloqueio nas estirpes de GII.4 do ano de 1987 até GII.4 do ano de 2006. Foi observado ainda que a utilização da estirpe 2006 reagiu com VLPs que circularam a partir de 2002 e também com as variantes circulantes após 2006 (DEBBINK et al., 2012; LINDESMITH et al., 2012).

Todo este cenário justifica o estudo do desenvolvimento de anticorpos monoclonais para fim diagnóstico, visto que a imunidade protetora para NV ainda encontra-se controversa.

Os anticorpos monoclonais até hoje desenvolvidos para NV utilizaram na sua grande maioria a ferramenta de hibridoma e imunização de camundongos. CHEN et al. (2013) utilizou a produção de uma biblioteca de anticorpos monoclonais de NV em chimpanzés por meio da técnica de *Phage Display*, sendo que estes animais são infectados principalmente pelo GI. Todavia, estudos utilizando a mesma técnica com a participação de anticorpos monoclonais humanos ainda estão sendo realizados, sendo que a utilização do repertório completo de uma biblioteca humana ainda não foi descrita (CHEN et al., 2013; ROGERS et al. 2013).

1.9 – Diagnóstico dos Norovírus

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada inicialmente para identificar as partículas de NV, porém apresenta uma sensibilidade inferior (em torno de 25% a menos) se comparada com a técnica de RT-PCR (RICHARDS et al., 2003). Este método é utilizado em laboratório de saúde pública em muitos países, contudo, exige um microscopista bem qualificado além de um equipamento muito caro, que torna inviável para o diagnóstico clínico (WRIGHT et al., 1998).

A utilização da técnica de RT-PCR em fezes e vômitos foi considerada o exame de escolha para o diagnóstico de NV, sendo considerada sensível e específica, possibilitando estudos epidemiológicos para a identificação de surtos de gastroenterites. Todavia, a sensibilidade do teste está diretamente relacionada com a utilização de *primers* capazes de amplificar diferentes estirpes de NV. Dentre o *pool* de *primers* utilizados para as ORFs 1, 2 e 3 os melhores resultados obtidos foram com *primers* da região da polimerase viral da ORF1, considerada mais conservada entre os genótipos. Outra questão relacionada à técnica é a extração do RNA das amostras que pode ser ineficiente, bem como a degradação do RNA viral devido o armazenamento das amostras e presença de ribonucleases (RNAses) (SCHWAB et al., 1997; KOOPMANS, 2008; SCIPIONI et al., 2008).

A técnica de *Real Time* RT-PCR quantifica moléculas específicas de DNA ou RNA em amostras clínicas e apresentam vantagens sobre a técnica de PCR convencional com maior sensibilidade e especificidade (TRUJILLO et al., 2006).

Um método ideal para detecção de NV seria um ensaio rápido, barato e mais sensível que o método de imunoensaio enzimático (ELISA) já disponível. Os testes de ELISA atualmente utilizados detectam o antígeno em amostras de fezes (Dako Cytomation, Ely, UK 2001; Denka Seiken, Tokyo, Japan 2002; R-biopharm AG, Germany 2004), porém, com baixa sensibilidade diagnóstica devido à diversidade genética dos NV (BULL et al., 2006). Estes testes vêm utilizando em seus reagentes VLPs produzidas por baculovírus recombinantes, soros hiperimunes e até mesmo anticorpos monoclonais com as novas gerações de *kits* RIDASCREEN® 3rd Generation kit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), o que favoreceu o diagnóstico (CASTRICIANO et al., 2007).

O presente estudo tem como objetivo produzir VLPs de NV e selecionar anticorpos monoclonais humanos (Fabs) apresentados em fagos. A escolha desta ferramenta molecular foi determinante devido à seleção não estar relacionada apenas a um único anticorpo monoclonal, mas sim a uma vasta biblioteca de anticorpos.

A seleção de anticorpos anti-NV expressos em fagos para fins diagnósticos pode oferecer diversas vantagens sobre os anticorpos monoclonais atualmente produzidos devido à diminuição do tempo e do custo de produção e ainda com relação à facilidade de isolamento de fagos contra outras estirpes epidêmicas e as que estão a emergir. Estes anticorpos monoclonais humanos podem ser úteis para o conhecimento dos sítios de ligação como domínios S, P1 e P2 do NV.

Pouco são os conhecimentos sobre a circulação de Norovírus (NV) no Brasil. Em Brasília, segundo OLIVEIRA & LATORRE (2010) as diarreias aparecem como as principais causas de óbito entre as doenças infecciosas e parasitárias, apresentando uma taxa de 13,6 óbitos por 1.000 nascidos vivos. No período de 2007 a 2010 foram notificados 336.751 casos de doenças diarreicas agudas no Distrito Federal, sendo que a população menor de 1 ano apresentou a taxa de 250,1 casos para cada 1.000 habitantes de acordo com o relatório de Situação do Distrito Federal (SVS/MS, 2011).

Pelo fato dos NV serem considerados a maior causa de infecção gastrointestinal não bacteriana (JUNG et al., 2012), estes podem ser detectados em amostras de fezes e vômitos e por isso existe a necessidade de estabelecer novas técnicas de diagnóstico.

Assim, o grupo de virologia da UnB poderá ser o primeiro a desenvolver VLP GII.4 de NV no Brasil o que contribuirá para o desenvolvimento de técnicas imunológicas para fim diagnóstico, tornando-se essencial o estudo deste vírus para a diminuição de morbimortalidade infantil.

2. OBJETIVOS

GERAL:

Produzir VLP de NV a partir do sistema de expressão de baculovírus e selecionar anticorpos monoclonais humanos utilizando biblioteca apresentada em fagos (*Phage Display*).

ESPECÍFICOS:

- Produzir VLPs de norovírus utilizando o vetor pFASTBac1 por meio do sistema de expressão de proteínas heterólogas.
- Purificar VLPs utilizando as técnicas de cloreto de cério e cromatografia por troca iônica para posterior estudo de antigenicidade.
- Selecionar anticorpos monoclonais humanos a partir da biblioteca de fragmentos de anticorpos (Fabs) apresentada em fagos frente às VLPs produzidas.
- Avaliar a diversidade de clones de fagos selecionados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Extração de RNA

Para extração do RNA foi utilizada a metodologia do Trizol que consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato. Durante a extração, o Trizol rompe as células e mantém a integridade do RNA.

Em um microtubo de 1,5 mL foi adicionado 400 µL de tampão PBS e 100 µL de amostra fecal. A suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos e após este procedimento 250 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL RNase *free*.

A este volume adicionou-se 750 µL de Trizol LS (Invitrogen™) e após homogeneização em vortex por aproximadamente 15 segundos, o conteúdo foi incubado à temperatura ambiente por 10 minutos.

Foram adicionados 200 µL de clorofórmio e o conteúdo foi vortexado por 15 segundos e posteriormente incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos. Foram formadas três fases após o processo de centrifugação: uma fase fenol-clorofórmio no terço inferior do microtubo, outra fase no terço intermediário e no terço superior, uma fase aquosa aonde estava o RNA de interesse.

Da fase aquosa foram transferidos 400 µL para um novo microtubo de 1,5 mL RNase *free* ao qual foi adicionado isopropanol na mesma proporção (cerca de 400 µL) para precipitação do RNA. O microtubo foi agitado por inversão e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos.

Em seguida todo o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol a 75% com movimentos circulares a fim de realizar uma lavagem do RNA (*pellet*) após centrifugação a 7.000 rpm por 3 minutos. Todo o conteúdo de etanol foi descartado permanecendo apenas *pellet* e o microtubo foi mantido no gelo para secagem total do etanol e posteriormente o sedimento foi ressuspense com 12 µL de água RNase *free*.

3.2 - Transcrição Reversa

A enzima utilizada para a transcrição reversa foi a SuperScript™ III Reverse Transcriptase (SS III RT) (Invitrogen™) uma versão modificada da enzima M-MLV (Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) que reduz a ação de RNA H e confere mais estabilidade térmica à reação.

Em um microtubo RNase *free* adicionou-se 1 µL de *primer* randômico, 1 µL de dNTP a 10 mM, 5 µL de RNA previamente extraído de acordo com o tópico 3.1 e 6 µL de água RNA-se *free*.

A mistura foi incubada a 65° C por 5 minutos e posteriormente, a amostra foi incubada no gelo por 1 minuto. Adicionou-se 4 µL do tampão da enzima (5X First-Strand Buffer), 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de RNase *OUT* e 1 µL da enzima SS III RT.

O microtubo foi incubado a 25° C por 5 minutos e em seguida incubado a 50° C por 1 hora. Após este passo realizou-se uma última incubação a 70° C por 15 minutos. Após a obtenção do cDNA as amostras foram encaminhadas para o processo de amplificação do material genético.

3.3 - Amplificação gênica

Um isolado de suspensão fecal (4474) identificado pelo estudo de projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF nº 93/09 em 11/05/2009 cedido pelo Núcleo de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN) foi detectado o norovírus GII.4 pela técnica de RT-PCR multiplex (ELNIFRO et al., 2000) e após sequenciamento foi identificado como variante 2006b. Esta amostra era de 2007, de uma criança de 1 ano de idade, moradora de Planaltina/DF. O aspecto das fezes foi relatado como diarreico e os resultados dos exames laboratoriais realizados foram negativos para bactérias piogênicas e para rotavírus (ELISA).

Os pares de *primers* NoroII/4 *BamH I* For e M10 *Sac Pst I* Rev (Tabela 1) foram utilizados para amplificar os genes que correspondem às proteínas VP1, VP2 e a região

3'UTR por meio da técnica de PCR, com a ação da enzima termoestável Long Amp DNA polimerase (New England Biolabs).

Tabela 1. *Primers* utilizados nas reações de PCR

Amplificação da região VP1 e VP2	
NoroII/4 <i>BamHI</i> For	5' - TTT GGA TCC ATG AAG ATG GCG TCG AA – 3'
M10 Sac <i>Pst I</i> Rev	3' - TATT CTG CAG AGC TCA AGC GTT ATC AAC GCA GA – 5'

A decisão em expressar as proteínas VP1+VP2+3'UTR foi baseada de acordo com o estudo realizado por BERTOLOTTI-CIARLET et al. (2003), o qual demonstra que os elementos de regulação gênica através da interação de proteínas virais ou celulares podem estar associados à síntese de VP2. Até o momento a relação dos elementos como cauda de poli (A) e a região terminadora 3' UTR na expressão gênica de NV ainda não está definida, todavia, a expressão de VP1 em células de inseto foi aumentada com a presença da região 3'UTR em baculovírus recombinantes.

A reação de PCR seguiu as seguintes condições:

Mistura da reação	Programa
5µL Tampão 5X da Long Amp	80°C 1 minuto
3 µL dNTPs 2,5 µM	94°C 2 minutos
0,5 µL primer NoroII/4 <i>BamHI</i> For (10mM)	94°C 30 segundos
0,5 µL primer M10 <i>Sac Pst I</i> Rev (10mM)	55°C 1 minuto
1 µL cDNA obtido na RT-PCR	65°C 2 minutos
1 µL enzima Long Amp	65°C 10 minutos
14 µL H ₂ O Milli Q	12°C (próxima etapa)
Volume final de 25 µL	35 ciclos

O tamanho esperado dos fragmentos de DNA amplificados era de 2418 pb. Para a confirmação, submetem-se os produtos de PCR à eletroforese em gel de agarose 1%.

Com o objetivo de aumentar a quantidade de DNA foram realizadas mais 5 reações e devido à característica dos produtos de PCR possuírem extremidades abruptas

criadas pela Long Amp DNA polimerase, foi realizada a adenilação do inserto com Taq DNA polimerase (InvitrogenTM) submetidos a uma temperatura de 70°C por 30 minutos, para a clonagem em pGEM-T Easy (Promega®).

O vetor pGEM-T Easy (Promega®) é considerado de alta produção de cópias devido à presença de promotores T7 e SP6 RNA polimerase que estão presentes na região de clonagem múltipla. Além disso, é linearizado nas extremidades da região 3' com a presença de uma timidina, o que melhora significativamente a eficiência da ligação dos produtos de PCR, impedindo a recircularização do mesmo. O plasmídeo em questão contém sítios de restrição na região de clonagem múltipla e é flanqueado pelas enzimas de restrição *EcoR I*, *BstZ I* e *Not I*.

Após a corrida de eletroforese em gel de agarose 1% corou-se o gel com Violeta Cristal (40µg/mL). A banda formada de fragmentos de DNA foi submetida à técnica de purificação utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

Quantificou-se em gel o produto da purificação para a posterior ligação no vetor plasmidial pGEM-T Easy (Promega®) de acordo com o fabricante utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega®) na condição de 4°C durante a noite.

3.4 - Preparo das células eletrocompetentes DH5α

Estas células são adequadas para a construção de bancos de genes ou bibliotecas de cDNA utilizando vetores derivados de plasmídeos. O marcador $\phi 80lacZ\Delta M15$ proporciona a α complementação do gene da β -galactosidase a partir de vetores específicos, tornando-se possível o rastreamento das colônias azuis e brancas nas placas com colônias bacterianas. (InvitrogenTM)

As células de *Escherichia coli* DH5α foram preparadas de acordo com SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989.

3.5 - Transformação em *E.coli* DH5 α

Após a ligação do inserto ao vetor pGEM-T Easy (Promega®), adicionou-se 2,5 μ L do produto de ligação a 50 μ L de células DH5 α e a transformação seguiu os parâmetros elétricos: 1,8 kV, 25 F e 200 Ω .

Adicionou-se 1 mL de meio SOC e as células eletroporadas foram submetidas à incubação a 37°C sob agitação de 240 rpm por 1 hora. Em uma placa contendo meio LB agar com ampicilina (100 μ g/mL), IPTG (40 μ g/mL) e X-Gal (100 μ g/mL) foram semeados 100 μ L das células.

As colônias brancas foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 μ g/mL) e submetidas à incubação a 37°C sob agitação de 240 rpm durante a noite.

A extração plasmidial foi realizada pela técnica padrão de miniprep de acordo com SAMBROOK & RUSSEL, 2006. Posteriormente digeriu-se os clones de perfil esperado com a enzima *EcoR I* (New England Biolabs, 20 U/ μ L) para confirmação após corrida em gel de agarose 1%.

Estes clones foram enviados para sequenciamento na Macrogen (Coréia) e com o auxílio dos programas *Staden Package* e BLAST para análise dos sequenciamentos, confirmados clones no sentido correto (*frame*).

Após digestão dupla com as enzimas *BamH I* e *Pst I* (New England Biolabs, 20 U/ μ L) purificou-se o inserto liberado do vetor pGEM-T Easy (Promega®) conforme descrito anteriormente para a posterior subclonagem no vetor pFASTBac1 (Invitrogen™).

No vetor pFASTBac1 (Invitrogen™) a expressão do gene de interesse é controlada pelo promotor da poliedrina (PH) ou promotor p10 para a expressão em alto nível em células de inserto. Este plasmídeo transporta o elemento Tn7 contendo o gene de resistência à gentamicina, o promotor da poliedrina, uma região múltipla no sítio de clonagem e o sinal de poliadenilação SV40.

3.6 - Subclonagem em pFASTBac1

O vetor de expressão pFASTBac1 (Invitrogen™) foi previamente submetido à digestão dupla com as enzimas *BamH I* e *Pst I* (New England Biolabs, 20 U/μL). Em seguida realizou-se a desfosforilação com CIP (New England Biolabs, 10 U/μL) por 1h a 37°C.

A ligação do inserto ao vetor conforme descrito no final do item 3.3 foi realizada. A transformação em células DH5α e a extração do DNA plasmidial foram realizadas conforme descrito no tópico 3.5.

Os clones de interesse foram digeridos com as enzimas *BamH I* e *Pst I* (New England Biolabs, 20 U/μL) confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente encaminhados para análise de sequenciamento na Macrogen (Coreia).

3.7 - Preparo das células termocompetentes DH10Bac

As células DH10Bac são utilizadas para a produção de baculovírus recombinantes e expressão de proteínas. Estas células contêm um bacmídeo pMON14272 e um plasmídeo auxiliar pMON7124. O bacmídeo contém um replicon mini-F, o gene de resistência à canamicina, o sítio attTn7 e o fator de complementação LacZ α. O plasmídeo auxiliar contém a região tnsABCD que fornece as proteínas necessárias para a transposição no sítio de inserção mini-Tn7 do plasmídeo doador no local de destino no bacmídeo (Invitrogen™).

Colônias de células *Escherichia coli* DH10Bac foram crescidas em placa contendo LB ágar após incubação durante a noite (cerca de 18 horas). Com colônias isoladas da placa realizou-se um pré-inóculo em tubo cônico de 15 mL contendo 1 mL de meio LB líquido. O tubo foi submetido à incubação de 37°C a 240 rpm durante a noite.

Em dois erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de meio LB líquido estéril em cada um, adicionou-se 200 μL de pré-inóculo. Após 2 a 3 horas de incubação a 37°C

e 240 rpm realizou-se a leitura espectrofotométrica para observar a densidade ótica (O.D 600), sendo ideal uma O.D de 0,6 a 0,7.

Após atingir a O.D esperada os volumes foram transferidos dos erlenmeyers para tubos de centrífuga estéreis (corex) e a partir desta etapa todo o procedimento foi realizado em condições refrigeradas. Os tubos permaneceram no gelo por 15 minutos.

Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e adicionou-se 200 mL da Solução 1 gelada em cada tubo e incubou-se no gelo por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Solução 1

0,588g	Acetato de potássio 30mM
2,42g	Cloreto de rubídio 100mM
0,294g	Cloreto de cálcio 10mM
2g	Cloreto de manganês 50mM
30mL	Glicerol 15%
	pH 5,8

Os sobrenadantes foram desprezados e os *pellets* ressuspensos com 100 mL da Solução 2 gelada em cada tubo e incubou-se no gelo por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Solução 2

0,21g	MOPS 100mM
1,1g	Cloreto de cálcio 75mM
0,121g	Cloreto de rubídio 10mM
15mL	Glicerol 15%
	pH 6,5

O conteúdo dos tubos foram reunidos 2 a 2, restando 4 tubos cônicos com 50 mL de Glicerol 10% e células. Os tubos foram centrifugados a 4500 rpm por 15 minutos a 12°C. Os conteúdos foram novamente reunidos nas mesmas condições até restar um único tubo.

O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas num volume residual de 1 mL da Solução 2. Estas foram aliqüotadas no volume de 100 μ L em microtubos de 1,5 mL e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido antes de serem acondicionadas a -80°C .

3.8 - Transformação em DH10Bac e Sistema Bac-to-Bac

Como já descrito, as células de *Escherichia coli* denominadas DH10Bac possuem o genoma completo de um baculovírus sob a forma plasmidial (basmídeo). Este, apresenta um sítio de inserção de clonagem por um mecanismo de transposição sítio-específica no *locus* da poliedrina (Tn7) e um outro plasmídeo auxiliar (*helper*), o qual codifica transposases para o evento de transposição entre o plasmídeo doador pFASTBac1 como inserto de interesse e o genoma do basmídeo receptor (Figura 3).

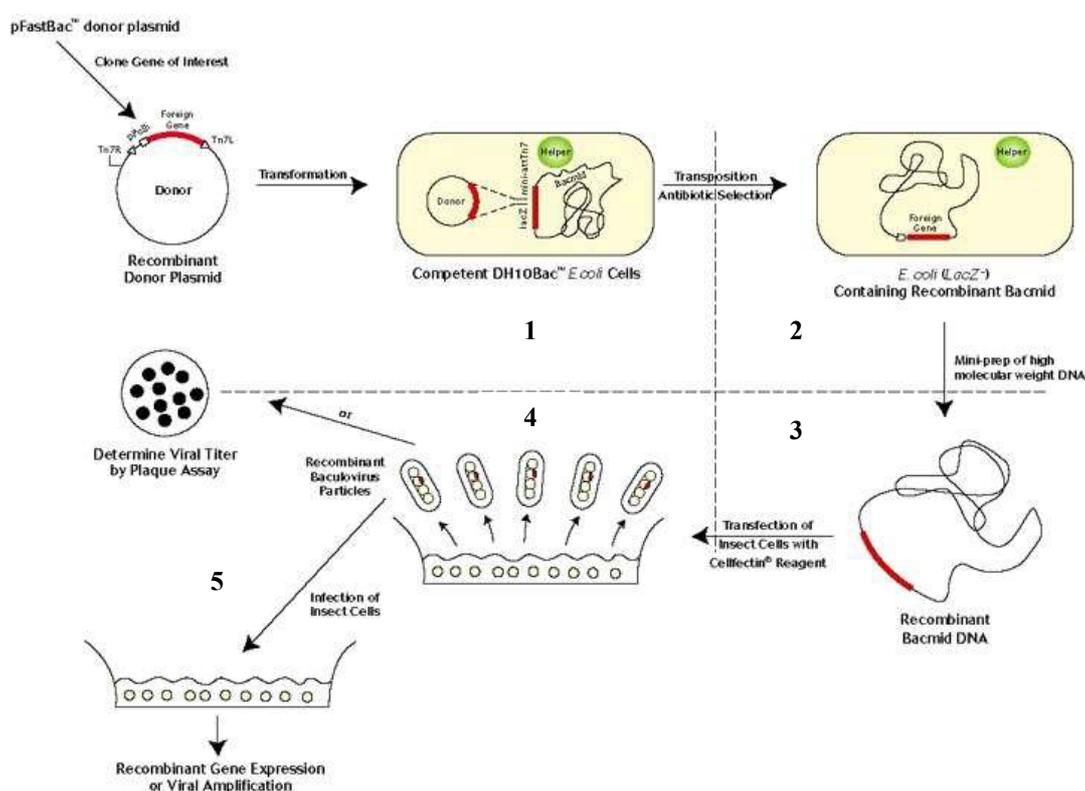


Figura 3. Sistema Bac-to-Bac de expressão. Figura representativa da transformação de bactérias DH10Bac que possuem o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de basmídeo, o plasmídeo pFASTBac1 e o inserto de interesse (1). A transposição (2) permite a inserção do gene selecionado no basmídeo que posteriormente é selecionado pelo antibiótico canamicina, seguido da extração do DNA do basmídeo (3). Transfecção do basmídeo nas células de inseto (4). Pode ser realizada a titulação viral para

infectar novas células e a posterior produção da proteína recombinante (5). Fonte: Bac-to-bac Baculovirus Expression System Manual – Invitrogen™

Esta transformação foi realizada pelo método de choque térmico a 42°C, conforme instruções do fabricante (Invitrogen™). As colônias foram selecionadas após a incubação de 48 horas a temperatura de 37°C das placas com LB ágar contendo 50 µg/mL de canamicina, 7 µg/mL de gentamicina, 10 µg/mL de tetraciclina, 100 µg/mL de X-Gal e 40 µg/mL de IPTG.

Cada colônia branca foi transferida para um tubo cônico de 12 mL contendo 3 mL de meio LB líquido com as mesmas concentrações de canamicina e gentamicina descritas anteriormente, pois, o gene de resistência à canamicina está localizado no bacmídeo e nas células DH10Bac e o gene de resistência à gentamicina está apenas nas bactérias nas quais ocorreram o evento de transposição.

Os inóculos foram incubados à 37°C sob agitação de 240 rpm durante a noite. O DNA plasmidial sequencialmente extraído seguiu as orientações do fabricante (Bac-to-bac Baculovirus Expression System Manual – Invitrogen™).

3.9 - Confirmação dos bacmídeos

O DNA do bacmídeo apresenta alto peso molecular e número baixo de cópias, portanto, a confirmação da transposição é realizada por meio de PCR. As combinações dos *primers* M13 For com M10 *Sac Pst I* Rev e NoroII/4 *BamH I* For e M13 Rev foram utilizadas. As sequências dos *primers* M13 estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados nas reações de PCR para confirmação do bacmídeo.

Confirmação do bacmídeo	
M13 For	5' – GTT TTC CCA GTC ACG AC – 3'
M13 Rev	5' – CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3'

As reações de PCR seguiram as condições abaixo:

Mistura da reação 1	Programa
2,5µL Tampão 5X da Long Amp	80°C 1 minuto
2 µL dNTPs 2,5 µM	94°C 2 minutos
0,5 µL primer NoroII/4 <i>BamHI</i> For (10mM)	94°C 15 segundos
0,5 µL primer M13 Rev (10mM)	50°C 30 segundos
0,5 µL DNA do bacmídeo	65°C 3 minutos
0,2 µL enzima Long Amp	65°C 10 minutos
18,8 µL H ₂ O Milli Q	12°C (próxima etapa)
Volume final de 25 µL	35 ciclos

Mistura da reação 2	Programa
2,5µL Tampão 5X da Long Amp	80°C 1 minuto
2 µL dNTPs 2,5 µM	94°C 2 minutos
0,5 µL primer M13 For (10mM)	94°C 15 segundos
0,5 µL primer M10 <i>Sac Pst I</i> Rev (10mM)	50°C 30 segundos
0,5 µL DNA do bacmídeo	65°C 3 minutos
0,2 µL enzima Long Amp	65°C 10 minutos
18,8 µL H ₂ O Milli Q	12°C (próxima etapa)
Volume final de 25 µL	35 ciclos

Os produtos das reações de PCR foram confirmados em eletroforese de gel de agarose 1%.

3.10 - Transfecção em células de inseto

Cerca de 1 µg de bacmídeo recombinante foi diluído em 200 µL do meio TC-100 sem soro fetal bovino em placas de poliestireno individuais (35mm). Acrescentou-se em outra placa um volume de 5 µL de *Cellfectin* (InvitrogenTM) para cada 200 µL de meio TC-100 sem soro, por amostra. A exposição do DNA do bacmídeo a vesículas

pequenas compostas por bicamadas de fosfolipídeos são introduzidos nas células de inseto. Estes lipossomos fusionam-se à membrana das células e então o DNA é liberado no interior do citoplasma celular e encaminhado ao núcleo para iniciar a infecção viral.

Retirou-se 200 μL desta mistura e acrescentou-se a cada placa com as células BTITn5B1-4 (*Trichoplusia ni*) que receberam os bacmídeos recombinantes. Após incubação de 30 minutos, uma placa de poliestireno de 6 poços ($9,6 \text{ cm}^2$) contendo células da mesma linhagem recebeu o DNA e lipossomos nos poços identificados para cada amostra e foi incubada a temperatura ambiente por três horas.

As células BTI-Tn5B1-4 apesar de formarem monocamadas irregulares em placas, são adaptáveis para cultura em suspensão isenta de soro e fornecem maior expressão de proteínas recombinantes (5 a 10 vezes) se comparadas com a linhagem Sf-21.

Após o período de três horas acrescentou-se 1,5 mL de meio TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino e então a placa foi submetida a uma incubação a 27°C por 7 dias.

3.11 - Cinética de proteínas

Observou-se o pico de expressão das VLPs de NV após os tempos de 24 h.p.i, 48 h.p.i, 72 h.p.i e 120 h.p.i, aonde foram recolhidos os sobrenadantes das placas. Os sobrenadantes de cada tempo foram submetidos à centrifugação de 5000 rpm por 5 minutos para a retirada das células.

Novas células da linhagem BTI-Tn5B1-4 foram infectadas em três garrafas de material plástico para cultivo de células de inseto TPP® (Techno Plastic Products AG, Switzerland) de 75 cm^2 (cerca de 5×10^6 e 1×10^7 células) com o sobrenadante das células após 120 h.p.i. Após 5 dias de infecção o sobrenadante que correspondeu a 105 mL de meio de cultura foi submetido ao processo de ultracentrifugação, após a retirada das células. Dez mililitros do sobrenadante foram reservados como estoque viral.

O volume total foi submetido à ultracentrifugação no Rotor 70 Ti Beckman a uma velocidade de 30000 rpm por 2 horas sob temperatura de 4°C para a sedimentação das proteínas.

Os *pellets* ressuspensos em tampão PBS 0,5x pH 5.5 foram reservados para análise por SDS-PAGE e *Western Blotting* utilizando o tempo zero (Mock) como controle negativo.

Nestes mesmos períodos as células de inseto foram observadas no microscópio de luz invertida Axiovert 100 (Zeiss) para verificação dos sintomas de infecção (relação núcleo citoplasma e morfologia celular).

3.12 - Multiplicidade de Infecção (MOI)

Para que o vírus seja determinado como infectivo, vários fatores precisam estar envolvidos como a proporção das partículas virais completas ou infecciosas, o reconhecimento do receptor celular e a suscetibilidade da célula hospedeira.

Em suspensões virais com as células que serão infectadas é importante determinar a proporção entre a quantidade de vírus que será inoculada e a quantidade de células no momento da infecção (O REILLY, MILLER & LUCKOW, 1994). Portanto, o estoque viral da infecção obtida no item 3.11 foi titulado.

Para quantificar o estoque viral foram infectadas células diluídas de maneira em que a diluição do estoque viral variasse entre 0,05 e 0,1 em placa estéril de 96 poços. Após 7 dias de infecção realizou-se a leitura da placa no microscópio de luz invertida Axiovert 100 (Zeiss) e calculou-se o MOI da seguinte maneira:

$$\text{Inóculo (mL)} = \text{MOI (pfu/cel)} \times \text{número de células} / \text{título estoque viral (pfu/mL)}$$

O título foi determinado pelo método de TCID₅₀ (REED & MUENCH, 1938).

3.13 - Purificação da VLP com Cloreto de Césio (CsCl) e por *Íon Exchange* (cromatografia por troca iônica)

Para assegurar a pureza das VLPs construídas nos sistemas de expressão, as técnicas de purificação devem ser empregadas de acordo com cada tipo de vírus. Os principais tipos de purificação incluem lise celular, métodos de clarificação, concentração e remoção de células ou produtos residuais. Em algumas técnicas de expressão como a utilização de células de inseto, as VLPs são secretadas para o meio de cultura e os passos de purificação são realizados com o sobrenadante das placas infectadas (ZELTINS, 2013).

Porém, nos casos em que as VLPs montadas permanecem dentro da célula é importante verificar de acordo com a natureza viral se a melhor alternativa é a utilização de detergentes para a lise das células, ou algum tratamento mecânico como sonicação (dispersão ultra-sônica) , repetidos ciclos de gelo/degelo e em alguns casos tratamentos enzimáticos. Vale ressaltar que para cada VLP construída deve ser utilizado um tampão de extração com pH que mantenha a estabilidade e integridade da partícula, bem como nos casos de proteger as partículas de proteases e oxidação. Estes tampões devem ser suplementados com agentes quelantes e inibidores de proteases (ZELTINS, 2013).

Em escala laboratorial as purificações de VLPs por ultracentrifugação pelos gradientes de cloreto de césio (CsCl) e sacarose são muitas vezes suficientes para a obtenção de partículas puras, porém, com baixa escalabilidade e muitas horas de ultracentrifugação. Em escala industrial a utilização de ultracentrifugação obtém algumas restrições, devido ao risco de agregação das partículas, a falta de escalabilidade e o aumento da intensidade do trabalho (KOHO et al., 2012; ZELTINS, 2013).

A cromatografia iônica (*Ion Exchange*) é outra metodologia que pode ser aplicada para purificação a qual separa biomoléculas de acordo com a diferença das cargas iônicas. Atualmente esta técnica vem sendo utilizada para purificação de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos. A técnica é capaz de separar biomoléculas apenas com pequenas diferenças de potencial iônico e uma vez que todas as moléculas com grupos ionizáveis podem ser tituladas, a carga destas em uma superfície líquida é

totalmente dependente do pH (BIOSCIENCES, 2004; VICENTE et al., 2011; KOHO et al., 2012).

A interação entre moléculas carregadas e os meios com cargas opostas são controlados para fornecer a ligação e eluição das moléculas específicas. Assim, uma proteína que não possui carga a um pH equivalente ao seu ponto isoelétrico (PI), não realizará a interação com o meio ou uma matriz de partículas esférica que são positivamente ou negativamente carregadas (coluna). Já uma proteína a um determinado pH acima do seu ponto isoelétrico ligar-se-á de forma positiva e a um pH abaixo do seu PI, a ligação será de carga negativa (BIOSCIENCES, 2004).

Para determinar a resolução da separação de biomoléculas pela técnica de troca iônica, realiza-se a combinação do grau de separação dos picos eluídos da coluna, a capacidade da coluna de produzir picos simétricos e a quantidade de amostra aplicada no sistema. Estes fatores são influenciados pelas propriedades da matriz, condições de ligação e eluição, condicionamento da coluna, taxas de fluxo, trocas iônicas para então a resolução (R_s) ser definida como a distância entre os picos máximos em comparação com a média da largura da base destes picos, que podem ser observados na análise do cromatograma (BIOSCIENCES, 2004).

Portanto, após a expressão proteica e purificação, as amostras devem ser acondicionadas nas mesmas condições que o tampão de partida utilizado na cromatografia, todavia posteriormente deverão ser dialisadas em um tampão de pH determinado para a conservação das VLPs.

3.13.1 – Cloreto de Césio

O *pellet* equivalente a 105 mL de meio de cultura obtido por meio da ultracentrifugação descrita no item 3.11 foi ressuspensão com Cloreto de Césio (CsCl 0,39g/mL) diluído em PBS 0,5x pH 5.5, de acordo com AUSAR et al. (2006).

O material foi ultracentrifugado no Rotor SW50 Ti Beckman a 35000 rpm por 18 horas a 4°C. As fases superior, média e inferior foram coletadas, devidamente identificadas e dialisadas no tampão PBS 0,5x pH 5.5 em três ciclos de 3 horas cada.

As amostras foram estocadas a 4°C para posterior análise por SDS-PAGE e *Western Blotting*.

3.13.2 – Cromatografia por troca iônica

Seis garrafas plásticas de 75cm² contendo células da linhagem BTI-Tn5B1-4 foram infectadas com cerca de 1 mL de estoque viral para realizar a purificação de maior quantidade de proteínas, o que correspondeu a 210mL de meio de cultura.

Para a coleta do sobrenadante realizou-se centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi reservado para ser submetido ao colchão de sacarose a 20%.

As células foram lavadas por três vezes no Tampão Fosfato de Sódio 50 mM por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. Realizou-se uma lavagem final com Tampão Fosfato de Sódio 50 mM adicionado de Triton 1% para lise celular com as mesmas condições de centrifugação.

Com o sobrenadante resultante das três lavagens com Tampão Fosfato de Sódio 50 mM e o sobrenadante da lavagem com o mesmo tampão acrescido de Triton 1% realizou-se o colchão de sacarose 20% (cerca de 1/3 do volume de sacarose a 20% diluída no Tampão Fosfato de Sódio 50 mM e 2/3 do volume de sobrenadante) que foi ultracentrifugado no Rotor T45i Beckman a 14000 rpm por 1 hora a 4°C.

O *pellets* foram ressuspensos em 1 mL do tampão Fosfato de Sódio 50 mM para manter as condições de pH e então submetidos à purificação por cromatografia.

A preparação correta do tampão é essencial para que se obtenha uma ótima separação das proteínas e evitar qualquer deterioração na coluna. Pequenos volumes de amostras com alta concentração de sal e após a retirada de possíveis contaminantes como lipídeos ou detergentes iônicos devem ser diluídos com o tampão de início para a cromatografia a fim de reduzir a quantidade de sal e não impedir a ligação na coluna.

As amostras foram submetidas à purificação após as condições adequadas do aparelho AKTA *purifier* (GE Healthcare Lifesciences) e a coluna foi equilibrada previamente com tampão Fosfato de Sódio 50 mM (pH 7,0). Foi aplicada a amostra na coluna de resina de 1 ml HiTrap Q FF (GE Healthcare) com taxa de fluxo de 150 cm/h de acordo com KOHO et al. (2012).

A coluna ou meio foi equilibrada antes do processo de purificação, por isso, tanto o pH quanto a força iônica do tampão de equilíbrio devem ser devidamente selecionados para assegurar que, por exemplo, as VLPs fiquem ligadas na coluna e o restante de outras proteínas que possam ser consideradas impurezas não sejam ionicamente selecionadas.

Após a ligação das proteínas de interesse, ocorreu o processo de eluição com o aumento da força iônica por meio da utilização de um tampão com maior concentração de sal ou alteração do pH. Com o aumento de sais, principalmente sódio e cloreto, os íons competem com os componentes ou proteínas ligadas na coluna e então as proteínas são eluídas. As proteínas com menor carga líquida no pH selecionado foram primeiramente eluídas da coluna de acordo com o aumento da concentração de sais, enquanto que as proteínas de maior carga líquida foram eluídas posteriormente.

As proteínas foram eluídas utilizando um gradiente de 10%, 20% e 40% do tampão de eluição NaCl 1M, 50 mM de Fosfato de Sódio, pH 7,0.

Por fim a coluna foi lavada com 10 CV (volume da coluna) de tampão de eluição e equilibrada com o tampão de corrida até uma constante UV de 280nm.

3.14 - Quantificação da proteína

As proteínas foram quantificadas de acordo com o protocolo NanoDrop 3300 Quant-iT Protein Assay (Thermo Scientific).

3.15 - SDS-PAGE e *Western Blotting*

Foram acrescentadas 10 μ L das amostras purificadas das amostras obtidas pela purificação por CsCl e cromatografia ao mesmo volume do tampão de amostra SDS e incubado a 95°C por 5 minutos.

Realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% conforme Laemmli (1970). As amostras foram analisadas em duplicata (dois géis), um para análise do SDS-PAGE o qual foi submetido à coloração do *Comassie blue* e outro gel o qual foi utilizado para transferência das proteínas a uma membrana de Nitrocelulose *Amershan Hybond C* (GE Healthcare) utilizando o Trans-blot (Bio-Rad) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Utilizou-se o marcador *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas) que torna possível a visualização da transferência das proteínas para a membrana após o período de 15 minutos a 15 V.

Bloqueou-se a membrana com o tampão PBS 1X com 3% de leite em pó desnatado por 1 hora. Em seguida adicionou-se o anticorpo primário produzido em coelho (anti-NV GII/4 gentilmente cedido por Dr. Shinichi Kobayashi, *Aichi Prefectural Institute of Public Health*, Nagoya, Japão) na concentração de 1:5000 e incubou-se por 2 horas sob leve agitação.

A membrana foi lavada três vezes com PBS Tween (0,1%) sob agitação leve com intervalos de três minutos a cada lavagem.

Em seguida acrescentou-se o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) na concentração de 1:3000 e incubou-se por 1 hora sob leve agitação. Novamente a membrana foi lavada três vezes com PBS Tween (0,1%) e posteriormente revelada com NBT/BCIP, sendo que estes reagentes são os substratos para ação da fosfatase alcalina. Após a reação, a mesma foi interrompida por meio da lavagem com água destilada.

3.16 - Visualização das VLPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Telas de cobre de 2,5 mm foram previamente preparadas com Formvar e 10 a 15 µL da amostra em duplicata foram colocados em contato com as telas.

As telas foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e em seguida realizou-se a contrastação com acetato de uranila 1% por 5 minutos. Retirou-se o excesso com água destilada.

As telas foram observadas no MET JEM 1011 (JEOL) da Universidade de Brasília, bem como no MET EM 109 (Zeiss) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, com a colaboração do Dr. Elliot Watanabe Kitajima.

3.17 - Imunização de Ratos

Dois ratos machos da linhagem Wistar, com pesos de 312 g (Rato 1) e 188 g (Rato 2) foram sensibilizados com 30 µg de proteína de capsídeo (VLP de NV) purificada por cromatografia, em quatro imunizações com intervalos de 2 semanas cada.

Na primeira sensibilização aplicou-se 150 µL da amostra com o mesmo volume de Adjuvante de Freund completo (Sigma-Aldrich) e a inoculação foi subcutânea.

A partir da segunda sensibilização, utilizou-se o Adjuvante de Freund incompleto (Sigma-Aldrich). Após 1 semana da última inoculação, realizou-se a punção cardíaca dos ratos e foi retirado cerca de 5 mL de sangue total do Rato 1 e 4 mL de sangue total do Rato 2. Após a coagulação, o sangue foi submetido à centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi armazenado a -20°C.

3.18 - *Phage Display*

A seleção da Biblioteca de fagos pré-existente gentilmente cedida pela Dra. Andrea Queiroz Maranhão (construída durante o trabalho de Doutorado da aluna Carmela Dantas Barbosa) foi realizada segundo o *Phage Display - A Laboratory Manual* (BARBAS, 2001).

Esta biblioteca foi construída a partir da obtenção de genes rearranjados das cadeias variáveis leves e pesada de pacientes com osteossarcoma (DANTAS-BARBOSA, BRÍGIDO & MARANHÃO, 2005). Os genes foram amplificados por PCR (Figura 4) e o repertório obtido a partir da extração de RNA de células sanguíneas periféricas especialmente os linfócitos B.

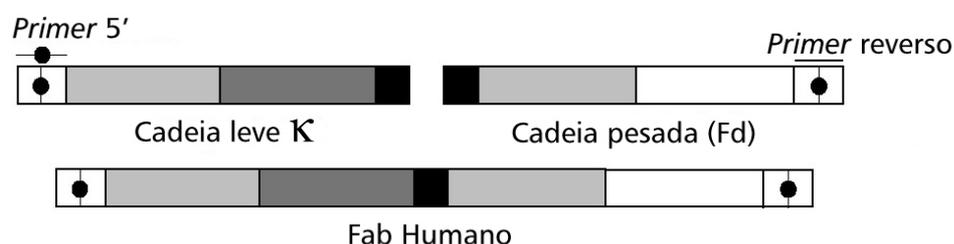


Figura 4. Representação esquemática do PCR de fusão dos 3 ciclos para a obtenção do Fab e posterior clonagem em pComb3XSS. Tamanho esperado entre 1500 a 1600 pb.

Ligado a um plasmídeo (pComb3XSS) o DNA obtido da amplificação foi transformado em células de bactérias específicas e juntamente com a presença de fagos auxiliares (*helpers*) a informação genética da proteína foi fusionada, resultando na formação de fagos recombinantes em que a proteína de interesse foi acoplada à proteína de capsídeo do fago (Figura 5).

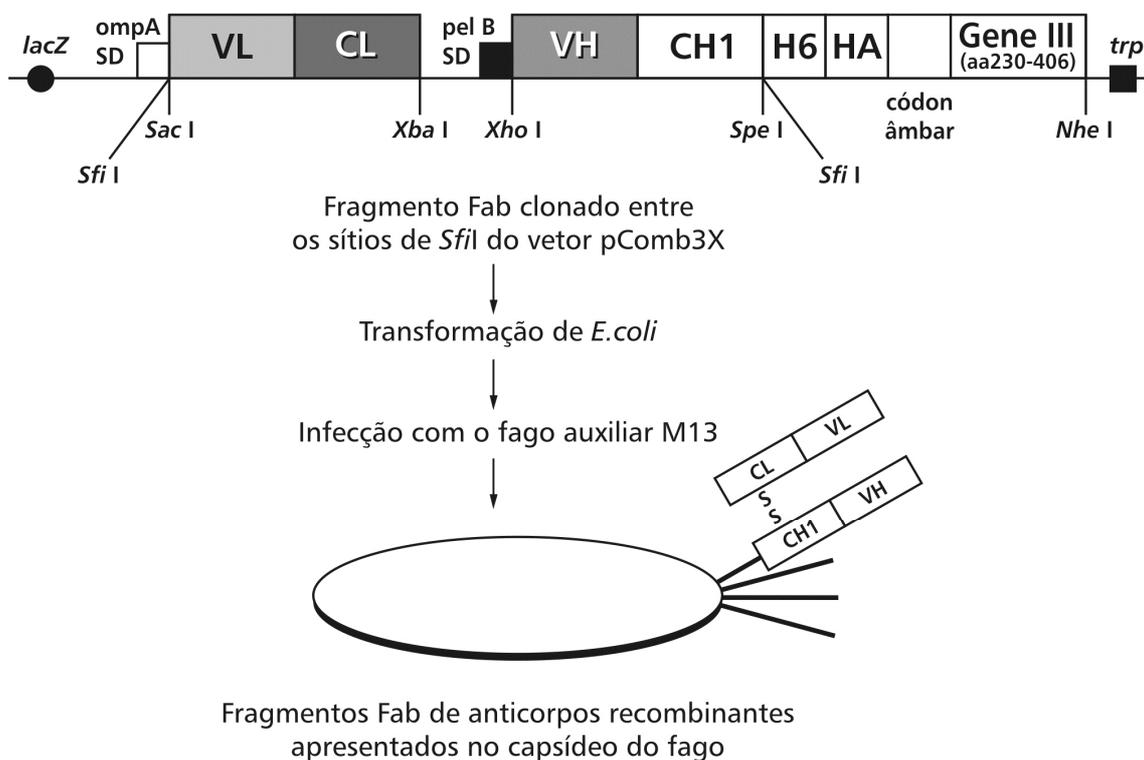


Figura 5. Representação esquemática do vetor pComb3XSS. Este vetor possui cerca de 4,5 kb e os promotores *plac*, *ori ColE1*, *ori f1*, *Ap^R*. Imediatamente após a região de clonagem do gene do anticorpo, uma região com seis histidinas (H6) pode ser utilizada para purificação em coluna de níquel ou para detecção com anticorpo monoclonal anti-His Tag. Uma outra região codificando os resíduos que constituem o epítipo de hemaglutinina (HA) possibilitam a detecção do Fab com a utilização de um anticorpo anti-hemaglutinina. A presença do códon (TAG) não reconhecido eficientemente por linhagens supressoras (Sup E44), como por exemplo, a XL 1 – Blue ou TG1, permite a expressão de proteínas de fusão ou a produção do anticorpo livre da proteína III, na forma solúvel, em algumas linhagens bacterianas não supressoras (HB2151). A sequência codificadora para parte da proteína III de bacteriófagos filamentosos (aminoácidos 230 a 406) também é constituinte do plasmídeo (SCOTT & BARBAS, 2000).

Os fagos específicos foram amplificados para posteriores seleções biológicas que envolvem os ciclos de ligação, eluição e amplificação. (SMITH, 1985). Na etapa de eluição foram utilizados tampões ácidos ou de elevada força iônica que geraram uma instabilidade inespecífica entre as proteínas e este fato aumenta a probabilidade de selecionar fagos específicos que interagem com a molécula alvo (Figura 6) (VODNIK et al., 2011).

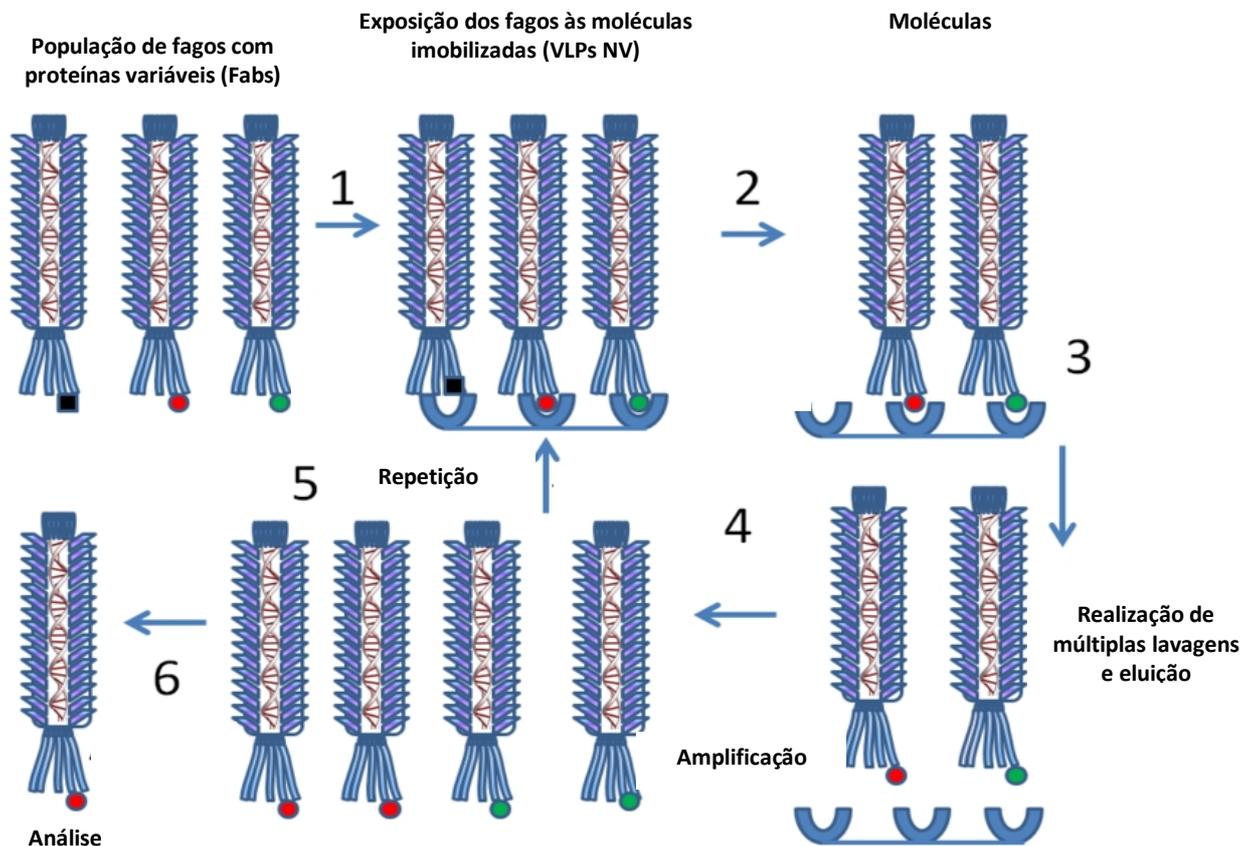


Figura 6. Ciclos do *Phage Display*. Uma população de fagos exibindo proteínas-alvo na sua superfície, no caso Fabs e expostos a uma molécula alvo (VLP de NV). Após a seleção por afinidade, os fagos com maior ligação são eluídos e amplificados. No último ciclo os anticorpos monoclonais expostos nos fagos que obtiveram maior afinidade serão analisados. Adaptado de TERSTAPPEN et al. (2007).

3.18.1 - Preparação de células XL1-Blue eletrocompetentes

As células de *Escherichia coli* XL1-Blue (InvitrogenTM) foram preparadas para serem utilizadas na amplificação da biblioteca por eletroporação, bem como para os pré-inóculos nos experimentos de seleção.

O protocolo foi baseado de acordo com AZEVEDO et al. (2003).

3.18.2 - Teste de eficiência da célula XL1-Blue

Em um microtubo de 1,5 mL previamente incubado no gelo por 10 minutos adicionou-se 1 μL do plasmídeo PUC19 a concentração de 100 $\text{pg}/\mu\text{L}$. A cuveta de eletroporação de 0,2 cm também foi mantida no gelo.

Cinquenta microlitros das células *E.coli* XL1-Blue (Invitrogen™) preparadas no tópico 3.18.1 foram transferidas para o tubo contendo 1 μL do plasmídeo PUC19 e em seguida foi realizada a eletroporação na cuveta de 0,2 cm seguindo os parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 F e 200 Ω , no equipamento Gene Pulser com Pulser Controller da Bio-Rad: (Bio-Rad).

A cuveta foi lavada com 1 mL de meio SOC e em seguida com mais 2 mL do mesmo meio. Foram transferidos os 3 mL de cultura para um tubo cônico de 50 mL e incubou-se a 37°C a 250 rpm por 1 hora.

Foram acrescentados 7 mL de meio SB totalizando o volume de 10 mL. Os volumes de 1 μL , 10 μL e 100 μL foram plaqueados em LB Agar contendo carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e as placas incubadas a 37°C durante a noite.

Para calcular a eficiência utilizou-se a seguinte fórmula:

$$[\text{Número de colônias/volume plaqueado em } \mu\text{L}] \times [1 \times 10^4 \mu\text{L}/100\text{pg}] \times [1 \times 10^6 \text{pg}/1 \mu\text{g}]$$

3.18.3 - Preparação do Fago Auxiliar (adaptado de Rader et al., 2000). Obtenção de placas de lise

Foram inoculados 2 mL de meio SB contendo tetraciclina a uma concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com 2 μL de XL1-Blue eletrocompetente. O inóculo foi incubado em agitador a 250 rpm a 37°C por cerca de 1 a 2 horas (até atingir uma $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0,6$ a 1,0).

As células (50 μL) eram aliqüotadas em microtubos e adicionava-se 1 μL de fagos auxiliares VCSM13 diluídos (10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}). As células com os fagos foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente.

A 3 mL de meio LB top Agar liquefeito (45-50°C), adicionou-se 50 μL de células contendo os fagos diluídos, homogeneizando e em seguida o meio foi espalhado em placas contendo uma fina camada do meio LB agar.

As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. Após a incubação era possível observar a formação de placas de lise (retardo de crescimento).

3.18.4 - Amplificação das placas de lise

Em 10 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C contendo tetraciclina a uma concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram inoculados 10 μL de XL1-Blue eletrocompetente em um tubo cônico de 50 mL. O inóculo foi incubado em agitador a 250 rpm a 37°C por uma hora.

Com auxílio de um palito estéril transferiu-se uma colônia da placa de lise obtida no procedimento anterior para a cultura. A cultura foi reincubada em agitador a 250 rpm a 37°C por 2 horas.

A cultura infectada foi transferida para um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, tetraciclina a uma concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubou-se por 15 minutos na mesma temperatura.

Em seguida foi adicionado canamicina a uma concentração final de 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a cultura foi incubada durante a noite em agitador a 250 rpm a 37°C.

Centrifugou-se a cultura a 2.500 $\times g$ por 15 minutos e o sobrenadante era transferido para tubos cônicos de 50 mL estéreis. Os tubos foram incubados a 70°C por 20 minutos com o objetivo de eliminar células ainda presentes na cultura.

Os tubos foram centrifugados a $2.500 \times g$ por 15 minutos e 10 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos cônicos de 15 mL estéreis e estocados a 4°C .

3.18.5 - Determinação do título da preparação de fagos auxiliares

Foram inoculados 2 mL de meio SB contendo tetraciclina a uma concentração final de $10 \mu\text{g/mL}$ com $2 \mu\text{L}$ de XL1-Blue eletrocompetente. O inóculo foi incubado em agitador a 250 rpm a 37°C por cerca de 1 a 2 horas (até atingir uma $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0,6$ a $1,0$).

As células ($50 \mu\text{L}$) eram aliqüotadas em microtubos e adicionava-se $1 \mu\text{L}$ de fagos auxiliares diluídos (10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}). As células com os fagos foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. A 3 mL de meio LB top Agar liquefeito ($45\text{-}50^\circ\text{C}$), foram adicionados os $50 \mu\text{L}$ de células contendo os fagos diluídos, homogeneizando e em seguida o meio foi espalhado em placas contendo uma fina camada de meio LB agar.

As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. Após a incubação era possível observar a formação de placas de lise (retardo de crescimento).

Após a incubação as placas de lise obtidas para cada diluição foram contadas. O título de fagos era expresso em unidades formadoras de placa (pfu)/ mL de fagos.

3.18.6 - Reamplificação da Biblioteca

Dois microlitros do volume do DNA da Biblioteca pré-existente clonado no vetor pComb3XSS foi inserido em $100 \mu\text{L}$ nas células *E.coli* XL1-Blue por eletroporação seguindo os parâmetros elétricos: $2,5 \text{ kV}$, 25 F e 200Ω . O τ esperado nessas condições é $4,0$ a $5,0$ milissegundos.

Foram realizadas 5 eletroporações e em cada uma, as células foram ressuspensas com 1 mL de meio SOC e depois a cuveta foi lavada com mais 2 mL de SOC (volume final de 15mL) e incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm por 1 hora.

Posteriormente o inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 35 mL de meio SB com carbenicilina (100 µg/mL) e tetraciclina (10 µg/mL) e de Glicose 2M.

O volume final de 50 mL foi incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm por aproximadamente 3 horas até a obtenção da densidade ótica (O.D) a 600 nm de 1.0. Ao volume de 50 mL foi adicionado 2 mL do fago auxiliar VCSM13 (*helper*), 148 mL de meio SB preaquecido a 37°C, carbenicilina (100 µg/mL) e tetraciclina (10 µg/mL).

O volume final de 200 mL foi incubado a 37°C sob agitação de 300 rpm por 2 horas. Após este período foi acrescentado canamicina (70 µg/mL) e incubado a 37°C sob agitação de 300 rpm durante a noite.

Uma placa de ELISA com 96 poços foi sensibilizada nos poços 1 e 2 com 0,5 µg de VLP de NV diluído em tampão TBS no volume final de 25µL e foi incubada durante a noite a 4°C.

3.18.7 - Seleção da Biblioteca de Fab utilizando VLP de Norovírus como antígeno

A placa sensibilizada como descrito no item anterior foi incubada por 1 hora a 37°C.

Das células incubadas com os fagos durante a noite foram retiradas duas alíquotas de 1 mL em microtubos, os quais foram submetidos a centrifugação de 5000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi recolhido e armazenado a 4°C e os *pellets* foram armazenados a -20°C. O restante do meio de cultura foi transferido para um tubo de centrífuga esterilizado o qual foi centrifugado a 3000 x g por 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante após a centrifugação foi transferido para um novo tubo de centrífuga esterilizado contendo 8 g de PEG-8000 e 6 g de NaCl. Para uma melhor dissolução o tubo foi submetido à agitação de 300 rpm a 37°C por 5 minutos. Em seguida foi incubado no gelo por 30 minutos. Nos ciclos 2 a 4 foram utilizados 4 g de PEG-8000 e 3 g de NaCl para o volume de 100 mL de sobrenadante.

O tubo contendo PEG-8000 e NaCl foi centrifugado a 15000 x g por 15min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o excesso de meio absorvido sobre um papel toalha. O *pellet* contendo os fagos foi ressuspenso com 2 mL de TBS contendo 1% de BSA e recolhido em microtubo de 2 mL.

Posteriormente o microtubo foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm a 4°C para a retirada do máximo de células. Este foi transferido para um novo microtubo estéril e o processo foi repetido. O sobrenadante contendo os fagos foi armazenado a 4°C.

Dos poços sensibilizados a 37°C da placa de ELISA foi retirado o tampão TBS 1X após 1 hora de incubação, realizou-se lavagem com TBS Tween 0,5% por três vezes e em seguida os poços foram bloqueados com 150 µL de TBS contendo 3% de BSA por 1 hora a 37°C.

Neste período foi realizado o preparo do pré-inóculo de *E. coli* cepa XL1-Blue para a utilização no próximo ciclo. Em um tubo cônico de 50 mL foi adicionado 5 mL de meio SB, tetraciclina (10 µg/mL) e 5 µL de células XL1-Blue, que foi incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm por aproximadamente 2 a 3 horas até obtenção de O.D de 600 nm de 1.0.

O tampão TBS contendo 3% de BSA na placa de ELISA foi retirado após 1 hora de bloqueio, realizou-se lavagem com TBS Tween 0,5% por três vezes e foram acrescentados 100 µL dos fagos sobre os poços sensibilizados e os mesmos foram incubados por 2 horas a 37°C.

Após este período, os poços foram lavados com 150 µL de TBS Tween 0,5% 5 vezes para o ciclo 1, 10 vezes para o ciclo 2 e 15 vezes para os ciclos 3 e 4.

Para cada lavagem realiza-se agitação com a pipeta e entre intervalos de 5 minutos por lavagem o tampão foi trocado. A placa era batida sobre um papel toalha para eliminação de todo excesso de tampão.

Após a última lavagem foi acrescentado 100 μ L de tampão de eluição (Glicina HCl 100mM pH 2.2) nos poços da placa que foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente.

Com o auxílio de uma pipeta, foi realizado agitação vigorosamente por 10 vezes e os fagos eluídos foram transferidos para um microtubo estéril com 12 μ L de Tris-base 2M para neutralização do pH. Este volume foi calculado para 200 μ L de eluído (3 μ L de Tris-base 2M para cada 50 μ L de fago eluído).

A dois mL do pré-inóculo de *E.coli* XL1-Blue devidamente crescido foi acrescentado 50 μ L dos fagos eluídos em um tubo cônico de 50 mL e foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida foi adicionado seis mL de meio SB pré-aquecido a 37°C com carbenicilina (100 μ g/mL) e tetraciclina (10 μ g/mL).

Estas células foram utilizadas para calcular o título de saída (*output*) do próximo ciclo. Os 8 mL finais foram incubados a 37°C sob agitação de 250 rpm por 1 hora. Após este período foi adicionado carbenicilina (100 μ g/mL) e reincubado nas mesmas condições por 1 hora.

Após a reincubação foi adicionado 1 mL do fago auxiliar VCSM13 (*helper*) e a cultura foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL aonde foi acrescentado 91 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, carbenicilina (100 μ g/mL), tetraciclina (10 μ g/mL) e 1 mL de Glicose 2M.

A cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 300 rpm por mais 2 horas. Após este período foi adicionado canamicina (70 μ g/mL) e incubado no sob agitação a 37°C a 300 rpm durante a noite.

Uma outra placa de ELISA de 96 poços foi sensibilizada em dois poços e incubada a 4°C conforme descrito no início deste tópico.

3.18.8 - Preparo para os cálculos dos títulos de entrada e saída dos fagos

3.18.8.1 - Título de Entrada

Em dois tubos cônicos de 15 mL foram adicionados 10 mL de meio SB. No primeiro tubo foi acrescentado 10 μ L dos fagos reservados a 4°C descritos no tópico 3.18.7 (Título de 10^{-3}).

Em seguida 10 μ L desta diluição foram repassados para os 10 mL de meio SB a do segundo tubo cônico de 15 mL (Título de 10^{-6}). Em três microtubos com meio SB foram utilizados para titulação sequencial, o primeiro com 198 μ L e o segundo e o terceiro com 180 μ L. Aos 198 μ L foram acrescentados 2 μ L da diluição realizada no segundo tubo cônico com o título de 10^{-6} (Título de 10^{-8}).

Foram retirados 20 μ L do primeiro microtubo e acrescentado aos 180 μ L do segundo microtubo (Título de 10^{-9}) e 20 μ L do segundo microtubo foi acrescentado aos 180 μ L do terceiro (Título de 10^{-10}). Em outros três microtubos foi acrescentado 100 μ L do pré-inóculo das células *E.coli* XL1-Blue, 1 μ L das diluições 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} dos fagos foram incubados a temperatura ambiente por 15 min.

O volume total de 100 μ L foi plaqueado em meio LB com carbenicilina (100 μ g/mL) com glicose 1% e as placas incubadas a 37°C durante a noite.

3.18.8.2 - Título de Saída

Da cultura preparada com volume final de 8 mL descrita no tópico 3.18.7 foram retirados 20 μ L, os quais foram acrescentados a 180 μ L de meio SB (Título de 10^{-1}).

Em seguida foram realizadas titulações sequenciais retirando 20 μ L do primeiro microtubo que foi acrescentado a 180 μ L de meio SB do segundo microtubo (Título de

10^{-2}). E 20 μL do segundo microtubo foi acrescentado a 180 μL de meio SB do terceiro (Título de 10^{-3}).

Destas titulações foram plaqueados 100 μL em meio LB com carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com glicose 1% e as placas incubadas a 37°C durante a noite.

3.18.9 - Análise de clones individuais por *Phage ELISA*

As culturas de bactérias infectadas com os fagos eluídos em cada ciclo de seleção eram crescidos em meio LB Agar em placas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina. Após a incubação durante a noite a 37°C as colônias isoladas obtidas foram inoculadas separadamente em 1 mL de meio SB em placas do tipo *deep well* de 96 poços contendo carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e glicose 2M.

A placa foi selada e sobre cada poço eram feitos três furos com a finalidade de melhorar a aeração e então a placa foi incubada por 20 horas a 37°C a 300 rpm.

No dia seguinte, 100 μL de cultura de cada clone foram transferidos para uma placa de 96 poços, estéril, do tipo ELISA. Foi acrescentado 63 μL de glicerol a 80% para o estoque de células a -80°C.

Em outra placa do tipo *deep well* contendo 900 μL de meio SB com carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e glicose 2M foi acrescentado 100 μL da cultura e incubada por nove horas a 37°C a 300rpm.

O restante da cultura foi centrifugado a 3000 x g por 15 minutos a 4°C e os sedimentos de células foram armazenados a -80°C para futuras preparações de DNA plasmidial.

Após a incubação foi adicionado 10 μL de fago auxiliar VCSM13 e a placa foi reincubada por mais 1,5 horas sob as mesmas condições.

Ao término da reincubação foi adicionado canamicina (70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em cada poço e a placa foi incubada a 37°C a 300 rpm durante a noite. Após este período a placa foi

centrifugada a 3000 x g por 15 minutos a 4°C e 5 µL dos sobrenadantes de cada poço foram utilizados para a realização do *Phage* ELISA.

Uma placa de microtitulação com 96 poços foi sensibilizada com 1 µg da proteína de interesse (VLP de NV) diluída em PBS, incubada durante a noite a 4°C. Posteriormente realizou-se o bloqueio com a solução de bloqueio PBS1X com BSA a 3% por 1 hora a 37°C.

O tampão de bloqueio foi retirado e a placa lavada 3 vezes com PBST 0,1%. Cada sobrenadante dos fagos descritos neste tópico foram acrescentados nos devidos poços e incubados a 37°C por 2 horas. Os sobrenadantes foram retirados e placa lavada 3 vezes com PBST 0,1%.

O anticorpo anti-M13/HPR (Amersham Pharmacia Biotech) foi diluído no tampão de bloqueio na concentração de 1:2500 e incubado por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação. Após a incubação placa lavada 3 vezes com PBST 0,1%.

O anticorpo anti-IgG de ovelha conjugado à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) foi diluído no tampão de bloqueio na concentração de 1:2500 e incubado por 1 hora em temperatura ambiente.

Lavava-se 3 vezes com PBST 1X e uma vez com tampão para fosfatase alcalina (APB). Revelava-se com 100 µL por poço de pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) 1 mg/mL dissolvido em APB, substrato para fosfatase alcalina. Incubava-se de 20 a 30 min. A partir daí a absorbância era lida no leitor de ELISA “*Microplate Reader BioRad®*” modelo 450 a um comprimento de onda de 405 nm. O fago auxiliar VCSM13 foi utilizado como controle negativo.

3.18.10 - Miniprep clones selecionados

Dos clones selecionados foram recuperados os DNAs plasmidiais dos sedimentos estocados a -80°C conforme descrito no 3.18.9 utilizando o *kit* comercial *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega).

3.18.11 - Análise dos clones selecionados com a enzima de restrição *Sfi I*

A enzima de restrição *Sfi I* (New England Biolabs, 20U/ μ L) foi utilizada conforme a reação abaixo:

DNA purificado	3 μ L
<i>Sfi I</i> (20 U por μ g de DNA)	0,2 μ L
Tampão NEB2 10X	1 μ L
BSA 100X	0,1 μ L
H ₂ O q.s.p.	até 10 μ L

Incubou-se durante a noite a 50°C.

A análise dos fragmentos digeridos foi realizada em gel de agarose 1%.

O tamanho esperado do fragmento é de cerca de 1500 a 1600 pb conforme a montagem da biblioteca por PCR de fusão.

3.18.12 - Análise dos clones selecionados com a enzima de restrição *BstO I*

A análise do perfil de restrição de clones isolados com a enzima *BstO I* (New England Biolabs, 20U/ μ L) permite uma avaliação da diversidade dos clones como descrito a seguir:

DNA (cerca de 1 μ g)	6,0 μ L
<i>BstO I</i>	1,0 μ L
Tampão NEB 3	1,5 μ L
BSA 100X	0,15 μ L
H ₂ O q.s.p.	até 15 μ L

As reações foram incubadas a 60°C durante a noite e posteriormente analisadas em gel de agarose 3%.

4. RESULTADOS

A estratégia de amplificação do gene do capsídeo foi determinada com a utilização dos *primers* descritos no tópico 3.3. O tamanho esperado de 2418 pb contendo os sítios de restrição para *BamH I* e *Pst I*, corresponde as proteínas do capsídeo VP1+VP2+3'UTR de NV conforme demonstrado na Figura 7.

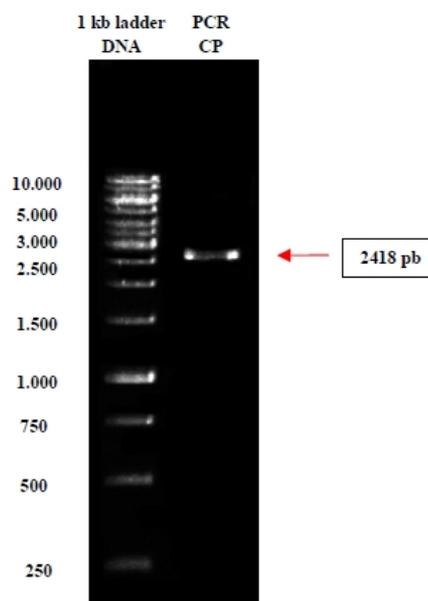


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1%. Poço 1 – marcador 1 Kb Plus LadderTM (InvitrogenTM); poço 2 – fragmento de PCR de NoroII/4 *BamH I* For e M10 Sac *Pst I* Rev.

Após a eluição do fragmento de 2418 pb e quantificação em gel, o inserto foi ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega®) e transformado em *E.coli* DH5a conforme descrito no tópico 3.5. O DNA plasmidial foi extraído a partir das colônias selecionadas e caracterizado por eletroforese em gel de agarose 1%.

Foi realizada a digestão com a enzima *EcoR I* (Figura 8) para a liberação do inserto e o DNA digerido foi caracterizado por eletroforese em gel de agarose 1%. Os clones confirmados foram submetidos à digestão dupla com as enzimas correspondentes aos sítios de restrição *BamH I* e *Pst I* e após a dupla digestão o inserto foi liberado para posterior subclonagem em pFASTBac1 (Figura 9).

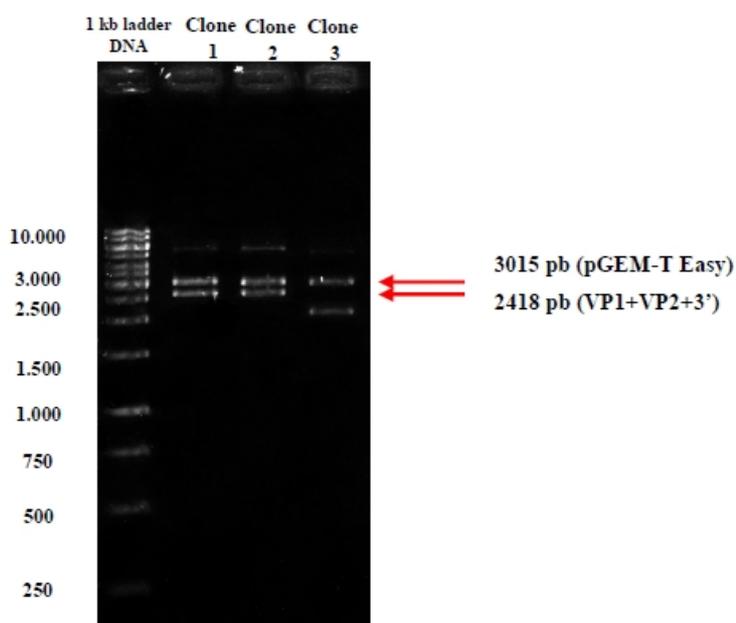


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando no poço 1 o marcador 1 Kb Plus LadderTM (InvitrogenTM); no poços 2 e 3 os fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pGEM-T Easy (Promega®) com a enzima *EcoR I* e o poço 4 não foi considerado como clone positivo por não apresentar o perfil de digestão esperado.

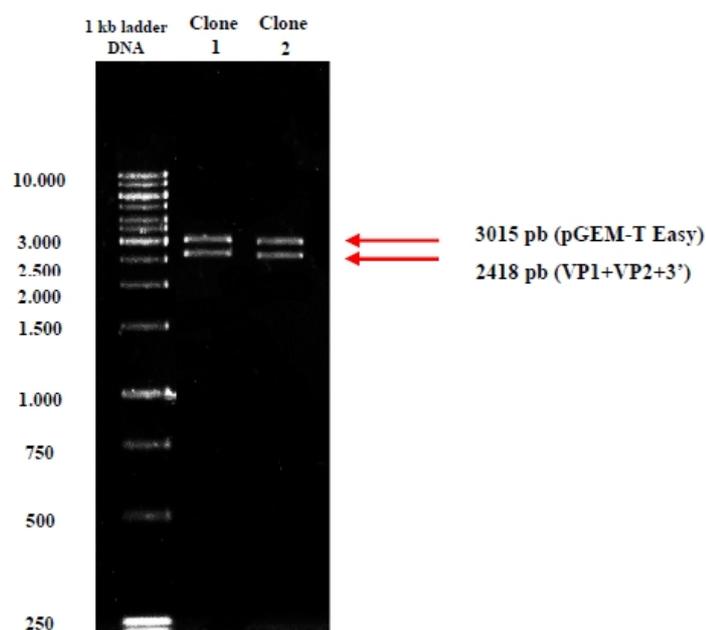


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando no poço 1 o marcador 1 Kb Plus LadderTM (InvitrogenTM); nos poços 2 e 3 os fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pGEM-T Easy (Promega®) digerido com as enzimas *BamH I* e *Pst I*.

Após a primeira digestão com *EcoR I* foi confirmada a liberação do inserto e então a segunda digestão com as enzimas de restrição específicas determinou o sucesso da clonagem. O vetor pGEM-T Easy (Promega®) linearizado possui um tamanho aproximado de 3015 pb, portanto o inserto correspondente a VP1+VP2+3'UTR com cerca de 2418 pb foi purificado.

O vetor pFASTBac1 foi desfosforilado com CIP para posterior ligação do inserto. Após a transformação em *Escherichia coli* DH5 α e a extração plasmidial, os plasmídeos contendo os insertos de interesse foram submetidos à digestão dupla com as mesmas enzimas *BamH I* e *Pst I* e então foram escolhidos 7 clones de interesse de acordo com o resultado da digestão (Figura 10).

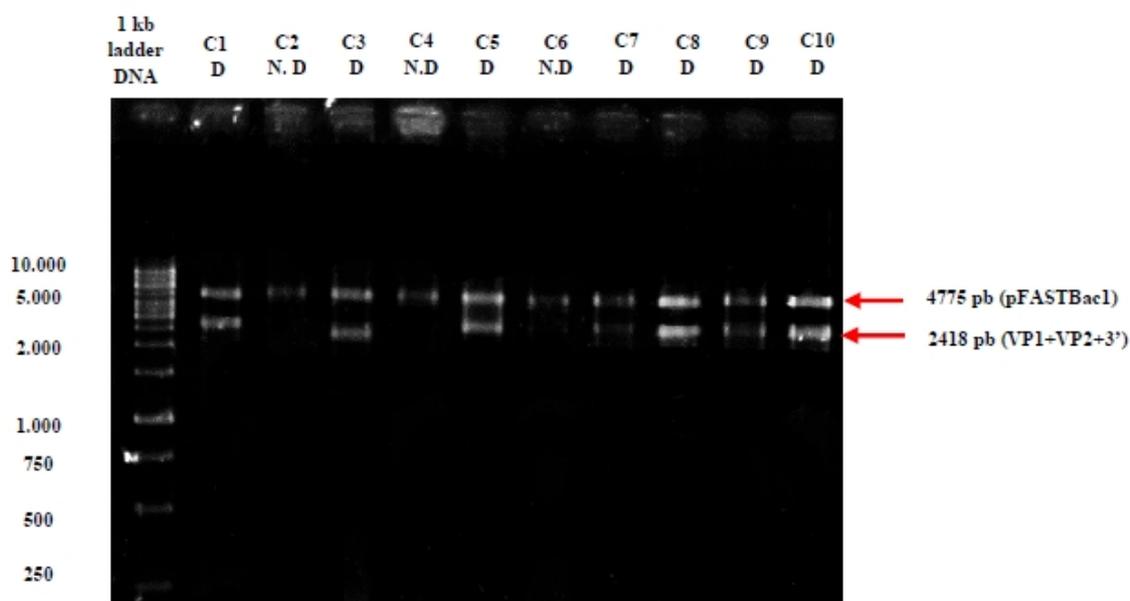


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando no poço 1 o marcador 1 Kb Plus Ladder™ (Invitrogen™), os poços 2, 4, 6, 8, 9, 10 e 11 (D) representam os fragmentos gerados do plasmídeo pFASTBac1 e os insertos após digestão com as enzimas *BamH I* e *Pst I* e os poços 3, 5 e 7 (N.D) não foram digeridos.

Da digestão de 10 clones suspeitos é possível observar que apenas 7 clones identificados como D (digeridos) pelas enzimas de restrição específicas apresentaram a liberação do inserto no tamanho esperado de 2418 pb. O vetor pFASTBac1 linearizado

possui um tamanho aproximado de 4775 pb. Os clones representados como N.D (não digeridos) não foram considerados.

Assim, os clones selecionados foram sequenciados e após confirmação nos sentidos corretos (*frame*), os DNAs plasmidiais foram transformados em células de *E.coli* DH10Bac para a obtenção do bacmídeo recombinante.

A confirmação da presença do inserto e da correta orientação foi realizada por meio da técnica de PCR. Utilizou-se a combinação dos *primers* M13 For e *Pst I* Rev, bem como *BamH I* For e M13 Rev. O resultado obtido (Figura 11) confirmou a presença de bacmídeos recombinantes para a transfecção em células de inserto.

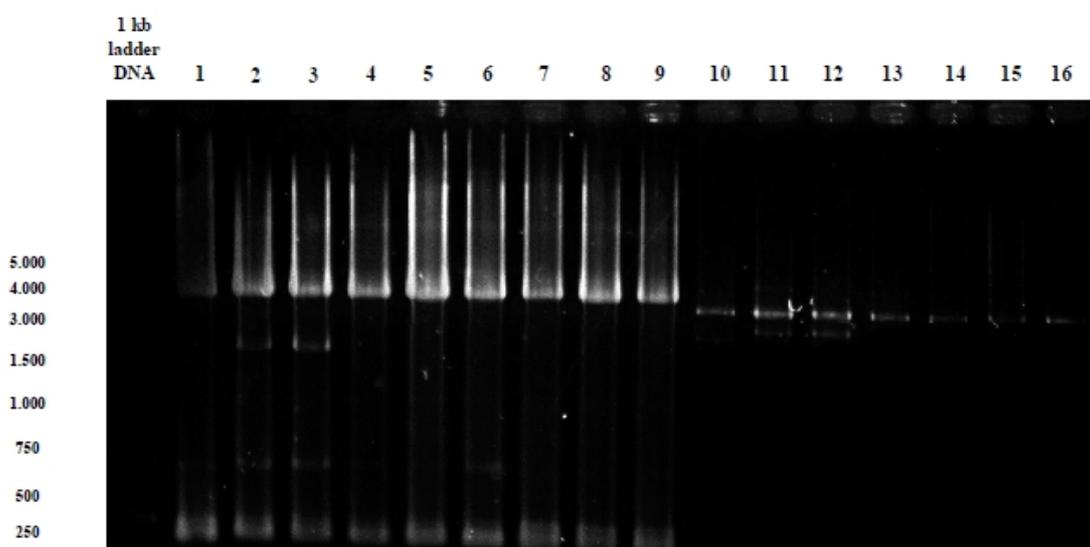


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose confirmando a transposição do gene VP1+VP2+3'UTR para o genoma do baculovírus. O poço 1 representa o marcador 1 Kb Plus Ladder™ (Invitrogen™), os poços 2 a 10 (amostras 1 a 9) representam os fragmentos gerados por PCR utilizando os *primers* M13 For e M10 Sac *Pst I* Rev e poços 11 a 17 (amostras 10 a 16) representam os fragmentos gerados por PCR utilizando os *primers* NoroII/4 *BamH I* For e M13 Rev.

O resultado obtido confirmou a presença dos bacmídeos recombinantes para a transfecção em células de inseto da linhagem BTI-TN-5B1-4 e como já descrito estas células possuem uma maior eficiência de expressão proteica se comparadas com a linhagem Sf21, pois as taxas de infecção superiores a 90% após 48 horas de infecção determinam a eficiência dos vírus brotados presentes no meio de cultura (GRANADOS et al., 1994). Os tamanhos esperados para os fragmentos da combinação entre os

primers M13 For e *Pst I* Rev era de 4000 pb e entre os *primers* *BamH I* For e M13 Rev era de aproximadamente 3000 pb.

Os bacmídeos foram transfectados com auxílio do *Cellfectin* (transfecção lipossomal) nas células BTI-TN-5B1-4. As células infectadas foram observadas e os sobrenadantes coletados após os períodos de 24, 48, 72 e 120 h.p.i. (Figura 12).

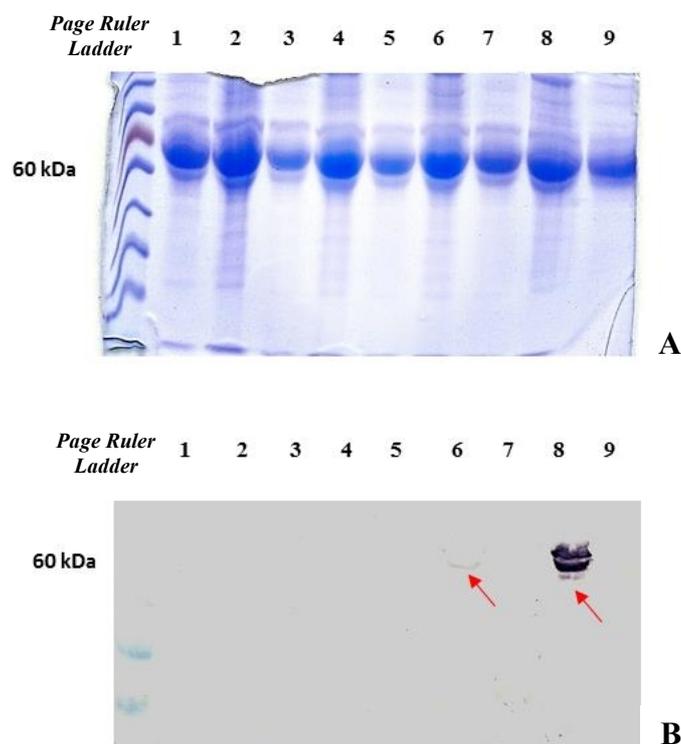


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando a expressão de proteínas em células de inseto BTI-Tn5B1-4 após 24, 48, 72 e 120 h.p.i. A) SDS-PAGE e B) *Western* Blotting utilizando o anticorpo anti-NoroII.4. A amostra 1 representa tempo zero ou Mock (células de inseto não infectadas), as amostras 2 e 3 (24 h.p.i), amostras 4 e 5 (48 h.p.i), amostras 6 e 7 (72 h.p.i) e amostras 8 e 9 (120 h.p.i), sendo que as amostras 2, 4, 6 e 8 representam o sobrenadante das células após os períodos de infecção e as amostras 3, 5, 7 e 9 os *pellets* após centrifugação. As setas indicam a expressão da proteína após 48 e 120 h.p.i no sobrenadante analisado.

É possível observar que as proteínas de capsídeo de NV começam a ter expressão após 48 h.p.i e que o tempo de 120 h.p.i representa a expressão na fase muito tardia de infecção, o que é esperado devido a ação do promotor da poliedrina.

O sobrenadante de 120 h.p.i foi utilizado como estoque viral e novas células foram infectadas. O sobrenadante desta infecção correspondeu a 105 mL de meio de cultura e foi submetido ao método de purificação por cloreto de cério (CsCl) conforme descrito no tópico 3.13.11.

Diferentes fases foram recolhidas após a purificação com CsCl. A fase superior ou leve correspondeu a um volume de 600 μ L, a fase intermediária (500 μ L) e a fase inferior ou pesada (800 μ L). Todas as fases foram submetidas ao procedimento de diálise em tampão PBS 0,5x pH 5.5. Os produtos das diálises foram processados em gel de poliacrilamida pelas técnicas de SDS-PAGE e *Western blotting* utilizando o anticorpo primário anti-NoroII.4 (gentilmente cedido por Dr. Shinichi Kobayashi, Japão) para a confirmação da presença da proteína de capsídeo (VP1+VP2) e do tamanho esperado de aproximadamente 60k Da (Figura 13).

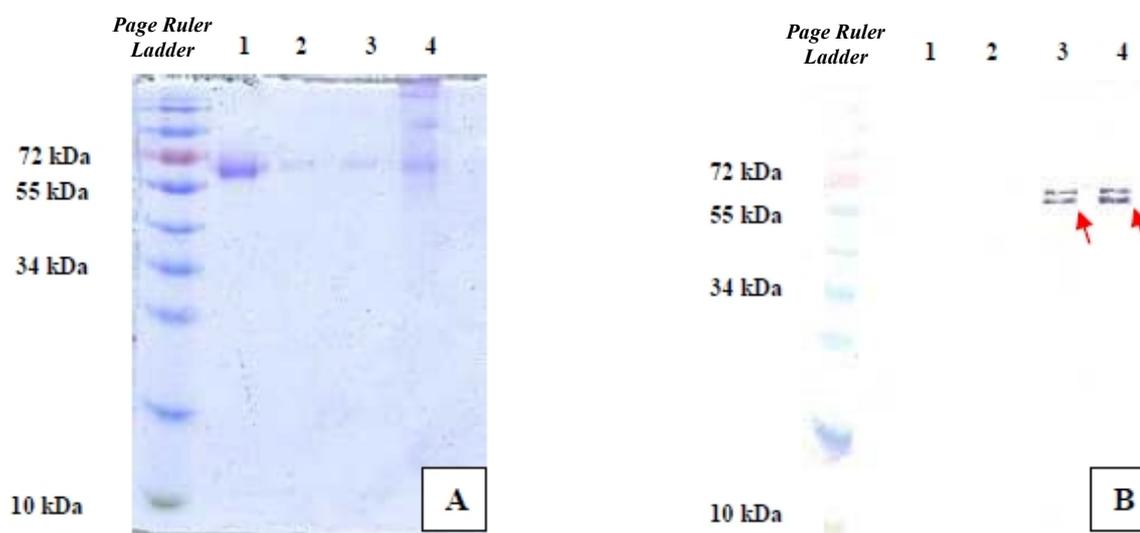


Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise por *Western blotting*. Em (A) SDS-PAGE: observa-se o gel corado com *comassie blue* e em (B) *Western Blotting*: membrana de nitrocelulose revelada demonstrando as fases recolhidas após purificação com CsCl e diálise em PBS 0,5x pH 5.5. O número 1 representa o controle negativo Mock, o número 2 representa a fase superior ou leve coletada após purificação com CsCl, o número 3 evidencia a fase média coletada após purificação com CsCl e o número 4 a fase inferior ou pesada coletada após purificação com CsCl. As setas indicam as proteínas (VP1+VP2) purificadas.

Como pode ser observado na figura 13B, as proteínas de capsídeo de NV foram recuperadas nas fases média e inferior após a purificação por CsCl e as proteínas purificadas de NV apresentaram duas bandas distintas, porém próximas ao peso molecular de 60 kDa.

Com o objetivo de obter maior quantidade de partículas virais para posterior purificação pelo método de *Íon Exchange* ou cromatografia de troca iônica, novas células foram infectadas (cerca de 210 mL de meio de cultura de células de inseto) com o estoque viral quantificado após titulação viral, cujo título viral foi de $2,7 \times 10^8$ pfu/mL. Foi adicionado cerca de 1 mL de estoque viral para cada 35 mL de meio contendo as células BTI-TN-5B1-4.

O produto do colchão de sacarose 20% conforme descrito no tópico 3.13.2 gerou 3 amostras a serem purificadas que foram submetidas à purificação por cromatografia. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 14.

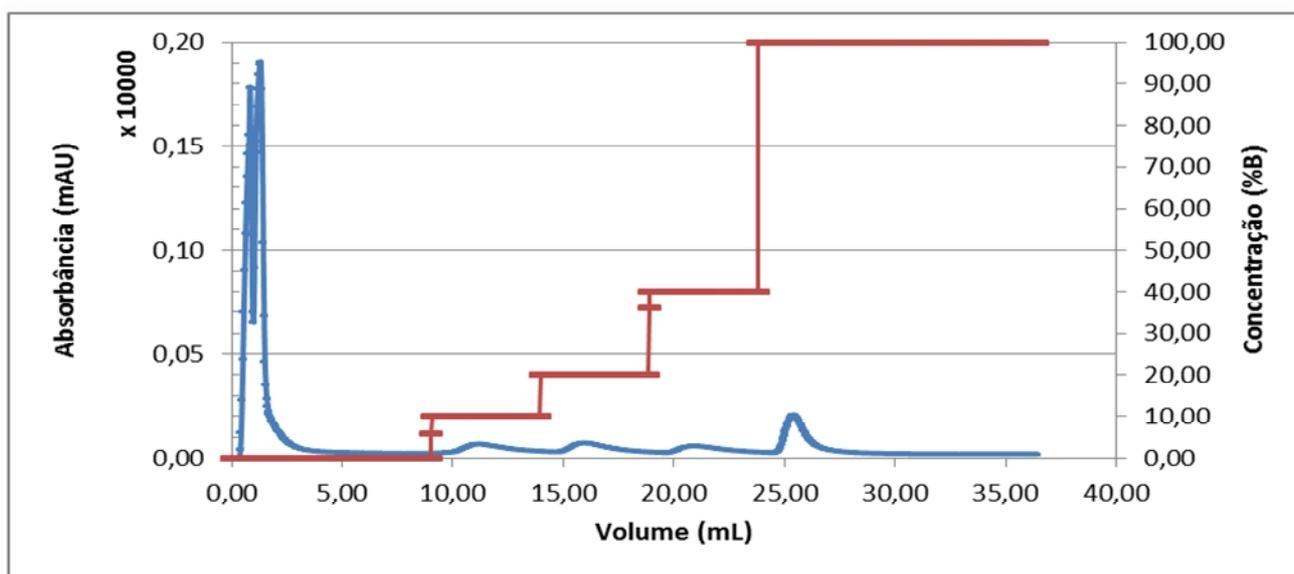


Figura 14. Cromatograma da purificação de VLPs de NV pela técnica de *Íon Exchange*. O eixo X corresponde ao volume por mL de tampão A (Fosfato de Sódio 50 mM (pH 7,0) sem sal) e o eixo Y determina a absorvância da luz Ultravioleta (UV) a 280 nm em mAU. Os picos das proteínas eluídas estão demonstrados em azul e a concentração do tampão salino B (Fosfato de Sódio 50 mM (pH 7,0) com NaCl 1M) está representada em vermelho.

Após a aplicação da de 1 mL da amostra, a coluna foi lavada com o tampão Fosfato de Sódio 50 mM (pH 7,0) sem adição de sal. Por este motivo é possível

observar um pico entre o volume 0 a 5 mL que representa as proteínas que não se ligaram à coluna.

A coluna HiTrap QFF é composta por resina de agarose e possui o grupo $-N^+(CH_3)_3$ o que configura carga positiva da coluna para a ligação de proteínas com carga negativa. Assim, o pico inicial provavelmente representa as proteínas com cargas positivas ou proteínas das células de inseto.

Para que ocorresse a eluição das proteínas ligadas à coluna foi utilizado um gradiente salino com o tampão Fosfato de Sódio 50 mM (pH 7,0) NaCl 1M nas concentrações de 10%, 20%, 40% e 100% como pode ser observado em vermelho no cromatograma (Figura 14).

Dependendo da quantidade de cadeias laterais destas proteínas a eluição ocorre de acordo com a concentração do gradiente salino. Provavelmente as que foram eluídas entre 25 e 26 mL possuíam maior carga negativa, pois foi necessário uma concentração de 100% do tampão salino para a liberação das proteínas fixadas à coluna.

Os picos de 9 e 10 mL, 14 e 15 mL e 25 e 26 mL foram analisados por SDS-PAGE e *Western Blotting* sendo que os picos 14 e 15 foram considerados com maior grau de pureza e maior exposição da proteína do capsídeo de NV. Foram realizadas três corridas com as três amostras obtidas após o colchão de sacarose a 20% e todas reproduziram os mesmos picos conforme a Figura 14.

Estes picos correspondem à ressonância que os anéis aromáticos principalmente dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina, absorvem na luz UV no comprimento de onda de 280 nm.

Como demonstrado na Figura 15 é possível observar que as proteínas foram eficientemente purificadas após a cromatografia excluindo outros tipos de proteínas que poderiam ser consideradas contaminantes. Foram observadas bandas duplas tanto na purificação com CsCl (Figura 13B) quanto na purificação por cromatografia (Figura 15B).

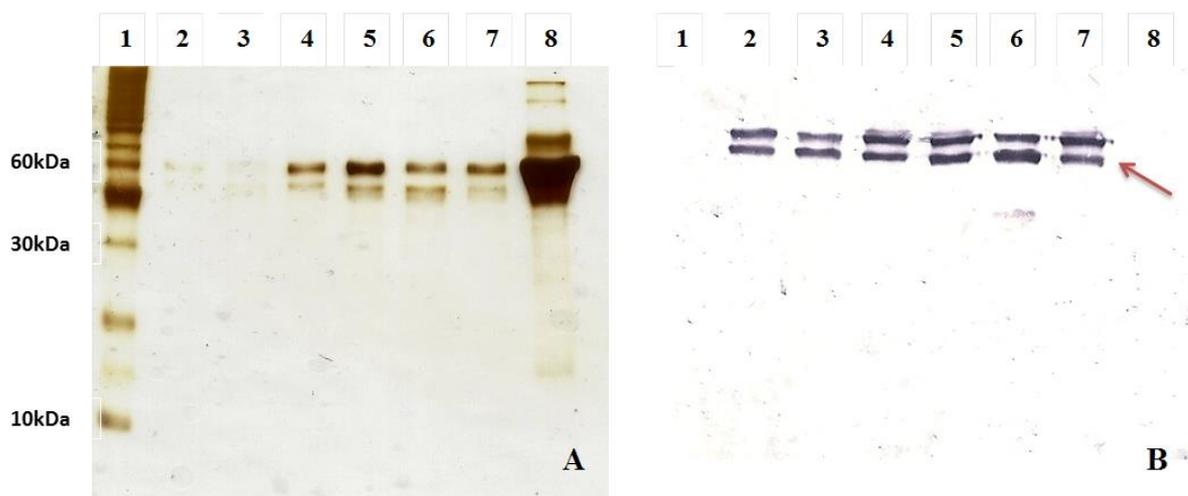


Figura 15. Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando as proteínas dos capsídeos de NV purificadas pelo método de Íon *Exchange*. Em (A) observa-se o gel de SDS-PAGE corado por nitrato de prata e em (B) *Western Blotting* utilizando o anticorpo primário anti NoroII.4 e o secundário anti-IgG de coelho-AP. Nas duas figuras o poço 1 representa o marcador Novex® Sharp *Unstained Protein Standard* (Invitrogen™), os poço 2, 3 e 4 evidenciam a amostra ou pico de 14 mL representada no cromatograma da Figura 14 após as corridas 1, 2 e 3 respectivamente e os poços 5, 6 e 7 revelam a amostra ou pico de 15mL representada no mesmo cromatograma após as corridas 1, 2 e 3 respectivamente. O poço 8 representa o controle negativo Mock. A seta indica as proteínas do capsídeo de NV purificadas.

O produto quantificado pelo protocolo NanoDrop 3300 Quant-iT Protein Assay (Thermo Scientific) após a purificação por CsCl representou 200 µg de proteína por mililitro de meio de cultura em um volume final de 800 µL da fase inferior ou pesada coletada após o processamento de 105 mL de sobrenadante de célula de inseto.

Já o produto quantificado após a purificação por cromatografia foi de 1955,4 µg de proteína por mililitro de meio de cultura em um volume final de 6 mL após o processamento de 210 mL de sobrenadante de célula de inseto.

Os resultados demonstrados na Tabela 4 são referentes à análise comparativa da quantidade de proteína purificada por volume de meio de cultura após o método de purificação por CsCl e por cromatografia de troca iônica.

Tabela 3. Quantificação das VLPs purificadas por CsCl e cromatografia utilizando o protocolo NanoDrop 3300 Quant-iT Protein Assay (Thermo Scientific) para quantificação das proteínas. A quantidade média foi obtida pelo *Hight Range* em $\mu\text{g/mL}$.

Purificação por CsCl		Purificação por cromatografia por troca iônica	
Quantidade meio de cultura processado	Quantidade de proteína	Quantidade meio de cultura processado	Quantidade de proteína
105 mL	200 $\mu\text{g/mL}$	210 mL	1955,4 $\mu\text{g/mL}$
Rendimento = 1,5 μg de proteína por mL de meio processado		Rendimento = 9,31 μg de proteína por mL de meio processado	

A quantidade de proteína obtida pelo processo de purificação por cromatografia obteve um maior rendimento (cerca de 6 vezes mais) se comparado ao método de purificação por CsCl.

Foram preparadas telas de cobre de acordo com o tópico 3.16 para a visualização das partículas no microscópio eletrônico de transmissão utilizando as amostras purificadas por cromatografia. Foi possível observar as VLPs com o tamanho esperado de aproximadamente 40 nm (Figura 16).

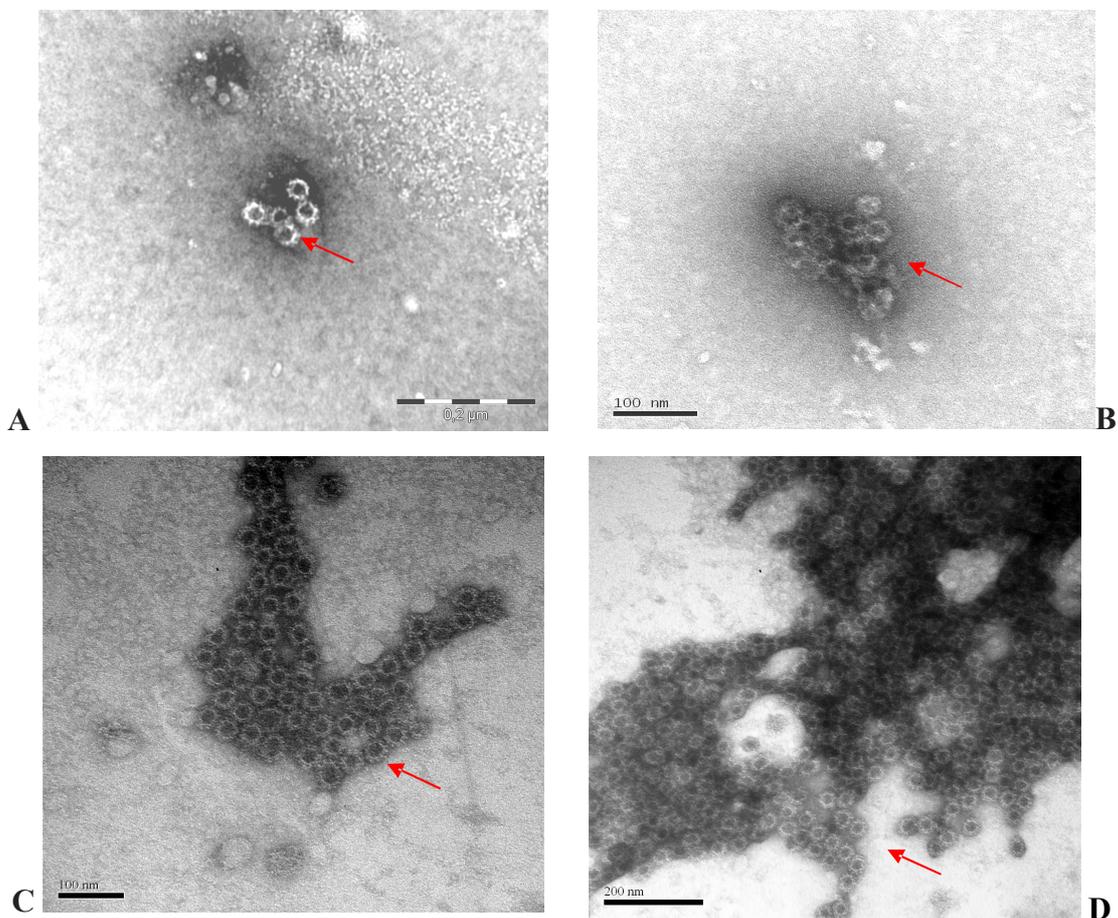


Figura 16. Microscopia eletrônica evidenciando a expressão das *Virus like particles* (VLPs) de norovírus com tamanho aproximado de 40 nm pelo sistema de baculovírus. A e B representam as partículas purificadas com CsCl e C e D demonstram as partículas após a purificação por cromatografia por troca iônica.

As VLPs purificadas por cromatografia foram utilizadas para a imunização dos 2 ratos da linhagem *Wistar* conforme descrito no tópico 3.17. Após a coleta dos soros, as VLPs foram processadas em gel de poliacrilamida sendo que os soros dos ratos foram utilizados como anticorpo primário na técnica de *Western blotting* (Figura 17).

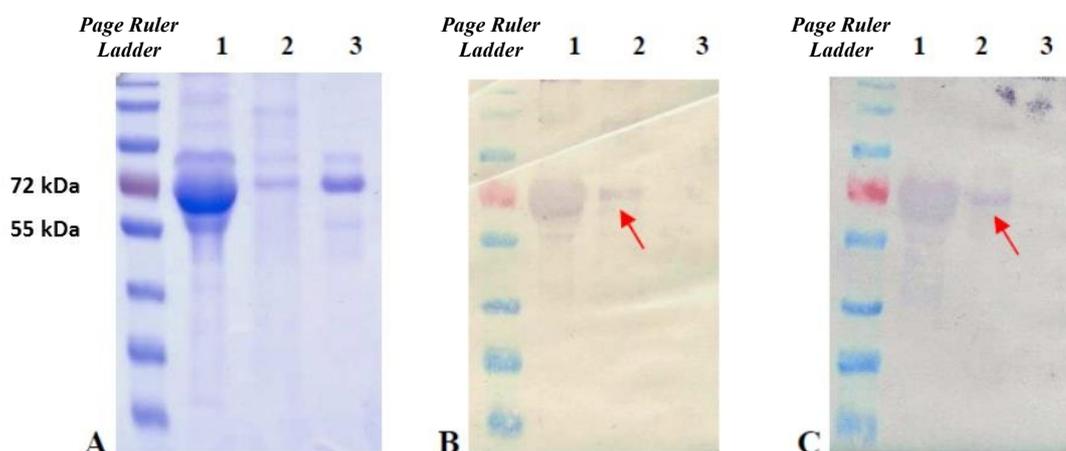


Figura 17. Análise dos anticorpos policlonais dos ratos após imunização com VLP de NV purificados por cromatografia. (A) SDS-PAGE; (B) *Western blotting* com soro do rato 1 e (C) *Western blotting* com soro do rato 2. O poço 1 corresponde o controle negativo Mock e o poço 2 a VLP purificada por cromatografia e o poço 3 a VLP purificada por CsCl. As setas indicam a reação dos soros dos ratos com a VLP.

Como pode ser observado foi realizado o teste de imunogenicidade dos soros dos ratos pela técnica de *Western Blotting*, todavia, não foi possível realizar o método de ELISA devido ao baixo título de imunoglobulinas específicas. Apesar das VLPs serem imunogênicas e terem sido realizadas 4 imunizações, este fato pode estar relacionado a pouca quantidade de VLP utilizada no processo de imunização (30 µg).

O estudo e a seleção de anticorpos monoclonais humanos para a caracterização imunológica dos epítomos antigênicos dos NV fez com que o presente trabalho utilizasse a técnica de *Phage Display* utilizando uma biblioteca de anticorpos humanos apresentados em fagos, para a obtenção de clones que possam ser reativos à VLP de NV.

No trabalho de DANTAS-BARBOSA, BRÍGIDO & MARANHÃO (2005) foram amplificados os repertórios das cadeias pesadas de IgG e IgM e de cadeia leve *kappa*. O cDNA foi obtido a partir da extração do RNA de amostras de sangue de 11 pacientes com osteossarcoma.

Como demonstrado, devido a diferentes formas na ordem de 10^8 representado pela biblioteca, foi necessário preparar células eletrocompetentes de *Escherichia coli* XL1-Blue que fossem capazes de amplificar a biblioteca como um todo.

Após o preparo das células como descrito no tópico 3.18.2 foi realizado o teste de eficiência com o 1 μ L plasmídeo pUC19 na concentração de 100 pg/ μ L e o resultado obtido foi de $2,2 \times 10^8$ / μ g de plasmídeo, considerada de boa eficiência para a transformação.

Os fagos auxiliares VCSM13 foram utilizados para a realização da amplificação e seleção da biblioteca. De acordo com o descrito no tópico 3.18.5 o título da amplificação foi de $4,6 \times 10^{11}$ pfu/mL.

A biblioteca foi reamplificada e o número de transformantes obtidos correspondeu a $7,68 \times 10^{11}$ /mL.

Os fagos montados na reamplificação passaram pelo processo de seleção ou *panning* utilizando a VLP de NV como antígeno após a purificação por cromatografia. Foram realizados 4 ciclos e em cada um deles foi calculado o título de entrada e o título de saída dos fagos de acordo com os tópicos 3.18.8.1 e 3.18.8.2. O título de entrada representa a quantidade de fagos que serão selecionados no ciclo e o título de saída são os fagos selecionados que se mantiveram ligados ao antígeno após sucessivas lavagens (Tabela 5).

Tabela 4. Resultados obtidos após a seleção dos fagos utilizando a VLP de NV como antígeno.

Ciclo	Número de lavagens	Título de Entrada	Título de Saída	Saída/Entrada
1	5	$6,5 \times 10^{12}$	$3,15 \times 10^5$	$4,8 \times 10^{-8}$
2	10	$1,8 \times 10^{13}$	5×10^3	$2,7 \times 10^{-10}$
3	15	$1,6 \times 10^{13}$	$1,8 \times 10^5$	$1,12 \times 10^{-8}$
4	15	$1,26 \times 10^{14}$	$4,7 \times 10^6$	$3,76 \times 10^{-8}$

O sucesso da reamplificação e seleção dos fagos pode ser observado na Tabela 4 na coluna dos valores que representam a razão entre os títulos de saída e entrada. No ciclo 2 o título $2,7 \times 10^{-10}$ representa uma reamplificação de fagos com afinidade à VLP de NV e após sucessivas lavagens nos ciclos 3 e 4, os títulos são representativos de reamplificação dos clones mais susceptíveis.

Foram escolhidos 87 clones aleatórios dos 4 ciclos de seleção e realizada a técnica de *Phage* ELISA, sensibilizando a placa com VLP de NV e utilizando o anticorpo anti M13/HPR como anticorpo primário e anticorpo anti-IgG de ovelha conjugado à fosfatase alcalina como anticorpo secundário. O procedimento foi realizado conforme o tópico 3.18.9 e os resultados podem ser observados na Figura 18.

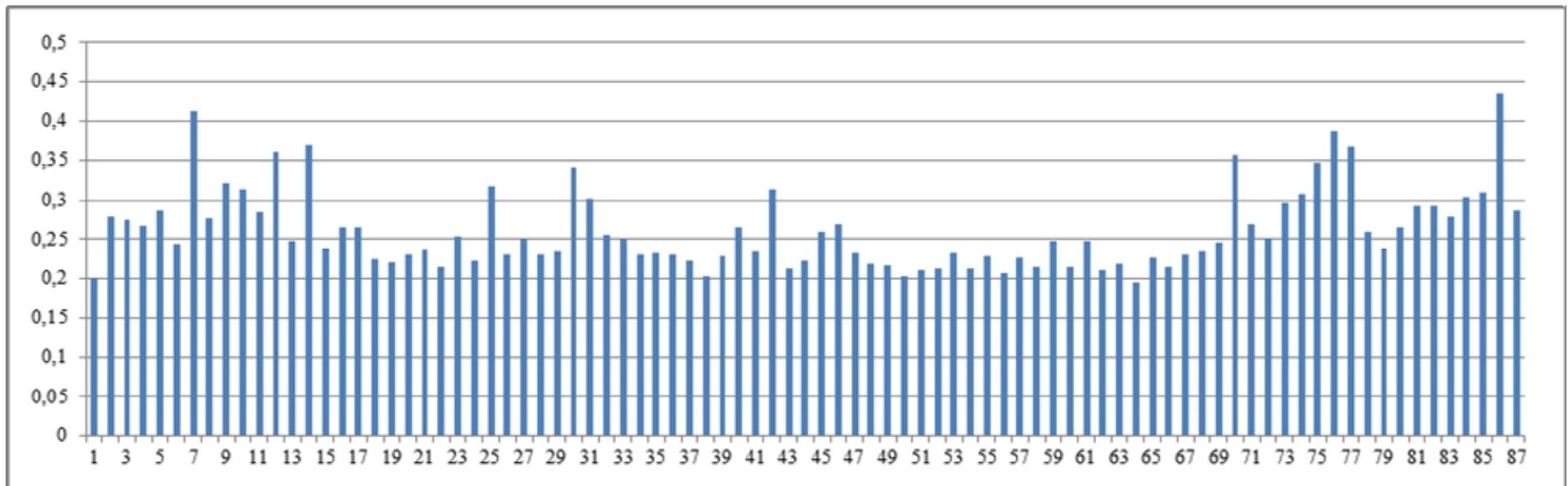


Figura 18. Análise dos clones individuais por Phage ELISA. O número 1 representa o controle negativo (fago M13) com absorbância de 0,201 a 405nm; de 2 a 14 estão representados os clones selecionados do ciclo 1; de 15 a 20 os clones selecionados do ciclo 2; de 21 a 47 os clones selecionados do ciclo 3 e 48 a 87 os clones selecionados do ciclo 4. Os clones escolhidos para a extração do DNA plasmidial estão descritos no Anexo 1.

Por meio dos resultados obtidos no *Phage* ELISA foram escolhidos os clones (Anexo 1) aonde foram recuperados 58 DNAs plasmidiais dos sedimentos estocados a -80°C conforme descrito no t3.18.10.

A análise dos perfis da biblioteca de fragmentos de anticorpos foi verificada pela digest3o do DNA plasmidial pela enzima de restri3o *Sfi I*. Todas as 58 amostras foram digeridas e uma nova digest3o foi realizada com 16 amostras que mais se aproximaram do tamanho de 1500 a 1600 pb (Figura 19).

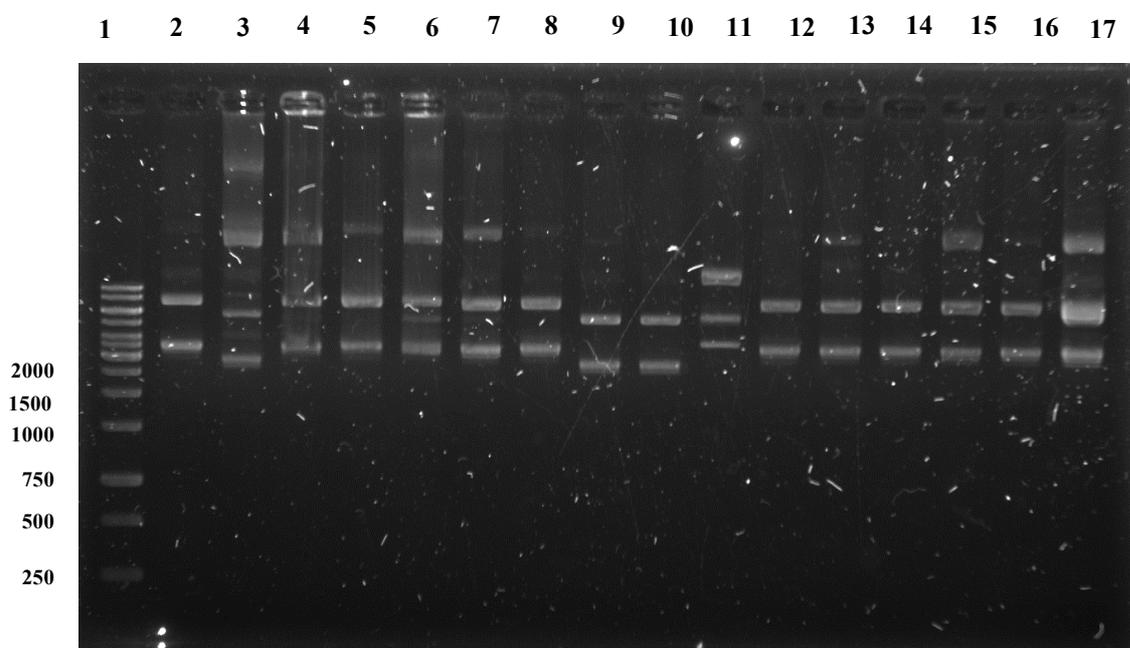


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando o produto da digest3o com *Sfi I* dos DNAs plasmidiais dos clones dos fagos ap3s a sele3o da biblioteca frente a VLP de NV. O po3o 1 representa o marcador 1 Kb Plus Ladder™ (Invitrogen™) e os po3os 2 a 17 representam os clones selecionados dos ciclos 1, 3 e 4.

Em seguida, a digest3o realizada com a enzima *BstO I* demonstrou os fragmentos obtidos para an3lise da diversidade dos clones, devido o arcabou3o plasmidial ser o mesmo, assim o DNA 3 flaqueado em diferentes s3tios aonde ocorre o reconhecimento da enzima *BstO I* que 3 considerada um izoesquiz3mero (Figura 20).

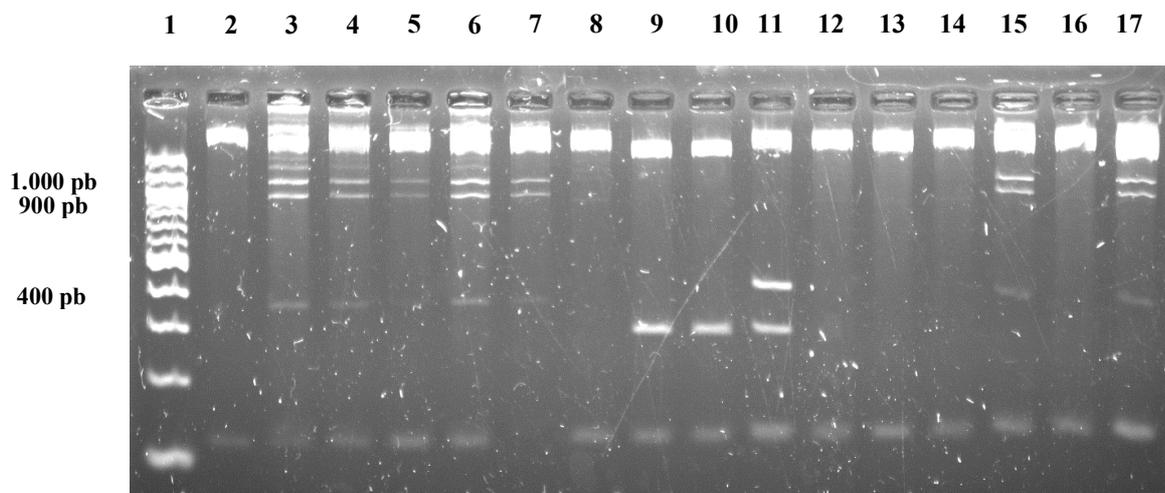


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 3% demonstrando o produto da digestão com a enzima *BstO I* dos DNAs plasmidiais após a seleção da biblioteca frente a VLP de NV. O poço 1 representa o marcador de massa molecular 100bp ladder (Amershan Pharmacia Biotech) e os poços 2 a 17 os clones selecionados dos ciclos 1, 3 e 4 após a análise da diversidade dos clones pela digestão com a enzima *Sfi I*.

Como é possível observar nas figuras 19 e 20 alguns clones (3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 15 e 17) demonstraram algum grau de diversidade, porém não foram encaminhados para a análise de sequenciamento devido a suspeita de recombinação e por não apresentarem um perfil de diversidade esperado. Este perfil seria representado pela soma da quantidade de pares de base de cada fragmento que deveriam corresponder a cerca de 1500 a 1600 pb (tamanho da biblioteca).

5. DISCUSSÃO

Os calicivírus são importantes causadores de gastroenterites e especialmente o norovírus vem causando infecções esporádicas e surtos (TRAN et al., 2013). O índice de positividade e detecção de NV em amostras fecais varia em torno de 7,6% a 56% dependendo do tipo da amostra e da sua procedência, ou seja, se esta amostra foi obtida de surto ou de um caso esporádico (GÓMEZ-SANTIAGO, RIBAS-APARICIO & GARCÍA-LOZANO, 2012).

A amostra do presente estudo foi caracterizada como caso esporádico de uma criança moradora da cidade de Planaltina/DF no ano de 2007, baseada nos dados fornecidos pelo Núcleo de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN/DF).

O gene amplificado da proteína de capsídeo de NV correspondeu a ORF2 (VP1), ORF3 (VP2) e 3'UTR. De acordo com os trabalhos que demonstram a co-expressão de VP1+VP2+3'UTR é possível observar que apesar da VP2 não ser essencial para a montagem da VLP, a sua presença aumenta a estabilidade e homogeneidade do tamanho da partícula quando expressa em células de inseto (BERTOLOTTI-CIARLET et al., 2003; VONGPUNSAWAD, VENKATARAMPRASAD & ESTES, 2013)

A proteína VP2 está localizada no interior do capsídeo e a primeira isoleucina (I1-52) na região N-terminal da VP1, localizada no domínio S, é conservada entre os genótipos de NV e assim torna-se relevante a interação entre VP1 e VP2. A análise estrutural do capsídeo de NV demonstra que a I1-52 está rodeada de resíduos hidrofóbicos e assim, qualquer mutação nesta região pode alterar a estrutura local e não haver a interação entre as proteínas VP1 e VP2 (VONGPUNSAWAD, VENKATARAMPRASAD & ESTES, 2013).

Com relação à escolha do sistema de expressão de proteínas, o sistema de baculovírus recombinante em células de inseto é amplamente utilizado para a produção de VLP de NV (PRASAD et al., 1994; ALLEN et al., 2009; DONALDSON et al., 2010; HUHTI et al., 2010; KOHO et al., 2012). Neste sistema, as células de inseto infectadas resultam na montagem de duas partículas de tamanhos diferentes: uma com cerca de 40

nm e outra com 23 nm (JIANG et al., 1995). Neste trabalho não foram avaliados os diferentes tamanhos das partículas montadas.

A hipótese relatada é que a partícula de 23 nm é formada quando 60 unidades da proteína de capsídeo monta uma estrutura com simetria T=1, porém, as duas partículas (T=3 e T=1) possuem as mesmas características antigênicas (WHITE, HARDY & ESTES, 1997). A formação da menor partícula pode estar relacionada com o tamanho do genoma de RNA, a presença de cátions divalentes, a força iônica e ao pH do meio. Considerando o pH, neste estudo foi determinado que as VLPs montadas deveriam ser dialisadas e estocadas em tampão com pH 5.5 após a purificação de acordo com o estudo de BERTOLOTTI-CIARLET et al. (2003) para evitar a degradação e manter a estabilidade das partículas.

Tradicionalmente partículas virais são purificadas pelos métodos de precipitação por polietilenoglicol (PEG), gradiente de sacarose ou cloreto de cério (CsCl) com subsequente ultracentrifugação. Na maioria dos casos o rendimento da aplicabilidade destas técnicas é consideravelmente baixo. No caso de VLPs a purificação por CsCl pode ocasionar alterações na conformidade das partículas devido às forças centrífugas ou choque osmótico (ADRIAENSSENS et al., 2012).

A técnica de purificação afeta as características estruturais, a imunogenicidade, integridade morfológica, antigenicidade e funcionalidade das VLPs purificadas. A purificação por cloreto de cério pode resultar VLPs com dimensões heterogêneas ou até mesmo fragmentadas. Pode ainda introduzir impurezas no final do processo, provavelmente devido ao demorado período de ultracentrifugação, além de provocar agregação das partículas durante o armazenamento. Como as VLPs de NV têm sido extensamente utilizadas para estudos de interação da proteína, montagem da partícula viral bem como ferramenta de diagnóstico para ensaios sorológicos, é de extrema importância a obtenção de VLP de alta qualidade (HUHTI et al., 2010).

Embora algumas destas situações possam ser remediadas, principalmente com uma padronização do gradiente de sacarose ou CsCl de acordo com o vírus estudado, as separações por gradiente em geral não são escalonáveis, além de serem dispendiosas e demoradas. Assim, a utilização da técnica de cromatografia por troca iônica é considerada mais rápida do que a purificação por CsCl. Todo o processo da

cromatografia demora cerca de 1 hora por corrida, dependendo do volume aplicado na coluna, da suspensão eluída, e ainda a amostra pode ser diretamente armazenada sem a necessidade de diálise, o que não ocorre com o CsCl (ADRIAENSSENS et al., 2012).

De acordo com os resultados obtidos na análise de antigenicidade das VLPs por meio de *Western blotting*, as proteínas purificadas tanto por CsCl como por cromatografia apresentaram perfis adequados de purificação bem como a massa molecular esperada (aproximadamente 60 kDa). Bandas duplas foram observadas nos dois métodos de purificação conforme observado nas figuras 13B e 15B e não foi possível observar bandas adicionais.

A banda superior de cerca de 60 kDa corresponde a proteína de capsídeo com sequência completa, e a banda inferior com cerca de 56 kDa representa o produto da proteína que pode ter sido truncada na extremidade N-terminal no resíduo do aminoácido 34 localizado no interior da partícula. Um potencial local de clivagem por proteases de largo espectro como a proteinase K e termolisinas presentes em células eucarióticas faz com que as duas bandas possam ser observadas (KOHO et al., 2012). Neste estudo foram utilizadas as células de inseto e, portanto, foi possível observar o produto de clivagem da proteína ocorrido no interior das células que não afetaram a montagem da VLP (PRASAD et al., 1999).

Com relação aos rendimentos das proteínas obtidas pela purificação por CsCl (1,5 µg/mL de meio de cultura) e por cromatografia (9,31 µg/mL de meio de cultura), KOHO et al. (2012) realizaram a mesma comparação utilizando a técnica de cromatografia por troca iônica aonde foi demonstrado um rendimento de cerca de 10 µg de proteína por mililitro de meio de cultura de células de inseto. É possível observar nas figuras 16C e 16D que a integridade morfológica das VLPs não foi afetada pelo processo de purificação.

Procedimentos baseados na cromatografia por troca iônica vêm sendo demonstrados para a remoção de contaminantes de baculovírus em preparações de VLPs (VICENTE et al., 2008; VELASQUEZ et al., 2011; KIM et al., 2012). No trabalho de HUHTI et al. (2013) foram demonstrados os picos de eluição das proteínas de capsídeo de NV em que as frações coletadas corresponderam aos picos 15 e 17 que

determinaram ausência de contaminação com proteínas de baculovírus. No presente estudo, os picos considerados com maior pureza foram os 14 e 15.

Os picos 9, 10, 25 e 26 conforme demonstrados na Figura 14 não apresentaram um bom resultado de antigenicidade testado pelo método de *Western blotting* e então pode-se inferir que estes picos representem a eluição de algumas VLPs contaminadas com outras proteínas de baculovírus.

Os picos entre os volumes 0 a 5 mL podem corresponder às proteínas de célula de inseto, como por exemplo, a glicoproteína de envelope gp64 do baculovírus bem como DNA de baculovírus. Estas proteínas com cargas positivas foram eluídas logo após a lavagem da coluna com o tampão de partida (HUHTI et al., 2013).

A gp64 pode apresentar ação adjuvante no momento de imunização animal e por esse motivo deve ser eliminada no processo de purificação. Esta glicoproteína possui um resíduo de manose que é expresso em macrófagos e células dendríticas. Estas células podem reconhecer a gp64 e ativar a resposta imune induzindo a participação de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral gama (TNF- γ) e interleucina 6 (IL-6). Neste sentido, a purificação das VLPs utilizando cromatografia evidencia a eliminação da gp64 gerando um grau de pureza das partículas maior que 90% (ABE et al., 2003).

Os ratos foram imunizados com as proteínas purificadas por cromatografia que corresponderam aos picos 14 e 15, representativos de maior grau de pureza após a análise por *Western blotting*. Após o processo de imunização foi possível observar uma baixa concentração de anticorpos específicos anti-NV conforme demonstrado na Figura 17. Este fato pode ter sido determinado pela baixa concentração de VLP utilizada nos períodos de imunização, visto que nos quatro períodos (em intervalos de 2 semanas para cada um) foram utilizados adjuvantes adicionados a cerca de 30 μ g de VLP.

Talvez a imunização com uma maior quantidade de VLPs purificadas por cromatografia sem a adição de adjuvantes poderia ter induzido uma melhor resposta imunológica ou ainda, a realização de dois processos consecutivos de cromatografia seriam necessários para a obtenção de partículas virais altamente purificadas, isentas de proteínas de baculovírus e com maior potencial imunogênico. Camundongos BALB imunizados com pequenas doses de VLPs purificadas por dupla purificação por

cromatografia e sem a adição de adjuvantes obtiveram uma forte resposta imunológica mista (Th1 e Th2) com a produção de anticorpos IgG2a e IgG1. Isto demonstra que as VLPs puras são altamente imunogênicas (DEML et al., 2005; BLAZEVIC et al., 2011; HUHTI et al., 2013).

Os adjuvantes são moléculas, compostos ou complexos macromoleculares que aumentam, mantêm ou potencializam a resposta específica aos antígenos. O aumento da imunogenicidade de antígenos fracos e o aumento da velocidade da resposta imune são algumas finalidades relacionadas à utilização de adjuvantes (DOUCE et al., 1995).

Muitos tipos de adjuvantes têm sido descritos, como por exemplo, o sal de alumínio. Este adjuvante ativa a proteína receptora de nucleotídeo de ligação do tipo 3 (NLRP3), por meio de fagocitose e por citotoxicidade, recrutando células da resposta imune. Porém, a indução da resposta imune adaptativa ainda está sendo discutida para a utilização do sal de alumínio (EXLEY, SIESJÖ & ERIKSSON, 2010). No caso de VLPs de NV este adjuvante não seria de escolha, visto que a partícula viral é muito imunogênica e necessita da indução da resposta adaptativa para a produção de anticorpos e então os sais de alumínio não potencializariam a resposta.

Já os adjuvantes baseados nos receptores TLR que reconhecem padrões associados a patógenos, como é o caso do adjuvante de Freund completo (o qual possui em sua composição micobactérias inativas) induzem uma boa resposta mediada por células. Entretanto, o polimorfismo genético dos receptores TLR ou proteínas envolvidas na via de sinalização podem afetar a eficácia da resposta ao antígeno misturado a este tipo de adjuvante (GARCÍA & DE SANCTIS, 2013). Este fato pode explicar a baixa concentração de imunoglobulinas específicas produzidas pelos ratos no presente trabalho.

Os antígenos atualmente disponíveis para o diagnóstico de NV utilizados principalmente no método imunoenzimático (ELISA) detecta alguns genogrupos e são aprovados para uso nos Estados Unidos apenas em epidemias com suspeita de NV. Para isso evidencia-se a necessidade de novas ferramentas de diagnóstico para NV que sejam de fácil execução, rápidas e economicamente viáveis (ROGERS et al., 20113).

Para tanto, a produção de anticorpos monoclonais oferece diversas vantagens para a questão epidemiológica e para o diagnóstico, já que os NV possuem genética e

antigenicidade divergentes. Muitos dos anticorpos policlonais foram desenvolvidos com a utilização de VLPs de NV, porém, a maioria possui um amplo reconhecimento antigênico gerando reações cruzadas entre os genogrupos (RABENAU et al., 2003; DE BRUIN et al., 2006).

O anticorpo monoclonal 5B18 que é atualmente utilizado em um *kit* de ELISA comercial (Denka Seiken, Japão) para detecção de NV, liga-se a diversos genótipos GII, mas não ao genótipo GI. HASMAN et al. (2012) descreveram que seis resíduos de aminoácidos do domínio P1 interagem com o Fab e quatro destes resíduos são altamente conservados nos genótipo de NV GII.

A obtenção de anticorpos monoclonais anti-NV utilizando Fabs humanos apresentados em fagos ainda não foi descrita. Uma biblioteca de fagos apresentando Fabs derivados da medula óssea de chipanzés contra NV GI.1 foi estudada e pode auxiliar nas estratégias de compreensão da antigenicidade dos NV, visto que, as imunoglobulinas de chimpanzés são semelhantes às imunoglobulinas humanas (CHEN et al., 2013).

Para isso, a utilização do *Phage Display* expressando o repertório de Fabs humanos pode representar uma produção rápida, eficaz e mais barata de anticorpos monoclonais humanos de NV.

É importante ressaltar que para obter o sucesso no processo da seleção dos fagos, objetiva-se selecionar anticorpos com especificidade e afinidade em relação ao antígeno de alvo ou de interesse. Neste caso o vetor pComb3XSS ou fagomídeo possui um promotor regulável (*lacZ*) do gene da β -galactosidase. Esse promotor sofre indução na presença de IPTG para transcrever os genes do seu domínio, para tanto, em todos os processos da seleção neste trabalho em que havia necessidade do crescimento bacteriano, necessariamente foi utilizado a glicose como repressora catabólica do gene *lacZ*. A presença de glicose evita que as células expressem as proteínas heterólogas e sofram pressão seletiva negativa que pode eliminar o gene que expressa a proteína de interesse (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

O padrão de *Phage Display* descrito por ANDRIS-WIDHOPF et al. (2000) não sugere a adição de glicose, porém, foi estabelecido a utilização desta solução para a realização dos procedimentos, porque provavelmente a diferença de tamanho entre as

molécula de Fab e o grau de toxicidade exercido por ela, justifique a necessidade de adição da solução para a seleção da biblioteca (DANTAS-BARBOSA, BRÍGIDO & MARANHÃO, 2005).

O tamanho da biblioteca é um fator limitante para isolar clones de acordo com a eficiência e seleção por afinidade dos fagos ligados à proteína de interesse. A biblioteca utilizada neste trabalho possui um bom repertório para a seleção, porém alguns clones não recombinantes podem sobrecarregar os clones recombinados e ligados ao alvo (BROCKMANN, 2012). Este processo pode estar relacionado aos fagos alvo independentes, ou seja, fagos que não possuem o reconhecimento específico ao alvo e possuem recombinações que lhes conferem uma vantagem de crescimento durante os processos de seleção (THOMAS, GOLOMB & SMITH, 2010).

A seleção da população de fagos de entrada gera uma ligação por afinidade e então os fagos de saída são amplificados nos ciclos subsequentes, sendo que os clones dos últimos ciclos são considerados mais promissores no sentido de reconhecimento à molécula alvo. Porém, infelizmente estes fagos de saída podem apresentar um comportamento indesejado. Estes clones não relacionados ao alvo ou à proteína de interesse, no caso da VLP de NV, pode apresentar uma propagação intrínseca ou extrínseca ao peptídeo. Na intrínseca, por exemplo, o peptídeo aumenta a eficiência de infecção ou de montagem e na extrínseca pode ocorrer a mutação em outro local do genoma do fago. Mesmo com a utilização de fagos com maior resistência aos processos de mutação este processo não pode ser ignorado (THOMAS, GOLOMB & SMITH, 2010).

Portanto, a seleção de termodinâmica, estabilidade, rendimento da construção da biblioteca, dobramento da proteína e a resistência de agregação são considerados elementos importantes para a avaliação e seleção dos clones. A estabilidade do Fab pode ser influenciada no momento da tradução da proteína de capsídeo levando em consideração a maquinaria da bactéria, bem como os procedimentos como temperatura e aeração no momento das reamplificações (JUNG, HONEGGER & PLUÈCKTHUN, 1999).

As taxas de recombinação nas bactérias são na faixa de 10^{-6} a 10^{-9} por nucleotídeo a cada geração bacteriana. Além disso, a troca entre genes diferentes,

interrupções de genes e exclusões podem ocorrer com uma frequência considerável. Estes mecanismos acontecem para a adaptação bacteriana à nova situação em que está sendo submetida, pois as bactérias realizam transferência horizontal de genes (BRÜSSOW, CANCHAYA & HARDT, 2004). Assim, evidencia-se a importância da utilização da glicose na metodologia de seleção de fagos, pois isto pode reduzir a taxa de recombinação e aumentar a expressão das proteínas (Fabs) na superfície dos fagos.

Uma alternativa para inibir a formação de mutantes é a utilização do DNA plasmidial de um *pool* de clones de um determinado ciclo. Assim, é possível a produção de novos clones sem o produto do gene de fusão pIII ou o gene da proteína de capsídeo do fago, por meio da utilização de uma cepa de *Escherichia coli* não supressora (que não contém o gene SupE44) a qual irá expressar as proteínas de forma solúvel ou Fabs solúveis.

Problemas de estabilidade no vetor e no DNA do inserto quando se utiliza fagomídeos pode alterar diretamente o empacotamento do fagomídeo no capsídeo viral. Este fator está diretamente relacionado ao tamanho do fagomídeo, pois os menores são empacotados com maior facilidade, enquanto vetores grandes com insertos são desfavorecidos. Ainda, como já relatado, os fragmentos de anticorpos como os Fabs expressos pela biblioteca exercem graus de toxicidades nas células de *Escherichia coli*, assim, as células podem crescer contendo fagomídeos deletados e se não houver pressão seletiva adequada como fatores termodinâmicos e o efeito de seleção-negativa exercido pela toxicidade da proteína pIII de capsídeo, isso pode resultar na degradação da biblioteca após vários ciclos de seleção (DANTAS-BARBOSA, BRÍGIDO & MARANHÃO, 2005).

Com a análise realizada pela técnica de *Phage* ELISA (Figura 18) foi possível observar o reconhecimento de fagos recombinantes selecionados nos ciclos e no último ciclo (4) é perceptível a presença de clones de alta afinidade com as VLPs de NV (clones 69 a 87).

É esperada uma diminuição da diversidade ao longo dos ciclos de seleção apesar dos Fabs reconhecerem especificamente o antígeno de maneira diferente da diversidade inicial com relação à biblioteca construída. Este fato pode observado com a presença de clones selecionados (Figura 19) em que após a digestão com a enzima *Sfi I* os clones 9 e

10 apresentaram fragmentos próximos a 1500 e 1600 pb (tamanho da biblioteca), porém, não foi possível observar uma boa diversidade de clones (Figura 20) devido aos possíveis eventos de recombinação.

A maior vantagem em utilizar a técnica de *Phage Display* é a possibilidade da seleção de fragmentos de anticorpos monoclonais totalmente humanos que podem ser utilizados em ensaios clínicos. Neste sentido, nos últimos anos o desenvolvimento do *Next Generation Sequencing* (NGS) ou *Deep sequencing* revolucionou os aspectos da pesquisa biológica (RAVN et al., 2010).

Realizar o sequenciamento de todos os clones resultantes da amplificação da biblioteca, bem como os clones do último ciclo (ciclo 4) resultantes da seleção após a exposição ao antígeno (VLP de NV) poderá refletir na diversidade real e uma boa análise da qualidade dos fragmentos de anticorpos a serem selecionados.

A diferença entre NGS do sequenciamento padrão (alternativo ao método de Sanger) é que este último possui a capacidade de sequenciar apenas uma parte do repertório, enquanto o NGS analisa todos os clones ou sequências em cada ciclo do *Phage Display* e oferece uma análise abrangente de todo o processo de seleção (RAVN et al., 2010). Com a utilização deste tipo de sequenciamento, a etapa de triagem realizada pela digestão dos possíveis clones com as enzimas de restrição *Sfi I* e *BstO I* torna-se desnecessária.

Alguns estudos evidenciam a eficácia do NGS utilizando a plataforma de Illumina que favorece o sequenciamento de fragmentos curtos. No caso do presente estudo, a proposta para a futura aplicação do NGS é a utilização do sequenciador 454 (Roche) que realiza o sequenciamento de fragmentos maiores, para o sequenciamento das cadeias VH e VL (com cerca de 300 pb cada) dos anticorpos da biblioteca e também dos anticorpos selecionados no ciclo 4 (FISCHER, 2011).

A grande quantidade de dados fornecidos por estas plataformas é idealmente adequada para uma extensa análise de conjuntos complexos de segmentos de genes diversificados como é o caso da biblioteca apresentada em fagos. Foi possível observar que a análise de diversidade após a digestão com a enzima *BstO I* (Figura 20) não reflete uma diversidade adequada no sentido de verificar a presença das cadeias VH e VL dos anticorpos.

Assim, uma análise de sequenciamento completo poderá fornecer informações sobre os potenciais clones altamente reativos à VLP de NV. Após a análise do sequenciamento será possível verificar as cadeias pesadas e leves e assim caracterizar os anticorpos monoclonais frente aos antígenos de NV.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com o desenvolvimento do presente trabalho foi possível produzir as VLPs de norovírus por meio do sistema de expressão heterólogo de baculovírus. Assim, o grupo de virologia da UnB foi o precursor no Brasil a desenvolver as ferramentas necessárias para utilizar as VLPs de NV em estudos de antigenicidade e imunogenicidade.

Ao realizar a comparação entre as técnicas de purificação das partículas virais, foi possível observar que a purificação por cromatografia de troca iônica é mais eficiente no que diz respeito à quantidade de proteína purificada bem como à pureza das partículas virais se comparada com o método de purificação por cloreto de cério (CsCl).

A utilização da biblioteca de anticorpos monoclonais humanos apresentadas em fagos demonstrou pelo ensaio de *Phage* ELISA a seleção de clones com afinidade de ligação às proteínas de capsídeo de NV, todavia, a diversidade dos clones pode ter sido influenciada por recombinações, sendo necessária uma avaliação mais precisa de clones de alta afinidade.

Com relação às perspectivas, pretende-se:

- Repetir da seleção aplicando a técnica de *Next Generation Sequencing* (NGS).
- Produzir os anticorpos monoclonais solúveis em cepas de *Escherichia coli* não supressoras;
- Caracterizar os anticorpos solúveis provenientes dos clones de alta afinidade frente às proteínas S, P1 e P2 de norovírus;
- Caracterizar os anticorpos solúveis com amostras fecais utilizando como anticorpo primário o anti-HA (anti-hemaglutinina).

7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- ABBAS, A., LICHTMAN, A., PILLAI, S. Anticorpos e Antígenos. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 75-96, 2008.
- ABE, T., TAKAHASHI, H., HAMAZAKI, H., MIYANO-KUROSAKI, N., MATSUURA, Y., TAKAKU, H. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. **J Immunol**. Vol.171, p. 1133–1139, 2003.
- ADRIAENSSENS, E. M., LEHMAN, S. M., VANDERSTEEGEN, K., VANDENHEUVEL, D., PHILIPPE, D. L., CORNELISSEN, A., CLOKIE, M. R., GARCÍA, A.J., DE PROFT, M., MAES, M., LAVIGNE, R. CIM(®) monolithic anion-exchange chromatography as a useful alternative to CsCl gradient purification of bacteriophage particles. **Virology**. Vol. 434, n. 2, 265-270, 2012.
- AGRAWAL A., EASTMAN Q.M., SCHATZ D. G. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. **Nature**. Vol. 394, p. 744–751, 1998.
- AGUS, S. G., DOLIN, R., WYATT, R. G., TOUSIMIS, A. J., NORTHRUP, R. S. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. **Ann Intern Med**. Vol. 79, p. 18-25, 1973.
- ALLEN, D. J., NOAD, R., SAMUEL, D., GRAY, J. J., ROY, P., ITURRIZA-GÓMARA, M. Characterisation of a GII-4 norovirus variant-specific surface-exposed site involved in antibody binding. **Virology**. Vol. 6, p.150, 2009.
- ANDRIS- WIDHOPF, J., STEINBERGER, P., FÜLLER, R., RADER, C. e BARBAS III, C.F. (2000). Generation of antibodies libraries: PCR amplification and assembly of light- and heavy-chain coding region. In: Phage Display – a laboratory manual. 1ª Edição. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp 9.1 – 9.113
- ARNDT, K. M., MÜLLER, K. M., PLÜCKTHUN, A. Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. **Biochemistry**. Vol. 37, n. 37, p. 12918-12926, 1998.
- AUSAR, S.F., FOUBERT, T. R., HUDSON, M. H., VEDVICK, T. S., MIDDAUGH, C. R. Conformational Stability and Disassembly of Norwalk Virus-like Particles. **J Biol Chem**. Vol. 281, n. 28, p. 19478-19488, 2006.
- AZEVEDO, M., O., FELIPE, M., S., S., BRIGIDO, M., M., MARANHÃO, A., Q., SOUZA, M., T. Técnicas básicas em Biologia Molecular. UNB. 1ª Ed., 2003.
- AZZAZY, H. M., HIGHSMITH, W. E. J. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin Biochem**. Vol. 35, n. 6, p. 425-445, 2002.

- BARBAS, C. F., BURTON, D. R., SCOTT, J. K., SILVERMAN, G. J. **Phage display – a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol Adv.** Vol. 19, n. 1, p. 1-33, 2001.
- BERTOLOTTI-CIARLET, A., CRAWFORD, S.E., HUTSON, A.M., ESTES, M.K. The 3' end of norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. **J Virol.** Vol.77, n. 21, p. 11603-11615, 2003.
- BIOSCIENCES, A. **Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing - Principles and Methods**, 2004.
- BLAZEVIC, V., LAPPALAINEN, S., NURMINEN, K., HUHTI, L., VESIKARI, T. Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. **Vaccine.** Vol. 29, p. 8126–8133, 2011.
- BOK, K., ABENTE, E. J., REALPE-QIUNTERO, M., MITRA, T., SOSNOVTSEV, S. V., KAPIKIAN, A. Z., VERDE, K. Y. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. **J Virol.** Vol. 83, p. 11890–11901, 2009.
- BORGES, A. M., TEIXEIRA, J.M., COSTA, P. S., GIUGLIANO, L. G., FIACCADORI, F. S., FRANCO, R. DE C., BRITO, W. M., LEITE, J. P., CARDOSO, DD. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the WestCentral region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Vol. 101, n. 7, p. 721-724, 2006.
- BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas Combinatórias em Phagos. **Biociencia Ciência & Desenvolvimento.** Vol. 26, p. 44-51, 2002.
- BROCKMANN, C. E. Selection of Stable scFv Antibodies by Phage Display. **Methods Mol Biol.** Vol. 907, p. 123-144, 2012.
- BRÜSSOW H., CANCHAYA, C., HARDT, W. D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiol Mol Biol Rev.** Vol. 68, n. 3, p. 560-602, 2004.
- BULL, R. A., TU, E. T. V., MCIVER, C. J., RAWLINSON, W. D., WHITE, P. A. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. **J Clin Microbiol.** Vol. 44, p. 327-333, 2006.
- BURNET F.M. The clonal selection theory. Nashville: Vanderbilt University Press, 1959.
- CASTILHO, J.G., MUNFORD, V., RESQUE, H. R., FAGUNDES-NETO, U., VINJÉ, J., RÁCZ, M. L. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. **J Clin Microbiol.** Vol. 44, p. 3947-3953, 2006.

- CASTRICIANO, S., LUINSTRAS, K., PETRICH, A., SMIEJA, M., LEE, C., JANG, D., PORTILLO, E., CHERNESKY, M. Comparison of the RIDASCREEN® Norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stool also assayed by RT-PCR and electron microscopy. **J Virol Methods**. Vol. 141, p. 216-219, 2007.
- CASTRO, M. E. B., SOUZA, M. L., SIHLER, W., RODRIGUES, J. C. M., RIBEIRO, B. M. Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Vol. 34, n. 10, 1999.
- CHAKRAVARTY, S., HUTSON, A. M., ESTES, M. K., PRASAD, B. V. Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. **J Virol**. Vol. 79, n. 1, p. 554-568, 2005.
- CHEN, R., NEILL, J. D., NOEL, J. S., HUTSON, A. M., GLASS, R. I., ESTES, M. K., PRASAD, B. V. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. **J Virol**. Vol. 78, n. 12, p. 6469-6479, 2004.
- CHEN, W., ZHONGYU, Z., FENG, Y., XIAO, X., DIMITROV, D. S. Construction of a large phage–displayed human antibody domain library with a scaffold based on a newly identified highly soluble, stable heavy chain variable domain. **J Mol Biol**. Vol. 382, n. 3, p. 779-789, 2008.
- CHEN, Z., SOSNOVTSEV, S. V., BOK, K., PARRA, G. I., MAKIYA, M., AGULTO, L., GREEN, K. Y., PURCELL, R. H. Development of Norwalk virus-specific monoclonal antibodies with therapeutic potential for the treatment of Norwalk virus gastroenteritis. **J Virol**. Epub ahead of print, Jun, 2013.
- CLEMENTI, N., MANCINI, N., SOLFOROSI, L., CASTELLI, M., CLEMENTI, M., BURIONI, R. Phage Display-based Strategies for Cloning and Optimization of Monoclonal Antibodies Directed against Human Pathogens. **Int J Mol Sci**. Vol.13, p. 8273-8292, 2012.
- COLECLOUGH, C., PERRY, R.P., KARJALAINEN, K. AND WEIGERT, M. Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. **Nature**. Vol. 290, p. 372- 378, 1981.
- DANTAS-BARBOSA, C., BRÍGIDO, M.M., MARANHÃO, A.Q. Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients. **Genet Mol Res**. Vol.30, No.2, p. 126-140, 2005.
- DE BRUIN, E., DUIZER, E., VENNEMA, H., KOOPMANS, M. P. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. **J. Virol. Methods**. Vol. 137, p. 259–264, 2006.
- DEBBINK K., LINDESMITH L. C., DONALDSON E. F., BARIC R. S. Norovirus immunity and the great escape. **PLoS Pathog**. Vol. 8, n. 10, p. e1002921, 2012.
- DEBBINK, K., DONALDSON, E. F., LINDESMITH, L. C., BARIC, R. S. Genetic mapping of a highly variable norovirus GII.4 blockade epitope: potential role in escape from human herd immunity. **J Virol**. Vol. 86, n. 2, p. 1214-1226, 2012.

- DEML, L., SPETH, C., DIERICH, M. P., WOLF, H., WAGNER, R. Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. **Mol Immunol**. Vol. 42, p. 259–277, 2005.
- DOLIN, R., BLACKLOW, N. R., DUPONT, H., FORMAL, S., BUSCHO, R. F., KASEL, J. A., CHAMES, R. P., HORNICK, R., CHANOCK, R. M. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. 1971. **J Infect Dis**. Vol. 189, n. 11, p. 2142-2147, 2004.
- DONALDSON, E.F., LINDESMITH, L.C., LOBUE, A.D., BARIC, R.S. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. **Nat Rev Microbiol**. Vol. 8, 2010.
- DOUCE, G., TURCOTTE, C., CROPLEY, I., ROBERTS, M., PIZZA, M., DOMENGHINI, M., RAPPUOLI, R., DOUGAN, G. Mutants of Escherichia coli heat-labile toxin lacking ADP ribosyl-transferase activity act as non-toxic mucosal adjuvants. **Proc Natl Acad Sci USA**. Vol. 92, p. 1644- 1648, 1995.
- DOUGUCHI, J., HASHIUCHI, A., SAKAMOTO, M. Construction of human monoclonal single-chain Fv antibodies against small-cell lung cancer by phage display libraries derived from cell-immunized SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes. **Proteomics Clin Appl**. Vol. 3, n. 11, p. 1265-1272, 2009.
- ELNIFRO, E.M., ASHSHI, A.M., COOPER, R.J., KLAPPER, P.E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clin Microbiol**. Vol. 13, n. 4, p. 559–570, 2000.
- ERMERT, K., MITLOHNER, H., SCHEMPP, W. AND ZACHAU, H.G. The immunoglobulin kappa locus of primates. **Genomics**. Vol. 25, p. 623-629, 1995.
- EXLEY, C., SIESJÖ, P., ERIKSSON, H. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? **Trends Immunol**. Vol. 31, p. 103- 109, 2010.
- FERREIRA, M.S.R., VICTORIA, M., CARVALHO-COSTA, F. A., VIEIRA, C. B., XAVIER, M. P. T. P., FIORETTI, J. M., ANDRADE, J., VOLOTÃO, E. M., ROCHA, M., LEITE, J.P., MIAGOSTOVICH, M. P. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. **J Med Virol**. Vol.82, p. 1442-1448, 2010.
- FIORETTI, J. M., FERREIRA, M. S. R., VICTORIA, M., VIEIRA, C. B., XAVIER M. D. A, T. P., LEITE, J. P. G., MIAGOSTOVICH, M. P. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Vol. 106, n. 8, p. 942-947, 2011.
- FISCHER, N. Sequencing antibody repertoires. **mAbs**. Vol. 3, n. 1, p. 17-20, 2011.
- FUGMANN, S.D., LEE, I.L., SHOCKETT, P.E., VILLEY, I.J., SHATZ, D.G. The RAG proteins and V(D)J recombination: Complexes, ends and transposition. **Annu Rev Immunol**. Vol. 18, p. 495-527, 2000.

- GARCÍA, A., DE SANCTIS, J. B. An overview of adjuvant formulations and delivery systems. **APMIS**. doi: 10.1111/apm.12143, 2013.
- GÓMEZ-SANTIAGO, F., RIBAS-APARICIO, R. M., GARCÍA-LOZANO, H. Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in mexican children. **J Virol**. Vol. 9, p.1-9, 2012.
- GRANADOS, R. R., GUOXUN, L., DERKSEN A. C. G., MCKENNA, K. A. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J Invertebr Pathol*. Vol. 64, p. 260-266, 1994.
- GREEN, K. Y. Caliciviridae: The noroviruses,. In: B. N. Fields (ed.), **Fields Virology**, 5. ed. Vol. 1, p. 949–980, 2007.
- GREEN, K. Y., CHANOCK, R. M., KAPIKIAN, A. Z. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P. M, editors. Human caliciviruses: fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. Vol. 1, p. 841-74, 2001.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis *Nucl. Acids. Symp*. Vol. 41, p. 95-98, 1999.
- HANSMAN, G. S., NATORI, K., SHIRATO-HORIKOSHI, H., OGAWA, S., OKA, T., KATAYAMA, K., TANAKA, T., MIYOSHI, T., SAKAE, K., KOBAYASHI, S., SHINOHARA, M., UCHIDA, K., SAKURAI, N., SHINOZAKI, K., OKADA, M., SETO, Y., KAMATA, K., NAGATA, N., TANAKA, K., MIYAMURA, T., TAKEDA, N. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. **J Gen Virol**. Vol. 87, p. 909-919, 2006.
- HANSMAN, G. S., TAYLOR, D. W, MCLELLAN, J. S., SMITH, T. J., GEORGIEV, I., TAME, J. R., PARK, S. Y., YAMAZAKI, M., GONDAIRA, F., MIKI, M., KATAYAMA, K., MURATA, K., KWONG, P. D. Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. **J Virol**. Vol. 86, n. 7, p.3635-3646, 2012.
- HAYNES, J. R., CUNNINGHAM, J., VON SEEFRIED, A., LENNICK, M., GARVIN, R. T., SHEN, S. H. Development of a genetically-engineered, candidate polio vaccine employing the selfassembling properties of the tobacco mosaic virus coat protein. **Biotechnology**. Vol. 4, p. 637–641, 1986.
- HITCHMAN, R. B., POSSEE, R. D., KING, L. A. Baculovirus Expression Systems for Recombinant Protein Production in Insect Cells. **Recent Pat Biotechnol**. Vol. 3, n. 1, p. 46-54, 2009.
- HOOGENBOOM H. R., BRUÏNE A.P., HUFTON S.E., HOET R. M., ARENDS J.W. e ROOVERS R.C. Antibody phage display technology and its applications. **Immunotechnology**. Vol 4, p. 1-20, 1998.
- HOOPEs, R. R., ROHRMANN, G. F. In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Vol. 88, n. 10, p. 4513-4517, 1991.

- HUHTI, L., BLAZEVIC, V., NURMINEN, K., KOHO, T., HYTÖNEN, V. P., VESIKARI, T. A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles. **Arch Virol**. Vol. 155, n. 11, p. 1855-1858, 2010.
- HUHTI, L., TAMMINEN, K., VESIKARI, T., BLAZEVIC, V. Characterization and immunogenicity of norovirus capsid-derived virus-like particles purified by anion exchange chromatography. **Arch Virol**. Vol. 158, n. 5, p. 933-942, 2013.
- JANEWAY C. A., TRAVERS P., WALPORT M., SHLOMCHIK M. Immunobiology. 5ed. New York and London: Garland Publishing, 2001.
- JEGERLEHNER, A., MAURER, P., BESSA, J., HINTON, H. J., KOPF, M., BACHMANN, M. F. TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. **J Immunol**. Vol. 178, p. 2415–2420, 2007.
- JIANG, X., MATSON, D. O., RUIZ-PALACIOS, G. M., HU, J., TREANOR, J., PICKERING, L. K. Expression, self-assembly, and antigenicity of a Snow Mountain Agent-like calicivirus capsid protein. **J. Clin. Microbiol**. Vol. 33, p. 1452–1455, 1995.
- JIANG, X., WANG, M., GRAHAM, D. Y., ESTES, M. K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. **J Virol**. Vol. 66, p. 6527–6532, 1992.
- JUNG, K., WANG, Q., KIM, Y., SCHEUER, K., ZHANG, Z., SHEN, Q., CHANG, K-O., SAIF, L.J. The effects of simvastatin or interferon-a on infectivity of human norovirus using a gnotobiotic pig model for the study of antivirals. **PLoS ONE**. Vol.7, n.7, e 41619, 2012.
- JUNG, S., HONEGGER, A., PLUÈCKTHUN, A. Selection for Improved Protein Stability by Phage Display. **J. Mol. Biol**. Vol. 294, p. 163-180, 1999.
- KAGEYAMA, T., SHINOHARA, M., UCHIDA, K., FUKUSHI, S., HOSHINO, F.B., KOJIMA, S., TAKAI, R., OKA, T., TAKEDA, N., KATAYAMA, K. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to *Norovirus* in Japan. **J Clin Microbiol**. Vol. 42, n.7, p. 2988-2995, 2004.
- KAMATA, K., SHINOZAKI, K., OKADA, M., SETO, Y., KOBAYASHI, S., SAKAE, K., OSETO, M., NATORI, K., SHIRATO-HORIKOSHI, H., KATAYAMA, K., TANAKA, T., TAKEDA, N., TANIGUCHI, K. Expression and antigenicity of virus-like particles of norovirus and their application for detection of noroviruses in stool samples. **J Med Virol**. Vol. 76, n. 1, p. 129-136, 2005.
- KAPIKIAN, A. Z. Overview of viral gastroenteritis. **Arch Virol Suppl**. Vol. 12, p. 7-19, 1996.
- KAPIKIAN, A. Z., WYATT, R.G., DOLIN, R., THORNHILL, T.S., KALICA, A.R., CHANOCK, R. M. Visualization by immune electron microscopy of a 27nm par-

- ticle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **J Virol**. Vol. 10, p. 1075-1081, 1972.
- KAPLAN, J. E., FELDMAN, R., CAMPBELL, D. S., LOOKABAUGH, C., GARY, G. W. Frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. **Am J Public Health**. Vol. 72, p. 1329-1332, 1982.
- KARST, S. M. Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. **Viruses**. Vol. 2, n. 7, p. 748-781, 2010.
- KIM, H. J., LIM, S. J., KWAG, H. L., KIM, H. J. The choice of resin-bound ligand affects the structure and immunogenicity of column-purified human papillomavirus type 16 virus-like particles. **PLoS ONE**. Vol. 7:e35893, 2012.
- KNAPPIK, A., GE, L., HONEGGER, A., PACK, P., FISCHER, M., WELLNHOFER, G., HOESS, A., WOLLE, J., PLUCKTHUN, A., VIRNEKAS B. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. **J Mol Biol**. Vol. 296, p. 57-86, 2000.
- KOHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. Vol. 256, p. 495-497, 1975.
- KOHO T, HUHTI L, BLAZEVIC V, NURMINEN K, BUTCHER SJ, LAURINMÄKI P, KALKKINEN N, RÖNNHOLM G, VESIKARI T, HYTÖNEN VP, KULOMAA MS. Production and characterization of virus-like particles and the P domain protein of GII.4 norovirus. **J Virol Methods**. Vol. 179, n. 1, p. 1-7, 2012.
- KOHO, T., MÄNTYLÄ, T., LAURINMÄKI, P., HUHTI, L., BUTCHER, S. J., VESIKARI, T., KULOMAA, M. S., HYTÖNEN, V. P. Purification of norovirus-like particles (VLPs) by ion exchange chromatography. **J Virol Methods**. Vol. 181, n. 1, p. 6-11, 2012.
- KOO, H. L., AJAMI, N., ATMAR, R. L., DUPONT, H. L. Noroviruses: The Principal Cause of Foodborne Disease Worldwide. **Discov Med**. Vol. 10, n. 50, p. 61-70, 2010.
- KOOPMANS, M. Progress in understanding norovirus epidemiology. **Curr Opin Infect Dis**. Vol. 21, p. 544-552, 2008.
- LEE, G-C., JUNG, G.S., LEE, C.H. Complete genomic sequence analysis of norovirus isolated from South Korea. **Virus Genes**. Vol. 45,n. 2, p. 225-236, 2012.
- LINDESMITH, L. C., DONALDSON, E. F., LOBUE, A. D., CANNON, J. L., ZHENG, D. P., VINJE, J., BARIC, R. S. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. **PLoS Med**. Vol. 5, n. 2, e31, 2008.
- LINDESMITH, L.C., BELTRAMELLO, M., DONALDSON, E.F., CORTI, D., SWANSTROM, J., DEBBINK, K., LANZAVECCHIA, A., BARIC, R.S. Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. **Plos Pathog**. Vol.8, n.5, e1002705, 2012.

- LINDESMITH, L.C., DONALDSON, E., LEON, J., MOE, C.L., FRELINGER, J.A., JOHNSTON, R.E., WEBER, D.J., BARIC, R.S. Heterotypic Humoral and Cellular Immune Responses following Norwalk Virus Infection. **J Virol.** Vol. 84, n.4, p. 1800-1815, 2010.
- LOBUE, A. D., LINDESMITH, L. C., BARIC, R. S. Identification of cross-reactive norovirus CD4+ T cell epitopes. **J Virol.** Vol. 84, n. 17, p. 8530-8, 2010.
- LOBUE, A. D., LINDESMITH, L., YOUNT, B., HARRINGTON, P. R., THOMPSON, J. M., JOHNSTON, R. E., MOE, C. L., BARIC, R. S. Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking antibodies against multiple strains. **Vaccine.** Vol. 24, n. 24, p. 5220-5234, 2006.
- LOCHRIDGE, V. P., HARDY, M. E. A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization. **J Virol.** Vol. 81, n.22, p. 12316-12322, 2007.
- LOCHRIDGE, V. P., JUTILA, K. L., GRAFF, J. W., HARDY, M. E. Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. **J Gen Virol.** Vol. 86, p. 2799-2806, 2005.
- MADELEY, C. R., COSGROVE, B.P. Letter: calicivirus in man. **Lancet.** p. 199-200, 1976.
- MARKS J.D., HOOGENBOOM H.R., BONNERT T.P., MCCAFFERTY J., GRIFFITHS A.D. e WINTERG. By-passing immunization of human antibodies from V-genes libraries displayed on phage. **J. Mol. Biol.** Vol. 222, p. 581-97, 1991.
- MATSUDA, F., SHIN, E.K., NAGAOKA, H., MATSUMURA, R., HAINO, M., FUKITA, Y., TAKA-ISHI, S., IMAI, T., RILEY, J.H. AND ANAND, R. Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. **Nat Genet.** Vol. 3, p. 88-94, 1993.
- MAX, E.E. Immunoglobulins: molecular genetics. In: Fundamental Immunology, 4th ed., WE Paul ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998.
- MCAULIFFE, O., ROSS, R., FITZGERALD, G. F. The new phage biology: from genomics to applications. In: MCCRATH, S.; SINDEREN, D. van der (Eds.). **Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology.** Wymondham: Caister Academic Press, p. 1-43, 2007.
- MCCAFFERTY J., GRIFFITHS J. **Phage display of peptides and proteins, a Laboratory Manual.** San Diego: Academic Press, 1996.
- MENEZES, F. G., CORREA, V. M. S. P., FRANCO, F. G. M., RIBEIRO, M. I., CARDOSO, M. F. D. S., MORILLO, S. G., CARMONA, R. C. C., TIMENETSKY, M. C. S. T., CORREA, L., PASTERNAK, J. An outbreak of norovirus infection in a long-term care facility in Brazil. **Einstein.** Vol. 8, p. 410-413, 2010.

- MILLER, L. K. **The Baculoviruses**. New York; Plenum Press: 1997.
- MORILLO, S. G., TIMENETSKY, M. C. S T. Norovirus an overview. **Rev Assoc Med Bras**. Vol. 5, n. 4, p. 464-467, 2011.
- NELSON, P. N., REYNOLDS, G. M., WALDRON, E. E., WARD, E., GIANNOPOULOS, K., MURRAY, P. G. Monoclonal antibodies. **Journal Clinical of Pathology**. Vol. 53, p. 111-117, 2000.
- NICOLLIER-JAMOT, B., OGIER, A., PIROTH, L., POTHIER, P., KOHLI, E. Recombinant virus-like particles of a norovirus (genogroup II strain) administered intranasally and orally with mucosal adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c mice induce specific humoral and cellular Th1/Th2-like immune responses. **Vaccine**. Vol. 22, p. 1079-1086, 2004.
- O REILLY, D. R., MILLER, L. K. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the EGT gene. **Nature Biotechnology**. Vol. 9, p. 1086-1089, 1991.
- O REILLY, D. R., MILLER, L. K., LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. New York, Oxford University Press: 1994.
- OKA, T., YAMAMOTO, M., YOKOYAMA, M., OGAWA, S., HANSMAN, G. S., KATAYAMA, K., MIYASHITA, K., TAKAGI, H., TOHYA, Y., SATO, H., TAKEDA, N. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. **J Virol**. Vol. 81, n. 13, p. 6798-6806, 2007.
- PARKER, T. D., KITAMOTO, N., TANAKA, T., HUTSON, A. M., ESTES, M.K. Identification of Genogroup I and Genogroup II broadly reactive epitopes on the norovirus capsid. **J Virol**. Vol. 79, n. 12, p. 7402-7409, 2005.
- PARMLEY, S., SMITH, G. Antibody-selectable filamentous fd phagevectors: affinity purification of target genes. **Gene**. Vol. 73, n. 2, p. 305-318, 1988.
- POSNER, B., SMILEY, J., LEE, I. E., BENKOVIC, S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. **Trends Biochem Sci**. Vol. 19, n. 4, p. 145-150, 1994.
- PRASAD, B. V., ROTHNAGEL, R., JIANG, X., ESTES, M. K. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. **J Virol**. Vol. 68, p. 5117-5125, 1994.
- PRASAD, B.V., HARDY, M.E., DOKLAND, T., BELLA, J., ROSSMANN, M.G., ESTES, M. X ray crystallographic structure of the Norwalkvirus capsid. **Science**. Vol. 286, p.287-290, 1999.
- RABENAU, H. F., STÜRMER, M., BUXBAUM, S., WALCZOK, A., PREISER, W., DOERR, H. W. Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best? **Intervirol**. Vol. 46, n. 4, p.232-238, 2003.
- RADER, C., STEINBERGER P. BARBAS III, C. F. Selection from antibody libraries In: *Phage Display Laboratory Manual*. 1st Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 10.2 – 10.20, 2000.

- RAVN, U., GUENEAU, F., BAERLOCHER, L., OSTERAS, M., DESMURS, M., MALINGE, P., MAGISTRELLI, G., FARINELLI, L., KOSCO-VILBOIS, M. H., FISCHER, N. By-passing in vitro screening-next generation sequencing technologies applied to antibody display and in silicocandidate selection. **Nucleic Acids Res.** Vol, 38, n. 21, e193, 2010.
- REED, L. J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am J Epidemiol.** Vol. 27, p. 493-97, 1938.
- RICHARDS, A. F., LOPMAN, B., GUNN, A., CURRY, A., ELLIS, D., COTTERILL, H., RATCLIFFE, S., JENKINS, M., APPLETON, H., GALLIMORE, C. I., GRAY, J. J., BROWN, D. W. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. **J Clin Virol.** Vol. 26, p. 109-115, 2003.
- ROCKX, B. H., VENNEMA, H., HOEBE, C. J., DUIZER, E., KOOPMANS, M. P. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. **J Infect Dis.** Vol. 191, n. 5, p. 749-754, 2005.
- ROGERS, J. D., AJAMI, N. J., FRYSZCZYN, B. G., ESTES, M. K., ATMAR, R. L., PALZKILL, T. Identification and characterization of a Peptide affinity reagent for detection of noroviruses in clinical samples. **J Clin Microbiol.** Vol. 51, n. 6, p.1803-1008, 2013.
- RUSSEL, M., LOWMAN, H. B., CLACKSON, T. Introduction to phage biology and phage display. In: CLACKSON, T.; LOWMAN, H. (Org.) **Phage display.** Oxford: Oxford Unity Press, p. 1-26, 2004.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. **Cold Spring Harb Protoc.**doi: 10.1101/pdb.prot4455, 2006.
- SAMBROOK, R., FRITSCH, E., MANIATIS, T. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual.* Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTOS, N. S. O., ROMANOS, M. T.V., WIGG, M. D. *Introdução à VIROLOGIA HUMANA.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2 ed, 2008.
- SCHWAB, K. J., ESTES, M. K., NEILL, F. H., ATMAR, R. L. Use of heat release and internal RNA standard control in reverse transcription - PCR detection of Norwalk virus from stool samples. **J Clin Microbiol.** Vol. 35, p. 511-514, 1997.
- SCHWARZ, K., GAUSS G. H., LUDWIG, L., PANNICKE, U., LI, Z., LINDNER, D., FRIEDRICH, W., SEGER, R. A., HANSEN-HAGGE, T. E., DESIDERIO, S., LIEBER, M. R., BARTRAM, C. R. *Rag mutations in human B cell-negative SCID.* **Science.** Vol. 274, p. 97-99, 1996.
- SCIPIONI, A., MAUROY, A., ZIANT, D., SAEGERMAN, C., THIRY, E. A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. **Virol J.** Vol. 5, p. 94, 2008.
- SCOTT J.K. e BARBAS III C.F. (2000) Phage display vectors. In *Phage Display Laboratory Manual.* 1st Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 2.1-2.19.

- SHIOTA, T., OKAME, M., TAKANASHI, S., KHAMRIN, P., TAKAGI, M., SATOU, K., MASUOKA, Y., YAGYU, F., SHIMIZU, Y., KOHNO, H., MIZUGUCHI, M., OKITSU, S., USHIJIMA, H. Characterization of a broadly reactive monoclonal antibody against norovirus genogroups I and II: recognition of a novel conformational epitope. **J Virol.** Vol. 81, n. 22, p. 12298-12306, 2007.
- SHIRASAKI, N., MATSUSHITA, T., MATSUI, Y., OSHIBA, A., OHNO, K. Estimation of norovirus removal performance in a coagulation–rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs. **Water Res.** Vol. 44, p. 1307-1316, 2010.
- SMITH G. P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science.** Vol. 228, p. 1315- 1317, 1985
- SMYTH, D. J., COOPER, J. D., HOWSON, J. M. M., CLARKE, P., DOWNES, K., MISTRY, T., STEVENS, H., WALKER, N. M., TODD, J. A. FUT2 Nonsecretor Status Links Type 1 Diabetes Susceptibility and Resistance to Infection. **Diabetes.** Vol. 60, p. 3081-3084, 2011.
- SUBBA-REDDY, C. V., GOODFELLOW, I., KAO, C. C. VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-based assay. **J Virol.** Vol. 85, n. 24, p. 13027-37, 2011.
- TAMMINEN, K., HUHTI, L., KOHO, T., LAPPALAINEN, S., HYTONEN, V. P., VESIKARI, T., BLAZEVIC, V. A comparison of immunogenicity of norovirus GII-4 virus-like particles and P-particles. **Immunology.** Vol. 135, n. 1, p. 89-99, 2012.
- TAN, M., FANG, P., CHACHIYO, T., XIA, M., HUANG, P., FANG, Z., JIANG, W., JIANG, X. Noroviral P particle: structure, function and applications in virus–host interaction. **Virology.** Vol. 382, p. 115–123, 2008.
- TAN, M., JIANG, X. Norovirus P particle: a subviral nanoparticle for vaccine development against norovirus, rotavirus and influenza virus. **Nanomedicine.** Vol. 7, n. 6, p. 889-897, 2012.
- TAN, M., HUANG, P., XIA, M., FANG, P.A., ZHONG, W., MCNEAL, M., WEI, C., JIANG, W., JIANG, X. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. **J Virol.** Vol. 85, p. 753–764, 2011.
- THOMAS, W. D., GOLOMB, M., SMITH, G. P. Corruption of phage display libraries by target-unrelated clones: diagnosis and countermeasures. **Anal Biochem.** Vol. 407, n. 2, p. 237-240, 2010.
- TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature.** Vol. 302, p. 575-581, 1983.
- TONEGAWA, S., STEINBERG, C., DUBE, S. AND BERNARDINI, A. Evidence for somatic generation of antibody diversity. **Proc Natl Acad Sci USA.** Vol. 71, p. 4027-4031, 1974

- TRAN, T. N. H., TRAINOR, E., NAKAGOMI, T., CUNLIFFE, N. A., NAKAGOMI, O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. **J Clin Virol.** Vol. 56, n. 3, p. 185-193, 2012.
- TRAN, T. N. H., TRAINORB, E., NAKAGOMIA, T., CUNLIFFE, N. A., NAKAGOMI, O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. **J Clin Virol.** Vol. 56, p. 185-193, 2013.
- TRUJILLO, A. A., MCCAUSTLAND, K. A., ZHENG, D. P., HADLEY, L. A., VAUGHN, G., ADAMS, S. M., ANDO, T., GLASS, R. I., MONROE, S. S. Use of TaqMan Real-Time reverse transcription- PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. **J Clin Microbiol.** Vol. 44, p. 1405-1412, 2006.
- TU, E. T., BULL, R. A., KIM, M. J., MCIVER, C. J., HERON, L., RAWLINSON, W. D., WHITE, P. A. Norovirus excretion in an aged- care setting. **J Clin Microbiol.** Vol. 46, p. 2119-2121, 2008.
- UNICEF, WHO. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. New York: Unicef, Geneva: WHO, p. 58, 2009.
- VELASQUEZ, L. S., HJELM, B. E., ARNTZEN, C. J., HERBST-KRALOVETZ, M. M. An intranasally delivered Toll-like receptor 7 agonist elicits robust systemic and mucosal responses to Norwalk virus-like particles. **Clin Vaccine Immunol,** Vol. 17, n. 12, p. 1850-8, 2010.
- VELASQUEZ, L. S., SHIRA, S., BERTA, A. N., KILBOURNE, J., MEDI, B. M., TIZARD, I., NI, Y., ARNTZEN, C. J., HERBST-KRALOVETZ, M. M. Intranasal delivery of Norwalk virus-like particles formulated in an in situ gelling, dry powder vaccine. **Vaccine.** Vol.29, p.5221–5231, 2011.
- VICENTE, T., ROLDÃO, A., PEIXOTO, C., CARRONDO, M.J.T., ALVES, P.M. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. **J Invertebr Pathol.** Vol. 107, p. S42-S48, 2011.
- VICENTE, T., SOUSA, M. F. Q., PEIXOTO, C., MOTA, J. P. B., ALVES, P. M., CARRONDO, M. J. T. Anion-exchange membrane chromatography for purification of rotavirus-like particles. **J Membr Sci.** Vol. 311, p. 270–283, 2008.
- VICTORIA, M., COLINA, R., MIAGOSTOVICH, M. P., LEITE, J. P., CRISTINA, J. Phylogenetic prediction of cis-acting elements: a cre-like sequence in Norovirus genome? **BMC Res Notes.** Vol. 2, p. 176, 2009.
- VIEIRA, J., MESSING, J. Production of single-stranded plasmid DNA. **Methods in Enzymology.** Vol. 153, p. 3-11, 1987.
- VODNIK, M., ZAGER, U., STRUKELJ, B., LUNDER, M. Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. **Molecules.** Vol. 16, p. 790-817, 2011.

- VONGPUNSAWAD, S., VENKATARAM PRASAD, B. V., ESTES, M. K. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. **J Virol.** Vol. 87, n. 9, p. 4818-4825, 2013.
- WHITE, L. J., HARDY, M. E., ESTES, M. K. Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. **J Virol.** Vol. 71, n. 10, p. 8066-8072, 1997.
- WINTER G., MILSTEIN C. Man-made antibodies. **Nature.** Vol. 349, p. 293-299, 1991.
- WÖRN, A., PLÜCKTHUN, A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragment. **Journal of Molecular Biology.** Vol. 305, n. 5, p. 989-1010, 2001.
- WRIGHT, P. J., GUNESEKERE, I. C., DOULTREE, J. C., MARSHALL, J. A. Small round-structured (Norwalk-like) viruses and classical human caliciviruses in Southeastern Australia, 1980-1996. **J Med Virol.** Vol. 55, p. 312-320, 1998.
- YODA, T., SUZUKI, Y., TERANO, Y., YAMAZAKI, K., SAKON, N., KUZUGUCHI, T., ODA, H., TSUKAMOTO, T. Precise characterization of norovirus (Norwalk-like virus)-specific monoclonal antibodies with broad reactivity. **J Clin Microbiol.** Vol. 41, n. 6, p. 2367-2371, 2003.
- ZACHAU, H.G. **The human immunoglobulin genes.** Cap 8 in Immunoglobulin Genes, Academic Press p.173-191, 1995.
- ZELTINS, A. Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. **Mol Biotechnol.** Vol. 53, n. 1, p. 92-107, 2013.

8. ANEXOS

Clones selecionados para recuperação do DNA plasmidial a partir dos resultados obtidos no *Phage ELISA*. Leitura realizada no *Microplate Reader BioRad®* modelo 450 a um comprimento de onda de 405 nm.

Número	Clone	Leitura
1	Controle negativo	0,201
2	Clone 1 ciclo 1	0,279
3	Clone 2 ciclo 1	0,275
4	Clone 3 ciclo 1	0,267
5	Clone 4 ciclo 1	0,287
7	Clone 6 ciclo 1	0,412
8	Clone 7 ciclo 1	0,277
9	Clone 8 ciclo 1	0,322
10	Clone 9 ciclo 1	0,313
11	Clone 10 ciclo 1	0,284
12	Clone 11 ciclo 1	0,361
13	Clone 12 ciclo 1	0,247
14	Clone 13 ciclo 1	0,369
15	Clone 1 ciclo 2	0,238
16	Clone 2 ciclo 2	0,265
17	Clone 3 ciclo 2	0,266
18	Clone 4 ciclo 2	0,225
19	Clone 5 ciclo 2	0,221
21	Clone 1 ciclo 3	0,236
23	Clone 3 ciclo 3	0,254
25	Clone 5 ciclo 3	0,318
27	Clone 7 ciclo 3	0,25
30	Clone 10 ciclo 3	0,34
31	Clone 11 ciclo 3	0,302
32	Clone 12 ciclo 3	0,255
33	Clone 13 ciclo 3	0,25

40	Clone 20 ciclo 3	0,266
42	Clone 22 ciclo 3	0,314
45	Clone 25 ciclo 3	0,259
46	Clone 26 ciclo 3	0,269
47	Clone 27 ciclo 3	0,232
53	Clone 5 ciclo 4	0,233
55	Clone 7 ciclo 4	0,229
57	Clone 9 ciclo 4	0,226
59	Clone 11 ciclo 4	0,247
61	Clone 13 ciclo 4	0,248
65	Clone 17 ciclo 4	0,227
67	Clone 19 ciclo 4	0,231
68	Clone 20 ciclo 4	0,235
69	Clone 21 ciclo 4	0,245
70	Clone 22 ciclo 4	0,356
71	Clone 23 ciclo 4	0,269
72	Clone 24 ciclo 4	0,252
73	Clone 25 ciclo 4	0,297
74	Clone 26 ciclo 4	0,308
75	Clone 27 ciclo 4	0,347
76	Clone 28 ciclo 4	0,388
77	Clone 29 ciclo 4	0,368
78	Clone 30 ciclo 4	0,26
79	Clone 31 ciclo 4	0,238
80	Clone 32 ciclo 4	0,265
81	Clone 33 ciclo 4	0,292
82	Clone 34 ciclo 4	0,293
83	Clone 35 ciclo 4	0,278
84	Clone 36 ciclo 4	0,303
85	Clone 37 ciclo 4	0,31
86	Clone 38 ciclo 4	0,435
87	Clone 39 ciclo 4	0,287
