



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
ESPECÍFICOS PARA O NOROVÍRUS GIL4**

LAYSSA MIRANDA DE OLIVEIRA

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Área Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília, 2014.

Dissertação de autoria de Layssa Miranda de Oliveira, intitulada “Produção e caracterização de anticorpos monoclonais específicos para o Norovírus GII.4 ”, apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, em 25 de fevereiro de 2014, aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (Orientador) (CEL – UnB)

Profa. Dra. Eliane Noronha (CEL – UnB)

Prof. Dr. Luis Isamu Barros Kanzaki (FS/CEL-UnB)

Profa. Dra. Thatiane Lima Sampaio (Suplente) (CEL – UnB)

Brasília, 2014.

“Ao meu Deus, senhor da minha vida”.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, nada do que aconteceu seria possível sem o Espírito de Deus. Obrigada meu pai o senhor foi o meu consolo nos dias mais angustiantes, me sustentou quando nem eu mesma acreditava que seria possível dar a volta por cima. Nada do que eu conquistei é mais valioso do que a nossa relação. Obrigada por fazer do meu ser o teu templo.

A minha família: minha mãe, meu pai, minha tia, meus irmãos (Ana Karolina e Bruno) por todo apoio incondicional, eu devo e agradeço muito a todos vocês. Aos meus tios, tias e primos minha eterna gratidão.

Ao meu orientador, Tatsuya Nagata, durante estes sete anos de convivência desfrutei de momentos valiosos, como um pai foi quem me ensinou os primeiros passos da ciência, foi quem segurou na minha mão quando eu tropecei e quando errei me deu puxões de orelha doloridíssimo, mas que me ajudaram a chegar onde estou. O senhor pra mim é referência de integridade, humildade e competência e eu agradeço muito pela confiança, amizade e por ter acreditado em mim.

As minhas amigas: Bruna, Raquel, Ana Cláudia, Karol, “Franchesca” e Naianny obrigada pelo companheirismo e cumplicidade. É muito bom compartilhar os momentos difíceis com todas vocês, obrigada pelo apoio, amizade e palavras de convicção e certeza que me fizeram acreditar que o amanhã será melhor do que hoje.

As minhas colegas de laboratório da Virologia Humana é muito bom saber que posso contar com todas vocês. Aos vizinhos (Baculovírus e Virologia vegetal) o meu agradecimento pelos inúmeros reagentes compartilhados, pela amizade diária. Adoro muito todos vocês.

A professora Eliane Noronha que compartilhou informações importantes e nos ajudou a superar as dificuldades nas etapas de purificação. As minhas parceiras de cromatografia

Brendinha e Toton pela disponibilidade e parceria minha gratidão por cada experimento realizado.

As parceiras da UFG: Lucimeire, Adriana, Cris e Iara pela colaboração e empenho nesse trabalho. Admiro muito a competência e seriedade de vocês e sou eternamente grata pela disponibilidade e pela contribuição. Aprendi muito nesses dois anos com vocês.

Enfim a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para que essa trajetória fosse concluída.

RESUMO

Os Norovírus (NoV) são a principal causa de gastroenterites aguda não bacteriana no mundo. O genoma dos NoV consiste de um RNA fita simples o qual codifica uma poliproteína (clivada em seis proteínas não estruturais) e duas proteínas estruturais. A estrutura da proteína do capsídeo (VP1) é dividida dentro de dois principais domínios: O *shell* (S) e o *protruding* (P). Devido à incapacidade de cultivar estes vírus, o estudo morfológico e estrutural tem sido restrito a habilidade da VP1 de se montar em partículas semelhantes a vírus (VLP) as quais são morfológicas e antígenicamente indistinguíveis dos vírions nativo. O desenvolvimento do método de diagnóstico eficaz deste vírus, mesmo ocorrendo mutação rápida, tem desafiado a produção de anticorpos monoclonais (MAb) que reagem com epítopos de vários genótipos de NoV. Aqui foi relatado a produção de MAb contra a VLP de NoV GII.4 e a sua caracterização à partir dos domínios S, P1 e P2 expressos em sistema procariótico. Nesta abordagem, os MAb foram selecionados basea-se em sua reatividade obtida no ELISA utilizando VLP e MAb selecionados foram testados por *Western blotting* contra os domínios S, P1 e P2 expresso em *E.coli*. Nossos resultados demonstraram que todos os MAb selecionados nesse estudo reconheceram o domínio S, embora a densidade óptica obtida no ELISA indireto demonstraram baixa afinidade. Este resultado sugeriu que uma possível desnaturação ou degradação da VLP foi responsável pela fraca ligação observada no ELISA. Em conclusão, nossos resultados mostram uma possibilidade de que a preservação da VLP intacta consiste em etapa essencial para a seleção de MAb que possuem boa sensibilidade para posteriormente serem utilizado no diagnóstico de NoV por ELISA.

Palavras-chave: calicivírus, norovírus, anticorpos monoclonais, *virus-like particles*.

ABSTRACT

Norovirus (NoV) is the main cause of acute non-bacterial gastroenteritis worldwide. NoV genome consists of a single-stranded RNA which encodes one polyprotein (which is cleaved into six non-structural proteins) and two structural proteins. The capsid protein (VP1) structure is divided into two major domains: The Shell (S) and Protruding (P) domains. Due to the inability to propagate the virus in cell cultures, the structural and morphological study have been restricted using self-assembled virus-like particles (VLP) by expressing VP1 which are morphological and antigenically indistinguishable from native virions. The development of effective method of diagnosis of this virus, even occurring rapidly changing, has challenged aiming to produce monoclonal antibodies (MAb) that react to several different genotypes of NoV. Here, we report the production of MAb raised against the VLP of a NoV GII.4, and the selected MAb were characterized by Western blotting against S, P1 and P2 domains prepared through the prokaryotic expression system. Our results demonstrated that all MAb selected in this study recognized the S domain, however the optical density values achieved by the indirect ELISA demonstrated low affinity of MAb to the prepared VLP. This result suggests that possible denatured or degraded VLP were responsible for low reactivity in the ELISA. In conclusion, our results show a possibility that the preservation of intact VLP is an essential step to select MAb and posterior detection of NoV by ELISA for good sensibility.

Key-words: calicivirus, norovirus, monoclonal antibody, *virus-like particles*.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema do genoma do NoV e a estratégia de expressão gênica.	5
Figura 2. Estrutura do capsídeo.	5
Figura 3. Vias para a síntese de ácido nucleico, indicando o bloqueio da <i>via de novo</i> pela aminopterina.	7
Figura 4. Etapas da produção de anticorpos monoclonais.	9
Figura 5. Micrografia eletrônica de partículas virais e VLP.	11
Figura 6. Sequência de aminoácido do capsídeo inteiro de Norovírus GII.4	20
Figura 7. Representação esquemática do vetor pENTR 2B (Invitrogen) salientando os sítios BamHI XhoI.	24
Figura 8. Representação esquemática do vetor pDEST 17 (Invitrogen).	25
Figura 9. Cromatograma de proteínas expressadas.	28
Figura 10. Amostras coletadas durante a purificação e analisadas por SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i> .	29
Figura 11. Micrografia eletrônica de transmissão da VLP de NoV após o processo de purificação por cromatografia de troca iônica.	29
Figura 12. Formação de colônias híbridas após 10 dias de fusão.	31
Figura 13. Clonagem dos hibridomas.	32
Figura 14. Amplificação dos domínios S, P1 e P2.	34
Figura 15. Representação da construção do domínio P1.	35
Figura 16. Clonagem dos domínios S,P1 e P2 em pENTR 2b.	36
Figura 17. Clonagem dos domínios S, P1 e P2 em pDEST 17.	37
Figura 18. Análise do perfil da expressão das proteínas dos domínios (S, P1 e P2) em <i>E.coli</i> .	38

Figura 19. Ensaio de reatividade dos MAb com as proteínas dos domínios do CP de NoV GII.4 e VLP. 39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Variantes circulantes com os respectivos subtipos.

Tabela 2: Programa de PCR para amplificar o domínio S e P2 do CP de NoV GII.4.

Tabela 3: Programa para amplificar o domínio P1-1 e P1-2 da VP1 de Norovírus GII.4.

Tabela 4: Programa utilizado durante a etapa de *overlap-extension PCR* de P1-1 e P1-2.

Tabela 5: Programa utilizado durante a etapa de amplificação da fusão de P1-1 e P1-2.

Tabela 6: Sequências dos *primers* utilizados durante as amplificações dos domínios S, P1 e P2.

Tabela 7: Testes imunoenzimáticos (ELISA) de soro de camundongos imunizado utilizando 1 µg/mL de VLP purificada, após 30 dias de imunização.

Tabela 8: Absorbância do ELISA dos hibridomas secretores de anticorpos específicos contra NoV GII.4.

Tabela 9: Densidade óptica por ELISA dos clones resultantes da reclonagem de 2B1.

Tabela 10: Monitoramento da estabilidade através da densidade óptica durante seis meses.

Tabela 11: Comparação da reatividade dos MAb entre VLP de lote antigo e mais recente.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus <i>Celsius</i>
cDNA	DNA sintetizado a partir de um RNA
CEPRACO	Centro de Produção de Anticorpos
CP	Capsídeo
DNA	Ácido Deoxirribonucléico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Óxido Metil Sulfônico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfato
D.O	Densidade Óptica
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
For	<i>primer forward</i>
G	Genogrupo
HAT	Hipoxantina, amnopterina e timidina
HBGA	<i>Histo-blood group antigens</i>
KDa	Kilo Dalton
HGPRT	hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase
Kb	Kilo base
KV	Kilo Volts
LB	meio de cultura Luria-Bertani
MAb	Anticorpo Monoclonal
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mL	Mililitros
Min	Minutos
Miniprep	Mini preparação (extração de DNA plasmidial)

Mm	Milimolar
MNV	Norovírus Murino
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
ng	Nanogramas
NS	Proteína não estrutural
NTA	Amino-terminal
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P	<i>Protruding Domain</i>
PAGE	Gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
PBS	Solução Tampão de salina fosfatada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Concentração de íon hidrogênio livre
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
Rev	<i>Primer reverse</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	<i>Shell Domain</i>
Seg	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOC	Caldo de Hanahan com adição de 20% de glicose
TBE	Tris Borato EDTA
TK	Timidina quinase

Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UTRs	Regiões não traduzidas
UV	Ultra-violeta
VLP	<i>Virus like particle</i>
VP1	Proteína Viral
VPG	Proteína viral ligada ao genoma
V	Volts
μl	Microlitro
μg	Microgramas
μg/mL	Microgramas/mililitro
x g	Velocidade de sedimentação gravitacional
3CLpro	Protease

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES	viii
ÍNDICE DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Norovirose	1
1.2 Epidemiologia Molecular Global	2
1.3 Estrutura e organização genômica	3
1.4 Patogênese	6
1.5 Anticorpos Monoclonais	6
1.6 Anticorpos monoclonais Anti-Norovirus	11
II. JUSTIFICATIVAS	13
III. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivos Gerais	14
3.2 Objetivos Específicos	14
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Preparação das VLP recombinantes em escala média	14
4.1.1 Clarificação por Cushion 20%	15
4.1.2 Purificação da VLP por troca iônica	15
4.1.3 Visualização por Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	16
4.2 Produção de Anticorpo monoclonal a partir da VLP NoV GII.4	16
4.2.1 Imunização	16
4.2.2 ELISA	16
4.2.3 Preparação das células de Mielomas (SP2)	17
4.2.4 Obtenção e Preparação das Células Esplênicas	17
4.2.5 Preparo da Camada de Macrófagos Peritoneais (<i>Feeder-layer</i>)	18
4.2.6 Fusão celular	18
4.2.7 Seleção dos Hibridomas	19
4.2.8 Clonagem dos Hibridomas	19

4.2.9 ELISA dos MAb selecionados com a VLP.....	20
4.3 <i>Clonagem dos domínios da VP1</i>	20
4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase.....	20
4.3.2 Clonagem em pENTR e pDEST 17	25
4.3.3 Análise da expressão dos domínios da CP	27
4.3.4 Purificação das proteínas dos domínios S, P1 e P2	28
V. RESULTADOS	29
5.1 <i>Preparação da VLP recombinante</i>	29
5.1.1 Visualização por Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	30
5.2 <i>Produção de Anticorpo monoclonal a partir da VLP NoV GII.4</i>	31
5.2.1 Imunização dos Camundongos.....	31
5.2.2 Seleção dos Hibridomas	32
5.2.3 Clonagem dos hibridomas	33
5.2.4 Monitoramento dos Clones	34
5.2.5 ELISA dos MAb selecionados com a VLP	35
5.3. <i>Clonagem dos domínios da VP1</i>	36
5.3.1 Amplificação dos genes dos domínios da VP1 por PCR	36
5.3.2 Clonagem dos domínios em pENTR 2B e pDEST 17	37
5.4 <i>Expressão e purificação de proteína dos domínios da VP1 em Escherichia coli</i>	39
5.5 <i>Ensaio de reatividade dos MAb com as proteínas dos domínios</i>	40
VI. DISCUSSÃO	41
VII. CONCLUSÃO.....	44
VIII. PERSPECTIVAS DO TRABALHO	44
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
X. ANEXOS TERMOS DE CONCESSÃO DE USO DAS IMAGENS	50

I. INTRODUÇÃO

1.1 Norovirose

O *Norwalk virus* (NoV) foi descrito como agente etiológico em surtos de gastroenterite aguda em 1968, após um surto em uma escola em Norwalk, Ohio (EUA). Os NoV são atualmente reconhecidos como a principal causa de gastroenterite aguda no mundo. Estes vírus se utilizam da via orofecal para estabelecer uma infecção gastrointestinal auto-limitada, que cursa com um período rápido de incubação de 24-48 horas (GOODFELLOW, 2013). Em países em desenvolvimento estima-se que cerca de 200.000 mortes em crianças com menos de cinco anos de idade são devidas as infecções por NoV. Este vírus tem sido reportado como a principal causa de morte relacionada à gastroenterite nos EUA, resultando em 800 mortes por ano (HALL *et al.*, 2012). A cada ano é notificado um aumento do número de ocorrências de surtos de gastroenterites provocados por NoV, o que contribui com 21 milhões de casos nos EUA (CDC, 2013).

Os sintomas incluem: náuseas, vômitos, diarreia e cólicas abdominais. Porém, em determinados grupos específicos como crianças e idosos, podem desenvolver uma gastroenterite mais severa com duração de até seis semanas, apresentando quadros de desidratação por perda de fluídos e eletrólitos por meio das fezes e vômitos. Infecções sintomáticas prolongadas têm sido reportadas em pacientes transplantados e em indivíduos imunodeprimidos apresentando sintomas com duração de até dois anos (KARST, 2010). Em algumas pessoas saudáveis, geralmente ocorre infecção sem o aparecimento dos sintomas (assintomáticos) e a resolução de um a três dias. Estes indivíduos representam cerca de 30% da população. Além dessas rotas, tem sido investigada a ocorrência de transmissão zoonótica de NoV humano. Esta suspeita tem sido levantada desde a detecção de NoV em espécie animal que mantinha contato próximo com humanos. Desde então, estudos baseados na detecção molecular têm sido realizados em diferentes espécies animais (ROCKX *et al.*, 2002; ATMAR *et al.*, 2008).

Apesar de seu impacto significativo, os NoV pertencem ao grupo de vírus de RNA mais pobremente caracterizado, devido à dificuldade de cultivo destes vírus em cultura celular (DUIZER *et al.*, 2004; PAPAFRAGKOU *et al.*, 2013; TAKANASHI *et al.*, 2013).

1.2 Epidemiologia Molecular Global

Os NoV têm sido classificados de acordo com a diversidade gênica de VP1 (capsídeo; CP) em cinco genogrupos (GI-GV). Os genogrupos I, II, IV são considerados patógenos humanos e GIII e GV patógenos bovinos e murinos, respectivamente (LINDESMITH *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2006). Desde meados da década de 90, os NoV genótipo 4 do genogrupo II (GII.4) tem sido associado a maioria desses surtos de gastroenterites ocorridos em humanos no mundo inteiro (CHEN, 2012; LINDESMITH e DEBBINK, 2012). Os NoV GII.4, aproximadamente a cada dois anos, sofrem alterações antigênicas que frequentemente são denominadas de variantes ou subtipos. Esta diversidade gênica é resultado de dois mecanismos: mutações devido a erro de polimerização por RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) viral e por recombinação homóloga (MOTOMURA *et al.*, 2008, 2010; LI *et al.*, 2010; MARSHALL e BRUGGINK 2011).

Somente no intervalo entre 1995-2006 quatro grandes pandemias foram documentadas e associadas à evolução do genótipo GII. 4 (LINDESMITH *et al.*, 2008). O surgimento de uma nova variante é identificado de acordo com as sequências da principal proteína VP1, diferenças menores que 14,3% são classificados pertencendo à mesma variante, os que possuem entre 14,3% e 43,8% de diferença pertencem ao mesmo genótipo e aqueles com 45% a 61,4% estão agrupados no mesmo genogrupo (LINDESMITH e DEBBINK, 2012). Porém devido à rápida acumulação de genótipos tem sido proposta a reorganização dos critérios de classificação (KRONEMAN *et al.*, 2013). Com a contínua emergência de novas estirpes e inúmeras informações conflitantes na literatura, recentemente Kroneman e colaboradores (2013) propuseram a padronização de novos genótipos dos NoV e variantes baseado na análise filogenética utilizando o gene completo de VP1 e o gene parcial da ORF 1 (região da RdRp).

A primeira pandemia de NoV foi provocada pela variante US (subtipo 95/96) (Tabela 1) e foi responsável por uma média de 55% dos surtos ocorridos nos EUA e 85% na Holanda em meados da década de 90. Estudos epidemiológicos nos EUA demonstraram que a proporção da norovirose por GII.4 desde 1994 aumentou de 5% para 85% em 2006 (CHEN *et al.*, 2012; LINDESMITH *et al.*, 2012).

Em 2002, a variante US 95/96 foi substituída pela variante Farmington Hills e se associavam com 80% dos surtos de norovírus nos Estados Unidos (LINDESMITH *et al.*, 2012). Uma nova variante em 2004 foi identificada como agente etiológico em 18

surtos investigados na Austrália. Esta variante, a Hunter GII.4, subsequentemente foi identificada em surtos epidêmicos de gastroenterites no Japão, Taiwan e Holanda (BULL *et al.*, 2006). Kroneman e colaboradores (2006) reportaram uma nova variação antigênica que co-circulava nos Estados Unidos e na Europa: variante Laurens (subtipo 2006a) e a variante Minerva (subtipo 2006b) (LINDESMITH *et al.*, 2012). No entanto, no verão e outono de 2007 o subtipo 2006b (Minerva/EUA; Kobe034/Japão e V6/Inglaterra) tornou-se dominante sobre o subtipo 2006a e estava associado ao aumento do número de surtos em muitos países (KRONEMAN *et al.*, 2006). Este subtipo predominou até 2009, quando foi gradualmente substituída pela GII.4-2009 em *New Orleans* (subtipo 2009) (DEBBINK *et al.*, 2013; KRONEMAN *et al.*, 2006; SIEBENGA *et al.*, 2008).

Em março de 2012, em Sydney, (subtipo 2012) foi descrito pela primeira vez a circulação de uma nova variante a GII.4-2012. Como identificado por Debbink e colaboradores (2013) esta variante possuía diferença antigênica de GII.4-2006 e GII.4-2009 (Tabela 1), o que reforça a hipótese de que a emergência de GII.4 é o resultado do escape do sistema imunológico em decorrência da evolução dos principais epítomos neutralizantes (DEBBINK *et al.*, 2013).

Tabela 1: Variantes circulantes com os respectivos subtipos.

Variante	Subtipo
US	95/96
Farmington Hills	2002
Hunter	2004
Laurens	2006a
Minerva	2006b
New Orleans	2009
Sydney	2012

1.3 Estrutura e organização genômica

O genoma do NoV é um único segmento de RNA fita simples senso positivo compacto que varia de 7.3 – 7.5 kb em todo o gênero. Na extremidade 5' o genoma

encontra-se associado covalentemente a proteína VPg que pode funcionar como um *primer* na replicação do RNA viral e na extremidade 3' é poliadenilado (KARST *et al.*, 2010) (Fig. 1).

As regiões não traduzidas (UTRs) na extremidade do genoma são curtas, possuindo no terminal 5' e 3' tamanho de 5 e 48 nucleotídeos, respectivamente. As UTRs contêm estruturas secundárias de RNA que se prolongam até as regiões codificantes. Estas estruturas são essenciais para os processos de replicação, tradução e patogênese (GOODFELOW, 2013).

Os NoV são pertencentes ao gênero *Norovirus* da família *Caliciviridae*. A partícula viral é icosaédrica, não envelopada e mede cerca de 38nm em diâmetro. (KAMATA *et al.*, 2005). O genoma é organizado em três *open reading frames* (ORFs). A ORF 1 codifica uma poliproteína que é precursora de seis proteínas: a proteína não estrutural 1 (NS1)/p48 que tem a função de inibir o tráfego de proteínas hospedeiras para a superfície celular; NS2/NTPase que possui atividade de NTPase-helicase; NS3/p22 que inibe a secreção de proteínas hospedeiras; NS4/VPg que é responsável pelo recrutamento de fatores de iniciação da tradução; NS5/3CLpro que cliva a poliproteína ORF 1; e NS6/Pol que replica o genoma viral (Fig. 1) (LINDESMITH *et al.*, 2008; KAMATA *et al.*, 2005).

A ORF 2 e ORF 3 são traduzidas a partir de um RNA subgenômico que codificam a maior (VP1) e menor (VP2) proteína do capsídeo, respectivamente. O RNA subgenômico possui 2.4 kb e também é covalentemente ligado a VPg no terminal 5' e a cauda de poli-A no terminal 3' (Fig. 1) (GOODFELOW, 2013). A VP1 se dobra em dois domínios grandes: O *shell domain* (S) o qual é altamente conservado entre os calicivírus e o *protruding domain* (P) que é mais variável (Fig. 2) (KARST, 2010). O domínio P ainda é subdividido em dois subdomínios: P1 e P2. Este domínio apresenta a propriedade de ligação à célula hospedeira e tem demonstrado ser útil nos estudos de antigenicidade (LINDESMITH *et al.*, 2008). O subdomínio P2 é altamente variável e alguns trabalhos sugerem que este subdomínio contém determinantes antigênicos da resposta imunológica do hospedeiro (KOHO *et al.*, 2012).

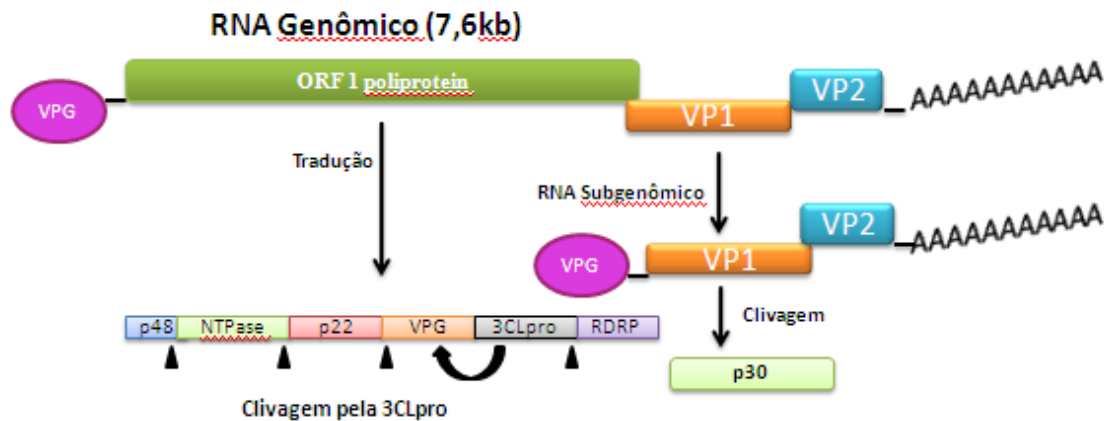


Figura 1. Esquema do genoma do NoV e a estratégia de expressão gênica. VPG=proteína viral ligada ao genoma. VP= proteína viral, 3CLpro= protease “3CL protease-like”. RDRP=polimerase de RNA dependente de RNA. Fonte: ViralZone com modificações.

A ORF 3, que codifica a proteína estrutural *minor* (VP2) (Fig. 1), está relacionada com a estabilidade da partícula viral e especula-se ainda a hipótese de atuar no empacotamento do vírus (LINDESMITH *et al.*, 2012; BULL *et al.*, 2006).

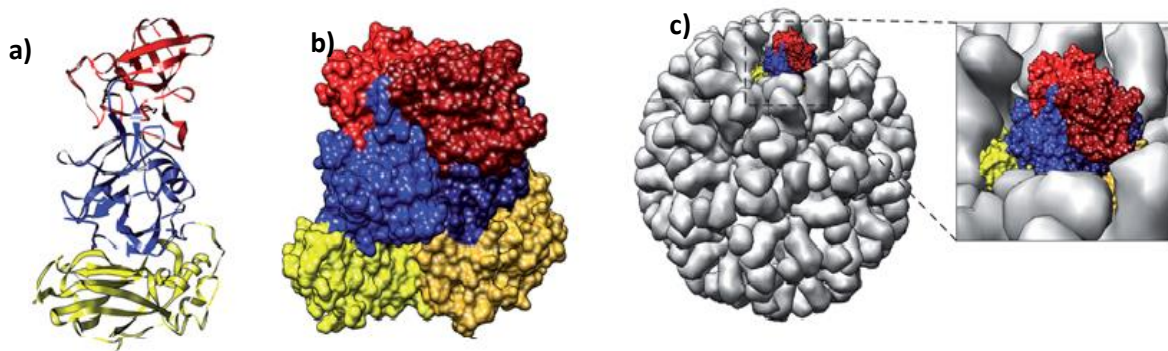


Figura 2: Estrutura do capsídeo. a) Estrutura do monômero de VP1 é mostrada na região vermelho = P2, azul = P1, amarelo = (S) b) Dois monômeros de proteínas do capsídeo forma o dímero A-B (indicado com o monômero A em tons claros e o monômero B em tons escuros), o qual permite o subdomínio P2 se projetar da partícula viral. c) A partícula semelhante a vírus é formada de 180 monômeros do capsídeo que montam através de diferentes dímeros. Os dímeros A-B, mostrado em colorido estende do capsídeo e fornece região de ligação de receptor e sítios de variação antigênica. Nesta partícula viral, VP2 é incorporada em baixo número de cópias. Modelos estruturais foram gerados e fotos foram processados usando MacPyMOL (Delano Scientific LLC, Palo Alto, California, USA). Modificado com permissão do “Nature Publishing Group”. Fonte: Donaldson, 2010.

1.4 Patogênese

A ausência de um sistema de cultura celular para propagar o vírus tem dificultado o entendimento da patogênese da infecção por NoV humano. Uma das alternativas para contornar essa limitação têm sido utilizar os NoV murino (MNV) como modelo de estudo para elucidar os vários aspectos do ciclo de replicação de NoV (GOODFELLOW, 2013), porém as comparações são restritas porque não explica totalmente o modelo humano. Informações detalhadas de como acontece o ciclo de replicação destes vírus e suas interações com a célula hospedeira é condição necessária para desenvolver estratégias permissivas ao cultivo celular humano para NoV humano (MARSH *et al.*, 2006) .

Outra estratégia é o estudo básico de caracterização do NoV humano através da VLP (*Virus-like particles*) de NoV humano. As VLP foram produzidas através da expressão da proteína do capsídeo (VP1) em sistema de baculovírus, o qual é bastante utilizado para o estudo de morfologia e antigenicidade mimetizando o vírus nativo (CHANG *et al.*, 2006; GOODFELLOW *et al.*, 2013; PARKER *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005). Estas partículas mantêm propriedade físico-química do vírion nativo e tem sido bastante utilizada no estudo de ligação às células hospedeiras. O subdomínio P2 de VP1, localizado na superfície do vírion contém sítios de reconhecimento para o HBGAs (*Histo-blood group antigens*), presente em saliva e células sanguíneas e também são expressos na superfície de células epiteliais da mucosa intestinal (VICENTINI *et al.*, 2013). Esta interação entre NoV e HBGA é genogrupos específica. Mesmo se GI e GII interagirem com o mesmo HBGA, os resíduos envolvidos nessa ligação podem ser diferentes (KARST, 2010).

1.5 Anticorpos Monoclonais

A descoberta em 1974 demonstrou que o protoplasto de planta quando tratado com polietilenoglicol (PEG) poderia se fundir. Isso foi o ponto de partida para Köhler e Milstein desenvolverem em 1975 a técnica de hibridoma para produção de anticorpos monoclonais (MAb) (KÖHLER e MILSTEIN, 1975; HARLOW e LANE, 1988). Köhler e Milstein observaram que era possível fusionar linfócitos B que possuíam a capacidade de produzir anticorpos com células de mieloma na presença de PEG e que o produto dessa fusão originava células híbridas com capacidade ilimitada de produzir

anticorpos com alta especificidade para um único epítipo (HARLOW e LANE, 1988; Köhler e Milstein, 1975). Atualmente a produção de hibridomas se diferencia em alguns aspectos do método empregado por Köhler e Milstein e as principais mudanças incluem o uso de células de mieloma não produtora de anticorpos e clonagem dos hibridomas por diluição limitante (Fig. 4) (TAMASHIRO, 2008).

Os linfócitos B normais produzem a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT) que atua na produção dos ácidos nucleicos. Estas células possuem duas vias para a síntese dos nucleotídeos: via *de novo* e via de salvamento. Drogas como a aminopterina, inibem a síntese de purinas e timidilato e, conseqüentemente, a síntese de DNA (Fig. 3) (ABBAS e LICHTMAN, 2003). Diante da impossibilidade de síntese dos nucleotídeos pela via *de novo*, os linfócitos B fazem uso da via de salvamento, onde Hipoxantina e Timidina exógena são utilizadas para síntese de purinas e timidilato na presença das enzimas hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT) e timidina quinase (TK), respectivamente (HARLOW e LANE, 1988).

Em contrapartida, as células de mieloma não podem utilizar a via de salvamento porque são deficientes de HGPRT. Desta forma as células de mieloma que não fundiram ou fundiram entre si não sobrevivem quando cultivada em meio HAT (Hipoxantina, aminopterina e timidina) (ABBAS e LICHTMAN, 2003).

Por outro lado, as células de mieloma que fundiram com os linfócitos B sobreviverão neste meio, pois possuem as enzimas HGPRT e TK. Já os linfócitos B que não fundiram naturalmente morrem após duas semanas de cultivo (HARLOW e LANE, 1988).

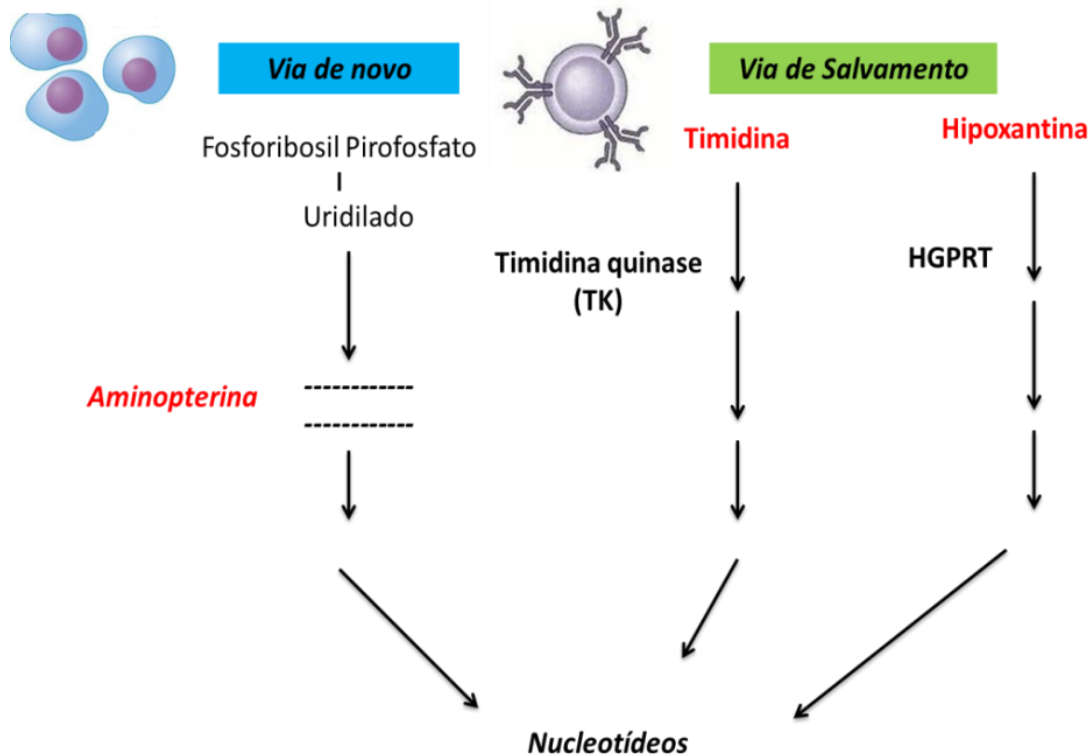


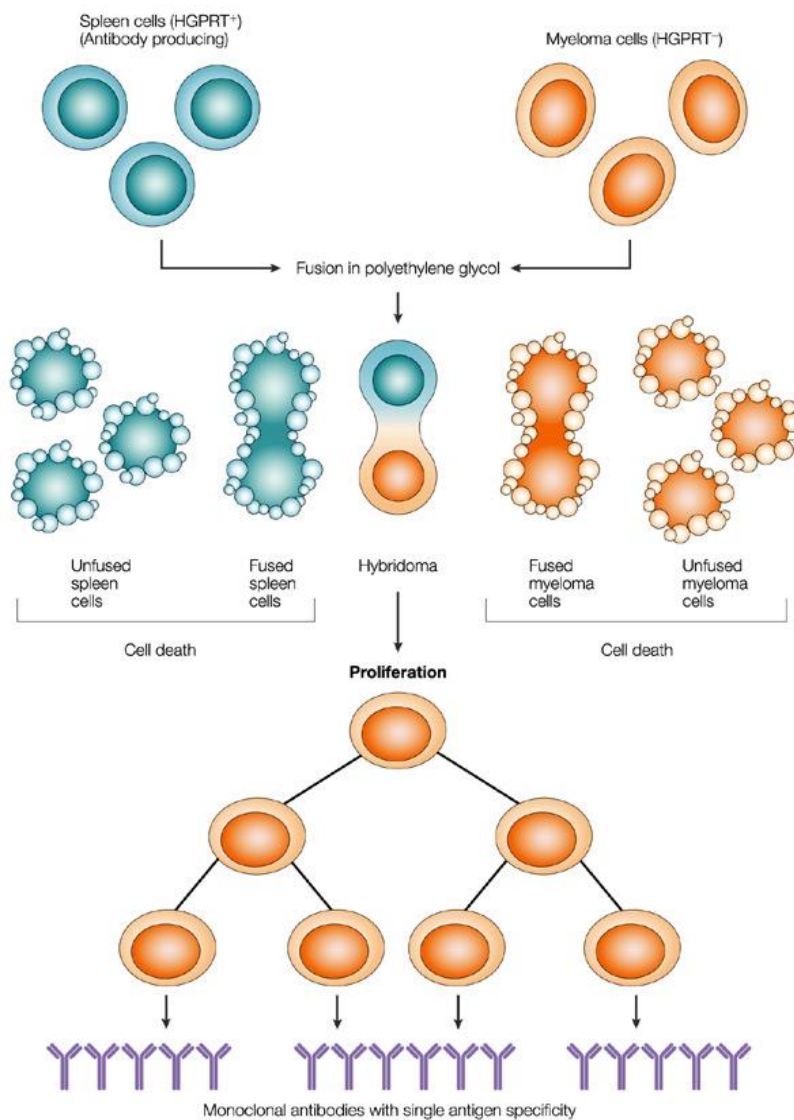
Figura 3: Vias para a síntese de ácido nucleico, indicando o bloqueio da *via de novo* pela aminopterina. Fonte: Abbas, 2003 com modificações.

A maior vantagem do uso dos MAb em relação aos anticorpos policlonais consiste na disponibilidade de grandes quantidades de anticorpos dirigido a único epítipo enquanto os policlonais reconhecem múltiplos epítipos, facilitando assim a ocorrência de reatividade cruzada não desejável (NEIL *et al.*, 2005). Outro aspecto a ser considerado é uma vez que os hibridomas produzidos são uma fonte constante e renovável, se tornando dessa forma uma ferramenta útil para a padronização experimental (NEIL *et al.*, 2005).

A monoespecificidade dos monoclonais é muito utilizada na avaliação de mudanças de aminoácidos (linear) conformacionais (terciária), nos estudos de interação proteína-proteína. Por outro lado uma pequena alteração na sequência de aminoácidos ou estrutura do epítipo por consequência de polimorfismo gênico, glicosilação ou desnaturação pode afetar a função dos MAb. Em contraste, os policlonais são heterogêneos e o efeito da mudança de um único epítipo é menos significativo (NEIL *et al.*, 2005). Desta forma, a produção de MAb também tem se tornado útil para a caracterização de sítios antigênicos do capsídeo e outras proteínas virais e pode fornecer

informações importantes para o desenvolvimento de ferramentas de diagnósticos e terapêuticas (FLINT *et al.*, 2000).

Uma aplicação bem sucedida dos MAb tem sido na terapia do câncer. A redução da quantidade de proteínas ligadas ao câncer por MAb e conjugação do MAb a drogas são estratégias adotadas para tratamento de linfomas e tumores sólidos e têm demonstrados sucesso clínico (ADAMS e WEINER, 2005).



Nature Reviews | Immunology

Figura 4: Uma representação esquemática da tecnologia do hibridoma. Linfócitos B de camundongos imunizados são fusionados, usando polyethylene glycol, com células de mieloma que se tornaram sensível a drogas por uma mutação no gene essencial HGPRT. As misturas das células é então cultivada em meio contendo as drogas seletivas. Como os linfócitos B, embora não sensível a HGPRT, sobrevive por apenas uma semana em cultura e as células de mieloma são sensíveis a droga elas morrerão dentro de uma semana. As únicas células que pode sobreviver são os híbridos de mieloma e linfócitos B que possuem o gene normal HGPRT proveniente das células imunes. Estes hibridomas podem crescer continuamente in vitro e alguns podem secretar anticorpo. Pelo uso da tecnologia de seleção apropriada, clones de células que secretam anticorpo de interesse podem ser identificados e expandidos in vitro ou in vivo para obter grande quantidade de anticorpo monoclonal que pode ser purificado para homogeneidade. HGPRT, hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase. Modificado com permissão do "Nature Publishing Group". Fonte: Alkan, 2004 com modificações.

1.6 Anticorpos monoclonais Anti-Norovirus

Muitos pesquisadores têm se empenhado em identificar MAb que possuem boa reatividade para detectar amplo espectro de genótipos ou genogrupos de NoV. O MAb mais conhecido é o anticorpo 5B18, o qual é atualmente comercializado para detecção de NoV, ELISA Denka, Seiken (Japão). Entretanto se ligam apenas a genótipos GII e não a GI o que restringe o espectro de detecção (HANSMAN *et al.*, 2012).

O primeiro grupo a identificar GI e GII em reatividade cruzada de um anticorpo monoclonal que reconhece epítomos conformacionais, foi o conduzido por Shiota e colaboradores (2007). Os resultados obtidos nesse estudo mostrou que o MAb 14-1 tinha alta reatividade para GI e GII com exceção de GI-3 e possuía um sítio de reconhecimento localizado na região terminal C de P1, a qual é relativamente mais conservada quando comparada com o P2 e N-terminal de P1 (SHIOTA *et al.*, 2007).

Já os dois anticorpos monoclonais (NV3901 e NV3912) produzidos por Parker e colaboradores (2005) reconheceram peptídeos conformacionais localizados na região N-terminal de P1. Porém a reação cruzada apenas ocorreu entre GI. O peptídeo possuía 91% de grau de similaridade de aminoácidos entre os NoV GI (PARKER *et al.*, 2005).

A presença de epítomos comuns compartilhados entre NoV humano e bovino tem sido descrito por Batten e colaboradores (2006). O MAb CM54 teve reatividade para duas regiões localizadas na região S: resíduos de aminoácidos 162-167 e 132-137, os quais são comuns a GI e GIII/2. A afinidade deste MAb a estes epítomos tem demonstrado utilidade na investigação de infecção humana por NoV bovino. Esta possibilidade foi avaliada por Widdowson e colaboradores (2005) quando testaram soro humano contra proteína do capsídeo recombinante bovina por ELISA, o qual obteve nível significativo de reatividade (WINDDOWSON *et al.*, 2005; BATTEN *et al.*, 2006).

Li e colaboradores (2010) também caracterizaram um MAb (N2C3) capaz de detectar NoV humano e bovino, mas que se ligavam aos resíduos 50-90 (região S). Entretanto tal anticorpo não obteve boa reatividade para detecção em amostras fecais quando comparado com os resultados de detecção por RT-PCR (LI *et al.*, 2010).

Recentemente Parra e colaboradores (2013), descreveram um epítomo linear no interior do domínio S do capsídeo de NoV, entre os resíduos 52-56, o qual é comum entre todas as estirpes dos seis genogrupos de NoV (PARRA *et al.*, 2013).

O MAb TV20 foi capaz de detectar por imunofluorescência o NoV murino em cultura celular, além de identificar as estirpes dos três genogrupos que infectam

humanos. Esse foi o primeiro estudo a demonstrar uma reação cruzada entre todo o gênero de NoV (PARRA *et al.*, 2013).

Resultados similares foram obtidos anteriormente por Yoda e colaboradores (2003) que caracterizaram anticorpos monoclonais de reatividade cruzada (1B4). Estes MAb reagiram na mesma região mas possuíram reatividade diferente. O 1B4 reconheceu a região do *core* da partícula correspondente à posição N-terminal do capsídeo viral (YODA *et al.*, 2003).

Estes estudos sugerem que a região S é uma região altamente imunogênica e por ser conservada demonstra ser um bom alvo para o desenvolvimento de anticorpos de amplo espectro.

Apesar da sua importância, pouco se conhece sobre epítomos que ocorrem nestes domínios da VP1 devido à falta de um sistema de cultura de células (a produção de anticorpo monoclonal é dependente da produção de *virus-like particles* (VLP) (Fig. 5), a qual exige uma técnica de expressão proteica (por exemplo, pelo sistema de baculovírus), e poucos têm condições de realizar este estudo.

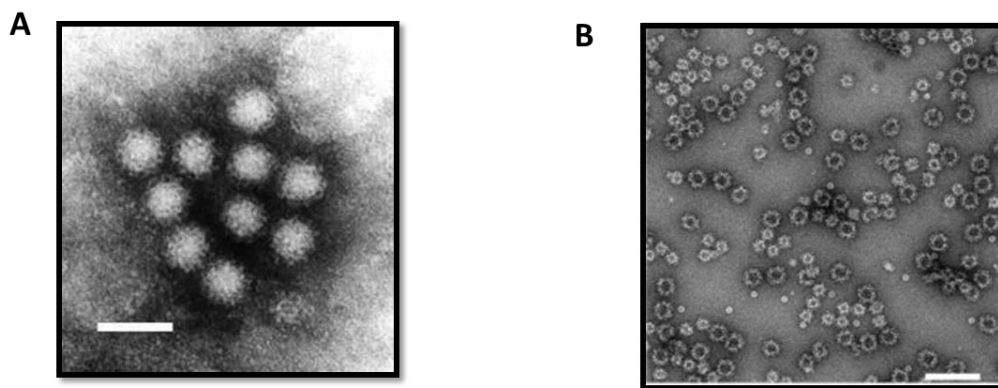


Figura 5. Micrografia eletrônica de partículas virais e VLP. (A) Micrografia eletrônica de partículas virais em amostras de fezes e (B) VLP produzidas por sistema de expressão de proteína do Baculovírus
Fonte: (A):Wikipedia. (B):SOMEYA, 2011.

O conhecimento de epítomos que participam da neutralização dos vírus pode fornecer informações úteis para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas eficazes que poderiam interferir na replicação viral. Além disso, é uma ferramenta útil para o estudo da imunidade viral e epidemiologia.

A produção de MAb para NoV permite o desenvolvimento de kits diagnósticos baseados em ELISA. No mercado mundial, existem alguns kits diagnósticos para NoV, entretanto, no Brasil ainda não há disponibilidade de kit diagnóstico sorológico

produzido nacionalmente e a distribuição de kits para NoV ainda não é realizado de forma rotineira na rede pública. Portanto, MAb que reagem em amplo e restrito espectro de genótipos de NoV, são de alta demanda na rede pública.

II. JUSTIFICATIVAS

Os NoV representam a maior causa de gastroenterite humana de origem viral no mundo. Atualmente a maior dificuldade enfrentada para a detecção de NoV tem sido a alta variabilidade gênica destes vírus, decorrentes de frequentes ocorrências de recombinações e mutações pontuais. Desta forma, o desenvolvimento de uma técnica imunológica de detecção de NoV GI e GII exige ensaios diagnósticos para a identificação da amplitude da especificidade, de ampla ou restrita para distintos genogrupos e genótipos (HARDY *et al.*, 1996).

Para este propósito, alguns anticorpos têm sido desenvolvidos para detecção e identificação dos NoV por ELISA. Contudo os kits diagnósticos disponíveis como o RIDASCREEN® Norovirus ELISA (R-biopharm), o IDEA™ NoV ELISA (Dako) e o SRSV (II)-AD (Denka) não permitem a detecção ampla de distintos genogrupos e genótipos, o que compromete a sua eficiência (KIRBY *et al.*, 2010). Atualmente, dois tipos de kits diagnósticos são demandados para o diagnóstico dos NoV, um de amplo espectro entre genótipos ou entre genogrupos do NoV (*wide-range*) e outro mais específico para GII.4 (*short range*). Entretanto, no Brasil, não há produção nacional de kit imunológico, assim como não há distribuição de kits importados para a rede pública.

Pela estrutura da VP1, esta proteína pode ser dividida em três regiões, o domínio *protruding* (P), o domínio *Shell* (S) e o braço amino-terminal (NTA) (Fig. 2). O domínio P está subdividido em duas regiões, P1 e P2. Os MAb que reconhecem NoV de amplo espectro podem reconhecer a região mais conservada da VP1 como o domínio S e mais específico como o subdomínio P2. Nesse trabalho foram produzidos MAb para NoV GII.4 e realizado o estudo de região da VP1 que estes MAb reconhecem para o estudo preliminar de mapeamento de epítomos. O avanço na compreensão da interação anticorpo-antígeno da VP1 do NoV fornecerá ferramentas importantes não somente para o estudo básico de Virologia, mas também para o desenho de drogas antivirais, o desenvolvimento de vacinas, kits diagnósticos e elucidação das interações entre o vírus e o sistema imunológico humano

III. OBJETIVOS

3.1 *Objetivos Gerais*

Este trabalho propôs a produção de anticorpos monoclonais (MAb) a partir de *virus-like particles* (VLP) do NoV GII.4 e a avaliação da reatividade (sensibilidade) e espectro dos MAb contra genótipos dos NoV GII.

3.2 *Objetivos Específicos*

- Purificar as VLP por cromatografia de troca iônica.
- Produzir e caracterizar MAb contra os domínios de VP1 do NoV GII.4.
- Avaliar a sensibilidade dos MAb contra as VLP de NoV GII.4 por ELISA.
- Clonar os domínios S, P1 e P2 do gene *vp1* em vetor plasmidial pENTR 2B e subclonar em vetor de expressão em bactéria, pDEST 17.
- Purificar as proteínas recombinantes e analisar por *Western blotting* usando anticorpo contra HisTag.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Preparação das VLP recombinantes em escala média*

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais se inicia com a imunização de camundongo. Devido à inviabilidade da preparação de vírus purificado em quantidade suficiente a partir de fezes de pacientes ou por cultura celular, o sistema de expressão de proteína heteróloga foi utilizado para preparar os antígenos virais. Neste estudo, a construção do bacmídeo recombinante com o gene da VP1-VP2 do NoV GII.4 subtipo 2006b (isolado 4474 do DF) foi cedido pela Dra. Thaís Alves da Costa Lamounier (UnB).

A expressão da VP1 do NoV GII.4 em média escala foi feita de acordo com o protocolo do fabricante do sistema Bac-to-Bac (Invitrogen) utilizando a linhagem celular BTI-Tn5B1-4 da espécie *Trichoplusia ni*. A expressão da VP1 e formação do

VLP recombinante foram monitoradas e confirmadas por *Western blotting* com anticorpo policlonal contra NoV GII.4 (cedido por Dr. Shinichi Kobayashi, *Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagoya, Japão*) e pela observação por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

4.1.1 Clarificação por Cushion 20%

Foram preparadas cinco garrafas *Tissue culture flasks* 75 cm² (TPP®) contendo células da linhagem BTI-Tn5B1-4 da *Trichoplusia ni* em 20 mL de meio TC100 contendo 10% de soro fetal bovino. Estas foram infectadas com 1 mL de estoque viral. Após a incubação por 120 horas, as células infectadas foram ressuspensas no próprio meio de cultura TC100 e centrifugadas em 3000 x g por 15min utilizando centrífuga J2-MI Centrifuge (Beckman).

As VLP de NoV presentes na fase do sobrenadante foram concentrados por ultracentrifugação utilizando colchão de sacarose a 20 % em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 correspondendo a 1/3 do volume. O tubo preparado foi centrifugado no rotor Ti45 Beckman a 14000 rpm (22725 x g) por 1 hora a 4°C. O pellet formado foi ressuspensado em 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e posteriormente submetido a purificação por troca iônica.

4.1.2 Purificação da VLP por troca iônica

A purificação da VLP foi realizada utilizando o cromatógrafo *Akta purifier* (*GE Healthcare*) e a coluna HiTrap Q FF (2mL) (*GE Healthcare*) equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) e em um fluxo de 150 cm/h. As proteínas foram eluídas utilizando uma etapa de gradiente isocrático de 10 %, 20 % e 40 % gerada com tampão de eluição (1 M NaCl, 50 mM fosfato de sódio, pH 7,0). As frações de 1 mL de VLP foram coletadas e estocadas a 4 °C até o uso.

Após a purificação as VLP foram dialisadas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 três vezes por duas horas cada troca em câmara fria (8 °C), a fim de conferir maior estabilidade às partículas.

4.1.3 Visualização por Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Com o objetivo de avaliar a integridade das partículas as VLP foram visualizadas no MET JEM 1011 (JEOL). Para isso foram preparado telinhas de níquel 2,5 mm com a película de Formvar e em seguida foi realizada a contrastação negativa com acetato de uranila (1 %).

4.2 Produção de Anticorpo monoclonal a partir da VLP NoV GII.4

4.2.1 Imunização

As imunizações foram realizadas no Centro de produção de Anticorpos (CEPRACO) na Universidade Federal de Goiás, seguindo as normas do Comitê de Ética de Pesquisa em Animal da UFG nº 286/2011.

Foram imunizados cinco camundongos fêmeas BALB/c intraperitonealmente com 5 µg/100 µl/camundongo de VLP NoV GII.4, diluído em PBS 1X, nos dias 1, 2, 4, 16, 18. Cada imunização foi acompanhada de 3 µl (180 µg) do adjuvante hidróxido de alumínio (EMS) em 100 µl de antígeno com exceção da última imunização (*booster*). No dia 21, quatro dias antes do procedimento de fusão, foi realizado o *booster* pré-fusão inoculando somente o antígeno diluído em PBS 1X.

4.2.2 ELISA

Para avaliar o título de anticorpos dos camundongos imunizados contra NoV, foi realizado um ELISA indireto. As placas foram sensibilizadas com 50 µl/ poço de VLP NoV GII.4 (1 µg/mL) em PBS 1X e incubadas a temperatura ambiente durante 4 horas. Em seguida foram bloqueadas com 100 µl de PBS 1x - Tween 20 (0,05 %) contendo 5 % de leite desnatado *overnight* a 4 °C. Após o bloqueio as placas foram lavadas três vezes com 200 µL de PBS 1x - Tween 20 (0,05 %). A placa de ELISA foi incubada com 50 µl do anti-soro ou sobrenadantes dos hibridomas a serem testados por 1 hora a 37 °C. Uma nova incubação foi realizada adicionando 50 µl do anti-camundongo IgG (1/10000) (Invitrogen) conjugado com peroxidase durante 1 hora à 37 °C e a revelação foi realizada por colorimetria por meio da adição do substrato da peroxidase, OPD (Sigma-Aldrich).

Todo o ensaio foi realizado em duplicata e os anticorpos foram diluídos em PBS - Tween 20 (0,05%) contendo 0,5% de leite desnatado. As placas foram lavadas por três vezes entre cada etapa de incubação com PBS - Tween 20 (0,05%). Para determinar a reatividade, foi considerado como positivo as D.O. (Densidade Óptica) que estavam acima do *cut off* da reação o qual foi calculado com base na média da densidade óptica do controle negativo somado duas vezes o desvio padrão. O anticorpo IgG de camundongo foi utilizado para sensibilização como controle positivo (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µg/mL.

4.2.3 Preparação das células de Mielomas (SP2)

Foram utilizadas células de mieloma da mesma linhagem do camundongo imunizado (BALB/c). As células de mieloma da linhagem SP₂/0 (2×10^6 céls./mL) foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37 °C, para evitar danos pelo componente crioprotetor do meio, DMSO (Merk Chemicals).

Em ambiente estéril, as células foram transferidas para um tubo de centrífuga e foram adicionados lentamente 10 mL de meio DMEM (Invitrogen) completo contendo 20 % de SFB (Invitrogen) em seguida foi centrifugado por 10 min a 1500 rpm em 25 °C. O sobrenadante foi então desprezado e as células foram ressuspensas em meio DMEM completo.

A cultura foi transferida para garrafas de 25 cm² em atmosfera de 5 % de CO₂ e 95% de umidade relativa a 37 °C e em seguida foi acompanhado a estabilização e o crescimento celular. Posteriormente foi adicionado 8-azaguanina (1%) (Sigma-Aldrich), o qual selecionará as células que são hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase negativas (HGPRT).

4.2.4 Obtenção e Preparação das Células Esplênicas

O camundongo imunizado que atingiu os títulos de anticorpos mais elevados para o antígeno, de acordo com o ELISA, foi sacrificado por deslocamento cervical e o baço foi transferido em condições estéreis para uma placa de Petri contendo 5 mL de meio RPMI (Sigma-Aldrich) com 15 % de SFB (Invitrogen). O órgão foi macerado com o auxílio de um dissociador celular e a suspensão de células esplênicas obtida foi separada e transferida para um tubo de centrífuga. Foi retirada uma alíquota (50 µl) da suspensão tripan (Vetec) para contagem celular em câmara Neubauer.

4.2.5 Preparo da Camada de Macrófagos Peritoneais (*Feeder-layer*)

O *feeder-layer* foi preparado semeando macrófagos coletados da cavidade peritoneal de camundongos normais, cerca de 50 horas antes do procedimento de fusão. Esta preparação fornece fatores de crescimento e diferenciação de linfócitos B, como a interleucina-6, além disso, confere maior densidade celular e limpeza do meio.

Inicialmente os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e posteriormente mergulhados em solução de álcool a 70 %. Em câmara de fluxo laminar, foi injetado na cavidade peritoneal do animal morto 7 mL de meio HAT contendo 10 % de SFB e realizada massagem no abdômen. O líquido contendo as células peritoneais foi aspirado com o auxílio de uma seringa e transferido para tubos estéreis mantidos em banho de gelo. Uma alíquota dessa suspensão foi retirada e diluída em azul de *tripan* (Vetec) a fim de determinar a concentração e viabilidade celular.

Após a contagem as células foram distribuídas em placas estéreis de 24 cavidades na densidade de 8×10^4 células/500 μ L/poço e para as placas de 96 cavidades a concentração foi de 2×10^5 células/100 μ L/poço. As placas foram mantidas em incubadora de CO₂ durante 48 horas, a 37 °C.

As placas de 96 cavidades foram preparadas para o procedimento de clonagem dos hibridomas.

4.2.6 Fusão celular

Em um tubo estéril foi adicionado 10 mL da suspensão de células esplênicas contendo $1,21 \times 10^8$ células e 12,5 mL da suspensão de células de mieloma na concentração de 2×10^7 , com a viabilidade de 91 % e 85 % respectivamente. O volume foi completado para 50 mL com meio RPMI sem soro e o tubo centrifugado a 1500 rpm por 15 min. O sobrenadante então foi descartado e o sedimento celular foi ressuspendido com leve batidas. E sobre essa massa de células foi depositado 1 mL de uma solução de PEG a 50 % em salina 0,15 M e 10 % de DMSO. Esta solução foi adicionado lentamente às células gota a gota sob agitação, em um intervalo de 1 min e em seguida foi incubado em banho-maria a 37 °C durante 90 seg, sob agitação constante.

Em câmara de fluxo laminar foi acrescentado lentamente ao volume da suspensão celular 20 mL de meio RPMI da seguinte maneira: 1 mL em 30 seg; em seguida 3 mL em 30 seg e o restante da solução (16 mL) foi adicionado em 60 seg e o volume total da suspensão foi completado para 50 mL com meio RPMI. Após 5 min. em repouso a suspensão foi centrifugada a 150 rpm por 15min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular ressuspenso em 50 mL de meio RPMI contendo 10 % de SFB e novamente centrifugado como descrito anteriormente.

O sedimento final foi ressuspenso em meio HAT contendo 15 % de SFB e as células foram distribuídas na densidade de 10^5 /poço em quatro placas de 24 cavidades contendo *feeder-layer* de macrófagos peritoneais. O volume foi completado para 500 μ L por poço com meio HAT contendo 15 % de SFB. Posteriormente as placas foram mantidas a 37 °C em estufa de CO₂ durante 15 dias sob acompanhamento periódico.

4.2.7 Seleção dos Hibridomas

Cerca de 10 dias após o procedimento de fusão foram testados o sobrenadante de cada cavidade (como descrito na etapa 4.2.2) que apresentou crescimento de clones e dessa forma foram determinadas as culturas secretoras de anticorpos.

4.2.8 Clonagem dos Hibridomas

Antes da etapa de clonagem, foram selecionadas as culturas identificadas secretoras de anticorpos para expansão em garrafas de cultura celular de 25 cm². Em seguida foi realizada a clonagem por diluição limitante, um procedimento que consiste em preparar uma suspensão celular contendo 100 células e semear volumes idênticos dessa suspensão em placa contendo 96 poços com a finalidade de obter 1 célula por poço. Desta forma foi realizada uma diluição 1/20 em meio HAT e então a partir desta diluição foi retirado 100 μ L e acrescentado mais 100 μ L de azul de *trypan* para a realização da contagem de células em Câmara de Neubauer. Após a determinação da concentração celular foram plaqueados 100 μ L em placa de 96 poços contendo *feeder layer*. As placas foram então mantidas em incubadora de CO₂ por um período de 10 dias e o crescimento de um único clone foi monitorado por meio do microscópio invertido (Leica).

Os MAb 2B1, 2B1D7 e 2B1G3 foram purificados a partir do meio de cultura (sobrenadante) por cromatografia de afinidade e concentrados utilizando o filtro AMICOM (Merck Millipore).

4.2.9 ELISA dos MAb selecionados com a VLP.

A reatividade dos MAb purificados foi avaliada em duas diluições: 1/500 e 1/1000 contra VLP de dois lotes diferentes. O ensaio foi realizado por ELISA como descrito no item 4.2.2.

4.3 Clonagem dos domínios da VP1

4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase

Foram amplificados por PCR os genes dos domínios: S e dos subdomínios P1 e P2 da VP1 do NoV GII.4 subtipo 2006b (Fig. 6), utilizando *primers* que flanqueiam cada região gênica específica (Tabela 6), os quais foram inseridos uma cauda de oligonucleotídeos que codifica o peptídeo hexa-histidina com o objetivo de facilitar a recuperação da proteína no processo de purificação.

As reações de S e P2 possuíam 1 µl de cDNA (1 ng), 5 µl de tampão LongAmp (5X), 1 µl LongAmp Taq DNA polimerase que consiste em uma mistura de Taq DNA polimerase e Pfx DNA polimerase (NEB), 3 µl de dNTPs (2,5 mM), 1 µl de *primer* S-For BamHI (10 µM) e S-Rev XhoI (10 µM) ou *primer* P2-For BamHI (10 µM) e P2-Rev Xho I (10 µM) (Tabela 6) em uma reação total de 25 µl. A região que codifica o domínio P1 está dividida em duas partes no genoma do NoV, separado pela região que codifica o subdomínio P2 no meio (Figura 6). Para viabilizar a clonagem da região que codifica o domínio P1, cada parte foi amplificada separadamente como P1-1 e P1-2. A reação destes subdomínios continha 1 µl de *primers* P1-1 for (10 µM) e P1-1 rev (10 µM) ou 1,25 µl de *primers* P1-2 For (10 µM) e P1-2 Rev (10 µM) para uma reação total de 25 µl.

Em seguida os subdomínios de P1 foram fusionados por *Overlap-extension* PCR. A reação de fusão de fragmentos de P1-1 e P1-2 foi realizada utilizando LongAmp Taq DNA polimerase (NEB). A reação de fusão foi realizada em duas etapas, na primeira etapa de fusão de dois fragmentos sem adicionar *primers*, esta etapa exige uma temperatura de anelamento mais baixa. E na segunda da amplificação dos fragmentos utilizando *primers* das extremidades. Reação (1): 5 µL de tampão LongAmp

(5 X), 100 ng de fragmento P1-1, 100 ng de fragmento P1-2, 3 µl de dNTPs (2,5 mM) e 0,5 µl de LongAmp Taq DNA polimerase (NEB) para uma reação total de 25 µl. Reação (2): 4,5 µl de tampão LongAmp (5 X), 1 µl de *primer* P1-1 For (10 µM), 1 µl de *primer* P1-2 Rev, 3 µl de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µl de LongAmp Taq DNA polimerase (NEB), 5 µl de DNA fusionada da reação 1. As ampliações foram realizadas no termociclador MyCycle (BioRad) como descrito na tabela 2, 3, 4 e 5.

```

1   MALEPVVGAATAAPVAGQQNVIDPWIRNNFVQAPGGEFTVSPRNAPGEIL 50
51  WSAPLGPDLNPLYLSHLARMYNGYAGGFVQVILAGNAFTAGKIIFAAVPP 100
101 NFPTEGLSPSQVTMEFPHIIVDVRQLEPVLIPLPDVRNNFYHYNQSNDSIT 150
151 KLIAMLYTPLRANNAGEDVFTVSCRVLTRPSPDFDFIFLVPPPTVESRTKP 200
201 FTVPIILTVEEMTNSRFPPIPLEKLEFTGPGSFAFVVQPQNGRCTTDGVLLGTT 250
251 QLSPVNICTFRQDVTHIAGSRNYTMNLASLNWNNYDPTEEIPAPLGTPDF 300
301 VGKIQGMLTQTTKGDGSTRGHKATVYTGSAFPTPKLGSVQFSTDTENDFE 350
351 THQNTKFTPVGVIQDGSTTHRNEPQOWVLPYSGRNVHNVHLAPAVAPTF 400
401 PGEQLLEFRSTMPGCSGYPNMDLDCLLPQEWVQHFYQEAAPAQSDVALLR 450
451 FVNPDTGRVLECKLHKSQYVTVVHTGQHDLVIPPNGYFRFDSWVNQFYT 500
501 LAPMEM

```

Figura 6. Sequência de aminoácido do capsídeo de Norovírus GII.4. Domínio S (1 a 190) está marcado em amarelo, P1-1(191 a 248) e P1-2 (392 a 506) em rosa e a região do subdomínio P2 em verde (separando os subdomínios de P1).

Tabela 2: Programa de PCR para amplificar o domínio S e P2 do CP de NoV GII.4

	Temperatura	Tempo
<i>Hot start</i>	80°C	1 min
Pré-desnaturação	94°C	2 min
30 ciclos	94°C	30 seg
	55°C	45 seg
	65°C	1 min
Pós- extensão	65°C	10 min
Armazenamento	12°C	∞

Tabela 3: Programa para amplificar o domínio P1-1 e P1-2 da VP1 de Norovírus GII.4.

	Temperatura	Tempo
<i>Hot start</i>	80°C	1 min
Pré-desnaturação	98°C	30seg
30 ciclos	98°C	10 min
	55°C	30 seg
	72°C	20 seg
Pós- extensão	72°C	10 min
Armazenamento	12°C	∞

Tabela 4: Programa utilizado durante a etapa de *overlap-extension PCR* de P1-1 e P1-2.

	Temperatura	Tempo
<i>Hot start</i>	80°C	1 min
Pré-desnaturação	98°C	30seg
30 ciclos	98°C	10 min
	55°C	30 seg
	72°C	20 seg
Pós- extensão	72°C	10 min
Armazenamento	12°C	∞

Tabela 5: Programa utilizado durante a etapa de amplificação da fusão de P1-1 e P1-2.

	Temperatura	Tempo
<i>Hot start</i>	80°C	1 min
Pré-desnaturação	94°C	2 min
30 ciclos	94°C	30 seg
	55°C	45 seg
	65°C	1 min
Pós- extensão	65°C	10 min
Armazenamento	12°C	∞

Tabela 6: Sequências dos *primers* utilizados durante as amplificações dos domínios S, P1 e P2.

NOME DOS PRIMERS	*SEQUÊNCIA
S-For (BamHI)	5'- TAT AAG <u>GAT CCT</u> ATG GCT TTG GAG CCC GTT -3'
S-Rev (XhoI)	5'- ATA TTA <u>CTC GAG TCA</u> <i>GTG ATG GTG ATG GTG ATG</i> CAC CAA AAA TAT AAA ATC AAA ATC AGG GGA -3'
P1-1 For (BamHI)	5'- TAT AAG <u>GAT CCT</u> CCA CCC ACA GTT GAG TCA AG -3'
P1-1 Rev	5'- GGC TAC AGC AGG GGC GCC TAA GAG CAC GCC ATC A -3'
P1-2 For	5'- TGA TGG CGT GCT CTT AGG CGC CCC TGC TGT AGC CCC -3'
P1-2 Rev (XhoI)	5'- ATA TTA <u>CTC GAG TCA</u> <i>GTG ATG GTG ATG GTG ATG</i> CAT GGG GGC AAG TGT GTA GAA T -3'
P2 For (BamHI)	5'- TAT AAG <u>GAT CCT</u> ACC ACC CAA CTG TCT CCT -3'
P2 Rev (XhoI)	5'- ATA TTA <u>CTC GAG TCA</u> <i>GTG ATG GTG ATG GTG ATG</i> TAG GTG TAC ATT GTG AAC ATT TCT AC -3'

*Sequência sublinhada=sítios de clonagem BamHI ou XhoI. Sequência em negrito=códon de terminação e sequências em itálico = His-Tag. Primers P1-1 Rev e P1-2 For são quase-complementares para fundir por *Overlap extension* PCR.

O DNA dos produtos amplificados foram aplicados em eletroforese de gel de agarose 1 % em TBE 0,5 X e corados com brometo de etídio (10 µg/mL) durante 10 minutos e posteriormente analisadas em luz UV. As corridas foram realizadas na cuba modelo Mupid®-2 plus (Mupid) e o *DNA ladder* utilizado foi o Gene Ruler, 1Kb (Fermentas).

4.3.2 Clonagem em pENTR e pDEST 17

Para a recuperação do DNA do gel, os fragmentos submetidos a eletroforese foram corados com violeta cristal (10 µg/mL) e eluídos seguindo o protocolo de purificação *Gel Band Purification* (GE Healthcare). O vetor pENTR 2B (Fig. 7) e os fragmentos purificados foram digeridos com BamHI HF e XhoI (NEB) de acordo com orientações do fabricante e a digestão foi confirmada por eletroforese. As ligações dos genes dos domínios em pENTR 2B foram realizadas utilizando 80 ng de vetor, 57 ng do domínio S, 51 ng do P1 e 43 ng do P2 na presença de 1 µl T4 DNA ligase, 1 µl de tampão da T4 DNA ligase 10 X para uma reação total de 10 µl em 8 °C *overnight*

As construções em pENTR 2B foram transferidas em *Escherichia coli* da linhagem DH5α por eletroporação sob 25 µF de capacitância, 200 Ω de resistência, 2,5 KV no eletroporador *Bio Rad Gene Pulser* (BioRad). Em seguida foi adicionado 1 mL de meio SOC (SAMBROOK & RUSSEL, 2011) em temperatura ambiente. As culturas de células foram então incubadas por 1 hora a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm. Após esse período foram plaqueados 100 µl de células eletroporadas em meio LB-ágar contendo canamicina (50 µg/mL). As placas contendo os transformantes foram incubadas a 37 °C por 16 horas e posteriormente os clones selecionados foram submetidos a extração do DNA plasmidial com o kit *Wizard plus Minipreps DNA purification* (Promega) de acordo com orientações do fabricante.

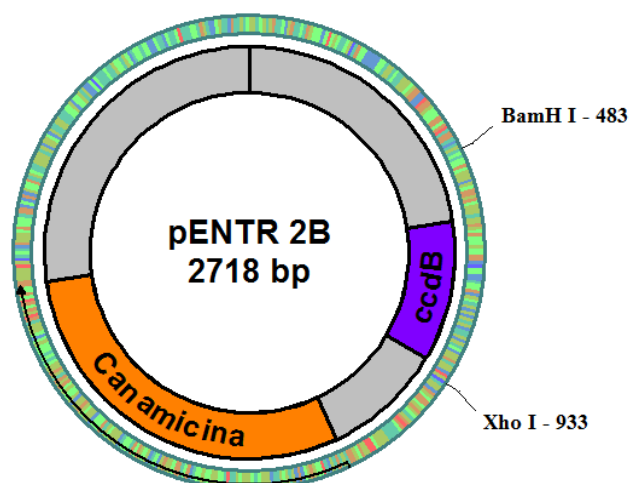


Figura 7: Representação esquemática do vetor pENTR 2B (Invitrogen) salientando os sítios BamHI XhoI e genes de resistência para canamicina (em laranja) utilizados para a clonagem.

A inserção dos genes foram confirmadas através das digestões com as enzimas BamH I HF e XhoI (NEB) e por eletroforese em gel de agarose 1 %.

O sistema de subclonagem escolhido foi o *Gateway Technology* (Invitrogen) com Clonase II que realiza uma reação de recombinação a fim de facilitar a transferência do gene de interesse para o vetor de expressão pDEST 17 (Fig. 8). Esta subclonagem só é possível porque as sequências dos genes alvos são flanqueadas por sítios *att* de recombinação.

A subclonagem subsequente foi realizada em vetor pDEST 17 que permite a introdução dos peptídeos na porção N-terminal e no C-terminal com tag de hexa-histidinas que facilita a detecção e purificação com resina de afinidade Ni-NTA..

A reação de recombinação foi realizada pela mistura de 75 ng de vetor pENTR 2B contendo os genes dos domínios S, P1 e P2 e 75 ng de pDEST 17 na presença de 1 µl de LR Clonase II (Invitrogen) e então foi incubada *overnight* em temperatura ambiente. Para a inativação da LR Clonase foi adicionado no dia seguinte 1 µL de proteinase K para cada reação e incubado por 37 °C por 10 min.

O produto de cada reação foi dialisado durante 20 min e transformado em células DH5α e digerido com BamHI / XhoI como descrito anteriormente. Todas as clonagens foram confirmadas por sequenciamento (Macrogen. Inc., Coréia do Sul).

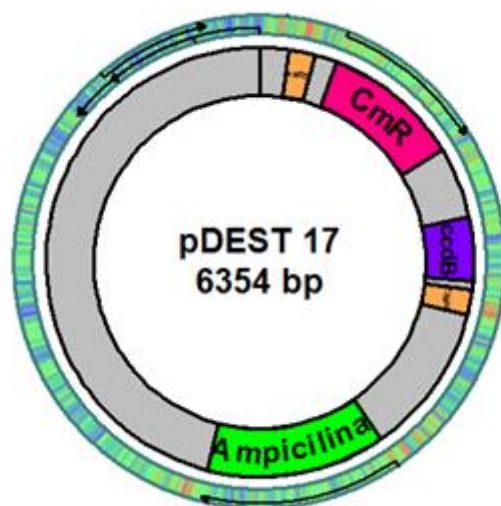


Figura 8. Representação esquemática do vetor pDEST 17 (Invitrogen). O mapa mostra: sítios de attR1 e attR2 (em laranja) que permitem a recombinação do gene de interesse a partir de um clone de entrada e na posição N-terminal e gene de resistência para ampicilina. Em verde gene de resistência para ampicilina, em rosa gene de resistência para clorafenicol e em azul o gene ccdB.

4.3.3 Análise da expressão dos domínios da CP

O pDEST 17 recombinante foi transformado em cepa de *E. coli* BL-21AI. Esta cepa possui no seu genoma inserções do gene que codifica T7 RNA polimerase, sendo assim a T7 RNA polimerase fica sob o controle de um promotor induzível por arabinose. A transformação nesta cepa foi realizada com 2 µl da reação contendo pDEST 17 recombinante (S, P1 e P2).

A indução da expressão da proteína foi feita da seguinte maneira. Foi preparado um pré-inóculo de pDEST 17 contendo os genes alvos e incubado à temperatura de 37 °C com agitação de 200 rpm *overnight*. No dia seguinte 50 µL desse pré-inóculo foi transferido para um novo tubo contendo 5 mL de meio LB e incubado por duas horas à 37 °C até atingir a D.O. próximo de 1,0.

Ao atingir a D.O. desejada, foi separada 1 mL de cada cultura não induzida para controle negativo em microtubos e centrifugado por 3 min a 13.000 x g. O restante de cultura foi induzido pela adição de arabinose na concentração final de 0,2 % e incubado à 37 °C com aeração. No período de duas horas após a indução foi transferido 1 mL para novo microtubos os quais foram centrifugados a 13.000 x g por 1 minuto e estocados no freezer -80°C. O pellet foi ressuscitado em 10 µl de tampão de LaemmLi (LAEMMLI, 1970) e fervido por 3 minutos.

As proteínas obtidas foram aplicadas em SDS-PAGE 10 % (SAMBROOK *et al.*, 2001) utilizando o aparelho Mini-Protean® Cell (BioRad). Um dos géis foi corado e fixado com solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e *Comassie 20 blue* 0,1 % por cerca de 2 horas e descorado com solução de 40 % metanol e 10 % de ácido acético, durante 2 horas, sob leve agitação. O outro gel foi utilizado para transferência das proteínas em membrana de nitrocelulose Hybond-C (GE Lifesciences), para detecção das proteínas virais por *Western blotting*.

As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para a membrana de nitrocelulose com o auxílio de um *Transblotter* (BioRad) nas condições: 15 V, 150 mA por 30 min. Após a verificação da confirmação da transferência pelo marcador pré-corado PageRuler (Thermo Scientific), a membrana então foi bloqueada com a solução de PBS 1 X e 5 % de leite em pó desnatado por 1 hora sob agitação.

Após a lavagem, a membrana foi novamente incubada por 2 horas com PBS 1 X contendo antisoro policlonal contra NoV GII.4 feito em coelho (1:3000) (gentilmente cedido por Dr. Shinich Kobayashi, Aichi Prefectural Institute of Public Health). A

membrana foi incubada com um novo tampão de PBS contendo o anticorpo secundário (anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina) na diluição de 1:3000.

Essa incubação foi realizada sob agitação por 2 horas em temperatura ambiente. A revelação foi feita em 10 mL de tampão alcalino (100 mM de tris e NaCl, 5 mM de MgCl₂ pH 9,5) e os substratos da fosfatase alcalina: 50 µl de Nitroblue Tetrazolium (NBT) (10 mg/mL) e 30 µl de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato (BCIP) (10 mg/mL) foram adicionados. A revelação foi realizada em ambiente escuro. Entre cada etapa foi realizado a lavagem em PBS 1 X Tween 0,1 % três vezes.

4.3.4 Purificação das proteínas dos domínios S, P1 e P2

Proteínas eucarióticas expressas em sistemas procarióticos, frequentemente são agregadas em corpos de inclusões em *E. coli*, portanto, se tornam insolúveis. Entretanto a proteína insolúvel não é adequada para purificação com coluna de afinidade. Por esta razão a solubilidade da proteína deve ser conhecida antes da purificação de proteínas por afinidade com partícula seguindo orientações do fabricante (MagneHisTM, Promega).

Para testar a solubilidade, o *pellet* da bactéria contendo a proteína expressa foi lisada com tampão de lise, *FastBreak Cell Lysis* (Promega), e esta solução foi incubada durante 1 hora sob agitação. Concluído esta etapa foi centrifugado a velocidade 16.000 x g por 12 min à 4 °C, e o sobrenadante formado foi transferido para novo tubo, que corresponde a fração solúvel, e o *pellet* foi ressuscitado com tampão de *LaemmLi*, o qual representa a fração insolúvel e aplicada no PAGE como descrito anteriormente. A purificação em condições desnaturantes foi realizada de acordo com as orientações do fabricante (MagneHisTM, Promega).

V. RESULTADOS

5.1 Preparação da VLP recombinante

O perfil cromatográfico demonstrou a presença de três picos que possivelmente poderiam ser VLP de NoV os quais correspondiam as frações 9, 10, 14, 15 e 19 (Fig. 9)

A pureza e as propriedades antigênicas das frações colhidas foram avaliadas por SDS-PAGE e *Western blotting*. Primeiramente as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE) e revelado com nitrato de prata.

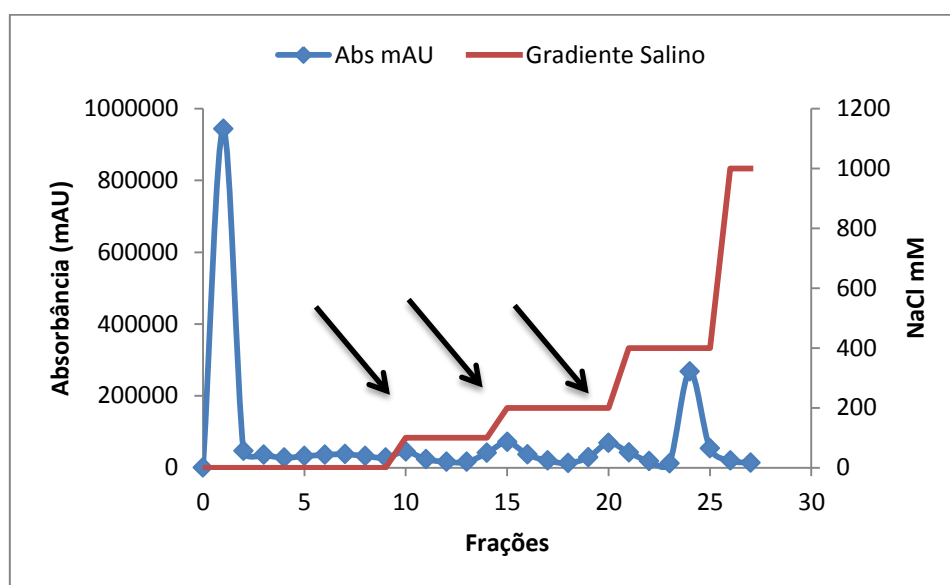


Figura 9: Perfil cromatográfico. As proteínas foram diluídas em tampão de corrida (50mM fosfato de sódio, pH 7,0) e carregado na coluna de troca iônica HiTrap Q FF. As proteínas ligada a coluna foi eluída por uma etapa de gradiente usando 1M de NaCl mM (pH7.0) como tampão de eluição. A eluição das proteínas está indicada por uma seta.

A análise por *Western blotting* confirmou que a VP1 poderia ser reconhecida e detectada, de amostras purificadas, utilizando anticorpo policlonal específico contra NoV GII.4 (Fig. 10B). Todas as amostras coletadas possuíam tripla banda proteica com peso molecular aproximado de 58, 65 e 68 kDa e foi revelado consistir na proteína VP1 de NoV. Como demonstrado na Fig. 10, a proteína foi eficientemente purificada. A melhor pureza e quantidade foi obtida na fração 10 (50 mM Na_2HPO_4 . 100 mM NaCl) (Fig. 9 e 10A).

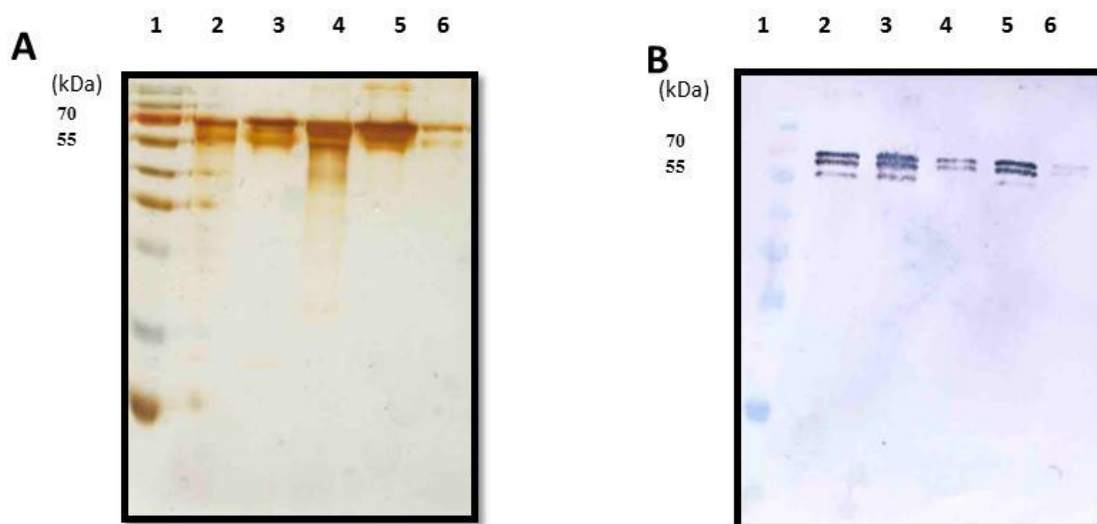


Figura 10: Amostras coletadas durante a purificação e analisadas por SDS-PAGE e *Western Blotting*. Em (A): SDS-PAGE corado com nitrato de prata e em (B): *Western Blotting* realizado utilizando anticorpo policlonal contra a VP1 de NoV GII.4. Na linha 1 *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas), linha 2-6 corresponde a frações de proteínas coletadas dos picos 9, 10, 14, 15 e 19 respectivamente da cromatografia de troca iônica.

5.1.1 Visualização por Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A confirmação da formação de VLP foi realizada na fração 10 e foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 11). As VLP possuíam tamanho aproximado de 40nm. Esta análise revelou que as características estruturais das amostras purificadas bem como a integridade morfológica não foram afetadas pela purificação.

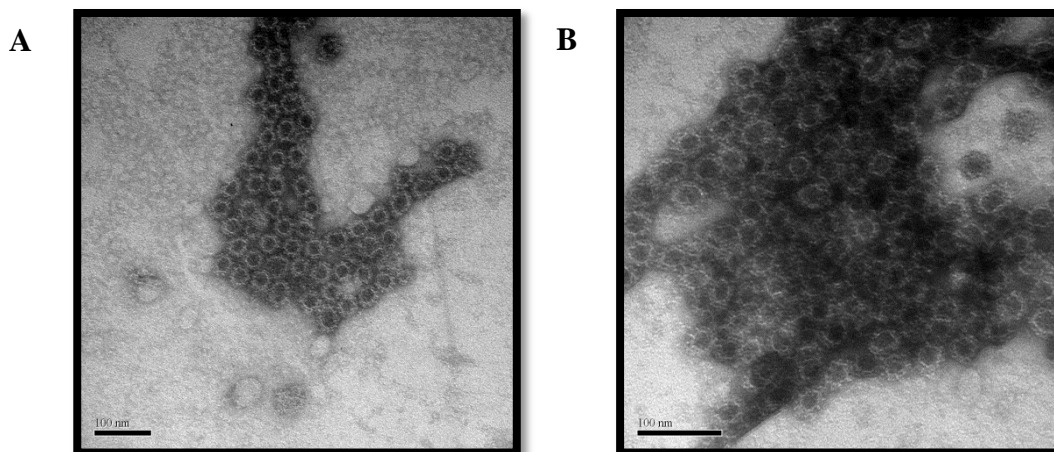


Figura 11: Micrografia eletrônica de transmissão da VLP de NoV após o processo de purificação por cromatografia de troca iônica. Barra = 100nm.

5.2 Produção de Anticorpo monoclonal a partir da VLP NoV GII.4

5.2.1 Imunização dos Camundongos

A partir da quantificação da VLP foi realizado o esquema de imunização via intraperitoneal, o que resultou em excelente resposta humoral. A tabela 7 mostra os resultados do teste imunoenzimático do antisoro diluído 1:500 o qual reagiu com 1 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno (VLP) purificado, o *cut off* dessa reação foi de D.O = 0,829. Desta forma estes anticorpos policlonais contra NoV GII.4 foram utilizados como controle positivo para a seleção de anticorpos monoclonais.

Tabela 7: Testes imunoenzimáticos (ELISA) de soro de camundongos imunizado utilizando 1 $\mu\text{g/mL}$ de VLP purificada, após 30 dias a primeira imunização.

Diluição do Soro	D.O 402nm
1/50	1.927
1/100	2.038
1/500	2.063

5.2.2 Seleção dos Híbridomas

Foram realizadas observações periódicas do crescimento celular dos híbridomas em quatro placas de 24 poços e após 10 dias de fusão observou-se o crescimento das primeiras colônias híbridas (Fig. 12). De 96, somente em 37 poços houve crescimento celular apresentando portanto um rendimento de 26%.

A nomenclatura empregada para os clones “mãe” é representada de forma que o primeiro número corresponde ao número da placa de origem, as letras representam as linhas e o último número da coluna da placa determinada.

O sobrenadante dos híbridomas foram testados para confirmar a secreção de anticorpos específicos contra NoV GII.4 (Tabela 8).

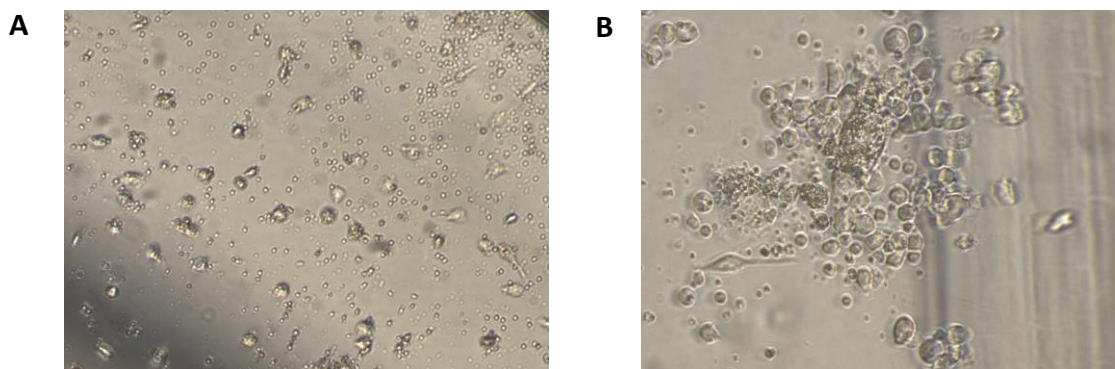


Figura 12: Formação de colônias híbridas após 10 dias de fusão. (A): Não houve a formação de colônia, Magnificação de 10 X. (B): Início da formação de colônia, Magnificação de 40 X.

Tabela 8: Absorbância do ELISA dos hibridomas secretores de anticorpos específicos para NoV GII.4.

Clone “Mãe”	D.O 402nm
1A2*	0,194
1B2*	0,402
1B6	0,194
1C4*	0,340
2A2	0,333
2B1*	0,727
2B2	0,286
2B3*	0,382
2C3	0,171
2C5	0,199
2D3	0,216

*Em azul está demonstrado os hibridomas selecionados quanto ao crescimento e produção de anticorpos específicos contra NoV GII.4. *Cut off*= 0,17.

5.2.3 Clonagem dos hibridomas

A clonagem dos hibridomas selecionados resultou na formação de 23 clones. Os quais possuíam característica de um agregado celular assim como demonstrado na Fig. 13B, o que não é verificado quando ocorre ausência de colônia (Fig. 13A).

A segunda clonagem do hibridoma 2B1 resultou em novos clones secretores de anticorpos específicos (2B1C7, 2B1D3, 2B1E11) (Tabela 9).

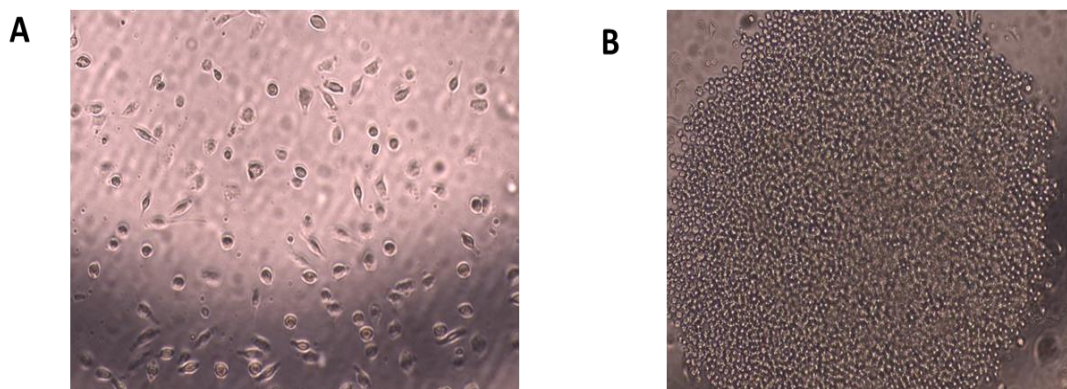


Figura 13: Clonagem dos hibridomas.(A): Demonstrando ausência de clone. (B): Formação de um clone.

Tabela 9: Densidade óptica por ELISA dos clones resultantes da reclonagem de 2B1

Clone “Mae”	D.O 402nm
2B1D7	0,609
2B1F7	0,562
2B1G3	0,703
2B1G7	0,652
2B1D3*	0,402
2B1C7*	0,360
2B1E11*	0,493

*Em azul clones obtidos na segunda clonagem. *Cut off*= 0,15.

5.2.4 Monitoramento dos Clones

A estabilidade dos clones selecionados foi monitorada durante seis meses por meio da coleta periódica dos sobrenadantes (meio). Os clones selecionados mostraram boa estabilidade quanto à produção de anticorpos específicos durante seis meses como demonstrado por ELISA (Tabela 10).

Tabela10: Monitoramento da estabilidade através da densidade óptica durante seis meses.

Clone	Maio*¹	Junho*²	Julho*³	Agosto*⁴	Setembro*⁵	Outubro*⁶
	DO	DO	DO	DO	DO	
2B1	0,590	0,374	0,720	0,370	0,390	0,310
2B1E11	-----	-----	-----	0,490	0,370	0,350
2B1C7	-----	-----	-----	0,360	0,380	0,410
2B1D7	0,609	0,299	0,870	0,510	0,420	0,350
2B1G3	0,703	0,388	0,910	0,500	0,370	0,340

*1: *Cut off* = 0,174, *2 = *Cut off* 0,120, *3: *Cut off* =0,270; *4: *Cut off*= 0,17, *5: *Cut off* =0,16, *6: *Cut off*= 0,21.

5.2.5 ELISA dos MAb selecionados com a VLP

A reatividade dos MAb 2B1, 2B1D7 e 2B1G3 testada por ELISA demonstrou melhor reatividade com a VLP do lote mais antigo do que com o lote mais recente na diluição de 1/1000 como demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11: Comparação da reatividade dos MAb entre VLP de lote antigo e mais recente.

Clone	VLP (Lote recente)	VLP (Lote antigo)
	D.O.	D.O.
2B1(1/500)	0.090	0,161
2B1 (1/1000)	0,071	0.135
2B1D7 (1/500)	0,101	0,356
2B1D7(1/1000)	0,146	0,322
2B1G3 (1/500)	0,119	0,378
2B1G3 (1/1000)	0,149	0,565

Cut off: 0,19

5.3. Clonagem dos domínios da VP1

5.3.1 Amplificação dos genes dos domínios da VP1 por PCR

Os domínios foram amplificados separadamente a partir da VP1 do NoV GII.4 com os *primers* (descritos na etapa 4.3.1). Os fragmentos de cDNA foram obtidos com o tamanho esperado para cada região. A amplificação do domínio S resultou em um fragmento de 570 pb, do subdomínio P2 de 431 pb. O domínio P1-1 e P1-2 foram amplificados separadamente e resultou em fragmentos de tamanho de 175 e 335 pb respectivamente, como exemplificado abaixo na Fig. 14.

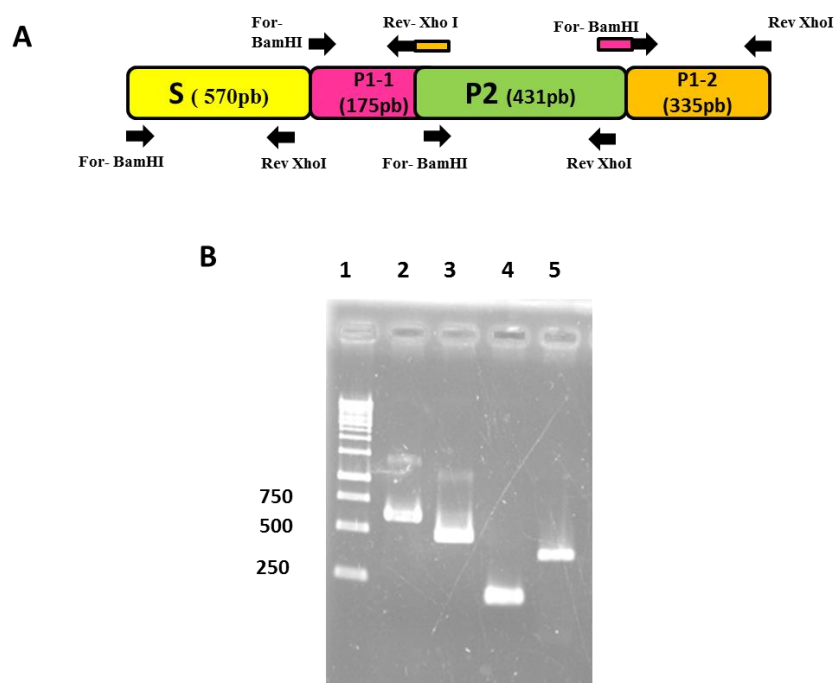


Figura 14: Amplificação dos domínios S, P1 e P2. (A): Representação esquemática dos domínios flanqueados pelos *primers* For-BamHI e Rev-XhoI (setas em preto). (B): Gel de agarose 2%: poço 1: Marcador *Gene Ruler* (Fermentas). Poço 2: Domínio S. Poço 3: Subdomínio P2. Poço 4: Domínio P1-1. Poço 5: Domínio P1-2.

Após a purificação, os fragmentos de PCR P1-1 e P1-2 foram fusionados por *overlap extension* PCR. As sequências de sobreposição introduzidas na extremidade de P1-1 permite o pareamento com a sequência complementar contida em P1-2, que é produto da primeira reação da fusão (Fig. 15B). Isto resultou no aparecimento de um único fragmento de 510 pb, confirmado por eletroforese em gel de agarose 1% (Fig. 15D).

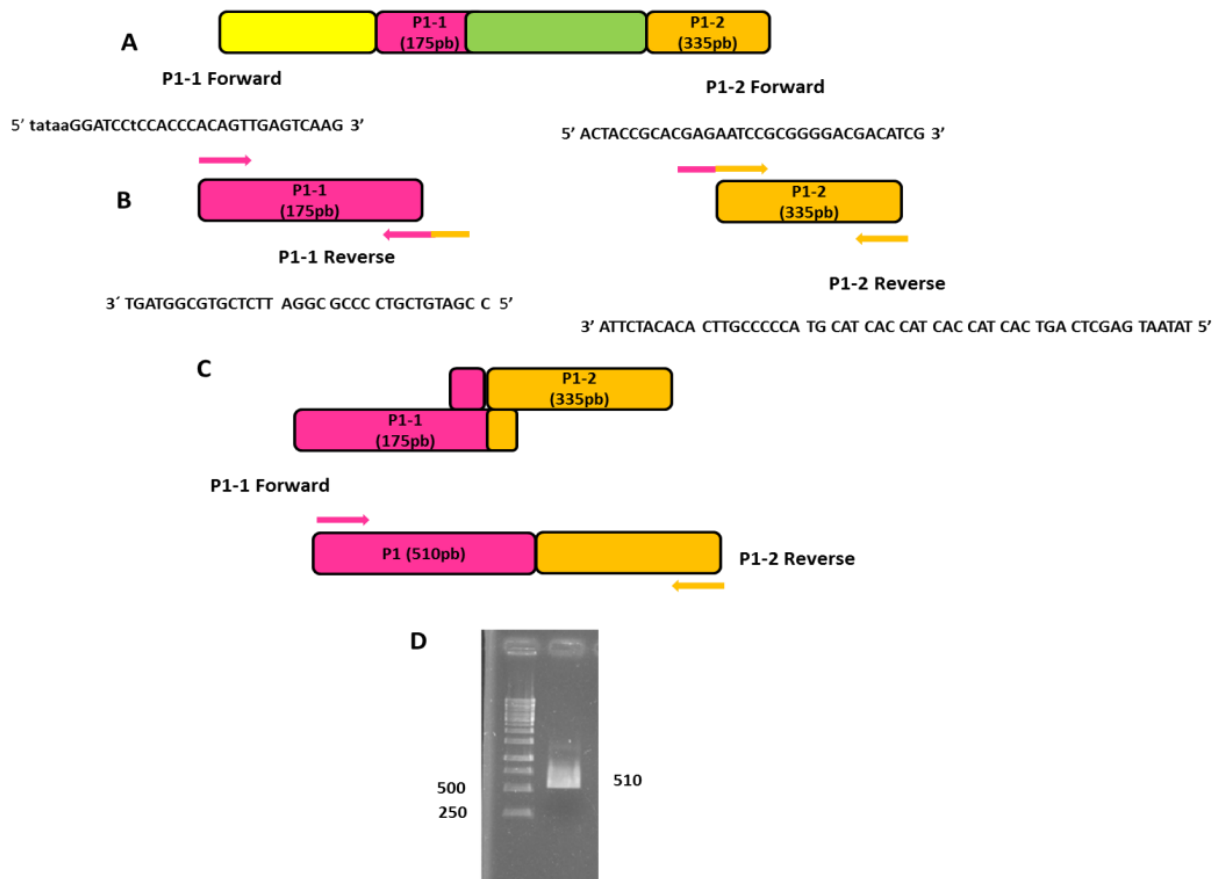


Figura 15: Representação da construção do domínio P1. (A): Localização dos domínios P1-1 e P1-2 na VP1 de NoV GII.4. (B): Demonstração da posição dos *primers* ao longo do gene VP1 (C): Primeira etapa da reação de fusão evidenciando a sobreposição entre P1-1 e P1-2 e consequentemente resultando em único fragmento de P1 que serve de molde para a segunda etapa da reação que permite amplificar o produto da fusão usando os *primers* P1-1 Forward e P1-2 Reverse. (D): Confirmação da fusão por eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a fusão do domínio P1.

5.3.2 Clonagem dos domínios em pENTR 2B e pDEST 17

Os domínios amplificados e purificados foram clonados em pENTR 2B e a sua correta inserção foi confirmada primeiramente por digestão com as enzimas XhoI e BamHI (Fermentas) (Fig. 16). Após a confirmação por sequenciamento da introdução correta dos domínios em pENTR 2B foi conduzida a recombinação para o plasmídeo pDEST 17 (Fig.17).

A confirmação da recombinação esperada dos domínios no vetor foi realizada através da análise dos perfis por eletroforese após a linearização com a enzima XhoI e mostrou um único fragmento para cada domínio de tamanho: (S): 6,9 kb, (P1): 6,8kb (P2): 6,7kb. O sucesso das três clonagens foi confirmado por sequenciamento e

analisadas no programa STADEN Package. A conservação de quadro de leitura também foi confirmado nas três construções.

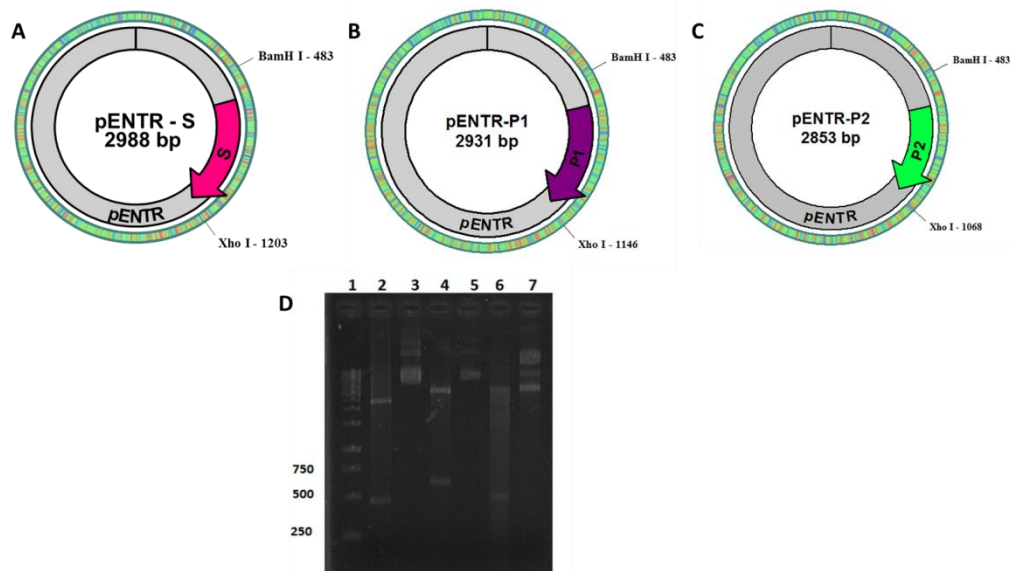


Figura 16: Clonagem dos domínios S,P1 e P2 em pENTR 2B (A): Construção do pENTR e domínio S, (B): Construção do pENTR e domínio P1, (C): Construção do pENTR e subdomínio P2.(D): Eletroforese dos clones dos domínios S, P1 e P2 em pENTR 2B digerido com as enzimas XhoI e BamHI. Poço 1: Marcador *Gene Ruler* (Fermentas). Poço 2: Subdomínio P2 digerido com XhoI/BamHI. Poço 3: Plasmídeo não cortado com o subdomínio P2. Poço 4: Domínio S digerido com XhoI/BamHI. Poço 5: Plasmídeo não cortado com o domínio S. Poço 6: Domínio P1 digerido com XhoI/BamHI. Poço 7: Plasmídeo não cortado com o domínio P1.

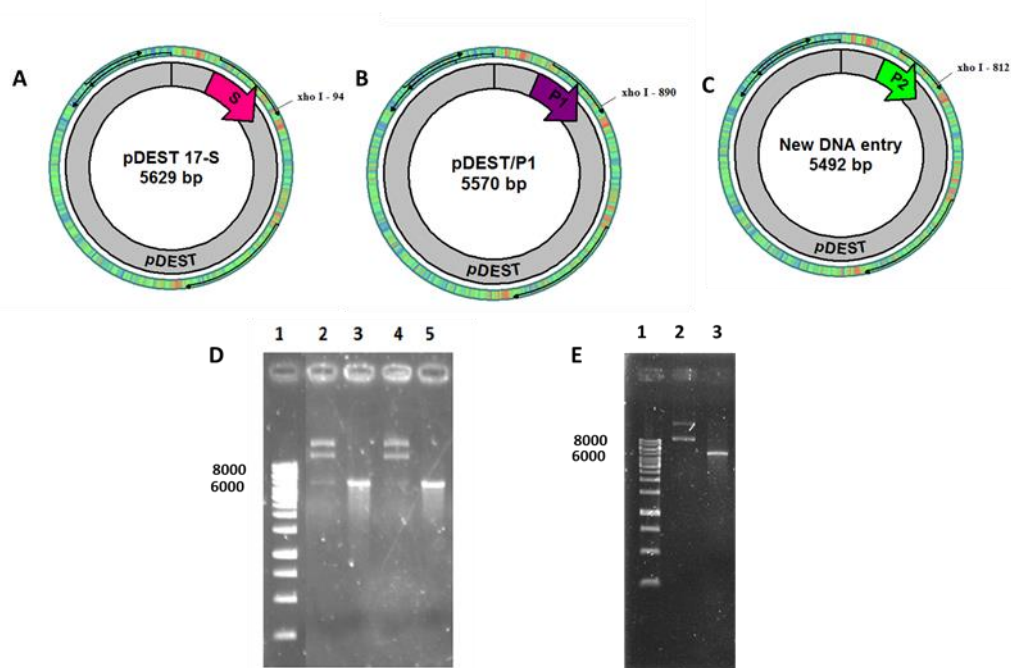


Figura 17: Clonagem dos domínios S, P1 e P2 em pDEST 17 (A): Construção do pDEST 17 e domínio S, (B): Construção do pDEST 17 e domínio P1, (C): Construção do pDEST 17 e subdomínio P2. Eletroforese com clones dos domínios S, P1 e P2 em pDEST 17 digerido com a enzima XhoI. (D) Poço 1: Marcador *Gene Ruler* (Fermentas). Poço 2: Plasmídeo não cortado com o domínio S. Poço 3: Domínio S digerido com XhoI. Poço 4: Plasmídeo não cortado com o domínio P1. Poço 5: Domínio P1 digerido com XhoI. (E): Confirmação da clonagem do subdomínio P2 em pDEST 17 com a enzima XhoI. Poço 1: Marcador *Gene Ruler* (Fermentas). Poço 2: Plasmídeo não cortado com o subdomínio P2. Poço 3: Subdomínio P2 digerido com XhoI.

5.4 Expressão e purificação de proteína dos domínios da VP1 em *Escherichia coli*

As construções pDEST- S/P1/P2 foram utilizadas no ensaio de indução com o indutor L-arabinose. O extrato total, produto das células BL-21AI induzidas foi avaliado após a expressão dos domínios duas horas pós-indução. A análise do SDS-PAGE 12 % revelou a expressão de três fragmentos de aproximadamente 30 kDa compatíveis com os tamanhos das proteínas de S, P1 e P2 respectivamente. A confirmação da expressão de tais proteínas foi realizada por *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-HisTag (Fig. 18).

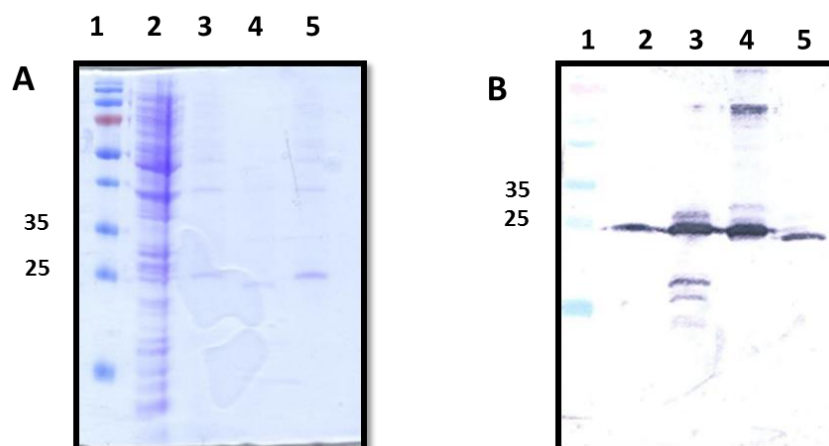


Figura 18: Análise do perfil da expressão das proteínas dos domínios em *E.coli*. (A): SDS-PAGE 12% corado com *comassie blue* após duas horas de indução. Poço 1: Page Ruler (Thermo Scientific). Poço 2: Controle negativo cultura não induzida. Poço 3: Proteína S. Poço 4: Proteína P2. Poço 5: Proteína P1 e (B): *Western Blotting* utilizando anti-HisTag. Poço 1:Page Ruler (Thermo Scientific). Poço 2: controle negativo cultura não-induzida. Poço 3: Proteína S. Poço 4: Proteína P1. Poço 5: Proteína P2.

A confirmação da expressão das proteínas por *Western Blotting* demonstrou a expressão de proteína basal no tempo zero (vazamento: *leaky expression*) de indução utilizado como controle negativo (Poço 2, Fig. 18 B).

Para determinar a metodologia a ser empregada na purificação da proteína expressa, a solubilidade da proteína foi estudada. As proteínas S, P1 e P2 foram preparadas como descrito no item 4.3.4 e as frações solúvel e insolúvel foram aplicadas na eletroforese de gel de PAGE e o *Western blotting* confirmou a insolubilidade das proteínas S, P1e P2. Desta forma os domínios foram eficientemente purificados por condição desnaturante.

5.5 Ensaio de reatividade dos MAb com as proteínas dos domínios

Após a purificação das proteínas dos domínios por MagneHis (Promega) e dos MAb selecionados na seção 5.2.5 foi realizado um novo ensaio a fim de verificar o espectro de reatividade dos MAb com as regiões da VP1 de NoV GII.4. Este ensaio foi realizado por *Western blotting* o qual revelou que dentre os MAb produto da reclonagem e da segunda clonagem, somente o 2B1F7 e 2B1G7 não reconheceram nenhuma das proteínas do domínio (Fig. 19). Os restantes dos MAb reconheceram

especificamente a proteína da região S, a qual tem localização na região mais interna da partícula viral. Interessantemente, o MAb 2B1C7 foi o único que apresentou reatividade contra VLP como dois sinais positivos juntos (Fig. 19, painel 2B1C7, poço 6 indicado com seta), demonstrando dessa forma um anticorpo promissor para futuras análises por ELISA.

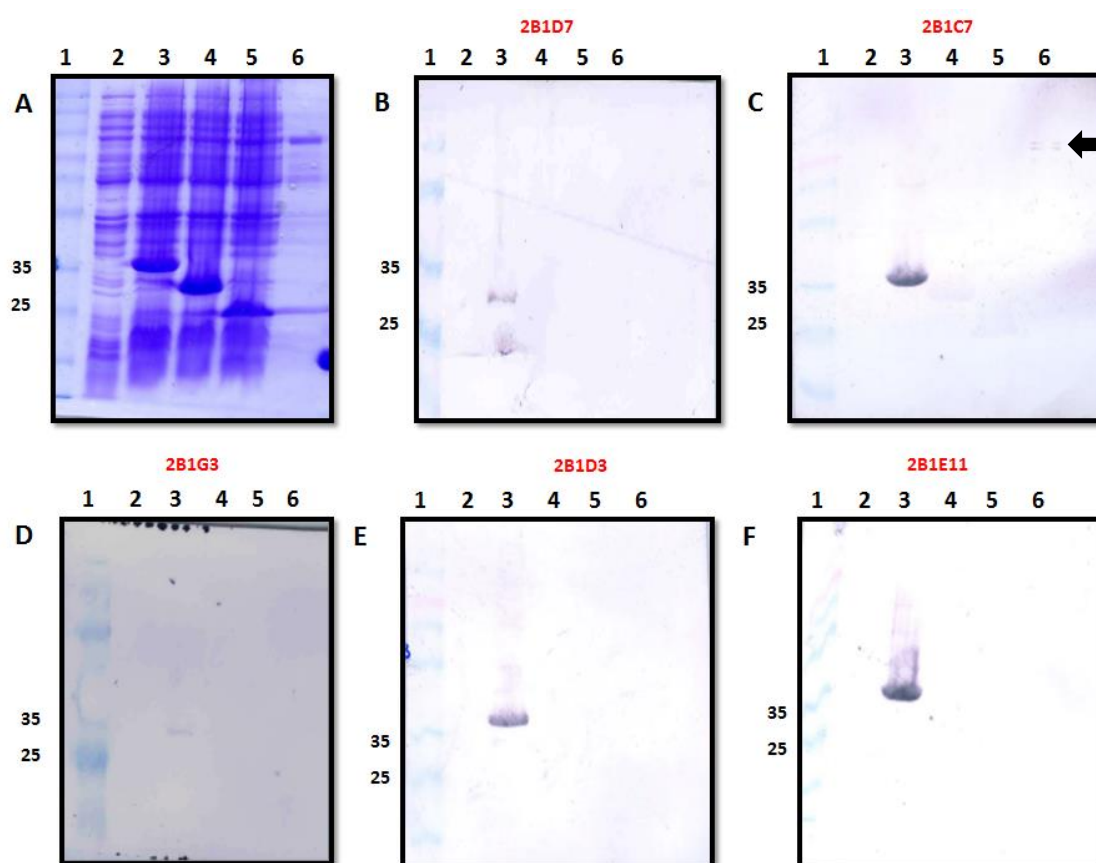


Figura 19: Ensaio de reatividade dos MAb com as proteínas dos domínios da VP1 de NoV GII.4 e VLP. (A): SDS-PAGE 12 % corado com *comassie blue*. Poço 1: Page Ruler (Thermo Scientific). Poço 2: Controle negativo. Poço 3: Proteína expressada do domínio S. Poço 4: Proteína expressada do domínio P1. Poço 5: Proteína expressada do subdomínio P2. Poço 6: VLP purificada (B) *Western blotting* usando MAb 2B1 D7. (C): *Western blotting* usando 2B1C7. (D): *Western blotting* usando 2B1G3. (E): *Western blotting* usando 2B1D3. (F): *Western blotting* usando 2B1E11. Ordem das amostras é a mesma do painel A para painéis B, C, D, E, e F. A seta do painel 2B1C7 indica a reação positiva do MAb contra VLP.

VI. DISCUSSÃO

Nesse trabalho apareceram três bandas específicas de NoV durante a análise de SDS-PAGE e *Western blotting* de VLP de NoV purificada por *Ion Exchange* com peso molecular aproximado de 58, 65 e 68 kDa (Fig. 10). A presença dessas bandas oriundas

de VP1 (capsídeo) não foi verificada em amostras de fezes contendo o vírus nativo (Li *et al.*, 2009). Dois fatores podem ter afetado a integridade da proteína capsidial: o tipo da linhagem celular de inseto e o pH do meio que a VLP está inerte. Estes fatores influenciaram a clivagem artificial do capsídeo VP1, gerando proteínas truncadas na análise por eletroforese (HANSMAN *et al.*, 2012).

De acordo com os resultados alcançados por SOMEYA e colaboradores (2011) a análise por espectrometria de massa revelou que o capsídeo truncado foi gerado por eliminação de três resíduos consecutivos de metionina na posição N-terminal pós-traducionalmente em células de inseto (SOMEYA *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrada que na posição 45 e 44 (N-terminal) possuía os resíduos treonina e alanina respectivamente, indicando dessa forma uma ligação peptídica susceptível a clivagem proteolítica em células de inseto (SOMEYA *et al.*, 2011). Estes resultados sugerem que a presença da tripla banda proteica do capsídeo no *Western blotting* possivelmente é produto da proteólise da proteína capsidial em diferentes sítios em células de inseto.

Neste estudo também foi realizada imunização com a VP1 de NoV GII.4 expresso em baculovírus para produzir um hibridoma secretor de MAb que reconhecia epítomos da VP1. Os MAb foram selecionados com base na reatividade obtida no ELISA indireto utilizando as VLP e no *Western blotting* contra os domínios S, P1 e P2 expressos em *E. coli*. Entretanto, os valores da densidade óptica obtida no ELISA indireto alcançaram valores muito distantes quando comparados com o controle positivo. Uma possível explicação para os resultados observados no ELISA é que o processo de seleção dos MAb foi realizado com VLP que estava desnaturada ou parcialmente degradada. E diante disso, é importante notar que se os MAb foram selecionados com as VLP degradadas, a ligação poderia não ocorrer com as VLP intactas.

A degradação pode ter sido provocada por mudança do pH do meio em que as VLP estavam inertes (ocorreu o erro de manipulação, diluindo VLP em tampão de PBS pH 7,2 para estocagem na geladeira, em vez de usar pH 5,5, antes de selecionar monoclonais). Esta hipótese está em concordância com os resultados obtidos por Ausar e colaboradores (2006) que demonstraram que as VLP desmontam completamente quando suspensas em pH igual ou superior a 8,9 (AUSAR *et al.*, 2006). Tais resultados são congruentes com as condições de pH (ácido) que o vírus nativo é encontrado no trato gastrointestinal. Portanto mudanças nessa faixa de pH são toleráveis visto que os NoV foram programados para superar drásticas mudanças nesse espectro. Em

contrapartida condições alcalinas são incompatíveis com a natureza do vírus (AUSAR *et al.*, 2006).

Durante a caracterização dos MAb por *Western blotting* realizado com as proteínas desnaturadas foi demonstrado que todos os MAb selecionados se ligavam ao epítopo conservado linear (a proteína mostra estrutura mais linear no *Western blotting*) localizado no domínio S (região mais interna da VP1).

Os vírus são conformacionalmente maleáveis e se utilizam dessa característica para proteger seu genoma e assim alcançar seu objetivo de invadir as células do epitélio gastrointestinal. Essas alterações conformacionais naturalmente acontecem *in vivo* em resposta a qualquer alteração drástica de pH. Como consequência aos estímulos ambientais pode ocorrer exposição dos sítios antigênicos conservados (HANSMAN *et al.*, 2012). A seleção de MAb que reconhecem regiões conservadas como os domínios: S e P1, são de grande interesse, pois a existência de epítopos comuns entre as diferentes variantes de NoV é um fator muito importante que precisa ser considerado nos diagnósticos sorológicos.

Parra e colaboradores (2013) foram um dos que documentaram a reatividade cruzada de MAb contra um epítopo linear do domínio S do capsídeo GII.3. O MAb TV20 reagiu com VLP de GI, GII, GIV e GV de NoV, demonstrando possível ferramenta para o diagnóstico e estudo de norovirose. Recentemente também foi desenvolvido o MAb contra o NoV genótipo bovino (GIII), o qual reconhecia resíduos localizados no domínio S. No entanto, este apenas reagiu com NoV GII.3, não apresentando nenhuma reatividade cruzada com outros genótipos (OLIVER *et al.*, 2006). O MAb N2C3 caracterizado por Li e colaboradores em 2010 também foi identificado por possuir reatividade cruzada contra as VLP de alguns genótipos de GI, GII, GIII, e GV, entretanto os genótipos GI.3, GI.9, GI.13, GII.5, GII.6 e GII.14 possuíam mutação que inviabilizava a interação com MAb N2C3.

Nesse estudo foram caracterizados MAb que possuíam reconhecimento ao domínio S. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que MAb podem potencialmente ser utilizados para o desenvolvimento futuro de ferramentas para uso no diagnóstico. Os resultados preliminares alcançados nessa dissertação indicam que devido a uma possível degradação das VLP, foram selecionados MAb que reconheciam epítopos lineares do domínio S, os quais não possuíam uma boa reatividade, o que indica que a preservação da partícula pode ser um fator que implica na seleção de bons MAb.

VII. CONCLUSÃO

Durante o desenvolvimento deste trabalho foi possível selecionar cinco MAb que reconheciam epítomos lineares no domínio S. Porém dentre estes, o MAb 2B1C7 foi o único que apresentou reatividade contra VLP (Fig. 19, painel 2B1C7, poço 6), demonstrando dessa forma um anticorpo promissor para futuras análises por ELISA.

Os MAb: 2B1, 2B1D7 e 2B1G3 não apresentaram boa reatividade quando avaliados por ELISA (Tabela 5.2.5). Estes resultados sugerem uma possível correlação com a instabilidade das VLP. Uma provável degradação da VLP pode ter contribuído para seleção destes anticorpos de baixa reatividade. Possivelmente os MAb reconheceram a partícula degradada e quando foram submetidos a análise com VLP intactas por ensaio imunológico a reatividade foi afetada.

Os resultados preliminares alcançados nessa dissertação indicam que a preservação da integridade da partícula pode resultar em um fator determinante para a seleção de MAb de baixa sensibilidade para o diagnóstico sorológico.

VIII. PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Uma provável estratégia para os próximos ensaios consiste em utilizar durante a seleção dos MAb VLP recombinantes recém preparadas. Com isso espera-se inicialmente avaliar a reatividade destes anticorpos contra a VLP. O próximo passo será analisar o espectro de reatividade dos MAb contra genótipos dos NoV GII.4 em amostras de fezes para verificar a utilidade destes anticorpos no diagnóstico imunológico. Recentemente três versões têm sido desenhadas para detectar genogrupo I e II simultaneamente: o RIDASCREEN[®], o IDEA[™] e o SRSV (II)-AD. E todos os três kits incluem pools de anticorpos monoclonais e policlonais de reatividade cruzada. Devido ao modesto desempenho desses kits comerciais, principalmente a sua baixa sensibilidade, eles não são recomendados para detecção de NoV em amostras clínicas. Para eliminar essa deficiência será realizado na próxima etapa desse trabalho o estudo de epítomos imunogênicos, o qual representa um passo essencial para o desenvolvimento de ferramentas que confirmem a reatividade cruzada entre diferentes genogrupos para detecção de norovírus com elevado grau de sensibilidade e especificidade.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K *et al.* **Imunologia Celular e molecular**. 4º ed Rio de Janeiro: Revinter 2003.

ADAMS, G.P e WEINER, L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature Biotechnology*. V. 23. N°9. p. 1147-1157, 2005.

ALKAN, S.S *et al.* **Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine**. *Nature Reviews Immunology*. V. 04. p.153-156, 2004.

ATMAR, R.L. *et al.* **Norwalk virus shedding after experimental human infection**. *Emerging Infectious Diseases*. V. 14. N°10. p. 1553-1557, 2008.

AUSAR S.F *et al.* **Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles effect of pH and temperature**. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 281. p. 19478–19488, 2006.

BATTEN, C.A *et al.* **Characterization of a cross-reactive linear epitope in human genogroup I and bovine genogroup III norovirus capsid proteins**. *Virology*. V. 356. N°1. p. 179–187, 2006.

BULL, R. A *et al.* **Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis**. *Journal Clinical Microbiology* V. 44 N°2. p. 327-333, 2006.

CHAN, M.C.W *et al.* **Fecal Viral Load Norovirus associated Gastroenteritis**. *Emerging Infectious Diseases*. V. 12, N° 8. p. 1278–1280, 2006.

CDC. **Norovirus: Food handlers**. Acessado em 23/08/2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/norovirus-foodhandlers.htm>.

CHEN, S. Y. AND C. H. CHIU. **Worldwide molecular epidemiology of norovirus infection**. *Paediatrics International Child Health*. V. 32. N°3. p.128-131, 2012.

DEBBINK, K. **Emergence of New Pandemic GII.4 Sydney Norovirus Strain Correlates With Escape From Herd Immunity**. *Journal of Infectious Diseases*. V.208. N° 11. p.1877-1887, 2013.

DONALDSON, E. F *et al.* **Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system.** Nature Reviews Microbiology. V. 08. p.2321-241, 2010.

DUIZER, E *et al.* **Laboratory efforts to cultivate noroviruses.** Journal of General Virology. V. 85. p. 79–87, 2004.

FLINT, S. J *et al.*, **Principles of virology 3rd ed.** Washington, D.C: Asm Press, 2000.

GOODFELOW, I. **Reverse Genetics of RNA Viruses: Applications and Perspectives.** First Edition, 2013.

HALL, A.J. **Noroviruses: The Perfect Human Pathogens?** The Journal of Infectious Diseases.V. 205.N°.11. p. 1639-1641, 2012.

HARDY, M.E *et al.* **Antigenic Mapping of the Recombinant Norwalk Virus Capsid Protein Using Monoclonal Antibodies.** Virology.V.217.N°.112. p.252-261, 1996.

HARLOW E, LANE D. **Antibodies: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

HANSMAN, G. S *et al.* **Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle.** Journal of Virology. V.86. N°. 7. p. 3635–3646, 2012.

KAMATA, K. *et al.* **Expression and antigenicity of virus-like particles of norovirus and their application for detection of norovirus in stool samples.** Journal Medical Virology.V. 76. N°.1. p. 129-136, 2005.

KARTS, S.M. **Pathogenesis of Noroviruses, emerging RNA viruses.** Viruses. V. 2. N°.3. p. 748–781, 2010.

KIRBY, A *et al.* **An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens.** Journal Clinical Virology. V. 49. N°.4. p. 254-7, 2010.

KOHO, T. L *et al.* **Production and characterization of virus-like particles and the P domain protein of GII.4 norovirus.** Journal of Virological Methods. V. 179 N°.1. p. 1-7, 2012.

KÖHLER G; MILSTEIN C. **Continuous culture of fused cel secreting antibody of predefined specificity.** Nature . V.256. p. 495-497, 1975.

KRONEMAN, A *et al.* **Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping.** Archives of Virology. V.158. p. 2059–2068, 2013.

KRONEMAN, A *et al.* **Increase in norovirus activity reported in Europe.** Eurosurveillance. V. 11. N°50. p. E061214- 1, 2006.

LI, X *et al.* **Characterization of a cross-reactive monoclonal antibody against Norovirus genogroups I, II, III and V.** Virus Research. V.151. p. 142-147, 2010.

LI, T.C *et al.* **Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus.** Journal of Virology. V. 79. p.12999–13006, 2005.

LI, X *et al.* **Identification and characterization of a native epitope common to norovirus strains GII/4, GII/7 and GII/8.** Virus Research. V.140. N°. 1. p. 188-193, 2009.

LINDESMITH, L.C. *et al.* **Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations.** PLoS Medicine., V. 5. N°.2, p. 269-290, 2008.

LINDESMITH, L.C. *et al.* **Monoclonal Antibody-Based Antigenic Mapping of Norovirus GII.4-2002.** Journal of Virology., V.86. N°. 2, p.873-883, 2012.

MARSH, M AND HELENIUS, A. **Virus Entry: Open Sesame.** Cell. V. 124. p. 729–740, 2006.

MARSHALL, J. A. **The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights.** International Journal of Environmental Research and Public Health . V. 8 N°.4: p. 1141-1149, 2011.

MOTOMURA, K. *et al.* **Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history.** Journal of Virology. V. 82. p.11247-11262, 2008.

MOTOMURA, K. *et al.* **Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan.** Journal of Virology. V. 84.p. 8085-8097, 2010.

NEIL, S. L *et al.* **Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources.** ILAR Journal. V. 46. N°3. p. 258-268, 2005.

OLIVER, S.L *et al.* **Genotype 1 and genotype 2 bovine noroviruses are antigenically distinct but share a cross-reactive epitope with human noroviruses.** Journal of Clinical Microbiology. V.44. p. 992–998, 2006.

PAPAFRAGKOU, E. *et al.* **Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models.** PLoS ONE. V. 8. N°. 6. p. e63485, 2013.

PARKER, T. D *et al.* **Identification of Genogroup I and Genogroup II Broadly Reactive Epitopes on the Norovirus Capsid.** Journal of Virology. V. 79. N°. 12. p. 7402–7409, 2005.

PARRA, G. I *et al.* **Identification of a Broadly Cross-Reactive Epitope in the Inner Shell of the Norovirus Capsid.** Plos one. V. 8. N°.6.p. e67592- e67592, 2013.

ROCKX, B. *et al.* **Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study.** Clinical Infection Disease. V. 35. N°.3. p. 246-53, 2002.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001

SIEBENGA, J *et al.* **Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GII.4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance.** Eurosurveillance. V. 13. N°. 2, 2008.

SHIOTA, T *et al.* **Characterization of a Broadly Reactive Monoclonal Antibody against Norovirus Genogroups I and II: Recognition of a Novel Conformational Epitope.** Journal of Virology. V. 81. N°. 22. p. 12298–12306, 2007.

SOMEYA, Y *et al.* **Assembly of homogeneous norovirus-like particles accomplished by amino acid substitution.** Journal of General Virology, V.92.p. 2320–2323, 2011.

TAKANASHI, S. *et al.* **Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with 900 microvilli grown in three-dimensional cultures.** Archives of Virology Epub ahead of print, 2013.

TAMASHIRO; WIRLA, M.S.C; AUGUSTO, E.F.P. **Anticorpos monoclonais**. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR.. 1ª ed. Roca. São Paulo, 2008.

VICENTINI, F. *et al* .**Molecular Characterization of Noroviruses and HBGA from Infected Quilombola Children in Espírito Santo State, Brazil**. Plos one. V. 8. N°7. p. 1-9, 2013.

VIRAL ZONE. **Norovirus**. Acesso em 24 de dezembro de 2013. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/194.html.

WIDDOWSON, M.A *et al* . **Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in The Netherlands**. Journal of Medical. Virology. V. 76. p. 119-128, 2005.

WIKIPEDIA. **Norovirus**. Acesso em 03 de dezembro de 2013. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Norovirus>

YODA, T *et al* . **Precise Characterization of Norovirus (Norwalk-Like Virus)-Specific Monoclonal Antibodies with Broad Reactivity**. Journal of Clinical Microbiology. V. 41, N°. 6. p. 2367–2371, 2003.

ZHENG,D.P. *et al* . **Norovirus classification and proposed strain nomenclature**. Virology., V. 346. N°. 2, p. 312-323, 2006.

X. ANEXOS TERMOS DE CONCESSÃO DE USO DAS IMAGENS

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 14, 2013

This is a License Agreement between Layssa Oliveira ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3207770937059
License date	Aug 14, 2013
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Microbiology
Licensed content title	Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system
Licensed content author	Eric F. Donaldson, Lisa C. Lindesmith, Anna D. LoBue and Ralph S. Baric
Licensed content date	Mar 1, 2010
Volume number	8
Issue number	3
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	FIGURE 1 Genome organization and capsid structure.
Author of this NPG article	no

Your reference number

Title of your thesis / dissertation

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais para Norovirus GII.4 de amplo e restrito espectro

Expected completion date Mar 2014

Estimated size (number of pages) 70

Total 0.00 USD

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]

(reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501090414.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 14, 2013

This is a License Agreement between Layssa Oliveira ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3207750653980
License date	Aug 14, 2013
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Immunology
Licensed content title	Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine
Licensed content author	Sefik S. Alkan

Licensed content date	Feb 1, 2004
Volume number	4
Issue number	2
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	FIGURE 3 Cell fusion and monoclonal antibody production.
Author of this NPG article	no
Your reference number	

Title of your thesis / dissertation

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais para Norovirus GII.4 de amplo e restrito espectro

Expected completion date Mar 2014

Estimated size (number of pages) 70

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
 Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
 For AOP papers, the credit line should read:
 Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:
 Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of

publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501090372.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.