



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterização molecular de fragmentos de anticorpos
anti-ssDNA obtidos a partir de uma biblioteca
combinatória de genes variáveis de galinha**

FERNANDA MARTINS DE SIQUEIRA

Orientadora: Prof^a. Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Co – Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Brasília – DF
2009



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterização molecular de fragmentos de anticorpos
anti-ssDNA obtidos a partir de uma biblioteca
combinatória de genes variáveis de galinha**

FERNANDA MARTINS DE SIQUEIRA

Orientadora: Prof^a. Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Co – Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia Celular
do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília como
requisito parcial à obtenção do
grau de Mestre em Biologia
Molecular

Brasília – DF
2009

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade – UFAM

Prof. Dr. Marcos Antônio Santos Silva – UnB

Prof^a. Dra. Cynthia Maria Kyaw - UnB

Prof^a. Dra. Andréa Queiroz Maranhão – UnB

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido – UnB

Trabalho desenvolvido no
Laboratório de Biologia
Molecular da Universidade de
Brasília sob orientação da Dra.
Andréa Queiroz Maranhão.

Eu dedico esse trabalho aos meus pais e a minha irmã, pela compreensão e apoio na elaboração deste trabalho que ocupou preciosas horas de convivência familiar, e ao grande amor da minha vida, Leonardo, pelo carinho incondicional. Obrigado por tudo. Amo Vocês.

Agradecimentos

Agradeço em especial aos meus amados pais pelo grande apoio todos esses anos, ensinando-me, principalmente a importância da construção e coerência dos meus próprios valores. Agradeço também toda a compreensão e todas as palavras e gestos de carinhos nos momentos que mais precisei. Serei eternamente grata a vocês.

À minha irmã e meu cunhado, meus companheiros e amigos de todas as horas e que sempre torceram tanto por mim.

Aos meus amigos muito especiais, Lucas, Ludmila, Danny, Daniela e Ana Beatriz, Ronan, Priscilinha, Raquelzinha, Leo, Andréa, Wagner, Liane, Pri, Carol, Lúcia, Poly, Cíntia, Paulinha e Bruna.. Amigos de longa data e que apesar de às vezes distantes sempre estiveram presentes. Pessoas que sei que sempre vou poder contar.

À minha madrinha, sempre muito carinhosa e atenciosa comigo. Ótima pessoa com que sempre gosto de estar. Você tem um lugarzinho especial no meu coração, viu?! A todas as minhas tias e tios, primas e primos, que não citarei o nome de todos eles aqui porque a lista é muito grande.

A minha quase-nova família: tia Célia, tia Lúcia, Luiza, Maurício e vó Maria. Pessoas maravilhosas e que agora vão fazer parte da minha vida definitivamente! Gosto muito de cada um de vocês!

Aos professores Andréa e Marcelo, pela disponibilidade irrestrita, pela forma exigente, criativa e crítica de arguir as idéias apresentadas, que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos.

Ao casal tão querido Barbarela e Yuri. Gostaria de agradecer pela ótima convivência, grande amizade e companheirismo. Vocês são pessoas fantásticas. Ahhh Barbarela, obrigado por ficar comigo me fazendo companhia a primeira vez que eu fiquei no laboratório de noite... e também por me ensinar a fazer Western. (vê se não chora, porque nós já cansamos de chorar esse ano, lembra?!). Yuri... amigo desde sempre e para sempre. Adoro vocês!

À Mary (manga), pessoa essencial que alegria o meu dia no laboratório com seu jeito animado, falante, agitado.... enfim, totalmente libriana. E não podia deixar de agradecer a sua companhia na viagem que foi muito boa, mesmo tendo que ouvir mil vezes sua apresentação em inglês: the aim of this work.. Huahuahauaha

À amiga Kelly Simi, pessoa doce, meiga e sempre pronta para ajudar a todos. Muito obrigada por cada continha tutelada, pela companhia nos finais de semana no laboratório e por cada desenho arrumado com tanta perfeição. Você tem um coração giga hein?! Quando eu crescer, quero ser igual a você.

À Mariana e Alex, que foram chegando de mansinho na minha vida e hoje já são completamente essenciais. A Mari com seu jeitinho todo delicado e o Alex que por se tornar amigo do Leo, conseqüentemente se tornou meu amigo também. Agora, vamos muuuuito para o clube!! Uhuuuuu!!!

À Flávia, vizinha de bancada!!! No início não nos conhecíamos muito bem... mas ao poucos a proximidade de bancada nos mostrou total afinidade. Muitas fofocas e risadas juntas. Obrigada por me entender e me agüentar utilizando várias bancadas. Eu te disse que era só até março!

Ao Leo, que além das sugestões pertinentes dadas durante o desenvolvimento desse trabalho, chegava sempre com as suas músicas “lançamentos” e narrando tudo que fazia no lab. Muito bom trabalhar com você.

À Carol, pessoa maravilhosa com quem aprendi muito. Obrigada pela força no início... meu mestrado não seria igual sem você.

Ao Rafa e Victor, dois caras totalmente brincalhões, animados e prestativos, apesar da bagunça das bancadas. Janaína, pelo incentivo nas corridas no parque e pelas nossas conversas, que eu morria de rir. Isso me ajudou muito na fase final. Paulo, obrigada por todas as ajudas, mas principalmente pela mudança no leitor de ELISA quando acabou a luz (se você não estivesse me ajudado, eu ia chora muuuuito!) e pelos PBSTs. Eu sempre fazia novamente para você, viu?! Taíssa, chegando sempre muito animada. Nossa, como nos divertimos juntas, hein?! À Isabella e Luana, obrigada pela força em tudo. Isa, obrigada também pelo cantinho da sua bancada todo dia que eu queria pegar alguma coisa na minha bolsa! À Izabel, uma pessoaal muito prestativa e atenciosa. Obrigada pela ajuda nas referências bibliográficas! À Vanessa, Taiana, Guto, pela convivência amigável, gostosa e produtiva que tivemos.

Aos funcionários do Laboratório Dona Ivonildes, Fátima, Daniel e Tompson.

Aos professores do Laboratório Biologia Molecular Sueli, Fernando, Lídia, Elida, Ildinete e Márcio.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular, em especial à Ana.

E por último, não poderia deixar de agradecer de forma especial ao meu companheiro e grande amor da minha vida, Leonardo, pela sua paciência infinita e crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída que foram sem dúvida os elementos propulsores dessa dissertação. Obrigada por ser tão atencioso, sempre me acompanhando no laboratório durante os finais de semana e nas intermináveis noites de purificação. Pelo apoio constante, carinho e atenção em cada etapa desse trabalho. Te amo cada vez mais e mais!

Sumário

Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
Introdução.....	1
1.1 Anticorpos.....	2
1.2 O fragmento scFv.....	7
1.3 Anticorpos anti-DNA	8
1.4 Anticorpos anti-DNA fita simples (Anti-ssDNA).....	10
1.5 Bibliotecas de Anticorpos Apresentadas em Fagos: Phage Display.....	11
1.6 Conversão Gênica e Geração de Diversidade das Cadeias Variáveis de Anticorpos de Galinha.....	16
1.7 Anticorpos de Galinha como Reagentes Alternativos.....	19
Objetivos.....	21
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Etapas Metodológicas.....	22
Resultados Anteriores.....	23
3.1 Construção da Biblioteca Combinatória de scFV de galinha.....	24
3.2 Estratégia utilizada na seleção de anticorpos ligantes a ssDNA, a partir de uma biblioteca de scFv de galinha.....	25
Materiais e Métodos.....	28
4.1 Materiais.....	29
4.1.1 Célula.....	29
4.1.2 Plasmídio utilizado.....	29
4.1.3 Oligonucleotídeos utilizados	30
4.1.4 Soluções estoques de inibidores de proteases.....	30
4.1.5 Meios de cultura e soluções para bactérias.....	31
4.1.6 Soluções e tampões de uso geral.....	32
4.1.7 Soluções e material para preparo de células competentes, transformação e indução - bactéria.....	33

4.1.8 Soluções para extração de DNA plasmidial.....	33
4.1.9 Tampão de endonucleases de restrição.....	35
4.1.10 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida.....	35
4.1.11 Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com <i>Comassie Brilliant Blue</i> (R-250).....	37
4.1.12 Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (ELISA, <i>Western e Dot blotting</i>).....	38
4.1.13 Coluna de cromatografia de afinidade.....	39
4.1.14 Soluções para cromatografia de afinidade.....	39
4.1.15 Materiais utilizados para concentração de sobrenadantes de cultura e proteínas purificadas.....	40
4.1.16 Filtros.....	40
4.1.17 Marcadores moleculares para DNA e proteína.....	40
4.1.18 Kits comerciais.....	41
4.1.19 Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA, <i>Western Blot e Dot Blot</i>	42
4.1.20 Enzima de restrição.....	42
4.1.20 Antibióticos.....	42
4.2 Métodos.....	44
4.2.1 Preparação de DNA plasmidial.....	44
4.2.2 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.....	45
4.2.3 Análise do DNA plasmidial em gel de agarose.....	45
4.2.4 Preparação de células competentes e transformação bacteriana.....	45
4.2.5 Seqüenciamento.....	46
4.2.6 Produção dos scFvs	47
4.2.7 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade	48
4.2.8 Análise de proteínas por <i>Dot Blotting</i>	49
4.2.9 Precipitação de proteína com TCA.....	50
4.2.10 Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE.....	50
4.2.11 Coloração do gel de SDS-PAGE.....	51
4.2.12 Análise de proteínas por <i>Western Blotting</i>	51

4.2.13 Concentração do sobrenadante de cultura utilizando o sistema Centriprep.....	52
4.2.14 ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	53
Resultados e Discussão.....	55
5.1 Sequenciamento dos scFvs previamente selecionados.....	56
5.2 Produção dos scFvs anti-ssDNA.....	59
5.3 Purificação.....	60
5.4 Caracterização dos scFvs quanto a afinidade e especificidade.....	67
Conclusão e Perspectivas.....	75
Referências Bibliográficas.....	78

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura de uma molécula de anticorpo.....	5
Figura 2. Representação esquemática do processo de rearranjo gênico que ocorre em nível cromossomal nos <i>loci</i> de imunoglobulinas.....	6
Figura 3. Representação esquemática dos fragmentos scFv e diabody.....	8
Figura 4. Organização estrutural de uma partícula viral do bacteriófago M 13.....	13
Figura 5. Representação esquemática de um fagomídeo hipotético para a construção de bibliotecas conformacionais na superfície de partículas virais.....	15
Figura 6. Organização dos <i>loci</i> de imunoglobulinas de galinha e eventos de conversão gênica.....	18
Figura 7. Estratégia de construção da biblioteca de scFv de galinha.....	24
Figura 8. Representação esquemática da seleção de anticorpos ligantes a ssDNA.....	25
Figura 9. Mapa do cacete de expressão do plasmídeo pComb 3X SS.....	56
Figura 10. Comparação das sequências codificadoras dos scFvs caracterizados.....	58
Figura 11. Imunodeteção das proteínas recombinantes.....	60
Figura 12. Imunodeteção do scFv B10 após a purificação em coluna de afinidade.....	61
Figura 13. Imunodeteção do scFv D03 após a purificação em coluna de afinidade.....	61
Figura 14. Imunodeteção do scFv F03 após a purificação em coluna de afinidade.....	62
Figura 15. Imunodeteção do scFv H07 após a purificação em coluna de afinidade.....	62
Figura 16. Imunodeteção dos scFvs B10 e D03 purificados.....	64
Figura 17. Imunodeteção dos scFvs F03 e H07 purificados.....	64
Figura 18. Produção do scFv B10.....	65
Figura 19. Produção do scFv D03.....	66
Figura 20. Produção do scFv F03.....	66
Figura 21. Produção do scFv H07.....	67
Figura 22. Ligação dos fragmentos scFvs a Oligo dT-biotina.....	68
Figura 23. B10: ensaio de competição.....	69
Figura 24. D03: ensaio de competição.....	70
Figura 25. F03: ensaio de competição.....	71
Figura 26. H07: ensaio de competição.....	71

Índice de Tabelas

Tabela 1. Comparação de animais utilizados para a construção de bibliotecas combinatórias de anticorpos.....	20
Tabela 2. Análise dos clones de scFvs selecionados pela ligação a Oligo dT-celulose- Ciclos 4 e 5.....	27
Tabela 3. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados.....	30
Tabela 4. Quantificação da atividade residual e inibição dos scFvs quando submetido aos competidores.....	73

Lista de Abreviaturas

Amp ^R	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
APS	Persulfato de amônio
Ac	Anticorpo
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato
BSA	Albumina bovina sérica
°C	Grau Celcius
CD	Marcador de superfície celular (<i>Cluster of differentiation</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDR	Região determinante de complementariedade
CH	Cadeia constante pesada de anticorpo
CL	Cadeia constante leve de anticorpo
C-Terminal	Extremidade carboxi – terminal
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de ligação imunoenzimática
Fab	Fragmento (de anticorpo) de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento (de anticorpo) cristalizável (porção constante)
FcR	Receptor de Fc
FDA	Administração de alimentos e medicamentos
FM	Arcabouço (<i>Framework</i>)
Fv	Fragmento (do anticorpo) varável
g	Gramma
g	Força gravitacional
h	Hora
HA	Hemaglutinina
Ig	Imunoglobulina
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Litro

M	Molar
mA	Miliampère
mAb	Anticorpo Monoclonal
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NBT	Nitro Blue Tetrazole
OD	densidade ótica
Oligo	oligonucleotídeo
ori	Origem de replicação
p	Peso
pb	Par de base
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação polimerásica em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
pLac	promotor lacZ
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonato
ptn	proteína
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
RNAase	Ribonuclease
scFv	Fragmento variável (de anticorpo) de cadeia única
SDS	Sódio Duodecil Sulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida / SDS
TEMED	N,N,N',N' - tetrametil etilenodimetilamina
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
U	Unidade enzimática
v	Volume
VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo

μg	Micrograma
μL	Microlitro
nm	Nanometro
μM	Micromolar

Resumo

Os anticorpos anti-DNA são comumente encontrados nas doenças auto-imunes. Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de se determinar as bases moleculares desse reconhecimento antigênico. Em trabalhos anteriores construiu-se uma biblioteca combinatória de fragmentos de anticorpos, a partir de cDNA de galinhas da raça Red/Black Cornish Cross, previamente imunizadas com BSA-fluoresceína. Os scFvs foram selecionados pela sua capacidade de ligação a DNA fita simples (Oligo dT-celulose) (Maranhão, 2001). A partir daí, quatro clones foram escolhidos. Esses scFvs foram novamente seqüenciados e analisados. Os fragmentos de anticorpos foram produzidos no sobrenadante de cultura de bactéria e posteriormente purificados por cromatografia de afinidade utilizando colunas de níquel. Para a confirmação da atividade ligante a ácidos nucleicos, bem como para a caracterização de sua afinidade e especificidade, essas proteínas foram submetidas à imunoensaios. A afinidade foi testada tanto por ELISA de ligação direta, onde o único antígeno utilizado era o Oligo dT-biotina, quanto por ELISA de competição. Neste último tipo de imunoensaio foram utilizados diversos ssDNA solúveis como competidores: Oligo dT, Oligo dA, Oligo dC, Oligo dG, Oligo dU. Além disso, dois desses scFvs foram testados quanto à capacidade de inibição da ligação a Oligo-dT pelo antígeno originalmente utilizado (FITC) para a imunização dos animais. As análises realizadas nesse trabalho mostram que os scFvs são capazes de se ligar ao antígeno utilizado na seleção da biblioteca. Além disso, existe uma dependência da composição das CDRs e a capacidade de reconhecimento dos Ac recombinantes de diferentes seqüências de DNA fita simples. Nesse sentido, um dos scFvs caracterizados apresentou uma grande polirreatividade, ligando-se a diferentes antígenos, enquanto que os outros três apresentaram ligação significativa apenas a Oligo-dT e a Oligo-dA, dentre os oligonucleotídeos testados. Também é de tamanha relevância o achado de que mesmo tendo sido obtidos a partir de uma seleção por afinidade a Oligo-dT, a ligação ao antígeno utilizado para a imunização dos animais (FITC) é mantida para os dois fragmentos de Ac testados. Todos esses dados sugerem que a afinidade e a especificidade desses fragmentos de anticorpos dependem não só da interação deste com o esqueleto de açúcar-fosfato, mas também com as bases nitrogenadas.

Abstract

Anti-DNA antibodies are commonly found in autoimmune disease patient sera. Several studies are made trying to understand their origin and the basis of their affinity. We had previously constructed a scFv library from BSA-fluorescein chicken immunized Ab repertoire and used it to select anti-ssDNA antibodies. Several clones were analyzed in terms of scFv production and VH and VL sequences, and among them, four representatives ones were chosen for further characterization. The aim of this work was to produce and characterize the selected scFvs in terms of their immunological features, comparing their specificities. The recombinant scFvs were produced in bacterial culture supernatants and were purified using metal affinity chromatography. The purified proteins were tested by ELISA immunoassays for ssDNA direct binding. The purified scFvs were also tested by ELISA immunoassays for ssDNA competition using soluble ssDNA: Oligo-dA, Oligo-dC, Oligo-dG, Oligo-dT, Oligo-dU. We also tested the remaining binding to FITC. The protein production and purification yielded enough recombinant products for immunological characterization. The recombinant affinity-purified products were able to bind to Oligo(dT)-biotin and this association was inhibited by Oligo-dT itself, Oligo-dA and Oligo-dU. Also, for the two tested scFvs, FITC was able to compete with Oligo-dT-biotin binding. Although quite similar to the other scFvs, one of the characterized proteins showed a strong polyreactivity. These data showed that we were able to select specific antibodies fragments anti-ssDNA from a non-immune source. The antibodies produced in bacterial cells relied their binding activity not only on sugar-phosphate backbone, but also on nitrogenous base recognition.

Introdução

INTRODUÇÃO

1.1- Anticorpos

O sistema imune dos vertebrados é especializado no reconhecimento de substâncias e organismos estranhos e na sua posterior eliminação. Esse processo envolve a participação de diversos tipos celulares e tipos de moléculas. Dentre essas últimas destacam-se os anticorpos, que são moléculas chave do reconhecimento antigênico, produzido pelos linfócitos B ativados (plasmócitos), que circulam através do sangue e da linfa. Os anticorpos pertencem à superfamília das imunoglobulinas e foram definidos funcionalmente por volta de 1890 como substâncias capazes de conferir, passivamente, a imunidade, ou seja, com capacidade de detectar, localizar, reconhecer, ligar-se e inativar ou dar início ao processo de eliminação do antígeno.

As imunoglobulinas são glicoproteínas de massa molecular elevada, em torno de 150 kDa, encontradas em abundância no soro de animais vertebrados. Essas moléculas são de natureza tetramérica, compostas por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, unidas por uma extensiva rede de interações não-covalentes, estabilizadas por pontes dissulfeto intercadeias e intracadeias (Figura 1A). Tanto as cadeias leves como as cadeias pesadas contêm uma série de unidades homólogas repetidas, cada uma com cerca de 110 resíduos de aminoácidos que se enovelam independentemente em um motivo globular classificado como Domínio Imune (Padlan, 1994) (Figura 1B).

A cadeia leve é composta de uma porção variável (VL) e uma porção constante (CL), e a cadeia pesada é composta de uma porção variável (VH) e três ou quatro porções constantes, dependendo da classe da imunoglobulina, chamados de CH1, CH2, CH3 e CH4. A região constante da cadeia leve pode apresentar dois tipos de domínios segundo suas seqüências de aminoácidos: capa (κ) ou lâmbda (λ). Já as regiões constantes das cadeias pesadas são constituídas de três ou quatro domínios agrupando-se em cinco padrões diferentes de seqüências de aminoácidos designadas pelas letras do alfabeto grego α , δ , ϵ , γ e μ . Esse último é o critério determinante da classe ou isotipo ao qual o anticorpo pertence, podendo este ser IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM, respectivamente correspondendo aos cinco tipos de regiões constantes. Esses cinco isotipos apresentam capacidades de multimerização distintas e funções efetoras próprias (Paul, 2003). A classe mais comum e abundante de

imunoglobulina é a IgG, sendo, inclusive, predominante entre os anticorpos de uso terapêutico.

Dentro de cada VH e VL são encontradas três alças, chamadas regiões determinantes de complementariedade, as CDRs 1, 2 e 3, que juntas formam os sítios de ligação ao antígeno, o paratopo. Este corresponde a uma superfície complementar ao epítipo (região que é reconhecida no antígeno) e define sua especificidade. As três CDRs de cada cadeia são definidas como CDR1, CDR2 e CDR3, ou então, H1, H2, H3 e L1, L2 e L3, explicitando a cadeia a qual pertencem, pesada e leve, respectivamente. As regiões que intercalam as CDRs são conhecidas como arcabouço (*framework- FW*) dos domínios variáveis (Abbas *et al*, 2000).

A variabilidade em tamanho e seqüência polipeptídica nas CDRs determina a grande diversidade estrutural na superfície dos *loops*, que pode se refletir em paratopos de formas variadas, incluindo desde superfícies protuberantes até cavidades em depressão. Enquanto as CDRs estão diretamente relacionadas com o reconhecimento e interação com o antígeno, a região FW, com menor grau de variabilidade quanto à seqüência peptídica, tem sua principal função relacionada com a manutenção da conformação estrutural do sítio de interação ao antígeno.

A determinação genética das CDRs é assim definida: as CDRs H1 e H2, L1 e L2 são codificadas apenas pelos segmentos gênicos variáveis (V) pesados e leves, respectivamente; as CDR H3 e L3 têm aminoácidos oriundos dos três segmentos pesados (VH, D, JH) e dos dois leves (VL e JL). Assim, a variabilidade de H1 e H2, L1 e L2 é dada primariamente, pela variabilidade intrínseca aos segmentos V. Enquanto que na CDR 3 de ambas as cadeias apresentam a característica adicional de incorporar variabilidade dos outros segmentos (D e J para a cadeia pesada e J para a cadeia leve), além de contar também com a vasta gama de eventos de inserções e retiradas de nucleotídeos que ocorrem no momento da junção dos segmentos. Devido a essa maior variabilidade observada nas CRD 3, a maioria dos estudos que buscam aumento ou mudança de afinidade de anticorpos, focaliza essas regiões, em especial, a CDR 3 (Watkins *et al*, 2003).

Os anticorpos são responsáveis pelo reconhecimento de determinantes antigênicos por meio da sua capacidade de ligação específica a esses antígenos, e também, pela ativação de sistemas efetores (tais como: degranulação, a fagocitose, a citotoxicidade celular dependente de anticorpo, a expressão de citocinas e a liberação de mediadores inflamatórios) para eliminá-los (Janeway *et al.*, 2001) . Devido às funções que desempenham, essas moléculas

apresentam uma ambigüidade estrutural, ou seja, as porções das cadeias das imunoglobulinas contribuem de forma desigual para as funções dos anticorpos. Por um lado, sua extremidade N-terminal apresenta uma variabilidade superficial capaz de interagir com moléculas dos mais variados tipos, enquanto a porção C-terminal deve ser reconhecida por sistemas efetores celulares do organismo a que pertencem, o que pressupõe certa constância estrutural (Goldsby, 2000).

Estruturalmente, a molécula de anticorpo pode ser comparada a um **Y**, sendo que os “braços” são denominados Fabs, cuja função é reter a atividade ligante ao antígeno e são constituídas pela cadeia leve e por parte da cadeia pesada (Fd), ou seja, uma porção variável e o primeiro domínio constante. A “raiz” do **Y** é o Fc, dímero constituído pelos demais domínios constantes das duas cadeias pesadas associadas por pontes dissulfeto. Conectando os Fabs ao Fc há uma porção peptídica flexível contendo uma ou duas cistinas intracadeias. Esse peptídeo de ligação é altamente susceptível à proteólise, o que permite o desmembramento da molécula em suas partes funcionais Fab e Fc (Plünckthun e Skerra, 1989).

A variabilidade dos anticorpos é garantida, na maioria dos vertebrados e em particular em camundongos e humanos, por meio do processo de rearranjo gênico que ocorre em nível cromossomal nos *loci* de imunoglobulinas. Na espécie humana existem três *loci*: um *locus* de cadeia pesada e dois *loci* para cadeia leve. O *locus* da cadeia leve *kappa* localiza-se no braço curto do cromossomo 2, o da cadeia leve *lambda* localiza-se no cromossomo 22 e o segmentos gênicos do VH estão localizados no cromossomo 14.

Entre os genes V kappa (κ), 32 são potencialmente funcionais, 16 possuem algum defeito, como por exemplo, alterações de 1 a 2 nucleotídeos, mas pode vir a codificar imunoglobulinas funcionais e 25 são pseudogenes, dos quais não se espera que codifiquem proteínas funcionais devido a presença de códons de parada (Zachau, 1995). Nesse *locus* estão presente 5 segmentos J κ que rearranjam sempre com o único segmento C κ presente.

Muita informação foi reunida sobre o repertório κ humano, no entanto, a distribuição dos genes λ expressos e os mecanismos envolvidos na sua origem ainda permanece pouco elucidada (Farner *et al*, 1999). O *locus* da cadeia leve λ é composto por 51 segmentos gênicos V λ , dos quais 30 são considerados funcionais. Existem ainda quatro segmentos gênicos J λ funcionais e quatro segmentos constantes (C λ) funcionais (Williams *et al*, 1996). No soro humano cerca de 60 a 70% dos anticorpos expressam cadeia leve κ e os 30 a 40% restantes são formados por genes da cadeia leve λ .

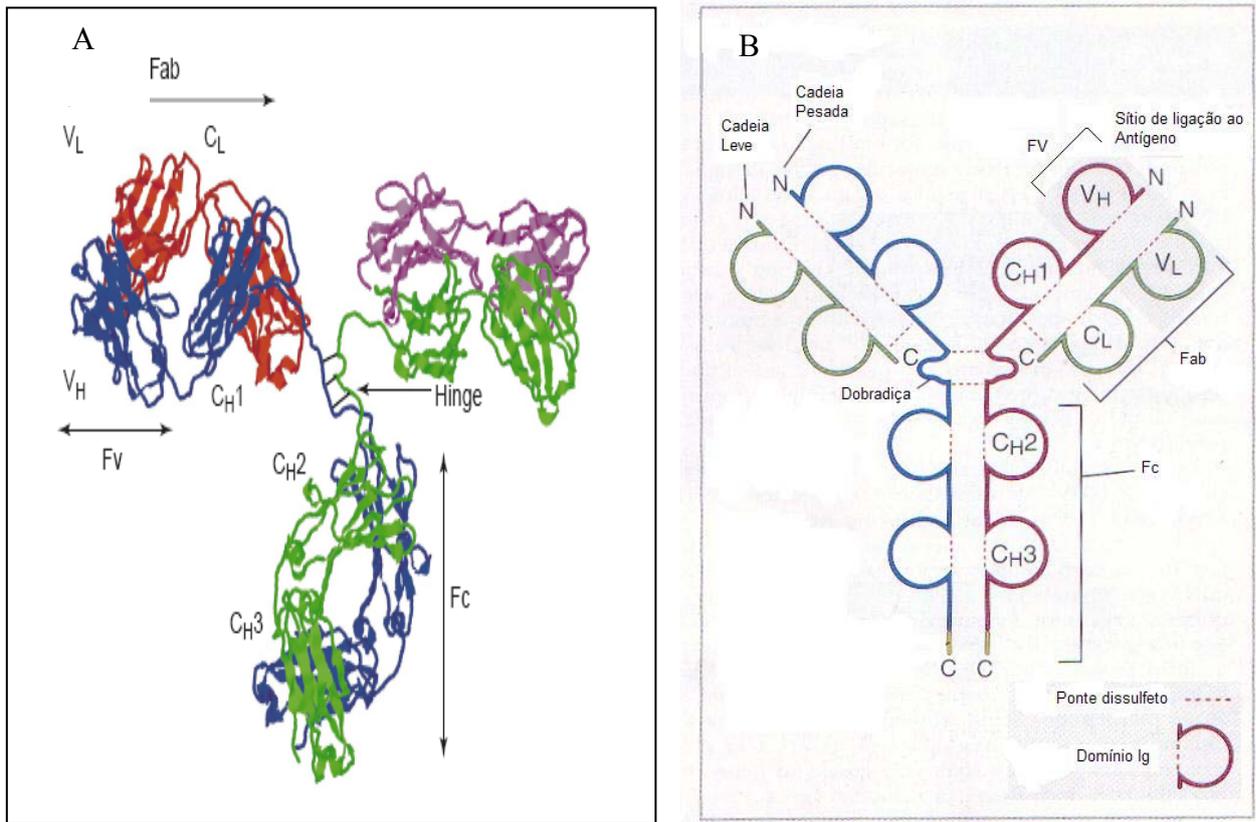


Figura 1. Estrutura de uma molécula de anticorpo. **A-** Organização espacial dos domínios de uma IgG revelada por cristalografia de raio X. A estrutura secundária predominante nos anticorpos é a folha β antiparalela (β -Sheet) com pequenas α -hélices em algumas alças (Little *et al.*, 2000). Fc, fragmento cristalizável; Fab, fragmento de ligação ao antígeno; Fv, fragmento variável. **B-** Representação esquemática de uma molécula de IgG. Neste desenho, os sítios de ligação do antígeno são formados pela justaposição de domínios variáveis de cadeias leves (VL) e domínios variáveis de cadeias pesadas (VH) (Abbas *et al.*, 2003).

A recombinação gênica acontece de forma a juntar os segmentos gênicos VH, D e JH para a cadeia pesada e os segmentos gênicos VL e JL para a cadeia leve. Nesse processo o alelo rearranjado perde parte de seu ácido desoxirribonucléico (DNA) e nas junções ocorrem ainda inserções e retiradas de nucleotídeos.

O processo de rearranjo é o grande responsável pela variabilidade dos receptores de célula B (Figura 2). A junção do exon VDJ com as cadeias constantes ocorre por *splicing* do pré-mRNA. Na medula óssea, o linfócito B maduro apresenta em sua superfície o receptor de célula B, na forma de uma IgM ou de uma IgD transmembrânica e posteriormente deixa a medula em direção ao órgão linfóides secundários. Nesses compartimentos, antígenos com capacidade de ligação aos receptores de célula B realizam processo de seleção clonal: ligação

do antígeno à imunoglobulina de superfície normalmente leva a uma expansão clonal, mudança de isotipo (para IgG, IgA ou IgE) e acúmulo de mutações nos genes variáveis dessas moléculas. Esse processo culmina com a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, células especializadas na produção de imunoglobulinas solúveis, e na maioria das vezes também em células B de memória, as quais são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo na ausência de um novo estímulo.

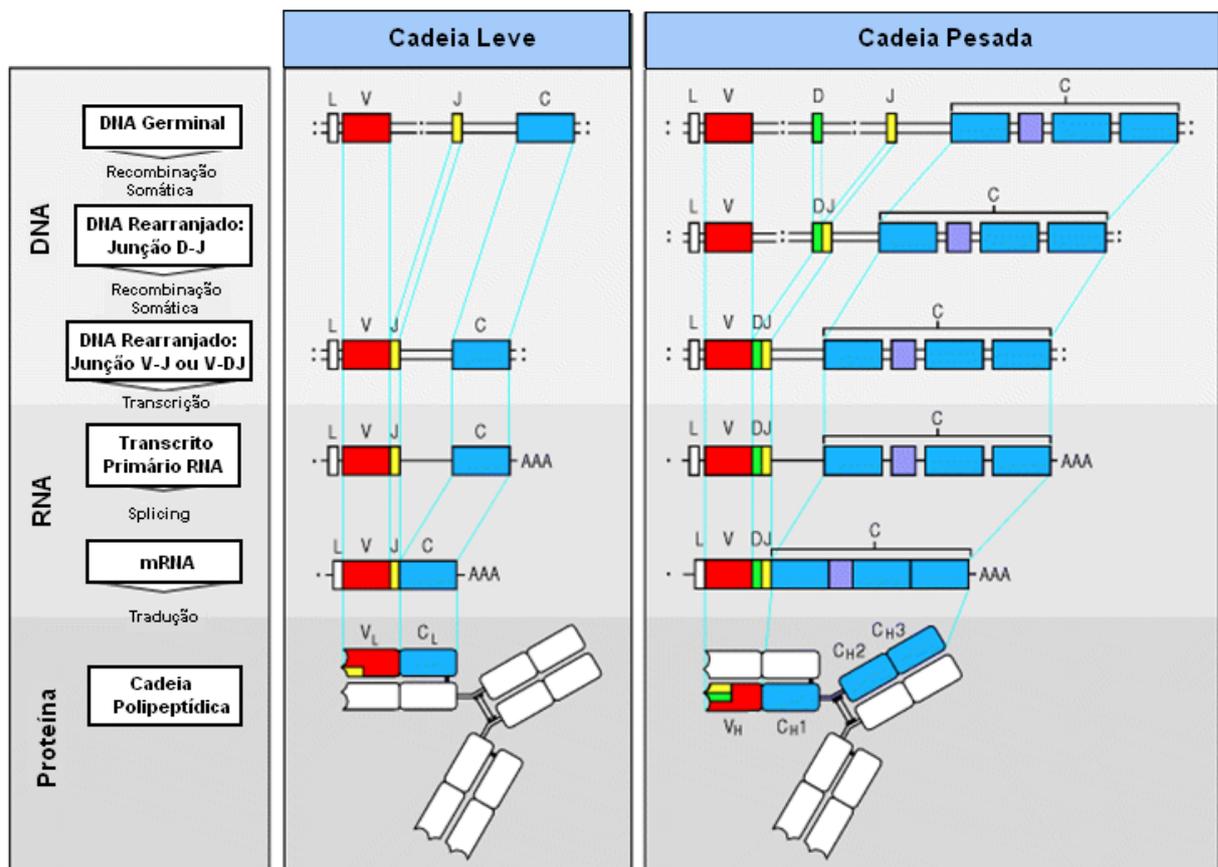


Figura 2- Representação esquemática do processo de rearranjo gênico que ocorre em nível cromossomal nos loci de imunoglobulinas (Adaptado Goldsby *et al.*, 2000). Brevemente, a recombinação gênica acontece de forma a juntar segmentos gênicos VL para a cadeia leve e VDJ para a cadeia pesada. L representa a região líder (codificadora do peptídeo sinal); V, segmento variável; D segmento gênico de diversidade; J, segmento gênico de junção e C, região constante.

1.2- O fragmento scFv

Hoje em dia, a indústria biotecnológica apresenta um enorme crescimento nos investimentos destinados à engenharia de anticorpos, desenvolvendo outros tipos de moléculas como os fragmentos de anticorpos e imunocjugados (Presta, 2006). Esse tipo de engenharia se tornou possível devido a estrutura em domínios dos anticorpos que permite sua divisão em subunidades funcionais que podem ser combinados artificialmente para criar novas moléculas. Nesse sentido, o desenvolvimento de novas imunoglobulinas (Ig) recombinantes tornou-se peça chave no tratamento de diversas doenças, visto que, a sua especificidade característica faz com que elas atuem em um alvo específico, aumentando, assim, a eficiência do tratamento.

Como a molécula de anticorpo é grande, com aproximadamente 150 kDa, a possibilidade de utilização de fragmentos de anticorpos no tratamento de enfermidades se tornou muito atraente para a medicina, e um dos primeiros triunfos na engenharia de anticorpos foi a construção de moléculas de fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv-*single chain Fv*) por manipulação genética dos genes de imunoglobulinas. Trata-se de um arranjo monocistrônico que apresenta um peptídeo conector flexível (Gly₄Ser)₃, por exemplo, unindo o carboxi-terminal do VH com o amino-terminal do VL ou vice-versa, onde se mimetiza a região Fv do anticorpo e mantém a mesma especificidade de ligação ao antígeno (Maranhão e Brígido, 2001). Além desse fragmento, é possível obter scFvs bivalentes, como por exemplo o *diabody*, onde duas cadeias de VHs estão ligadas diretamente às VLs que se conjugam formando duas regiões de reconhecimento ao antígeno (Figura 3).

A aplicação dessas moléculas, como o modelo scFv, apresenta certas vantagens em relação à utilização de uma molécula de anticorpo. Entre estas vantagens estão: a maior facilidade de manipulação gênica (por se tratar de uma construção monocistrônica), a alta capacidade de penetração nos tecidos quando comparado ao anticorpo inteiro (facilitando sua ação, por exemplo, dentro de tumores) e manutenção da capacidade de reconhecimento e ligação ao antígeno, podendo levar à formação de imunocomplexos e eliminação dos antígenos. Outro aspecto é o fato de não possuir região Fc, o que contribui para tratamentos onde a função efetora não é necessária. (Damasceno *et al.*, 2004 e Powers *et al.*, 2001).

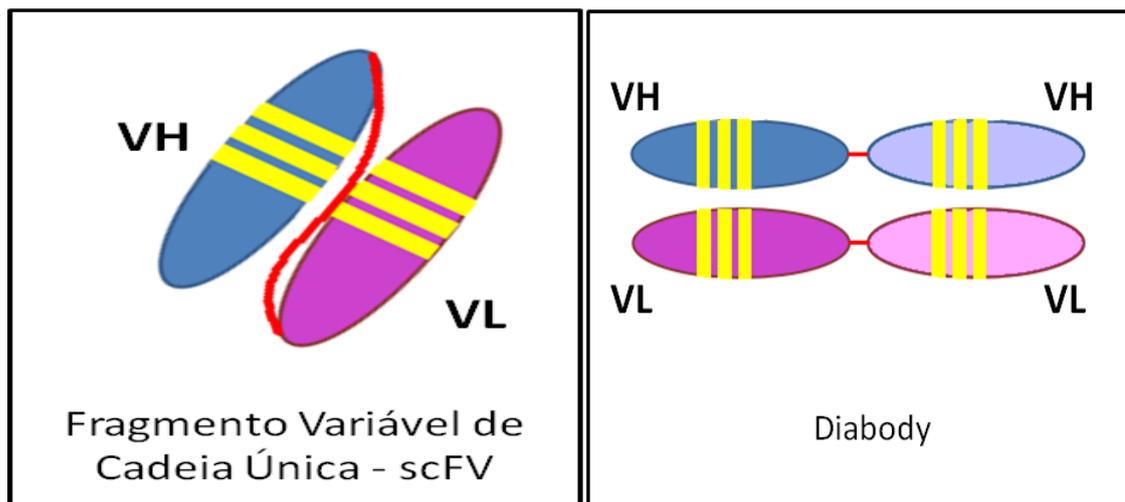


Figura 3. Representação esquemática dos fragmentos scFv e diabody. Em azul, região variável da cadeia pesada (VH). Em rosa, região variável da cadeia leve (VL). Linhas amarelas, CDRs – regiões determinantes de complementaridade. Em vermelho, peptídeo conector flexível que une a porção C- terminal do VH com a porção N-terminal do VL no caso do scFv e a porção C-terminal do VH com a porção N-terminal do VH assim como a porção C-terminal do VL com a porção N-terminal do VL no caso do diabody (adaptado de Maranhão & Brígido, 2001).

1.3- Anticorpos Anti-DNA

O sistema imunológico tem como principal função a proteção do indivíduo por meio de mecanismos específicos que reconhecem antígenos (patógenos, proteínas ou outras moléculas) estranhos ao hospedeiro. A formação desses anticorpos está sob rígido controle no indivíduo sadio. Entretanto, a resposta anormal a componentes próprios pode ser desencadeada pela quebra do controle ativo de tolerância imunológica resultando na produção de altos títulos de anticorpos auto-reativos, como por exemplo, aqueles que reagem com ácidos nucleicos nas suas mais diversas formas, e que eventualmente causam lesão tecidual.

Os auto-anticorpos são marcadores de muitas doenças auto-imunes. Em algumas delas, como a miastenia grave e a tireodite de Hashimoto, os auto-anticorpos são claramente patogênicos. Em outras doenças, como lupus eritematoso e a artrite reumatóide, existe uma forte associação entre o surgimento de anticorpos na circulação do paciente com especificidades particulares e o início das manifestações clínicas, porém, a contribuição desses anticorpos para patogenia não é tão clara (Diamond *et al.*, 1992).

A etiologia do lupus eritematoso sistêmico (SLE), o protótipo das doenças auto-imunes, não é conhecida, mas o marco imunológico dessa doença é a presença de anticorpos anti-nuclear e de vários outros auto-anticorpos nas suas mais diversas formas (fita simples, dupla fita- formas B e Z-, duplêx de RNA/DNA e triplêx) nesses pacientes, assim como, em modelos de animais com essa doença. A maioria desses anticorpos não tem associação direta com a doença em si, mas os anticorpos anti-DNA podem estar envolvidos nessa patogenia (Kotzin, 1996). Enquanto a patofisiologia do SLE é complexa, existem evidências em alguns estudos que sugerem que esses auto-anticorpos são responsáveis por alguns danos, particularmente as doenças renais, que são sintomas comuns nesta patologia e ocorre pela formação de imunocomplexos inflamatórios com DNA circulante que se depositam no glomérulo renal, induzindo inflamação e com o tempo a perda da função renal (Mandaio, 1999).

Outros estudos apontam que uma forma de ação desses auto-anticorpos seria a ligação de altos títulos de anticorpos a anticorpos anti-DNA (anti-idiotipos) nos pacientes com SLE. A presença desses anticorpos anti-idiotipo favoreceriam a formação de imunocomplexos patogênicos com os anticorpos anti-DNA (Leung *et al.*, 2000), que originaria um desequilíbrio na rede idiotípica proposta por Jerne, em 1974. Além disso, estudos usando células sanguíneas periféricas mostraram que anticorpos anti-DNA, em conjunto com o próprio DNA, são capazes de mimetizar o efeito de indutores de citocinas normalmente encontrados nos pacientes com SLE.

Neste tipo de paciente, os anticorpos anti-DNA estão sempre associados com a manifestação da doença e são encontrados, na maioria das vezes, anticorpos IgG com alta afinidade para ácidos nucléicos dupla fita. Porém, auto-anticorpos anti-DNA produzidos em pacientes que não possuem SLE podem ser participantes “naturais” do repertório normal de imunoglobulinas e, em geral, são IgM que reagem principalmente com DNA fita simples ou desnaturado. Eles são normalmente polireativos e derivados de genes não mutados ou com poucas mutações (Rioux *et al.*, 1995).

A origem desses anticorpos ainda não é clara. Eles podem ser o resultado ou de uma ativação policlonal ou de uma disfunção na regulação da resposta imune para um antígeno endógeno ou exógeno, ou ambos (Zouali, 1992). Podem ainda, estar ligados a uma perda de tolerância em um processo dependente de linfócitos T e B (Painter *et al.*, 1986) ou podem estar ligados a anticorpos normais contra determinados antígenos que, por uma única substituição de aminoácido na molécula da imunoglobulina, dariam origem a afinidade ao

DNA (Diamond e Scharff, 1984). Certos vírus e bactérias apresentam antígenos de estrutura homóloga a antígenos próprios forçando o organismo a uma resposta auto-imune devido ao impasse causado por um mimetismo molecular.

Mesmo não estando clara a origem e o seu papel nestas patologias, esses anticorpos circulantes que reagem com DNA *in vitro* são importantes, pois são muitos usados como marcadores de diagnóstico e prognóstico em exames laboratoriais (Roben *et al.*, 1996). Além da participação em doenças, os anticorpos anti-DNA podem ser considerados modelos para interações proteínas-ácidos nucléicos ou ainda ser utilizados como sondas para conformações específicas de ácidos nucléicos (Stollar, 1992).

O DNA de mamífero é um imunógeno fraco. Já o de origem bacteriana induz a formação de anticorpos, no entanto estas imunoglobulinas não reconhecem ácidos nucléicos de eucariotos (Putterman & Diamond, 1998). Artificios como a imunização de animais com complexos DNA-proteína, com o objetivo de se conseguir resposta anti-DNA, inclusive seqüência específica têm sido propostos (Cerutti *et al.*, 2001). Outra alternativa tem sido a utilização de estruturas como o Z-DNA, DNA tripla-fita, híbrido DNA-RNA que são potentes imunógenos, pois o DNA, em sua forma B é um componente ubíquo e reatividade contra ele desencadearia um processo auto-imune, sendo então normalmente tolerados em indivíduos sadios.

1.4- Anticorpos anti-DNA fita simples (anti-ssDNA)

Diversos anticorpos anti-DNA já foram isolados de pacientes com SLE e de modelos de animais com esta doença. Grande parte destes anticorpos teve sua atividade ligante caracterizada e/ou seu gene clonado e analisado. A atividade de reconhecimento a DNA fita dupla (dsDNA) é mais restritiva que para fita simples (ssDNA). Esta conclusão foi obtida a partir de trabalhos que mostraram que anticorpos que reconhecem ssDNA, normalmente apresentam alguma ligação residual a dsDNA, não sendo o inverso verdadeiro (Kalsi *et al.*, 1996).

Apesar da pequena disponibilidade de dados cristalográficos específicos para os anticorpos anti-DNA, os cristais e os modelos produzidos para anticorpos anti-DNA dupla e tripla fita, revelam algumas diferenças marcantes entre os sítios de ligação a antígeno destes

anticorpos e os de anti-ssDNA. Segundo Barry e colaboradores (1994), os sítios de ligação ao antígeno de anticorpos anti-duplex tendem a ser mais planos que aqueles de anticorpos anti-ssDNA.

Anticorpos anti-ssDNA também são encontrados no soro de pacientes com SLE. Dentre as poucas estruturas cristalográficas de auto-anticorpos disponíveis está a do anticorpo auto-imune que reconhece DNA de fita simples, o BV 04-01. Esse anticorpo teve sua estrutura cristalográfica determinada em suas formas complexadas ao antígeno e não ligada (Herron *et al.*, 1991). Esse anticorpo é seqüência-específica e, em solução, possui afinidade por cadeias de polideoxinucleotídeos maiores de seis nucleotídeos.

De acordo com dados cristalográficos, a ligação ao antígeno pode ocorrer por interação das CDR de ambas as cadeias tanto com o esqueleto açúcar-fosfato, quanto com as bases nitrogenadas, o que justificaria o reconhecimento de determinadas seqüências. O sítio de ligação ao antígeno apresenta-se como uma grande fenda irregular entre os topos de VH e de VL, com uma largura de aproximadamente 11,5 Å, compatível com a acomodação de apenas uma fita de DNA. A ligação ao antígeno parece ocorrer por formação de pontes de hidrogênio entre os átomos das bases nitrogenadas e de resíduos de aminoácidos presentes nas CDRs, por empilhamento, e poucas ligações eletrostáticas entre esses resíduos e o esqueleto açúcar-fosfato.

1.5- Bibliotecas de Anticorpos Apresentadas em Fagos: Phage Display

A primeira evidência experimental do uso de anticorpos foi proposta pelo médico alemão Emil Adolf Von Behring, que demonstrou, juntamente com Shibasaburo Kitasato, a utilização de imunoglobulinas para neutralizar a toxina diftérica, fato que gerou grande revolução no pensamento científico da época. Por este feito, recebeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1901 (Nobelpreis, 2004).

Paul Ehrlich foi médico e bacteriologista alemão, agraciado com o Prêmio Nobel de Medicina de 1908 por trabalhos sobre as teorias da imunidade (Nobelpreis, 2004). Ele propôs a teoria da cadeia lateral (*side-chain*), da formação do anticorpo, muito semelhante ao pensamento atual sobre os receptores de superfície. Referia-se a essas novas moléculas como balas mágicas (*Magic bullets*), pela sua capacidade de encontrar o antígeno-alvo e, por meio

de interações específicas, neutralizá-lo e destruí-lo. Demonstrou também que poderiam ser de grande interesse na aplicação terapêutica.

No ano de 1975, os médicos imunologistas Georges Jean Franz Köhler, e César Milstein, – ganhadores do prêmio Nobel de medicina de 1984, pelo desenvolvimento da tecnologia de hibridomas e dos princípios de anticorpos monoclonais- provaram que, da fusão de células tumorais capacitadas para sobreviver e se reproduzir em cultura com linfócitos de animais imunizados, originavam-se os hibridomas produtores de anticorpos monoclonais (Véliz, 2002).

Uma enorme expectativa foi gerada em torno da possibilidade de uso dos anticorpos para o tratamento de inúmeras doenças. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais com especificidade definida e disponibilidade ilimitada reviveu o interesse da comunidade científica e sua aplicação como forma de terapia. Contudo havia um impedimento ao emprego dessa nova descoberta. Por serem de origem animal, mais precisamente de camundongos, o uso em seres humanos gerava uma resposta de anticorpos humanos contra aqueles de origem murina, denominada resposta HAMA (*human anti-mouse antibody*). O desenvolvimento de anticorpos pelo hospedeiro, gerando resposta imune contra imunoglobulinas administradas, culminava na neutralização destas ou forte reação imune. Isso foi um grande desalento para o meio científico no que diz respeito à sua utilização como agente terapêutico, pois leva o paciente a sofrer com as fortes reações alérgicas, podendo inclusive chegar à anafilaxia. (Schroff *et al.*, 1985).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e engenharia genética, foram possíveis as primeiras tentativas de minimizar este potencial imunogênico por meio da obtenção de anticorpos quiméricos, fusionando-se as regiões da cadeia leve e da cadeia pesada do anticorpo de camundongo, com as cadeias constantes de imunoglobulinas humanas. Contudo, essas moléculas, ainda imunogênicas, geravam a resposta HACA (*human anti-chimeric antibody*) pelos anticorpos humanos anti-quiméricos. Para contornar este problema, outro método foi desenvolvido. Este preconiza o transplante das regiões determinantes de complementaridade – CDRs murinas, para a região variável das cadeias leves e pesadas do arcabouço da molécula de anticorpo humano, que, além disso, mantêm as cadeias constantes da imunoglobulina humana, buscando assim diminuir sua imunogenicidade (Maranhão e Brígido, 2001).

Atualmente é possível aplicar, em laboratório, métodos que visam dirigir artificialmente, a evolução molecular em função de objetivos predeterminados. Uma das

metodologias mais empregadas atualmente é a construção de bibliotecas conformacionais, que são definidas como uma população de ligantes em potencial, composta por (bio)moléculas de formas variantes. Quanto maior o número de formas representadas na biblioteca, mais fácil será encontrar um ligante afim (Posner *et al.*, 1994). Vários tipos dessas bibliotecas foram descritos e entre elas, destacam-se aquelas produzidas em sistemas vivos como os bacteriófagos filamentosos, bactérias e leveduras (Scott, 1993).

Os fagos filamentosos (M13, d1, fd, entre outros), pertencem à família *Inoviridae* de bacteriófagos, possuindo como material genético DNA circular de fita simples (ssDNA) envolvidos em um capsídio protéico cilíndrico. A infecção viral ocorre via *pillus* sexual de células de bactérias Gram negativas que apresentam o gene desta fimbria especial codificando o plasmídeo F. A liberação das partículas virais, que são produzidas a cada ciclo, se realiza a partir da extrusão do DNA pela membrana e nenhum destes processos ocorre lise celular.

A partícula viral esquematizadas na figura 4 é composta pelo genoma viral e por cinco proteínas estruturais. No capsídio do fago estão presentes as proteínas pIII, pVI, pVIII, pVII e pIX. No fago selvagem, encontra-se cerca de 2.800 cópias da proteína pVIII, que formam o corpo cilíndrico e flexível. Nas extremidades desse capsídio encontra-se de três a cinco cópias das demais proteínas estruturais. A extremidade distal contem as proteínas pVII e pIX, enquanto que a proximal é composta pelas proteínas pIII e pVI (Makowisk, 1993).

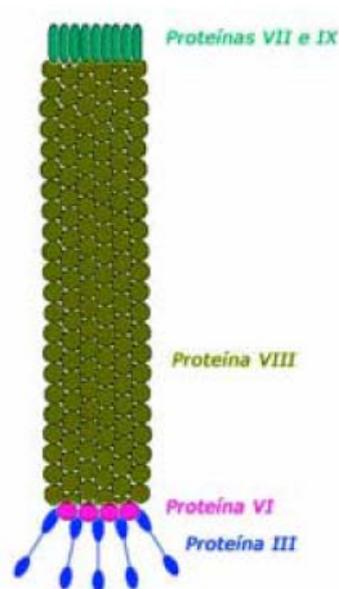


Figura 4- Organização estrutural de uma partícula viral do bacteriófago M13 (Brígido e Maranhão, 2002).

Em 1985, Smith desenvolveu uma técnica denominada *Phage Display* que se baseia na utilização de bacteriófagos para a produção de proteínas de interesse, uma vez que a fusão de peptídeos exógenos à porção amino-terminal da proteína III de bacteriófagos, não impedia a montagem da partícula viral e possibilitava a incorporação do peptídeo exógeno ao capsídeo viral. A expressão da proteína de fusão no capsídeo de fagos ocorria de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante. Por manipulação genética, introduz-se uma biblioteca de DNA codificando milhões de variantes ligantes fusionados ao gene que codifica uma das proteínas do capsídeo viral (pIII ou pVIII). Esses plasmídios são utilizados para transformar células bacterianas, que são posteriormente infectadas de partículas virais contendo a proteína de interesse acoplada ao seu capsídeo viral (Posner *et al.*, 1994)

Diversas estratégias têm sido descritas para a manipulação desses genes com vista à obtenção de sistemas eficientes para a expressão das bibliotecas (Smith, 1993). Uma das formas encontradas para superar os problemas da manipulação do DNA viral (RFDNA) foi a utilização de fagomídios (que são plasmídios que possuem além da origem de replicação ativa em *E. coli*, a origem de replicação de fagos filamentosos, que contém todos os elementos em *cis* para a síntese da fita complementar e replicação viral, bem como o sinal de empacotamento do DNA fita simples) como vetores para a construção de bibliotecas (O'Connell *et al.*, 2002). A maior vantagem deste sistema é a possibilidade do gene da proteína de fusão se propagar na forma de plasmídio. Dependendo do promotor utilizado, este plasmídio pode ser amplificado de forma regular até o momento da infecção com o fago auxiliar.

Nesses sistemas, células transformadas com os fagomídios são infectadas por um fago auxiliar que contém todos os genes do bacteriófago filamentosos e o gene de replicação defeutivo, permitindo desta maneira o resgate dos fagomídios sob forma de partícula viral. A maior vantagem desse sistema é a possibilidade do gene da proteína de fusão se propagar na forma de um plasmídio sendo esse de manipulação mais fácil que o DNA viral. O esquema geral de um fagomídio utilizado para a produção de bibliotecas na superfície de bacteriófagos filamentosos está representado na figura 5. Dentre os elementos constituintes mais importantes destacam-se: as origens de replicação de *E. coli* e de fagos, o gene que confere resistência a antibiótico, o promotor que dirige a transcrição do gene de fusão e a sequência líder responsável pela citolocalização do produto de fusão.

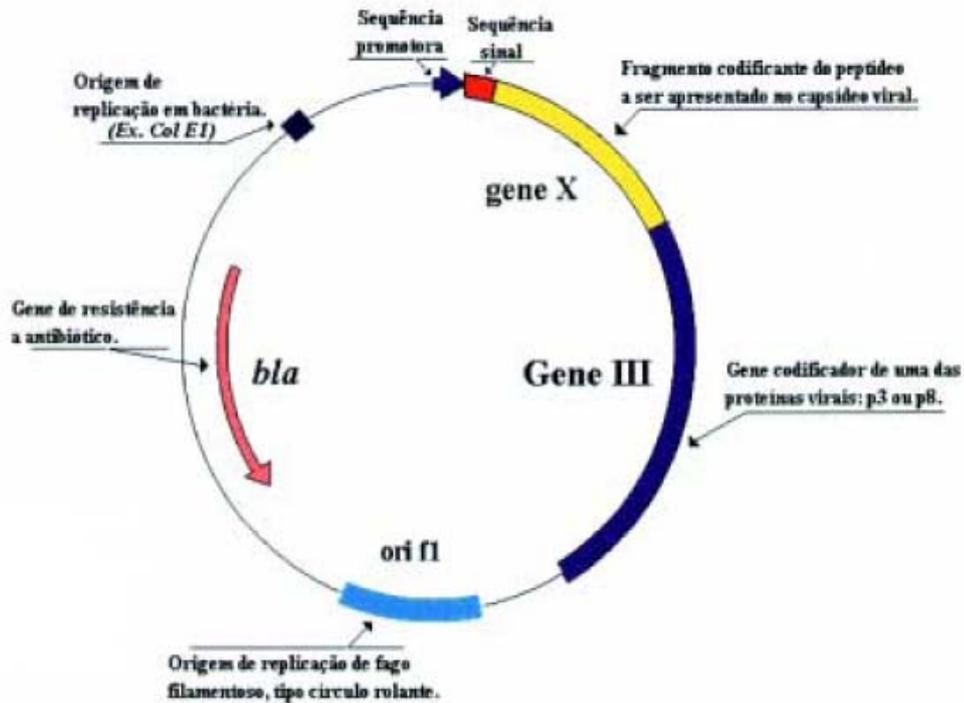


Figura 5- Representação esquemática de um fagomídio hipotético para a construção de bibliotecas conformacionais na superfície de partículas virais. (Brígido & Maranhão, 2002).

Bibliotecas de fagos apresentando peptídeos exógenos em sua superfície são utilizadas em ciclos de seleção repetitivos, constituídos das seguintes etapas: seleção pela ligação comum a molécula alvo imobilizada, lavagens para eliminação dos fagos não ligados, eluição daqueles remanescentes, reamplificação a partir da infecção em bactérias hospedeiras (Daugherty *et al.*, 1998).

Os genes de anticorpos foram utilizados nas primeiras bibliotecas eficientemente expressas na superfície de fagos. A utilização dessas moléculas recombinantes selecionadas a partir de bibliotecas apresentadas em fagos, cujo maior objetivo é o desenvolvimento de novos agentes para o uso em pacientes humanos, vem crescendo muito nos últimos anos na medicina e na biotecnologia e é o mecanismo pelo qual os anticorpos monoclonais humanos com alta especificidade (como por exemplo, o anticorpo Humira, já aprovado pela FDA) podem ser selecionados sem utilizar a convencional técnica de tecnologia de hibridomas. O isolamento desses anticorpos específicos de um repertório imunológico requer uma biblioteca grande e diversificada, assim como procedimentos eficientes de seleção (Hoogenboom *et al.*, 1998).

A maioria das grandes bibliotecas combinatoria existentes é baseada em genes de imunoglobulinas humanas. Entretanto, uma das alternativas para se conseguir anticorpos reativos a antígenos conservados durante a evolução dos mamíferos é a imunização de outros doadores como coelhos, camelos, gado, ovelhas e galinhas (Wyngaardt *et al.*, 2004).

1.6- Conversão Gênica e Geração de Diversidade das Cadeias Variáveis de Anticorpos de Galinha

As aves apresentam órgãos linfóides diferentes daqueles observados em mamíferos. A Bursa de Fabricius é o órgão linfóide localizado sobre a parede dorsal da cloaca, onde são formados os linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos em galinhas. Este órgão está presente em aves saudáveis até elas alcançarem a maturidade sexual, surgindo no quinto dia da vida embrionária como um divertículo dorsal da cloaca, diferenciando-se até que no vigésimo dia a maioria das células são linfócitos B diferenciados. Após quatro semanas da eclosão do ovo, a bursa involui e não é mais capaz de gerar células B (Weill e Reynaud, 1987).

Em ambos os *loci* (IgH e IgL) existe apenas um único segmento V funcional – V_{H1} e V_{L1}- para os *loci* de cadeia pesada e leve, respectivamente. Anteriormente a estes segmentos encontramos grupos de pseudogenes, que no caso do *locus* IgL são encontrados aproximadamente 25 segmentos (grupo de genes que ocupa 20 kb do genoma da galinha) e no *locus* IgH 80 segmentos. Eles são considerados pseudogenes, pois não codificam nenhuma proteína funcional. Tratam-se de seqüências homólogas a segmentos V com menos de 100 pb, truncadas na porção 5' e/ou na porção 3'. Além disso, alguns destes pseudogenes também apresentam alterações na fase de leitura (Reynaud *et al.*, 1987).

Posteriormente ao V_{L1} encontra-se o único segmento J_L, espaçado deste por uma região de aproximadamente 1,8 kb. Cerca de 1,6 kb após encontramos o domínio constante lambda C_λ. O locus IgH tem organização similar ao IgL. Logo após o V_{H1} encontramos aproximadamente 16 segmentos D, distribuídos em aproximadamente 15kb e posteriormente a este, um único segmento J_H do *locus* da cadeia pesada. O segmento constante μ localiza-se aproximadamente 22 kb após o segmento J_H (Figura 6) (Reynaud *et al.*, 1989).

Depois da colonização da bursa de Fabricius por progenitores de células B, existe um curto período da vida embrionária definida quando ocorre o rearranjo envolvendo o único segmento V funcional de ambos *loci* (Thompson e Neiman, 1987). Para a geração da cadeia leve V_L1 é rearranjado com J_L e para a cadeia pesada, V_H1 com D e J_H . Este evento de recombinação ocorre no estágio embrionário e apenas durante um tempo limitado, não sendo mais observado após a eclosão do ovo (McCormack *et al.*, 1989). Outra diferença marcante com o sistema murino e humano é que parece não haver uma seqüência de rearranjo entre os *loci* IgH e IgL, ocorrendo ambos ao mesmo tempo. Uma vez que há apenas um segmento gênico V e um J para cada uma das cadeias, a diversidade gerada pelo rearranjo é limitada.

A maioria dos clones de células B no 18º dia de vida embrionária já está rearranjada e este processo não ocorre mais na bursa. A partir daí acontece o processo de conversão gênica, que é o grande responsável pela variabilidade observada nos anticorpos de galinha. Durante a conversão gênica os segmentos rearranjados são trocados por pseudogenes V (Ratcliffe e Jacobsen, 1994) (Figura 6). Este é um processo que ocorre em *cis* e é direcional: sempre do pseudogene para a seqüência rearranjada aceptora. Ocorre em altas taxas e é dependente de homologia, ou seja, ocorre preferencialmente entre os pseudogenes mais homólogos à seqüência aceptora que está no *locus* rearranjado. Além do evento dependente de homologia, este processo inclui também eventos não modelares como, por exemplo, a observação de que é normal a presença de mutações pontuais e inserções nas extremidades do segmento convertido (Weil e Reynaud, 1995). A conversão é um evento estocástico que envolve a troca de grandes pedaços de DNA de 10 a 100pb e, surpreendentemente, ocorre com alto grau de precisão, uma vez que poucos erros foram detectados em clones convertidos analisados (Weil e Reynaud, 1987).

Apesar do mecanismo de conversão gênica das imunoglobulinas de galinha ainda não estar totalmente elucidado, tanto em galinhas como nos mamíferos, os genes rearranjados e posteriormente convertidos sofrem também o processo de hipermutação somática. É comum a observação de mutações ao longo dos CDR e arcabouços e algumas mutações já foram encontradas, inclusive nas regiões constantes. Os três processos juntos conferem uma taxa de modificação em relação ao gene terminal de cerca de 1 a 2×10^{-3} , compatíveis com os níveis encontrados em mamíferos (Arakawa *et al.*, 1996).

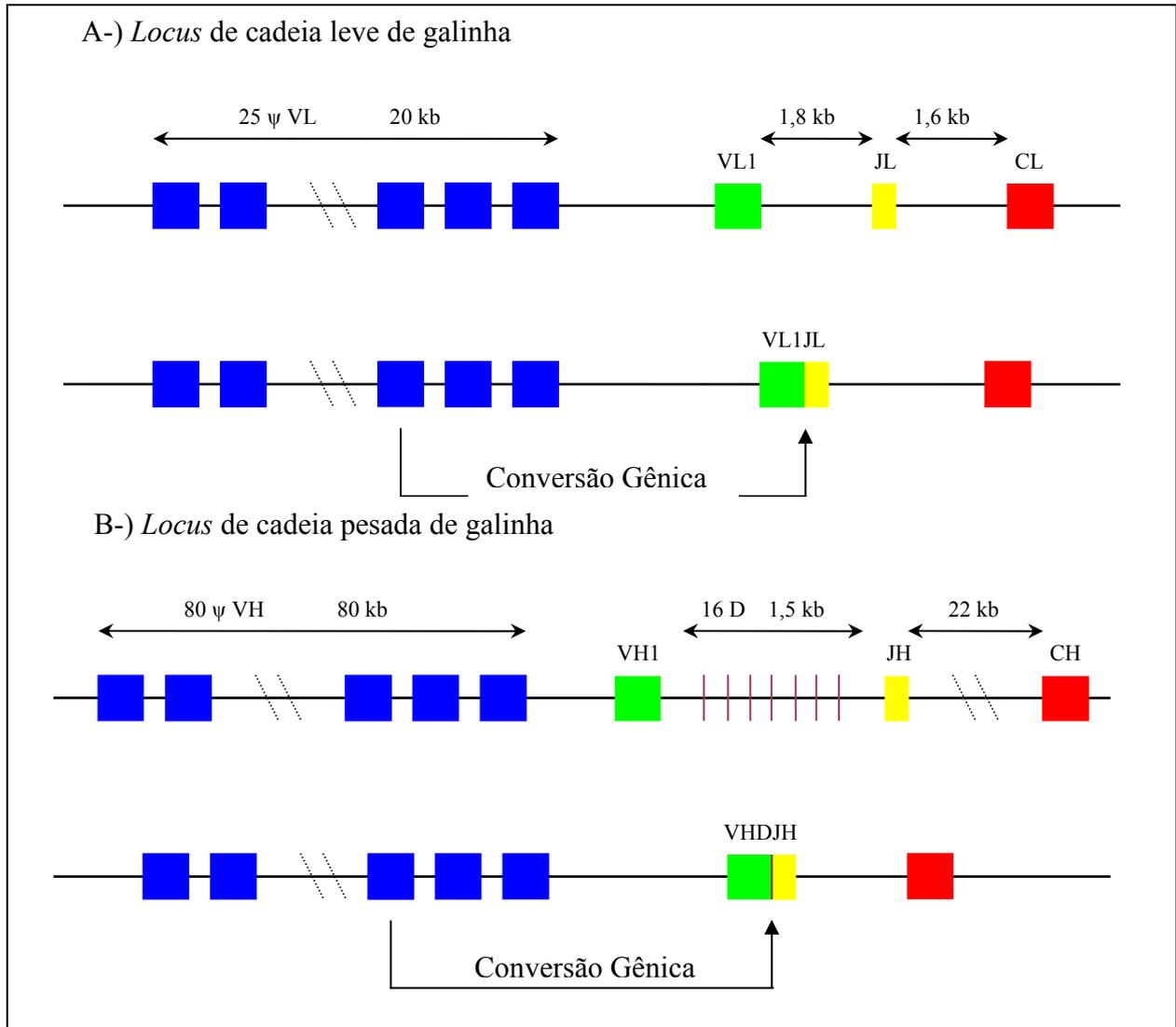


Figura 6 - Organização dos *loci* de imunoglobulinas de galinha e eventos de conversão gênica.

A-) *Locus* da cadeia leve: apresenta cerca de 25 pseudogenes (caixas azuis) distribuídos em 20 kb, um único segmentos funcional VL1 (caixa verde), o segmento JL em amarelo e o segmento codificador da cadeia constante (caixa vermelha). B-) *Locus* da cadeia pesada: apresenta cerca de 80 pseudogenes (caixas azuis) distribuídos em aproximadamente 80 kb. O padrão das cores adotado foi o mesmo para a cadeia leve, excetuando-se os segmentos D, exclusivos da cadeia pesada (linhas roxas). Os espaçamentos entre as regiões assim como os eventos de conversão gênica em ambos *loci* estão indicados.

1.7- Anticorpos de Galinha como Reagentes Alternativos

A capacidade de induzir uma resposta imune é variável entre os diferentes antígenos e isto se deve principalmente ao processo de tolerância, que refere a um estado de não-reatividade específica para um determinado antígeno ou grupos de antígenos. A tolerância pode ser induzida para antígenos não-próprios, mas o aspecto mais importante da tolerância é a autotolerância, que impede que o organismo elabore um ataque contra seus próprios constituintes.

Essa tolerância também pode ser observada em protocolos de imunização nos quais ela pode se manifestar quando baixas doses de antígeno são administradas ao animal experimental ou ainda quando este antígeno apresenta um grande número de epitopos homólogos ao repertório antigênico do animal. Uma forma de diminuir as manifestações e efeitos da tolerância é utilizar animais com uma maior distância evolutiva em relação à espécie doadora do antígeno (Andris-Widhoph *et al.*, 2000a)

Pode-se dizer que, enquanto em camundongos e homens o evento de rearranjo é o principal contribuinte para a geração da diversidade do repertório das imunoglobulinas, em aves e em galinhas, em especial, o evento de rearranjo ocorre preferencialmente no sentido de fornecer um substrato para a conversão gênica, processo que gera a maior parte da variabilidade.

A geração de bibliotecas de fragmentos de anticorpos apresentados na superfície de bacteriófagos filamentosos, utilizando galinhas como fonte para tal procedimento, foi proposto em 1995 por Davies e colaboradores (Davies *et al.*, 1995). A amplificação dos genes codificadores para as cadeias leve e pesada de um animal imunizado ou não, é facilitada pelo evento de conversão gênica, conforme explicado anteriormente. As bibliotecas são facilmente construídas uma vez que um único VH e um único VL são usados em cada locus e recombinam-se com um único JH e um único JL. Os eventos de conversão não afetam as regiões líder e constantes destes segmentos gênicos, permitindo que um único par de iniciadores (Tabela 1) para cada cadeia seja capaz de amplificar, por PCR reverso todo o repertório imune do animal (Andris Widhopf *et al.*, 2000a). Fragmentos de anticorpos com alta especificidade e afinidade já foram obtidos utilizando-se bibliotecas do repertório de galinhas imunizadas apresentadas na superfície de bacteriófagos. Dentre estes, destacam-se anticorpos anti-anticorpos do clã III murino (Cary *et al.*, 2000), anti-fluoresceína, anti-

albumina murina sérica (Yamanaka *et al.*, 1996) e antilisozima do ovo, tiroglobulina bovina e albumina bovina sérica (Davies *et al.*, 1995).

A utilização de aves como fonte de anticorpos se constitui ainda em uma alternativa para conseguir anticorpos reativos a antígenos conservados durante a evolução dos mamíferos (Andris-Widhopf *et al.*, 2000b). Além disso, a região constante das imunoglobulinas de galinha apresenta características distintas daquelas mostradas pelas mesmas regiões de imunoglobulinas de mamíferos. Dentre estas, destacam-se a não ligação com as proteínas A e G e com o fator reumatóide humano. Tais características podem ser exploradas em vários ensaios imunológicos (Yamanaka *et al.*, 1996).

Tabela 1- Comparação de animais utilizados para a construção de bibliotecas combinatórias de anticorpos (Barbosa *et al.*, 2004)

Animal	Quantidade de Imunógeno/ injeção (µg)	Número de Iniciadores para V _H ^a	Número de Iniciadores para V _L ^{a,b}	Número total de Reações de PCR ^c
Homem	---	6 – 5' 2 – 3'	4 – capa 5' 1 – capa 3 9- lambda 5 1- lambda 3'	25
Camundongo	50	19 – 5 4 – 3	17 – capa 5' 3 – capa 3 1- lambda 5' 1-lambda 3'	Normalmente utilizam-se misturas dos iniciadores, fazendo-se reações com populações mistas dos iniciadores.
Coelho	200	4 – 5' 1 – 3'	3 – capa 5' 3 – capa 3' 1 - lambda 5' 1- lambda 3'	14
Galinha	200	1 – 5' 1 – 3'	1 – 5' 1 – 3'	2

a- Os iniciadores são os propostos por Andris-Widhopf *et al.*, 2000b e contém degenerações para amplificar todos os genes codificadores das cadeias variáveis leves e pesadas. Os iniciadores 5' são complementares à extremidade 5' dos segmentos gênicos V, enquanto os iniciadores 3' são complementares aos segmentos gênicos J.

b- Os iniciadores das cadeias leves foram listados de acordo com os *loci* capa ou lambda.

c- As amplificações são resultado das combinações dos iniciadores 5' e 3' de cada *loci*. No caso de camundongo para se evitar mais de 120 reações de amplificações se utiliza o artifício de fazer misturas com diferentes razões molares proporcional à frequência relativa dos segmentos gênicos no repertório murino.

Objetivos

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Produção, purificação e caracterização dos fragmentos de anticorpos anti-ssDNA isolados a partir de uma biblioteca de scFvs de galinha apresentada na superfície de bacteriófagos selecionados pela capacidade de ligação a Oligo dT.

2.2 ETAPAS METODOLÓGICAS

- Transformação da bactéria *Escherichia coli* (TOP 10) com o plasmídeo pComb3x codificador dos scFvs selecionados;
- Produzir no sobrenadante de cultura de *Escherichia coli* (TOP 10), transformada com os plasmídeo codificadores dos scFvs selecionados, as proteínas recombinantes;
- Purificação dos fragmentos dos anticorpos anti-ssDNA e caracterização dos mesmos, quanto ao nível de pureza e massa molecular;
- Caracterização da especificidade e afinidade do reconhecimento antigênico de DNA fita simples, por ELISA, com diferentes competidores;
- Análise de modelos de interação Antígeno- Anticorpo.

Resultados Anteriores

RESULTADOS ANTERIORES

3.1 Construção da Biblioteca Combinatória de scFV de galinha

A construção da Biblioteca de scFv de galinha anti-ssDNA foi realizada pelo **grupo de Imunologia Molecular, da Universidade de Brasília**, a partir de cDNA de galinhas da raça *Red/Black Cornish Cross*, previamente imunizadas com o hapteno isotiociano de fluoresceína (FITC), conjugado a BSA. O cDNA foi utilizado como molde para a amplificação dos genes V com iniciadores específicos. Na segunda reação de PCR, os fragmentos VH e VL foram misturados em proporções iguais para gerar os scFvs. Posteriormente, foi feita a digestão dos scFvs obtidos por PCR e do vetor pComb 3X com a enzima *Sfi* I para se obter produtos com extremidades coesivas compatíveis para a ligação (figura 7) (Maranhão, 2001).

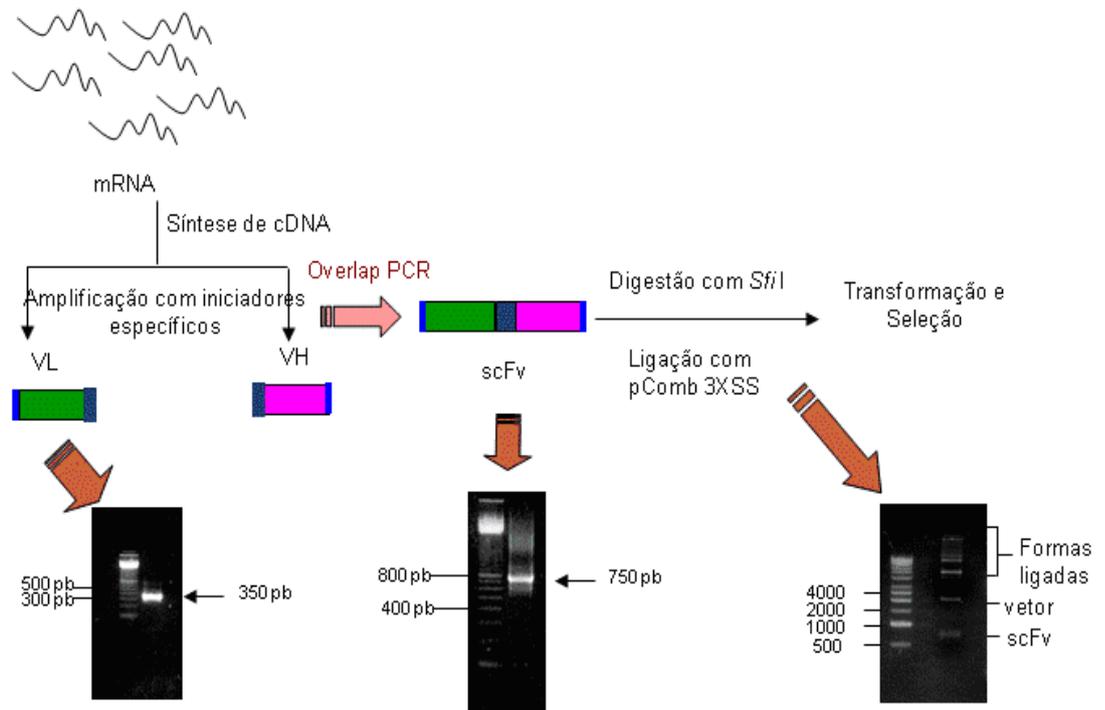


Figura 7- Estratégia de Construção da Biblioteca de scFv de Galinha. Representação esquemática da obtenção dos scFvs após a mistura dos fragmentos VH e VL gerados por PCR. Abaixo estão confirmados cada passo com as fotos do gel de agarose 0,8% (Maranhão, 2001).

3.2 Estratégia utilizada na seleção de anticorpos ligantes a ssDNA, a partir de uma biblioteca de scFv de galinha

Após a construção da biblioteca combinatória, foi realizada a seleção de partículas virais de fusão ligantes a ssDNA (Figura 8). O antígeno escolhido foi DNA fita simples, imobilizado em resina de celulose (resina de Oligo-dT celulose). Após a adição de Oligo-dT-celulose, eram realizadas centrifugações e lavagens, para eliminação dos não ligados, seguidas de eluição utilizando oligo-dT livre, não complexado.

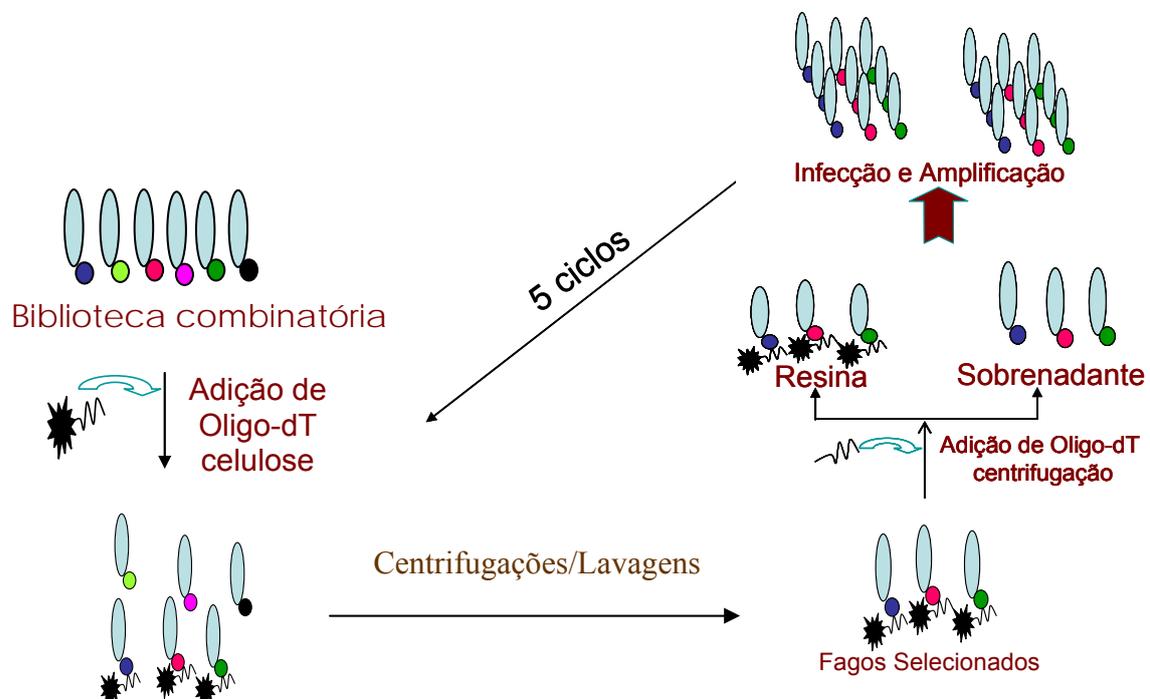


Figura 8- Representação esquemática da seleção de anticorpos ligantes a ssDNA. A biblioteca de scFv de galinha construída foi incubada com a resina de oligo dT – celulose. Em seguida, os fagos sem capacidade de ligação foram lavados por sucessivas centrifugações e ressuspensões em PBS. A eluição foi realizada adicionando-se oligo-dT não ligado, diluído em PBS. Após a centrifugação, tanto o sobrenadante (contendo os fagos que se soltaram da resina) quanto a própria resina (que continha os fagos que permaneceram ligados) foram utilizados para infectar células de *Escherichia coli* da linhagem XL1-Blue. A partir de então, essas duas subpopulações de fagos foram amplificadas, e aqueles obtidos no sobrenadante foram eluídos sempre na presença do antígeno (oligo-dT solúvel), enquanto que os oriundos da infecção com a própria resina, não foram eluídos, sendo que a própria resina, após as lavagens, era utilizada no procedimento de amplificação dos fagos, nos ciclos subsequentes. O número de lavagens variou ao longo dos ciclos, sendo 6 no ciclo 1, 10 nos ciclos 2 e 3 e 15 nos ciclos 4 e 5 (Maranhão, 2001).

Após a eluição tanto os fagos que se desligavam da resina (eluídos com o antígeno solúvel, presentes no sobrenadante), quanto àqueles que permaneciam ligados à resina (antígeno adsorvido) eram utilizados para amplificação.

Realizou-se o crescimento de clones dos ciclos 4 e 5 em placas *Deep Well* em condições de indução. Foram selecionados clones produtores de scFv com anticorpo anti-HA e scFvs ligantes a ssDNA por reconhecimento de Oligo dT-biotinilado, ambos por meio de imunoenensaio do tipo *Dot Blot*. Os clones com capacidade de ligação ao Oligo dT foram seqüenciados, alinhados e analisados em relação a composição das CDRs das cadeias leve e pesada (Tabela 2). A partir daí foram selecionados quatro scFvs (B10, D03, F03 e H07) para a caracterização em relação a afinidade e especificidade.

Tabela 2 –

Análise dos clones de scFv selecionados pela ligação a Oligo-dT celulose – Ciclos 4 e 5

Clone	Ciclo	L1 (Seq)	#	L2 (Seq)	#	L3 (Seq)	#	H1 (Seq)	#	H2 (Seq)	#	H3 (Seq)	#
A01	4S	SGGSGSYG	8	SNNQRPSN	8	GSFDRGTGGVGI	12	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
B03	4S	----	----	----	----	----	----	GTFNSYNMG	10	IGNSGTIHTSYGPAVQG	12	TTCYGSWTGCAGSIDA	16
C01	4S	SGGGNRYGSSYG	12	SNDKRPSP	8	GGYDRNTYVGI	11	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTIYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
C02	4S	SGGYRYG	7	WDDKRPSP	8	GSYDSSSADSM	11	GFSFGDRGLY	10	ISNTGRHTKYGAAVQV	11	GTSGYNSVGEIDV	14
C03	4S	----	----	WDDKRPSP	8	GSRDSSADG	9	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
D01	4S	SGGSGSYG	8	NNNRPSP	8	GGYDSSYAAI	11	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
D02	4S	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQV	11	GTSVYNSVGEIDA	14
E01	4S	SGGSCNYG	8	YNDKRPSP	8	GAYDYSSTAI	10	----	10	----	----	----	----
E02	4S	SGSSGSYG	8	DNTNRPSP	8	GSRDDNTHVGI	11	GFTFTNYGMA	10	IGSTGSSTAYGPAVQG	11	TNSGYIYGANSIDA	14
E03	4S	SGSSKNYG	8	DNDKRPSP	8	GAWDSISAV	9	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQV	11	GTSGYNSVGEIDV	14
F02	4S	SGSSYYG	8	QNNQRPSN	8	GSCDRNRAGI	11	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
F03	4S	SGGSSSYYG	10	NNNRPSP	8	CNGGSSDT	8	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
G02	4S	SGSSSGYG	8	SNNKRPSP	8	GSYDSSYVGI	11	----	10	----	----	----	----
G03	4S	SGGSGRYG	8	SNDKRPSP	8	GSWDDNAGI	9	GFSFGDRGLY	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTTLYNSAGEIEA	14
A05	4R	SGGSGNYG	8	YNDKRPSP	8	GAYDYSSTAI	10	GTFSDRGMV	10	ISSTGRYTNYSFVKG	11	GASGYSTDAGLIDA	14
B04	4R	SGSRNNYG	8	CNDKRPSP	8	GGYDSSYVGI	10	----	----	----	----	----	----
B05	4R	SGSSGRYG	8	YNDKRPSP	8	GSADSSGAI	9	GTFSSYGMH	10	----	----	----	----
B06	4R	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
C04	4R	SGGSCNYG	8	YNDKRPSP	8	GAYDYSSTAI	10	GTFSDRGMV	10	ISSTGRYTNYSFVKG	11	GASGYSTDAGLIDA	14
C05	4R	SGGSYNYG	8	SNDKRPSP	8	GNVDSTYAGI	10	GFSFGDRGLY	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	SYNSLQ???	-
C06	4R	SGSISGYG	8	QNDKRPSP	8	GSADISTYDGI	11	GTFSDRGMV	10	ISSSGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
D04	4R	SGSSGSYG	8	YNDKRPSP	8	GGWSSSAGYVGI	12	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
D05	4R	SGGSYKYG	8	SNNQRPSN	8	GSADSSYVGL	10	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIGA	13
D06	4R	SGSYSYYG	8	SNDKRPSP	8	GAWDSNSHSGI	11	GTFSDRGMV	10	ISGSSGRHTKYGAAVKG	12	GTSGYNSVGEIDV	14
E04	4R	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISSTGRYTNYSFVKG	11	GASGYSTDAGLIDA	14
E05	4R	SGSRITYG	8	NGNRPSP	8	GSADTTGAA	9	----	----	----	----	----	----
E06	4R	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSVYNSVGEIDV	14
F04	4R	SGGSGRYG	8	NSYNRPSP	8	GSWDSSTAYAGI	11	GFSFGDRGMV	10	ISNSGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
F05	4R	SGSRITYG	8	NGNRPSP	8	----	----	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
F06	4R	SGSRITYG	8	NGNRPSP	8	GSADTTGAA	9	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
G04	4R	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
G05	4R	SGGSSSYYG	9	SNDKRPSP	8	GNRDSSYVGI	10	GTFSSYGMQ	10	IDKTGSYTNYGAAVKG	11	SKYSIGDIDT	10
G06	4R	SGSSGSYG	8	NNDKRPSP	8	GSYDRTAGYVGI	11	GFSFGDRGLY	10	ISNTGRHTKYGAAVQV	11	SYNSLQ???	-
H06	4R	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISNSGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
A07	5S	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQD	11	GTSVYNSVGEIDV	14
A09	5S	SGGRYNYG	8	YNDKRPSP	8	GNADNSGYDDI	11	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQD	11	----	----
B08	5S	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISNSGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
C07	5S	----	----	----	----	----	----	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	----	----
D07	5S	SGGSGSYG	8	NNNRPSP	8	GGYDSSYAAI	11	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
C09	5S	SGSSYYG	8	SNDKRPSP	8	GAYDSTTYVAM	11	GFSFGDRGLY	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	SYNSLQ???	-
D07	5S	SGGSGSYG	8	NNNRPSP	8	GGYDSSYAAI	11	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
D09	5S	SGSSRYG	8	SNDKRPSP	8	GSADRSTHAGL	11	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQV	11	GTSGYNSVGEIDV	14
E10	5S	SGGSGSYG	8	NNNRPSP	8	GGYDSSYAAI	11	GTFSSYGMH	10	ISA'VGSWTGYGAAVKG	11	DGYDGN'YAGQIDA	13
F07	5S	----	----	----	----	----	----	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
H07	5S	SGSRITYG	8	NGNRPSP	8	GSADTTGAA	9	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
A11	5R	SGGSGRYG	8	NTYNRPSP	8	GTKDSSGSSI	10	----	----	----	----	----	----
A12	5R	----	----	----	----	----	----	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
B11	5R	SGISGGYGYG	10	GSRRKRPSP	8	GSYDSSYVGL	11	GTFSSYGMH	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
F03	5R	SGGSGSYG	8	SNNQRPSN	8	GSFDRGTGGVGI	12	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
C10	5R	----	----	NNNRPSP	8	GSYDSRYDGI	10	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	----	----
C11	5R	SGGGSYG	8	SNDKRPSP	8	GSRDSSYVGI	10	GTFSSYGMH	10	INGVGSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
C12	5R	SGGSSNYG	9	HNNKRPSP	8	GSYDSSYVGI	11	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
D10	5R	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTTGYNSVGEIDA	14
D12	5R	----	----	----	----	----	----	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
E10	5R	SGRGSYG	8	SNDKRPSP	8	GSFDSSTYAAI	11	----	----	----	----	----	----
E11	5R	SGGGRYNYG	9	RNDKRPSP	8	GSADSSYAAI	9	----	----	----	----	----	----
E12	5R	SGGSGSYG	8	NNNRPSP	8	GGYDSSYAAI	11	----	----	----	----	----	----
F10	5R	SGGSGNYG	9	SNDKRPSP	8	GNVDNEYVGI	10	GTFSDRGMV	10	ISNSGRHTKYGAAVQD	11	GTSGYNSVGEIDV	14
F11	5R	SGGSGSYG	8	SNDKRPSP	8	GSYDSSYVGV	12	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
F12	5R	SGGSGRYG	10	SNDKRPSP	8	GSYDSSYVGI	12	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEI??	14
G10	5R	SGGSGSYG	8	NNNRPSP	8	GGYDSSYAAI	11	GTFSSYGMH	10	ISGVSWTGYGAAVKG	11	DGYGGSYAGQIDA	13
D03	5R	SGSSSYYG	9	NNDKRPSP	8	GSYDRTAGYVGI	12	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
H11	5R	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISNTGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14
H12	5R	----	----	----	----	----	----	GTFSDRGMV	10	ISNSGRHTKYGAAVQG	11	GTSGYNSVGEIDV	14

A primeira coluna, denominada clone, se refere aos nomes dados aos clones selecionados dos ciclos 4 e 5; a coluna ciclo está relacionada ao ciclo que o clone foi selecionado: 4S (quarto ciclo, sobrenadante), 4R (quarto ciclo, resina), 5S (quinto ciclo, sobrenadante) e 5R (quinto ciclo, resina). As colunas L1, L2 e L3 são referentes às sequências das CDRs 1, 2 e 3 da cadeia leve, respectivamente. As colunas H1, H2 e H3 são referentes às sequências das CDRs 1, 2 e 3 da cadeia pesada, respectivamente. # indica o número de aminoácidos presente em cada CDR.

Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Célula

4.1.1.1 Linhagem Bacteriana

- **Top 10** – F⁻, *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) [Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1*, *deoR* PCR Cloning Kit, *araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galU galK* (InvitrogenTM life *rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* technologies], Invitrogen[®].

Essa linhagem foi utilizada para produção de proteína recombinante na forma solúvel.

4.1.2 Plasmídio Utilizado

- **pComb3X S – f(-)** – 4,0 kb, promotores *plac*, *ori* ColE1, *ori* f1, *Amp^R* e imediatamente após a região de clonagem do gene do anticorpo possui uma região com seis histidinas (H6) para purificação em coluna de níquel ou para detecção com Ac monoclonal anti-His Tag. Contêm ainda uma região codificando os resíduos que constituem o epitopo de hemaglutinina, que possibilita sua detecção com o anticorpo anti-HA. Apresenta o códon de terminação âmbar (TAG) não reconhecido eficientemente por linhagens supressoras (Sup E44), como a XL-1 Blue ou TG1, permitindo assim a expressão de proteínas de fusão ou a produção de anticorpos livre da proteína III, na forma solúvel em algumas linhagens bacterianas não supressoras. Possui a seqüência codificadora para parte da proteína III de bacteriófagos filamentosos (Scott e Barbas, 2000).

4.1.3 Oligonucleotídeos utilizados

Os oligonucleotídeos foram solubilizados em água Mili-Q para concentração de uso de 10 pmoles/ μ L para o seqüenciamento e 100 pmol no caso dos Oligos utilizados na caracterização. A tabela 3 mostra as seqüências de cada um dos oligonucleotídeos.

Tabela 3. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados.

Oligo	Seqüência	Utilização
mmb4	5' GCT TCCGGCTCGTATGTTGTGT 3'	Seqüenciamento dos scFvs presente no plasmídeo pComb 3X, a partir do VL
mmb5	5' CGT TTGCCATCT TTTCATAATC 3'	Seqüenciamento dos scFvs presente no plasmídeo pComb 3X, a partir do VH
Oligo dT-biotina	5' /5Bio-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	Antígeno
Oligo dT	5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	Antígeno para a competição
Oligo dA	5' AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'	Antígeno para a competição
Oligo dC	5' CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC 3'	Antígeno para a competição
Oligo dG	5' GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 3'	Antígeno para a competição
Oligo dU	5' UUUUUUUUUUUUUUUUUUUU 3'	Antígeno para a competição

4.1.4 Soluções estoques de Inibidores de Proteases

PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) 0,1 M

Solubilizado em isopropanol e estocado a temperatura ambiente por até 1 ano. É um inibidor de serino e tiol proteases como, por exemplo, tripsina, quimiotripsina, trombina, papaína etc. Concentração final de 1 mM.

EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 0,5M

Solubilizado em água, pH 8-9, estocado a 4°C por até 6 meses. É um inibidor de metaloproteases. Concentração final de 5 mM.

4.1.5 Meios de Cultura e soluções para bactérias

Meio LB (*Luria-Bertani*)

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)

pH 7,0.

Meio LB ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,4% (p/v).

Meio SB (*Super Broth*)

Peptona de caseína	3,0% (p/v)
Extrato de levedura	2,0% (p/v)
MOPS	1,0% (p/v)

pH 7,0.

Meio SOB

Bacto-triptona	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,06% (p/v)
KCl	0,002% (p/v)

pH 7,0.

Meio SOC

Meio SOB	98 mL
Solução estoque de Mg ₂₊ 2 M	1 mL
Solução estoque de glicose 2 M	1 mL

Solução estoque de glicose 2 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução estoque de Mg₂₊ 2M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Após dissolver os reagentes em água destilada, todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C por 15 minutos.

4.1.6 Soluções e tampões de uso geral

Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5% (p/v)

Esta solução era utilizada para a conservação dos tampões PBS e PBS-T e nas soluções estoque dos anticorpos em concentração final de 0,05% (p/v).

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Glicogênio

Glicogênio 20mg/mL

Glicerol – Solução estoque

Glicerol 50% (v/v)

Tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 10X, pH 7,4

NaCl 1,5 M

Na₂HPO₄ 0,1 M

NaN₃ 0,02% (p/v)

Tampão PBST 1X, pH 7,4

PBS 1X acrescido de Tween 20 na concentração final de 0,1% (v/v)

4.1.7 Soluções e material para preparo de células competente, transformação e indução – bactéria

Solução de CaCl₂

CaCl₂ 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

Solução de CaCl₂ + 10% de Glicerol (v/v)

CaCl₂ 50 mM

Glicerol 10%

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

Glicerol 50% (v/v)

Esterilizado por filtração e estocada a 4°C

IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) 1M

Foram dissolvidos 0,238g de IPTG em 1mL de água milli Q, em seguida a solução foi esterilizada por filtração em membrana de ester de celulose de 0,2μm de diâmetro e estocada a -20°C.

4.1.8 Soluções para extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris-HCl pH 8,0 25 mM

EDTA pH 8,0 10 mM

Glicose 50 mM

Solução II

NaOH 0,2 M

SDS 1,0% (p/v)

Solução III

Acetato de potássio 3 M

Ácido Acético 2 M

pH ajustado para 4,8 - 5,0

RNase A

RNase A (Invitrogen[®], nº de catálogo 12091-021).

Clorofane

Fenol equilibrado em pH 7,6	1 v
Clorofórmio	1 v
β-hidroxiquinilona	0,05% (p/v)
Equilibrado com 0,1v de Tris-HCl 100 mM pH 7,6	

Clorofil

Clorofórmio	24 v
Álcool isoamílico	1 v
Equilibrado com 0,25 v de tampão TE	

Etanol 100%

Etanol 100% (v/v)

Etanol 70%

Etanol 70% (v/v)

Isopropanol 100%

Isopropanol 100% (v/v)

Acetato de sódio 3 M, pH 4,8

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de pequena escala.

Acetato de amônio 7,5 M

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de larga escala.

4.1.9 Tampão de Endonuclease de Restrição

O Tampão de enzima de restrição empregado foi comercializado pela *New England Biolabs*[®]:

NEB 2

Tris-HCl pH 7,9	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM

4.1.10 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida**Tampão de corrida TEB 10X**

Trizma base		0,89 M
Ácido Bórico		0,89 M
EDTA		0,02 M
dH ₂ O	q.s.p. pH 8,0	1 L

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

Tampão de corrida TEB 20X	50% (v/v)
Glicerol	50% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno Cianol	0,1% (p/v)

Solução de brometo de etídeo 20.000X

Brometo de etídeo	10 mg/mL
-------------------	----------

Tampão de corrida para SDS-PAGE 5X

Trizma base	125 M
Glicina	125 mM
SDS	0,5% (p/v)

Tampão de amostra 5X para SDS-PAGE

Tris-HCl pH 6,8	250 mM
SDS	10% (p/v)
Glicerol	50% (v/v)
β -mercaptoetanol	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0,5% (p/v)

Acrilamida 30% (29:1)

Acrilamida	145 g
Bis-acrilamida	5 g
dH ₂ O	q.s.p. 500 mL

Estocar a 4°C ao abrigo da luz.

Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

Tris	36,34 g
dH ₂ O	q.s.p. 200 mL

Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

Tris	12,11 g
dH ₂ O	q.s.p. 200 mL

SDS 10%

SDS	10 g
dH ₂ O	q.s.p. 100 mL

APS 10% (p/v)

Persulfato de amônio 100 mg/mL de água

TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina)

Gel Concentrador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	4% (p/v)
--	----------

Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

Gel Separador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	10% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8	400 mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

4.1.11 Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com *Comassie Brilliant Blue (R-250)*

Solução Fixadora para Coloração com *Comassie*

Etanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

Solução Corante *Comassie Brilliant Blue R-250*

Comassie brilliant blue R-250	1% (p/v)
Etanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

Solução Descorante para Coloração com *Comassie*

Etanol	20% (v/v)
Ácido acético	5% (v/v)

4.1.12 Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (ELISA, *Western*, *Dot blotting* e Imunoprecipitação)

Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)

Tris-HCl	pH 9,5	100 mM
NaCl		100 mM
MgCl ₂		5 mM

Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas

Trizma-base	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,037% (p/v)
Metanol	20% (v/v)

Solução de Bloqueio

Leite em pó desnatado	5% (p/v)
Dissolvido em PBS-T 1X	

Solução de Bloqueio com BSA

BSA	3% (p/v)
Dissolvido em PBS 1X	

Solução Reveladora para ELISA

pNPP (para-nitro-fenil-fosfato)	1 mg/mL
Dissolvido em APB	

Solução Reveladora para *Western* e *Dot blotting*

O NBT (Nitro Blue Tetrazole) e o BCIP (5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato) eram preparados numa solução estoque de 50 mg/mL. O NBT solubilizado em N,N-dimetil formamida e o BCIP, em água. Para preparar 10 mL da solução reveladora, adicionavam-se

66 µL do estoque de NBT em 10 mL de APB e em seguida 33 µL do estoque de BCIP. Esta ordem deve ser respeitada para se evitar a precipitação dos reagentes.

Membrana de Nitrocelulose

Hybond-C Extra (Amersham[®] Bioscience n.º catálogo. RPN 303E)

Placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços com fundo chato para ELISA

(Nunc[®], Polysorp e Maxsorp, n.º catálogo: 456537 e 467320, respectivamente)

His Grab[™] Nickel Coated Plates (clear, 8-well strip) para ELISA (Pierce n.º catálogo: 15142)

Placa de microtitulação Nunc immobilizer streptavidin F96 clear para ELISA (Nunc[®], n.º catálogo: 436014)

Oligo(dT)-celulose tipo 7 (Amersham Biosciences n.º catálogo: 27-5543-02)

FITC (Sigma n.º catálogo: F7550)

Concentração estoque: 5 mM

Concentração de uso: 0,1; 1 e 10 µM

4.1.13 Coluna de cromatografia de afinidade

HiTrap[™] HP 1mL (GE healthcare, n.º catálogo. 17-0402-01). Para purificação dos fragmentos de anticorpos.

4.1.14 Soluções para cromatografia de afinidade

Tampão de ligação HisTrap

Fosfato de Sódio 20 mM,

Cloreto de Sódio 0.5 M

Imidazol 20-40 mM

pH 7,4 e filtrado em membrana com poros de 0,45 μm

Tampão de Eluição HisTrap

Fosfato de Sódio	20 mM
Cloreto de Sódio	0.5 M
Imidazol	500 mM

pH 7,4 e filtrado em membrana com poros de 0,45 μm

4.1.15 Materiais utilizados para concentração de sobrenadantes de cultura e proteínas purificadas

Concentradores Amicon[®] Bioseparations:

- Centriprep YM-10 (nº. catálogo 4307)
- Concentrador: Stirred Ultrafiltration Cell Millipore, Modelo 8400 (nº. catálogo: 5124)
- Membrana: Ultrafiltration Membrane. NMWL: 10.000 (nº. catálogo: 13642)

4.1.16 Filtros

Membrana com poros de 0,22 μm : Millipore Corporation (nº. catálogo: SLGV025LS)

Membrana com poros de 0,45 μm : Millipore Corporation (nº. catálogo: SLHV033RS)

4.1.17 Marcadores moleculares para DNA e proteína

1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen[®] nº. catálogo: 10787-026)

Fragmentos de DNA em pb: 100; 200; 300; 400; 500; 650; 850; 1.000; 1.650; 2.000; 3.000; 4.000; 5.000; 6.000; 7.000; 8.000; 9.000; 10.000; 11.000; 12.000.

1 kb DNA Ladder (Invitrogen[®] nº. catálogo: 15615-016)

Fragmentos de DNA em pb: 201; 220; 298; 344; 396; 500; 517; 1.018; 1.636; 2.036; 3.054; 4.072; 5.090; 6.106; 7.126; 8.144; 9.162; 10.180; 11.198; 12.216.

Low Mass DNA Ladder (Invitrogen[®] n.º catálogo: 10068-013)

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 2.000; 1.200; 800; 400; 200 e 100. Utilizando 2 µL do marcador, corresponde a massa de 100; 60; 40; 20; 10 e 5 ng, respectivamente.

High Mass DNA Ladder (Invitrogen[®] n.º catálogo: 10496-016)

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 10.000; 6.000; 4.000; 3.000; 2.000 e 1.000. Utilizando 2 µL do marcador, corresponde a massa de 100; 60; 40; 30; 20 e 10 ng, respectivamente.

Page Ruler[™] Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas[®] n.º catálogo: SM1811)

Fragmentos de proteínas em kDa: 250; 130; 100; 70; 55; 35; 27; 15 e 10.

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas[®] n.º catálogo: SM0431)

Fragmentos de proteínas em kDa: 116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4; 14,4.

4.1.18 Kits comerciais

QIAprep Spin Miniprep Kit (250) - Para preparação plasmidial em pequena escala (Qiagen[®], n.º catálogo 27106).

Qiaquick PCR purification kit 50 – Para purificação de DNA para seqüenciamento (Qiagen[®], n.º catálogo 28104).

PlusOne Silver Staining kit Protein. Para coloração de géis de poliacrilamida com prata. (GE Lifescience, n.º catálogo. 17-1150-01).

Qubit[®] Fluorometer - para quantificação de proteínas. Invitrogen (n.º catálogo: Q32860)

4.1.19 Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA, *Western Blot* e *Dot Blot*.

Anti – HA (Santa Cruz Biotechnology – Y11 n° catálogo: SC-805)

Soro policlonal produzido em coelho, anti epitopo de hemaglutinina (HA).

Concentração: 1,8 mg/mL

Titulação de uso: 1:1500 (ELISA e *Western blot*)

Anti – IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (Zymax™ n° catálogo: 81-6122)

Anticorpo anti IgG de coelho, produzido em cabra, conjugado a fosfatase alcalina.

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:2500 (*Western blot* e *Dot blot*) 1:3000 (ELISA)

ExtrAvidina (Sigma Immuno Chemicals n° catálogo: E-2511)

Concentração: 2 mg/mL

Titulação de uso nos experimentos de ELISA: 100 µg/mL

Estreptoavidina – conjugada a fosfatase alcalina (Sigma® n° catálogo:E-2636)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso nos experimentos de ELISA: 1:3000.

4.1.20 Enzima de restrição

SfiI (New England Biolabs n° catálogo R0123S)

20 U/mL

4.1.21 Antibióticos

Ampicilina

A ampicilina liofilizada foi ressuspendida em água milli Q na concentração de 20 a 50 mg/mL. Após a ressuspensão, ela foi esterilizada por filtração em membrana de ester de celulose 0,22 µm de diâmetro e estocadas em pequenas alíquotas a -20°C, sob o abrigo da luz.

O agente anti-microbiano, utilizado como marca de seleção, foi adicionado aos meios de cultura nas concentrações finais indicadas nos protocolos da seção Métodos.

Carbenicilina

A carbenicilina liofilizada foi ressuspensa em água milli Q na concentração de 100 mg/mL. Após a ressuspensão, ela foi esterilizada por filtração em membrana de ester de celulose 0,22 µm de diâmetro e estocadas em pequenas alíquotas a -20°C, sob o abrigo da luz. O agente anti-microbiano, utilizado como marca de seleção, foi adicionado aos meios de cultura nas concentrações finais indicadas nos protocolos da seção Métodos.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação de DNA plasmidial

4.2.1.1 Em pequena escala (adaptado de (Sambrook e Russel, 2001)).

- 1- Coletavam-se 3,0 mL de cultura de células de *Escherichia coli*, transformadas com o(s) plasmídeo(s) de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37°C, por meio de duas centrifugações de 5 min a 5.000 rpm em microtubos de 1,5 mL, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação.
- 2- Ressuspendia-se o sedimento em 200 µL de Solução I. Incubavam-se as amostras no gelo por 5 min.
- 3- Adicionavam-se 400 µL de Solução II e homogeneizavam-se as amostras, invertendo-se gentilmente o tubo várias vezes. Incubavam-se à temperatura ambiente por 5 min.
- 4- Adicionavam-se 300 µL de Solução III, repetindo-se o mesmo procedimento de homogeneização e incubava-se no gelo por 10 min.
- 5- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 6- Ao sobrenadante eram adicionados 5 µL de RNase A e incubava-se por 1 hora a 37°C.
- 7- Adicionavam-se 300 µL de clorofane e, após forte homogeneização, centrifugava-se por 5 min a 5.000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.
- 8- Adicionavam-se 300 µL de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.
- 9- Adicionavam-se 2,0 v de etanol absoluto gelado e incubava-se a -20°C por no mínimo 2 horas.
- 10- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.
- 11- Adicionava-se 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 12- Secava-se o sedimento a vácuo ou por simples exposição ao ar.
- 13- Ressuspendia-se o sedimento em 50 µL de TE. As amostras eram conservadas a -20°C.

4.2.2 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.

Realizavam-se as digestões dos plasmídios utilizados com enzimas de restrição conforme instruções dos fabricantes. O tempo de incubação e a quantidade de material a ser digerido variavam de acordo com o interesse do experimento realizado.

4.2.3 Análise de DNA plasmidial em gel de agarose (Sambrook e Russel, 2001).

Preparava-se a agarose de 0,7 a 1,0% em tampão TEB 1X com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. Aplicavam-se as amostras de DNA com tampão de amostra para gel de agarose no gel e submetiam-se à eletroforese em tampão TEB como descrito por (Sambrook e Russel, 2001). Para visualização do DNA incidia-se luz ultravioleta no gel utilizando-se um transluminador (UVP[®]-M26) e a imagem era digitalizada em aparato de fotodocumentação.

4.2.4 Preparação de células competentes e transformação bacteriana

4.2.4.1 Por choque térmico-CaCl₂ (adaptado de Maranhão, 2003).

- 1- Inoculavam-se 500 µL de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada da célula de interesse, em 50 mL de meio LB. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD_{600nm}) de 0,1 a 0,3.
- 2- Centrifugava-se a 3.000 *x g* por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante (Após essa etapa é importante que em todas as etapas subsequentes as células sejam mantidas resfriadas para evitar uma perda de eficiência).
- 3- O sedimento era ressuspendido em 10 mL de solução de CaCl₂ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 4- Centrifugava-se a 3.000 *x g* por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante.
- 5- Ressuspendia-se o sedimento em 1 mL de solução de CaCl₂ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 6- Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo aliquotavam-se as células e estas podiam ser usadas por um período máximo de 24 horas.

- 7- Incubavam-se de 100 a 200 μL de célula competente com o plasmídio de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.
- 8- Procedia-se o choque térmico incubando-se o sistema de transformação em banho a 42°C por 3 min.
- 9- Adicionava-se imediatamente 1 mL de meio LB e incubava-se por 1 h a 37°C .
- 10- Semeavam-se quantidades variáveis do sistema de transformação em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina a $150 \mu\text{g/mL}$. Mantinham-se as placas na estufa a 37°C por 16 horas.

4.2.5 Seqüenciamento

Após ter sido realizada uma análise de restrição, seqüenciava-se os scFvs utilizando-se o seqüenciador automático MegaBACE 500 Plus(Molecular Dinamics[®]).

4.2.5.1 Reação de seqüenciamento com o Kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE 500 Plus (Molecular Dinamics[®]).

- 1- Os oligonucleotídeos utilizados foram: mmb5 para a cadeia pesada (VH) e mmb4 para os genes da cadeia leve (VL).
- 2-As reações eram realizadas conforme instruções do fabricante:

DNA		150 ng
Iniciador		10 ρmoles (tipicamente 1 μL)
DYEnamics ET Terminator pré-mix		4 μL
H ₂ O	q.s.p	10 μL

Aplicavam-se as amostras no MegaBACE 500Plus de acordo com as instruções do fabricante, sendo em geral injetadas a uma voltagem de 1 a 2 kVa por 60 a 120 segundos. Realizava-se a corrida por 100 minutos a 9 kVa.

4.2.5.2 Seqüenciamento automático de DNA e análise de seqüências.

Analisavam-se as seqüências obtidas por meio do seqüenciamento automático utilizando-se ferramentas de bioinformática: Phred e CAP3 disponíveis na página: www.biomol.unb.br. Depois da análise de qualidade, as seqüências eram submetidas à ferramenta de procura de alinhamentos básicos locais (BLAST, do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para análise de identidade com seqüências já depositadas no *GenBank*. Manipulavam-se e analisavam-se as seqüências obtidas com seqüências depositadas em um banco de dados pessoal utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 2007).

4.2.6 Produção dos scFvs

4.2.6.1 Produção dos scFvs em pequena escala

- 1- Espalhava-se o produto da transformação em placas de petri contendo meio LB-ágar suplementado com ampicilina para concentração final de 100 µg/mL e incubava-se durante a noite a 37°C.
- 2- Inoculavam-se os clones isolados das placas durante a noite a 37°C, sob agitação, em 1mL de meio SB contendo carbenicilina a uma concentração final de 100 µg/mL e 0,5 % de glicose em tubos de rosca.
- 3- No dia seguinte, inoculavam-se 20 mL do meio SB com 1 mL do pré-inóculo de *E. coli* crescido durante a noite.
- 4- Incubava-se a cultura a 37°C sob agitação até a cultura atingir uma A_{600} de 0,9. Logo após, adicionava-se IPTG para concentração final de 5 mM.
- 4- Incubava-se a cultura a 30°C durante 16 horas sob agitação de 300 rpm. Retirava-se alíquotas de 1 mL nos intervalos de tempo 0, 2 e 16 horas de indução.

4.2.6.2 Produção dos scFvs em média escala

- 1- Espalhava-se o produto da transformação em placas de petri contendo meio LB-ágar suplementado com ampicilina para concentração final de 100 µg/mL e incubadas durante a noite a 37°C.
- 2- Inoculavam-se os clones isolados das placas durante a noite a 37°C, sob agitação, em 5mL de meio SB contendo carbenicilina a uma concentração final de 100 µg/mL e 0,5 % de glicose em tubos de rosca
- 3- No dia seguinte, inoculavam-se 100 mL do meio SB com 2 mL do pré-inóculo de *E. coli* crescido durante a noite.
- 4- Incubava-se a cultura a 37°C sob agitação até a cultura atingir uma A_{600} de 0,9. Logo após, adicionava-se IPTG para concentração final de 5 mM.
- 4- Incubava-se a cultura a 30°C durante 16 horas sob agitação de 300 rpm. Retirava-se alíquotas de 1 mL nos intervalos de tempo 0, 2 e 16 horas de indução.

4.2.7 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

Realizava-se a purificação dos scFvs recombinantes na coluna HiTrap HP 1mL (GE healthcare).

- 1- Preparava-se a bomba peristáltica preenchendo-a com tampão de ligação. Retirava-se a tampa da parte superior da coluna e conectava-se a mangueira da bomba peristáltica a coluna cromatográfica gota a gota.
- 3- Lavava-se a coluna com 3-5 volumes de água destilada.
- 4- Equilibrava a coluna com 5 volumes de tampão de ligação mantendo o fluxo de passagem do tampão pela coluna em 1 mL/min.
- 4- Aplicava-se o sobrenadante de cultura filtrado e concentrado, de acordo com os itens 4.1.16 e 4.2.13 de Materiais, respectivamente.
- 5- Lavava-se a coluna com 10-15 volumes de tampão de ligação.

6- Passava-se o tampão de eluição para retirada dos scFvs ligados a resina e limpeza da coluna. O material era coletado em 10 tubos de *eppendorf*, num volume de 1mL para cada um.

7- Lavava-se a coluna com mais 10 volumes de tampão de ligação.

8- Aplicava-se etanol 20%, no qual se estocava novamente a resina a 4°C.

Imediatamente após o fim da coleta, aplicavam-se 5µL de cada amostra em uma membrana de nitrocelulose para análise por *Dot Blotting*, seguindo o protocolo do item 4.5 de métodos. Além disso, a eluição era monitorada tanto pelo Quibit como por leitura espectrofotométrica a 280 nm, 260 nm e 230 nm, a fim de avaliar a eficiência do processo de eluição e determinar a fração com maior concentração de proteína. Em seguida os valores obtidos foram calculados por meio da fórmula, segundo Brígido (2003):

$$\text{Concentração de proteína em mg/mL} = K3 \times A_{280 \text{ nm}} - K4 \times A_{260 \text{ nm}},$$

$$\text{onde } K3 = 1,55 \text{ e } K4 = 0,76$$

4.2.8 Análise de proteínas por *Dot Blotting* (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

1- Adicionavam-se de 5 µL das frações obtidas durante o processo de purificação diretamente a uma membrana de nitrocelulose.

2- Com a membrana seca, contendo as proteínas ligadas, procedia-se o bloqueio, utilizando leite em pó desnatado 5%, por 2h a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C. 3 - Após essa etapa a membrana era lavada 3X com PBS – T 1X.

4- Incubava-se com o anticorpo anti-HA na diluição de 1:1500 por 1 hora a temperatura ambiente.

5- Após essa etapa a membrana era lavada 3X com PBST 1X.

6- Incubava-se com o anticorpo anti-IgG de coelho (feito em cabra) conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:2500 por 1 hora a temperatura ambiente.

7- Após essa etapa a membrana era lavada 3X com PBS T 1X e uma vez com APB.

8- Adicionava-se a solução reveladora (NBT/BCIP). O aparecimento das bandas coloridas era controlado visualmente. Após a reação, lavava-se a membrana com água destilada até retirar o

excesso da solução reveladora e interromper a reação da enzima. Preservava-se a membrana seca, sobre papel filtro.

4.2.9 Precipitação de proteína com TCA

- 1- Transferiam-se os sobrenadantes de cultura para tubos *ependorf*. Adicionava-se TCA para a concentração final de 10% e incubava-se no gelo por pelo menos 30 minutos.
- 2- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C em microcentrífuga.
- 3- Descartavam-se os sobrenadantes e os sedimentos eram gentilmente lavados com 1mL de acetona gelada. Deixava-se em repouso no gelo por pelo menos 15 minutos e repetia-se o passo 3 mais uma vez.
- 4- Descartava-se a acetona e os tubos deixados em repouso por aproximadamente 15 minutos para secar o sedimento. Ressuspendiam-se os sedimentos em 25 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e procedia-se a análise em gel de poliacrilamida.

4.2.10 Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

Após a purificação dos scFvs procedia-se a análises em gel desnaturante de poliacrilamida.

- 1- Inicialmente preparava-se o gel separador em concentração de 10% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.
- 2- A partir daí, logo após a adição da solução do gel concentrador preparado em concentração de 4% (p/v), introduzia-se o pente para permitir a formação dos poços, tendo a sua polimerização catalisada por 0,12% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.
- 3- Uma vez polimerizado o gel, acoplava-o ao aparato de eletroforese. Antes da aplicação das amostras, lavavam-se os poços com tampão de corrida.
- 4- Imediatamente antes da aplicação das amostras (já preparadas com o tampão de amostra), procedia-se a fervura das mesmas em banho-maria a 100°C por 10 minutos.
- 5 – Procedia-se a aplicação das amostras e iniciava-se a corrida do gel a 20 mA por gel.

6- Após a corrida do gel, realizavam-se os procedimentos de coloração com *Comassie Brilliant Blue* (R-250) ou prata, especificados respectivamente no item 4.2.11. de métodos. E a realização de *Western Blotting*, onde o gel era submetido à transferência para membrana de nitrocelulose, especificada no item 4.2.12 de métodos.

4.2.11 Coloração do gel de SDS-PAGE

4.2.11.1 Com *Comassie Brilliant Blue* R-250.

- 1- Após a eletroforese colocava-se o gel em solução fixadora por 30 minutos, sob agitação, a temperatura ambiente.
- 2- Descartava-se a solução anterior e incubava-se o gel com a solução de *Comassie* R-250 por no mínimo 2 horas ou durante a noite, sob agitação.
- 3- Aplicava-se a solução descorante em 4 etapas: 15 min, 45 min, 120 min, 120 min. Trocando-se a solução descorante a cada etapa.
- 4- O gel era guardado na solução preservadora.

4.2.11.2 Com prata

Realizava-se a coloração com prata com o kit *PlusOne Silver Staining kit Protein* (GE Lifescience) segundo instruções do fabricante.

4.2.12 Análise de proteínas por *Western Blotting* (adaptado de (Sambrook e Russel, 2001).

Após a corrida, transferia-se o gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema de transferência semi-seca com eletrodos de grafite (Pharmacia-LKB[®]).

- 1- Conforme instruções do fabricante, fazia-se um "sanduíche" de papéis de filtro, previamente embebidos em tampão de transferência contendo, nessa ordem, 6 papéis de filtro, a membrana, o gel e mais 6 papéis de filtro.

- 2- Colocava-se o "sanduíche" entre os eletrodos de grafite e submetia-se a uma corrente elétrica de $0,8 \text{ mA/cm}^2$ de membrana por 1h 45 min.
- 3- Após este procedimento embebia-se a membrana, contendo as proteínas transferidas, em solução de bloqueio, com leite em pó desnatado 5%, e incubava-se por 2 h à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C .
- 4- Removia-se a solução de bloqueio e lavava-se a membrana 3X com PBST 1X a temperatura ambiente.
- 5- Incubava-se com o anticorpo anti-HA na diluição de 1:1500 por 1 hora a temperatura ambiente.
- 6- Após essa etapa, a membrana era lavada 3X com PBST 1X.
- 8- Incubava-se com o anticorpo anti-IgG de coelho (feito em cabra) conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:2500 por 1 hora a temperatura ambiente.
- 9- Após essa etapa, a membrana era lavada 3X com PBST 1X e uma vez com APB.
- 7- Adicionava-se a solução reveladora (NBT/BCIP). O aparecimento das bandas coloridas era controlado visualmente. Após a reação, lavava-se a membrana com água destilada até retirar o excesso da solução reveladora e interromper a reação da enzima. Preservava-se a membrana seca, sobre papel filtro.

4.2.13 Concentração do sobrenadante de cultura utilizando o sistema Centriprep

Utilizava-se para concentração uma membrana de ultrafiltração NMWL: 10.000, a qual permite a passagem de proteínas com tamanho menor que 10 kDa e retem aquelas com massa molecular superior a isso.

- 1- Adicionava-se 20 mL de sobrenadante ao aparato e submetia-se a rotação de $3.000 \times g$ por 40 minutos. Mantinha-se o sistema a 25°C , conforme as instruções do fabricante.
- 2- Observava-se o sistema, após a centrifugação, de forma a impedir que todo o sobrenadante passasse e secasse a membrana. Quando restavam aproximadamente 5 mL de sobrenadante no sistema, retirava-se o que tinha passado pela membrana (separando num Falcon e acondicionado a 20°C) e adicionavam-se mais 15mL de PBS 1X para a troca do meio utilizado na indução.
- 3- Após a redução do volume para 5 mL, repetiam-se os passos 1 e 2 até que todo o sobrenadante fosse submetido a coluna.

4.2.14 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

4.2.14.1 ELISA – Ligação Direta

Realizava-se os ensaios do tipo ELISA para verificar a ligação dos fragmentos de anticorpos (scFvs) ao Oligo dT- biotina. Após cada lavagem as placas de microtitulação de poliestireno (Nunc[®]) eram invertidas sobre uma pilha de papel toalha e com batidas vigorosas, procedia-se a retirada completa das soluções presentes. Durante as incubações as placas permaneciam fechadas para evitar a evaporação das soluções. Os anticorpos utilizados estão detalhados no tópico 4.1.18 dos Materiais.

- 1- Sensibilizavam-se os poços de interesse na placa com 100 μ L de avidina numa concentração de 100 μ g/mL por 1 hora a temperatura ambiente.
- 2- Lavava-se 3X com 150 μ L por poço de PBST 1X. Em seguida, o bloqueio era feito com 150 μ L de BSA 3% por, no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente.
- 3- Lavavam-se 3X com PBST 1X, 150 μ L por poço e adicionava-se o Oligo dT- biotina numa concentração final de 1 μ M.
- 4- Lavava-se 3X com 150 μ L por poço de PBST 1X.
- 5- Incubavam-se 150 μ L por poço do scFv purificado, diluído em PBS 1X 1:100, e realizavam-se diluições seriadas de fator comum 3 em PBS, onde o volume final era de 100 μ L por poço e títulos de 1:1; 1:3; 1:9; 1:27 e 1:81, da solução inicial. Utilizava-se a mesma diluição para todas as amostras. As reações eram realizadas em triplicatas. Incubava-se por 1 hora a temperatura ambiente.
- 6- Lavava-se 3X com 150 μ L por poço de PBST 1X.
- 7- Incubava-se com 100 μ L por poço do anticorpo anti-HÁ (produzido em coelho), na diluição de 1:1.500, por 1 hora a temperatura ambiente.
- 8- Lavava-se 3X com 150 μ L por poço de PBS – T 3X.
- 9- Incubavam-se 100 μ L do anticorpo Anti – IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina por 1 hora a temperatura ambiente.
- 10- Lavava-se 3X com PBST 1X e uma vez com tampão para fosfatase alcalina (APB).
- 11- Revelava-se com pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) a uma concentração de 1mg/mL, 100 μ L por poço, dissolvido em APB. Incubava-se de 20 a 30 min. A partir daí a absorbância era lida

no leitor de ELISA “*Microplate Reader BioRad*”[®] modelo 450 a um comprimento de onda de 405 nm.

4.2.14.2 ELISA – Competição

Realizavam-se os ensaios do tipo ELISA sanduíche para detecção e quantificação da ligação dos scFvs aos competidores. Após cada lavagem invertiam-se as placas de microtitulação, previamente sensibilizadas com estreptoavidina (Nunc[®]), sobre uma pilha de papel toalha e realizavam-se batidas vigorosamente até a retirada completa das soluções presentes. Durante as incubações as placas permaneciam fechadas para evitar a evaporação das soluções. Os anticorpos utilizados estão detalhados no tópico 4.1.18 dos Materiais.

- 1- Lavavam-se 3X os poços de interesse na placa (previamente sensibilizada com estreptoavidina) com 100 µL de PBST cuja finalidade era garantir melhoria na leitura e um coeficiente de variação (CV%) baixo.
- 2- Incubava-se nesses poços Oligo dT- biotina numa concentração final de 1 µM, durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 3- Lavava-se 3X com PBS - T 1X, 150 µL por poço.
- 4- Adicionava-se 50 µL por poço do scFv purificado, diluído em PBS 1X 1:100, previamente incubados com os competidores (Oligo dT, Oligo dA, Oligo dC e Oligo dU) por 15 minutos em diferentes concentrações (0,1 µM; 1 µM e 10 µM) a temperatura ambiente. Realizava-se as reações em triplicatas. Incubava-se por 1 hora a temperatura ambiente.
- 5- Lavava-se 3X com PBS - T 1X e incubava-se com 100 µL por poço do anticorpo anti-HA na diluição de 1:1.500 por 1 hora a temperatura ambiente.
- 6- Lavava-se 3X com 150 µL por poço de PBST.
- 7- Incubava-se 100 µL do anticorpo Anti – IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina por 1 hora a temperatura ambiente.
- 8- Lavava-se 3X com 150 µL por poço de PBST e uma vez com 150 µL de tampão para fosfatase alcalina (APB).
- 9- Revelava-se com 100 µL por poço de pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) 1 mg/mL dissolvido em APB. Incubava-se de 20 a 30 min. A partir daí a absorbância era lida no leitor de ELISA “*Microplate Reader BioRad*”[®] modelo 450 a um comprimento de onda de 405 nm.

Resultados e Discussão

Resultados e Discussão

5.1 Seqüenciamento dos scFvs previamente selecionados.

Os fragmentos de anticorpos utilizados neste trabalho (B10, D03, F03 e H07) foram selecionados de acordo com a análise das seqüências de suas CDRs. Essa análise se baseou na freqüência com que essas regiões determinantes de complementariedade apareceram nos ciclos 4 e 5 durante a seleção dos scFvs com oligo dT-celulose (Tabela 2). Ao observamos esses ciclos podemos perceber que quanto mais refinada ficou essa seleção, mais evidente ficaram as CDRs das cadeias leve e pesada pertencentes ao clones B10 e H07. Já os clones D03 e F03 também possuem as CDRs referentes à outra cadeia pesada com alta freqüência no ciclo 5, porém, com CDRs de cadeia leve menos freqüentes. Todos esses scFvs selecionados foram seqüenciados novamente para que fosse possível confirmar suas seqüências.

Inicialmente foi preparada célula competente (tópico 4.2.4) e a linhagem TOP 10 de *Escherichia coli* foi transformada com o plasmídio pComb3x SS (Figura 9), codificador dos scFvs de interesse, por choque térmico (de acordo com 4.2.4.1 de Métodos). A linhagem bacteriana não supressora TOP 10 foi escolhida tanto para a preparação de DNA plasmidial, quanto para, posteriormente, obter os scFcs na forma solúvel.

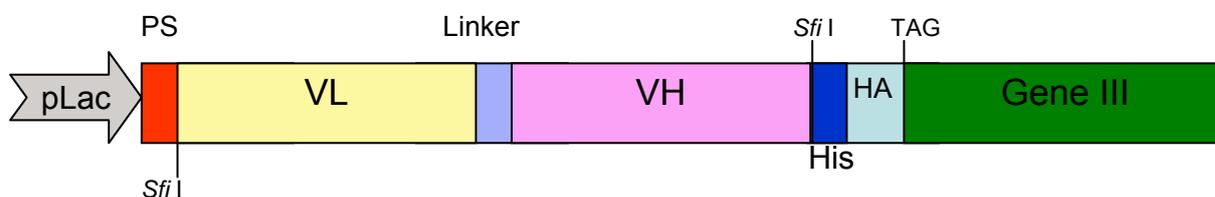


Figura 9 – Mapa do cassete de expressão do plasmídio pComb 3X SS. O vetor possui imediatamente após o gene do anticorpo, uma região codificadora de seis resíduos de histidina para purificação das proteínas solúveis em coluna de níquel ou para detecção utilizando o Ac monoclonal anti-His e, logo após o códon âmbar (que permite a produção do anticorpo sem a pIII de fusão nas linhagens bacterianas não supressoras). Além disso, possui um promotor lacZ (pLac) e uma cauda de hemaglutinina, para imunodeteção (HA).

Para confirmar a presença dos fragmentos de anticorpos foram feitas mini-preparações plasmidiais dos quatro clones e estas foram purificadas pelo Quiagen MinElute PCR Purification Kit. Realizou-se em todas as amostras a análise de restrição com a enzima *SfiI*, em gel de agarose 0,8%, e todas elas apresentaram o perfil esperado; isto é, observou-se o vetor de aproximadamente 5,0 kb e a liberação do fragmento de 700 pb, correspondente ao scFv.

Com base nos resultados obtidos nas digestões por *SfiI* e da quantificação realizada também em gel de agarose, todos os clones foram submetidos ao seqüenciamento automático para determinação das seqüências codificadoras das cadeias pesadas e leves. Foram realizadas reações usando iniciadores específicos: mmb4 e mmb5 (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). As seqüências obtidas dos scFvs foram qualitativamente analisadas, utilizando ferramentas de bioinformática (Tópico 4.2.5.2), onde observou-se que as CDRs das cadeias leves dos clones B10 e H07 são idênticas, assim como também foi possível observar grande similaridade na CDRs da cadeia pesada, diferindo apenas em apenas um único aminoácidos a mais encontrado na CDR 3 do H07. Já o D03 e F03 são completamente diferentes dos outros dois clones, pois as CDRs da cadeia leve são completamente diferentes uma da outra e já as regiões determinantes de complementariedade da cadeia pesada apresentaram seqüências idênticas, com exceção da CDR 3 do clone F03 (que não foi possível fazer uma análise uma vez que não obter a seqüência complementar), além de alta freqüência no último ciclo (Figura 10).

Nesse novo seqüenciamento, foram encontradas algumas diferenças em relação às seqüências obtidas anteriormente (Tabela 2). O clone B10, na CDR3 3H apresentou um aminoácido a menos que o anteriormente determinado. Esse fato provavelmente se deveu a erros no seqüenciamento anterior que foi realizado a partir de preparações plasmidiais menos elaboradas, em contraposição àquela que realizamos cujos plasmídios foram preparados utilizando *kits* de purificação.

As CDR3 das cadeias pesadas e leves são particularmente importantes, pois dão forma ao paratopo apresentando assim altas variações nas seqüências de aminoácidos e no comprimento das CDRs. Essas regiões apresentam mutações em relação aos segmentos germinais, além de adições de nucleotídeos (codificados pelos diferentes segmentos germinais ou oriundos do processo de recombinação somática) e deleções que conduzem essa variedade. No presente estudo, nos quatro clones observou-se uma variação de resíduos nas CDR3, sendo que uma maior diversidade foi atribuída as CDRs H3.

5.2 Produção dos scFvs anti-ssDNA.

Com o objetivo de avaliar os fragmentos de anticorpo anti-ssDNA quanto à capacidade e à especificidade de ligação ao DNA fita simples, foi planejada a produção de quatro scFvs previamente selecionados.

A expressão de proteínas heterólogas pode acarretar problemas de estabilidade do plasmídeo, levando a eventos de recombinação que podem ser negativamente selecionados (Bradbury e Marks, 2004). O vetor de expressão utilizado pertence à categoria de vetores que possuem um promotor regulável, no caso, o promotor *lacZ* do gene da β -galactosidase.

Esse promotor é imediatamente induzido a transcrever os genes sob seu controle na presença de lactose ou seu análogo, o indutor IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactosídeo). A glicose, repressora catabólica do gene *lacZ*, é utilizada com frequência para evitar que as células que expressam proteínas heterólogas tóxicas, sofram pressão negativa e façam recombinação genética, eliminando dessa forma o gene codificador da proteína exógena (Sambrook e Russel, 2001).

Além disso, nessa fase utilizamos uma linhagem bacteriana não supressora (TOP 10), a qual permite a produção dos scFvs na forma solúvel no sobrenadante de cultura na presença do indutor do promotor *lac* do pComb 3X SS. Essa linhagem, ao contrário da XL1-Blue, não possui o gene SupE44, sendo assim, o códon de parada âmbar (TAG) que existe entre a cauda de histidina (His-Tag) e o gene codificador da proteína III (pIII), será lido como um sinal de terminação da tradução. Dessa forma, a cadeia pesada será sintetizada sem a fusão com a pIII, de forma solúvel.

Durante a fase de indução das proteínas recombinantes, os clones foram crescidos em meio SB. Somente quando a cultura atingiu uma OD_{600 nm} de aproximadamente 1,0 foi adicionado então o agente indutor (IPTG) e incubava-se a 30°C durante 16 horas (Tópico 4.6.2.2 de Métodos). Nessa temperatura, abaixo da temperatura ótima de crescimento da *E. coli*, ocorre uma diminuição na taxa de crescimento, resultando em melhor produção de proteína recombinante (Lim, *et al.*, 2004).

Em seguida, conforme descrito no tópico 4.3, foram retiradas alíquotas nos intervalos de tempo 0, 2 e 16 horas com o objetivo de posterior análise dos níveis de produção dos scFvs e testes iniciais de afinidade de ligação ao antígeno. Após a realização de uma cinética de indução foi observado que o melhor tempo era de 16 horas, que foi escolhido, a partir de então para ser o tempo de coleta. As amostras dos sobrenadantes de cultura foram submetidas

à precipitação de proteínas e estas foram, juntamente com os sedimentos, analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e por imunoenensaio do tipo *Western blot*. Esse tipo de análise permite uma abordagem rápida para verificar a produção e secreção dos scFvs, dectando clones que foram induzidos com IPTG (Figura 11).

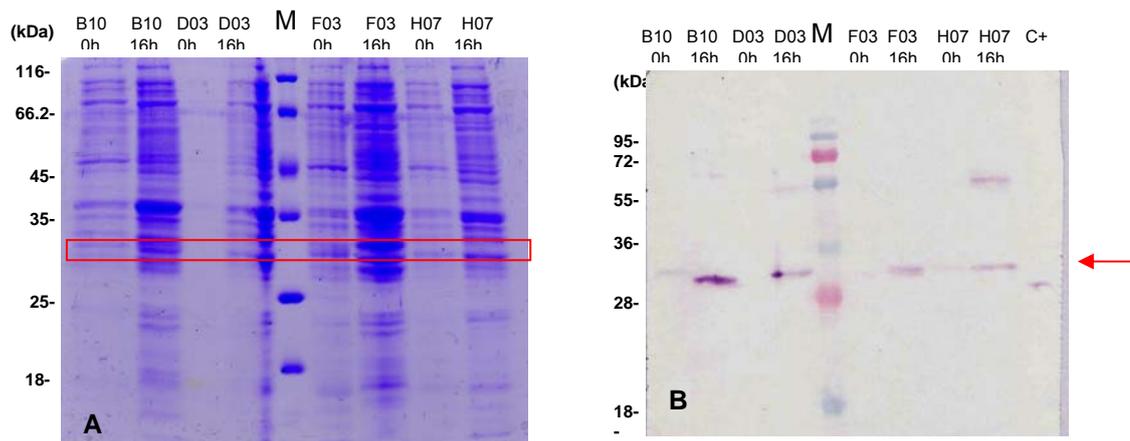


Figura 11 - Imunodeteccção das proteínas recombinantes. Os sobrenadantes de cultura dos tempos 0 e 16 horas de indução dos scFvs foram analisados por SDS-PAGE 12% corados com *Coomassie Brilliant Blue* (A) e *Western Blot* (B). As proteínas recombinantes foram detectadas utilizando como anticorpo primário IgG de coelho anti-HA seguido de um anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina . M: marcador de massa molecular molecular (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus: Fermentas®).

5.3 Purificação

Os sobrenadantes das induções foram submetidos à centrifugação e filtragem (utilizando um filtro de 0,22 μm), a fim de se retirar células e debris celulares, para posterior purificação. A purificação desses fragmentos de anticorpos, a partir do sobrenadante de cultura, foi feita na câmara fria por cromatografia de afinidade de Ni Sepharose (His Trap HP 1 mL - GE healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante, que reconhece e se liga em proteínas que possuem seis resíduos de histidina acoplados à sua extremidade carboxi-terminal, a qual tem afinidade de ligação com o níquel.

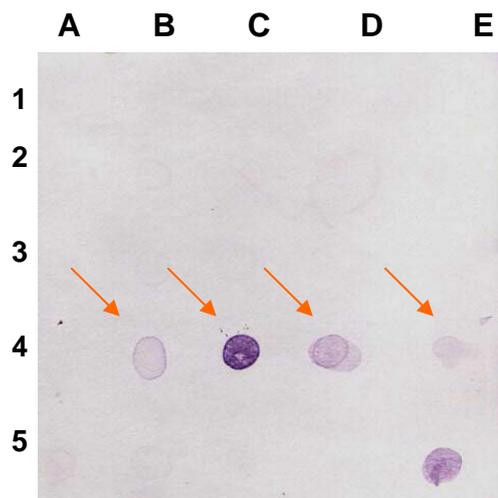


Figura 12 - Imunodeteção do scFv B10 após a purificação em coluna de afinidade. Cinco microlitros de cada fração coletada durante as purificações foram aplicados em membrana de nitrocelulose e a presença do scFv foi detectada conforme descrito para o *Western Blot*. A1- água destilada que passou pela coluna. B1 e D1 - tampão de lavagem que passou pela coluna. (após amostra). D1a C3- frações que não ficaram retidas na coluna. D3 a C5- frações eluídas da coluna, com 500 mM de imidazol. D5- controle negativo (PBS). E5- controle positivo: scfv purificado anteriormente.

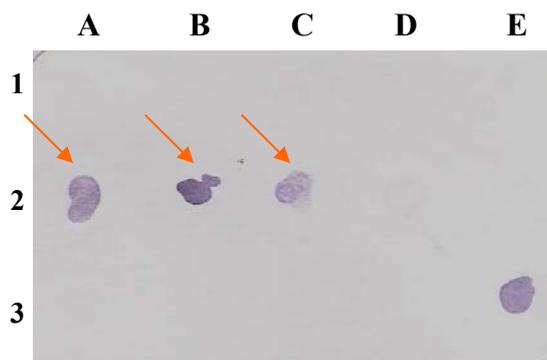


Figura 13 - Imunodeteção do scFv D03 após a purificação em coluna de afinidade. Cinco microlitros de cada fração coletada durante as purificações foram aplicados em membrana de nitrocelulose e a presença do scFv foi detectada conforme descrito para o *Western Blot*. A1 e B 1- tampão de lavagem (após amostra). C1- conjunto das frações total que não ficaram retidas na coluna. D1 a C3- frações eluídas da coluna com 500 mM de imidazol D3- controle negativo (PBS). E3- controle positivo: scfv purificado anteriormente.

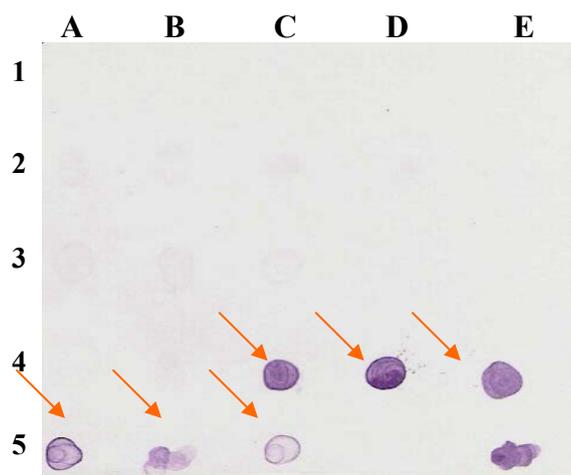


Figura 14 - Imunodeteção do scFv F03 após a purificação em coluna de afinidade. Cinco microlitros de cada fração coletada durante as purificações foram aplicados em membrana de nitrocelulose e a presença do scFv foi detectada conforme descrito para o *Western Blot*. A1- água destilada que passou pela coluna. B1 e C1- tampão de lavagem que passou pela coluna (após amostra). D1 a C3- frações que não ficaram retidas na coluna. D3 a C5- frações eluídas da coluna com 500 mM de imidazol. D5- controle negativo (PBS). E5- controle positivo: scfv purificado anteriormente.

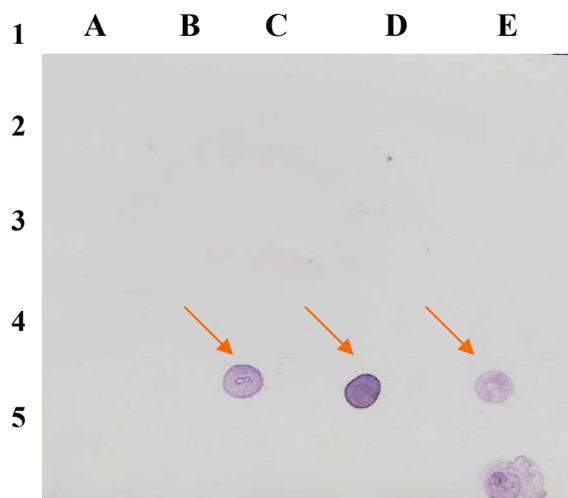


Figura 15 - Imunodeteção do scFv H07 após a purificação em coluna de afinidade. Cinco microlitros de cada fração coletada durante as purificações foram aplicados em membrana de nitrocelulose e a presença do scFv foi detectada conforme descrito para o *Western Blot*. A1- água destilada que passou pela coluna. B1 e C1- tampão de lavagem que passou pela coluna (após amostra). D1 a C3- frações que não ficaram retidas na coluna. D3 a C5- frações eluídas da coluna com 500 mm de imidazol. D5- controle negativo (PBS). E5- controle positivo: scfv purificado anteriormente.

Em todas as purificações foram coletadas 10 frações de eluição (de 0,5 a 1 mL), além da água destilada, tampão de lavagem e das frações que não ficaram retidas na coluna. Imediatamente após o fim de todas as coletas 5µL de cada amostra foram aplicados em membrana de nitrocelulose para análise quanto à presença de proteínas de interesse por imunoensaio do tipo *Dot Blot*, que permite um acompanhamento rápido do processo de purificação dos scFvs, conforme pode ser observado nas Figuras 12, 13, 14 e 15. A detecção foi feita usando IgG de coelho anti-HA seguido de um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina.

Pode-se observar que a purificação foi realizada com sucesso, não apresentando anticorpos nas frações em que se realizava a ligação a resina (*flow through*). Tanto a detecção dos scFvs, a partir da fração de eluição, como o pico de liberação desses fragmentos da coluna, variou conforme a purificação, sendo tipicamente entre as frações 3 a 7 após a adição do tampão de eluição, com exceção do F03, que variou entre as frações 5 a 10.

Para confirmar se a purificação tinha sido realmente eficiente, as frações de eluição que apresentavam os scFvs recombinantes (indicadas pelas setas vermelhas no *Dot Blot*) foram analisadas em géis de SDS-PAGE 12%, onde os géis eram submetidos à transferência para membranas de nitrocelulose para análise por *Western Blotting*. A detecção dos fragmentos do anticorpo foi feita com o anticorpo anti-HA, como anticorpo primário, e o anticorpo anti – IgG de coelho, conjugado a fosfatase alcalina, como anticorpos secundário. Essa análise demonstrou um bom grau de pureza, principalmente para B10, D03 e F03 e as bandas referentes aos scFvs podem ser observadas em torno de 29 kDa (Figuras 16 e 17).

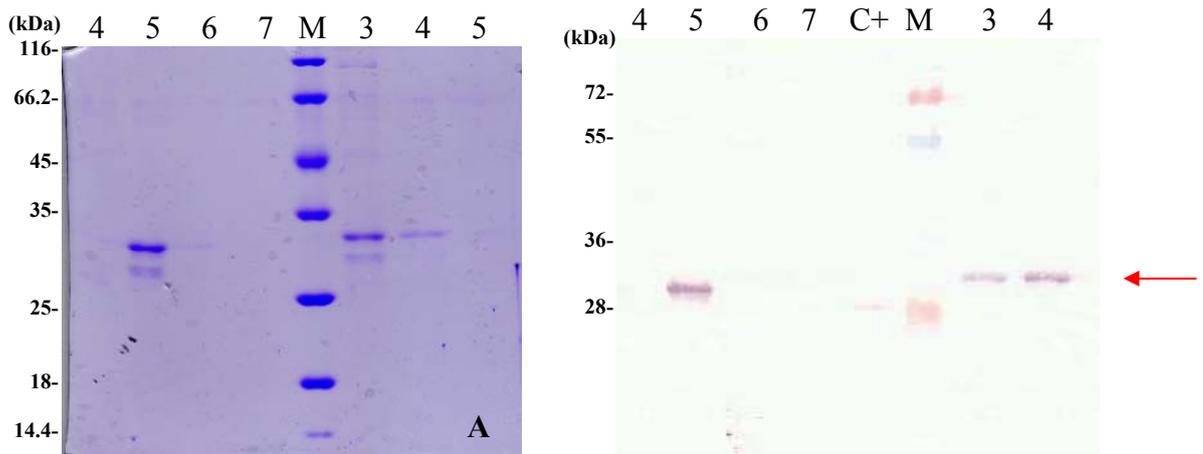


Figura 16 - Imunodeteção dos scFvs B10 e D03 purificados. As frações 4, 5, 6 e 7 purificadas do scFv B10 foram analisadas por SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue* (lado esquerdo do marcador). As frações 3, 4 e 5 purificadas do scFv D03 foram analisadas por SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue* (lado direito do marcador). M: marcador (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus: Fermentas®) (A). As mesmas frações, com exceção da fração 5 do D03, foram analisadas por *Western Blot*, que foi revelado usando IgG de coelho anti-HA seguido de um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (B). Por último, o controle positivo: scfv purificado anteriormente

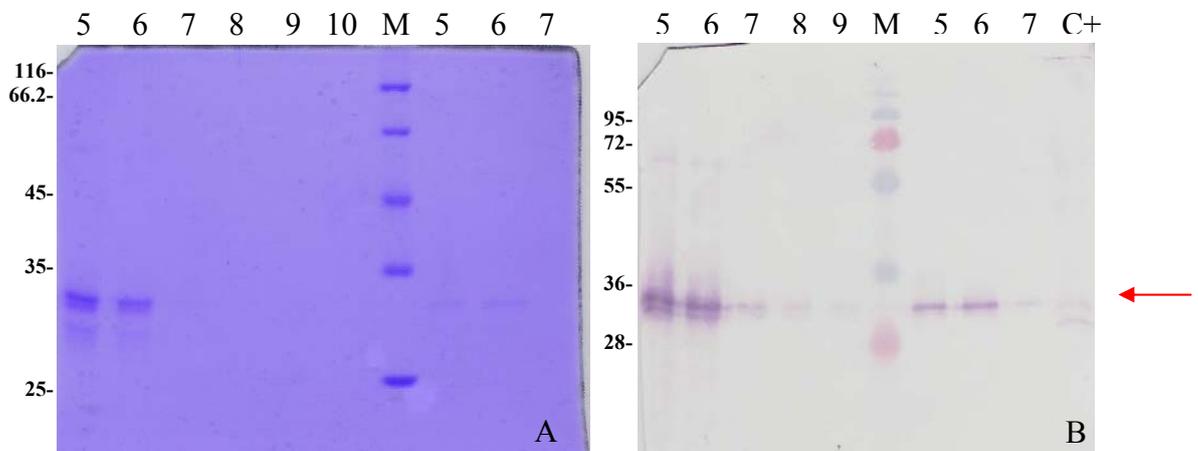


Figura 17- Imunodeteção dos scFvs F03 e H07 purificados. As frações 5, 6, 7, 8, 9 e 10 purificadas do scFv F03 foram analisadas por SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue* (lado esquerdo do marcador). As frações 5, 6 e 7 purificadas do scFv H07 foram analisadas por SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue* (lado direito do marcador). M: marcador (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus: Fermentas®) (A). As frações 5, 6, 7, 8 e 9 purificadas do scFv F03 (lado esquerdo do marcador) e as frações 5, 6 e 7 purificadas do scFv H07 (lado direito do marcador) foram analisadas por *Western Blot* que foi revelado usando IgG de coelho anti-HA seguido de um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (B). Por último, o controle positivo: scfv purificado anteriormente.

Uma vez padronizada a purificação, foi necessária nova produção dos scFvs com uma maior quantidade de sobrenadante de cultura, suficiente para obtenção de proteínas recombinantes purificadas para realização dos ensaios de ligação ao antígeno, de acordo o protocolo 4.2.14.1 de Métodos. Com isso, partiu-se para a nova purificação por cromatografia de afinidade dos anticorpos recombinantes.

Com a purificação realizada as frações obtidas foram analisadas quanto à quantificação dos mesmos. A fração 4 do scFv B10 (Figura 18) e a fração 4 do H07 (Figura 21) apresentaram maior concentração de proteína (0,67 mg/mL e 0,66 mg/mL, respectivamente). O D03 (Figura 19) também apresentou o pico de produção de proteína na fração 4 assim como o F03 (Figura 20), porém ambos em quantidade inferior os scFvs anteriores (0,4 mg/mL e 0,48 mg/mL, respectivamente). O B10 apresentou outra fração, além das citadas acima, com boa quantidade de proteína (fração 5: 0,57 mg/mL).

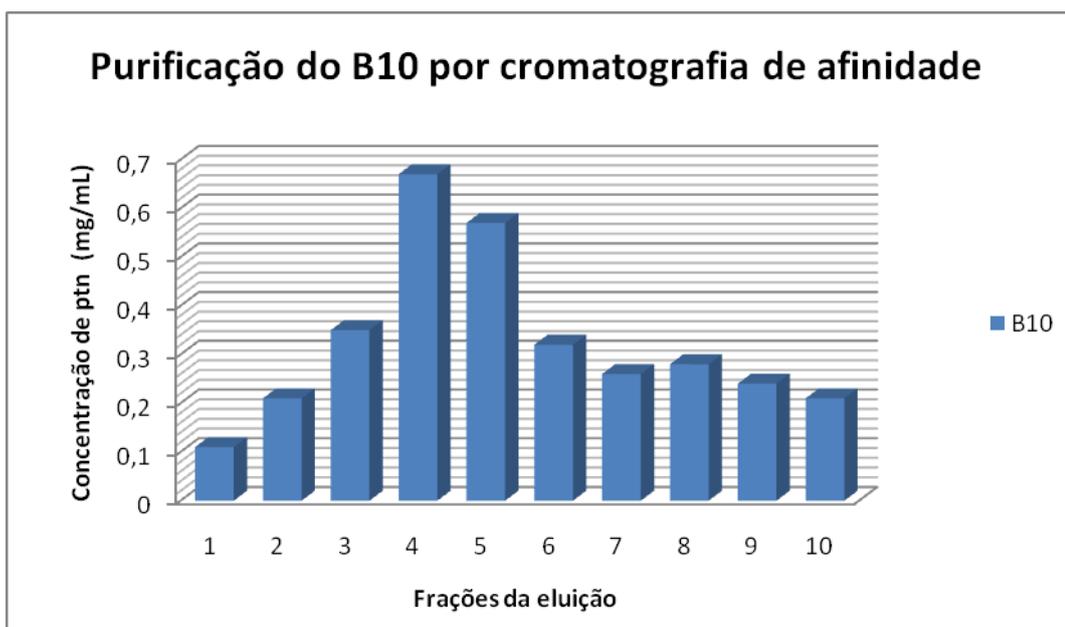


Figura 18 – Produção do scFv B10. Foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade com Ni, na coluna His Trap de 1mL. Após a lavagem, frações de 1mL foram coletadas a partir do tampão de eluição. No gráfico, estão representadas as quantidades de proteínas em mg/mL obtidas em cada fração eluída, determinadas por espectrofotometria.

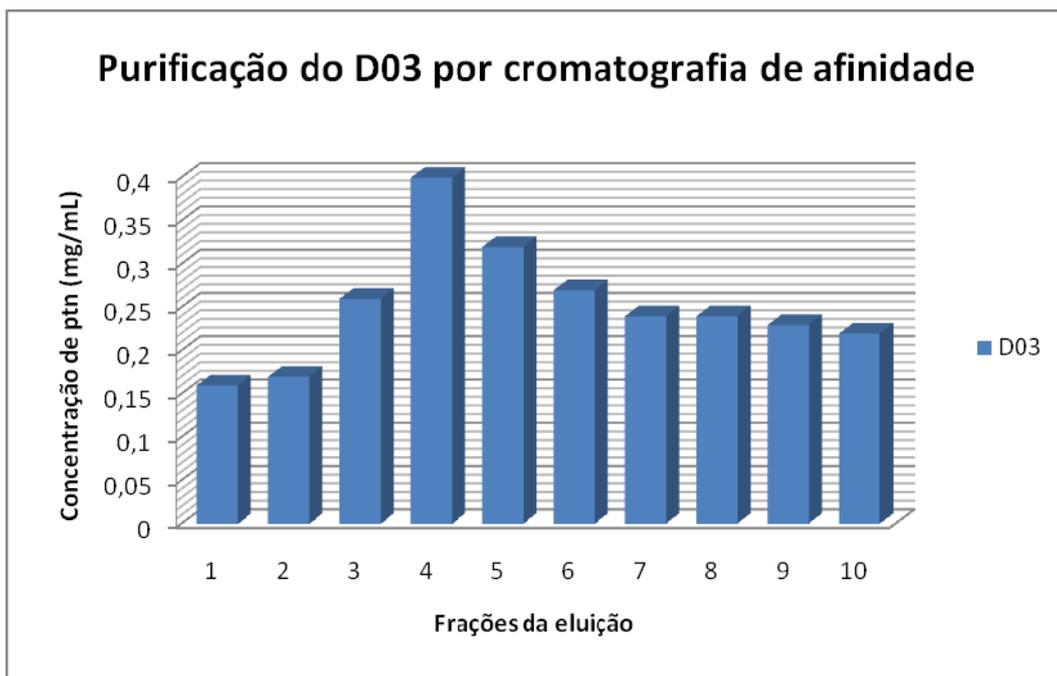


Figura 19 – Produção do scFv D03. Foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade com Ni, na coluna His Trap de 1mL. Após a lavagem, frações de 1mL foram coletadas a partir do tampão de eluição. No gráfico, estão representadas as quantidades de proteínas em mg/mL obtidas em cada fração eluída, determinadas por espectrofotometria.

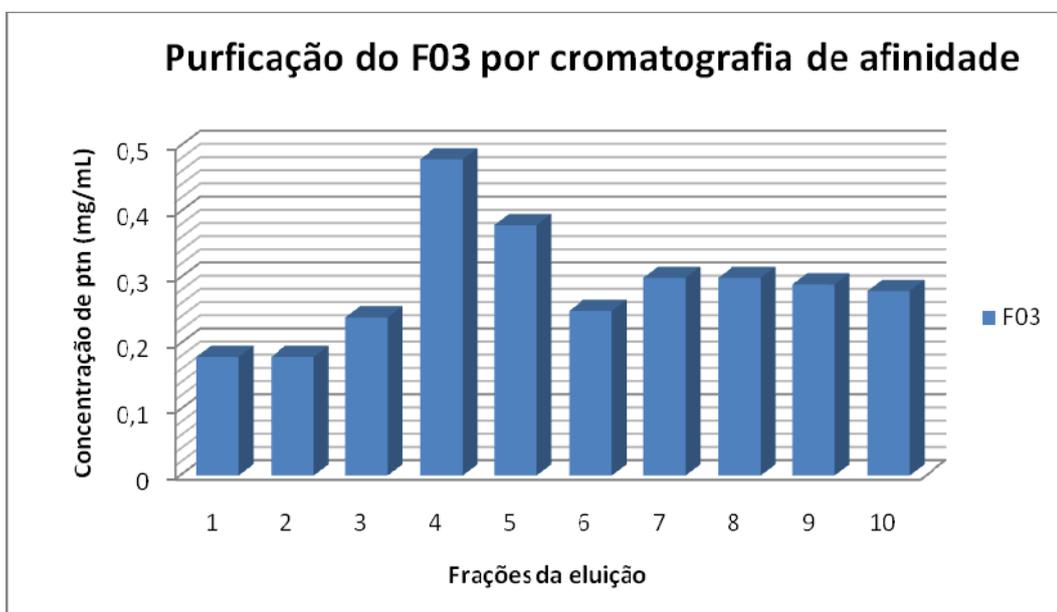


Figura 20 – Produção do scFv F03. Foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade com Ni, na coluna His Trap de 1mL. Após a lavagem, frações de 1mL foram coletadas a partir do tampão de eluição. No gráfico, estão representadas as quantidades de proteínas em mg/mL obtidas em cada fração eluída, determinadas por espectrofotometria.

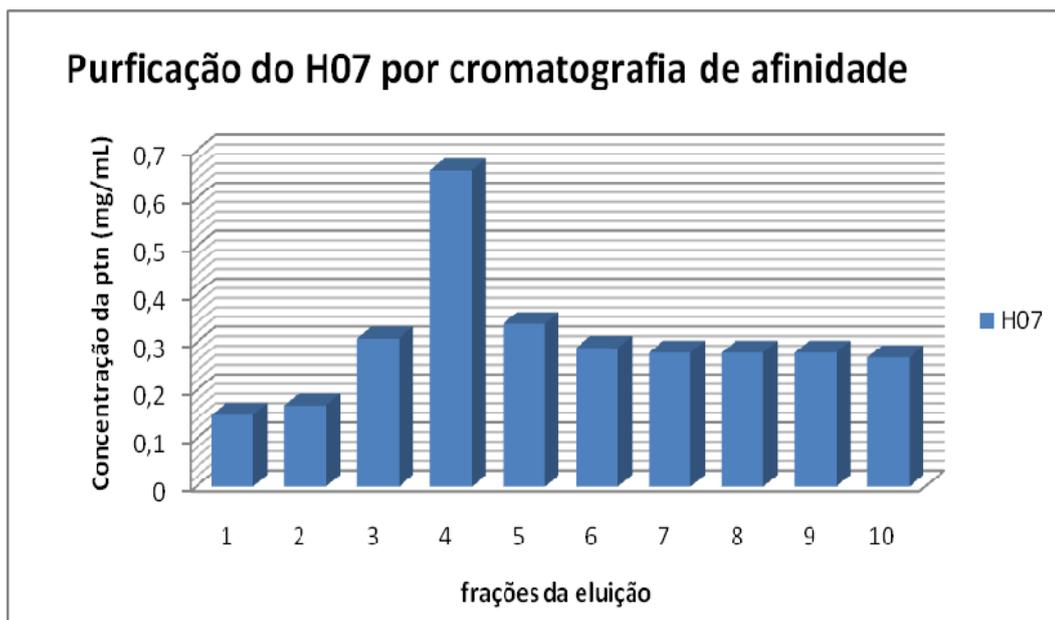


Figura 21 – Produção do scFv H07. Foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade com Ni, na coluna His Trap de 1mL. Após a lavagem, frações de 1mL foram coletadas a partir do tampão de eluição. No gráfico, estão representadas as quantidades de proteínas em mg/mL obtidas em cada fração eluída, determinadas por espectrofotometria.

Após a purificação as frações com a maior quantidade de proteína, com exceção do B10 (pois a fração com maior quantidade de proteína era muito maior do que as outras), de cada clone foram escolhidas para posterior caracterização. As amostras escolhidas foram: B10-5, D03-4, F03-4 e H07-4. Todas as amostras foram diluídas para uma concentração de 0,4 mg/mL.

5.4 Caracterização dos scFvs quanto a afinidade e especificidade

Com a finalidade de avaliar a capacidade de ligação ao Oligo dT-biotina foi realizado um imunoenensaio de ligação direta (ELISA) onde o tampão PBS foi utilizado como controle negativo. O ensaio foi conduzido com scFvs purificados, diluídos 1:100 da concentração final, após a placa de ELISA ser sensibilizada com avidina, bloqueada e incubada com oligo dT-biotina (Figura 22).

Pela análise da figura, percebe-se que todos os scFvs ligaram-se ao Oligo-dT biotilado de maneira similar, com exceção do F03 que apresentou uma ligação mais forte

em todas as concentrações testadas, no entanto, isso pode ser devido a uma eventual diferença na quantidade de proteína, uma vez que a curva se mostra com as mesmas características que aquelas das demais proteínas. Além disso, o controle negativo não apresentou reação, o que torna o resultado de acordo com o esperado.

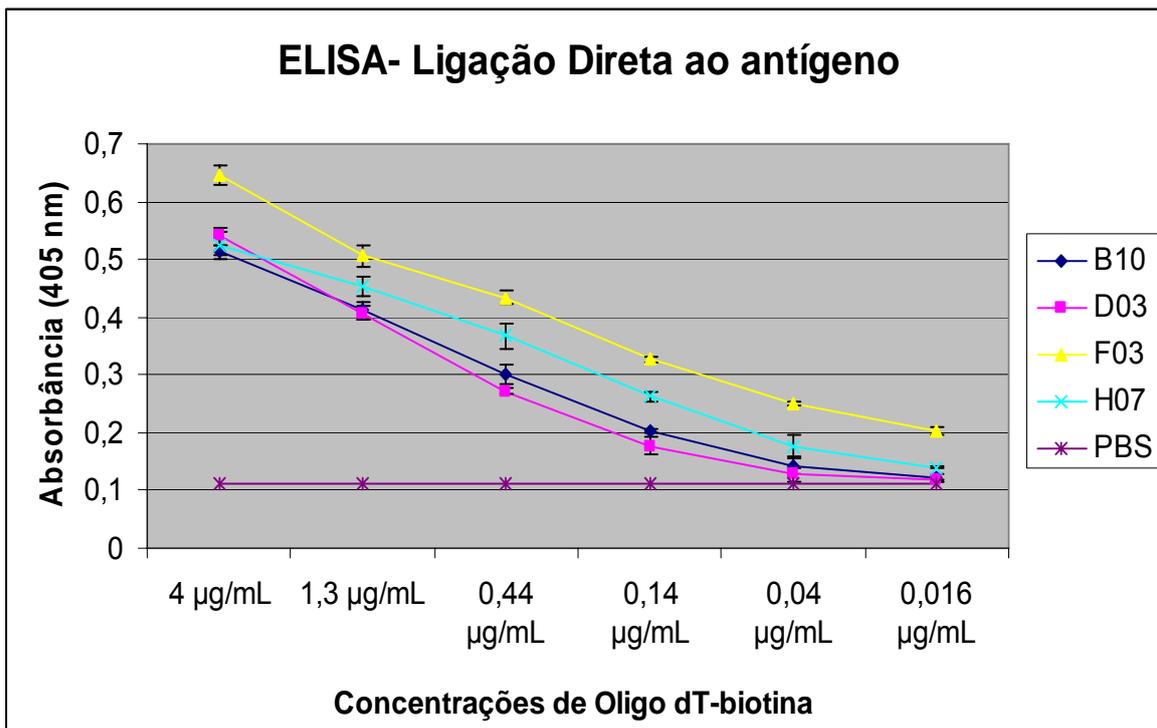


Figura 22. Ligação dos fragmentos scFvs a oligo-dT-biotina. Imunodeteção da ligação dos scFvs ao OligodT-biotilado. O antígeno (Oligo dT biotilado) foi adsorvido em uma placa sensibilizada com avidina. Após a lavagem quantidades decrescentes das proteínas purificadas foram incubadas na placa. A detecção dos scFvs foi feita utilizando IgG de coelho anti-HA seguido de um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina. Após a revelação com PNPP (para-nitro-fenilfosfato) a absorbância a 405 nm foi determinada.

Para a caracterização da seletividade/especificidade dos scFvs foram realizados testes de afinidade que consistiram em ELISA de competição, conforme está descrito em Métodos 4.2.14.2. Para fazer a competição, inicialmente o Oligo dT-biotina (1µM) foi adicionado a placa por uma hora. Após 3 lavagens com PBST, foram adicionadas diferentes concentrações (0,1 µM, 1 µM e 10 µM) dos competidores (Oligo dT, Oligo dA, Oligo dC, Oligo dG e Oligo dU), que foram previamente incubados com os scFvs. Para todos os resultados foram

diminuídos os valores do controle negativo (PBS). A atividade de ligação residual ao antígeno original foi determinada pela detecção dos scFvs utilizando-se IgG de coelho anti-HA, como anticorpo primário, e anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina, como anticorpo secundário.

Conforme mostra a Figura 23, todos os competidores inibiram a ligação do scFv B10 ao Oligo dT-biotina o que nos permite observar que este scFv analisado e purificado foi capaz de reconhecer e se ligar inicialmente ao Oligo dT-biotinilado, porém, ao ser adicionado concentrações mínimas de qualquer competidor, essa ligação diminuiu, atestando uma polirreatividade deste scFv em particular.

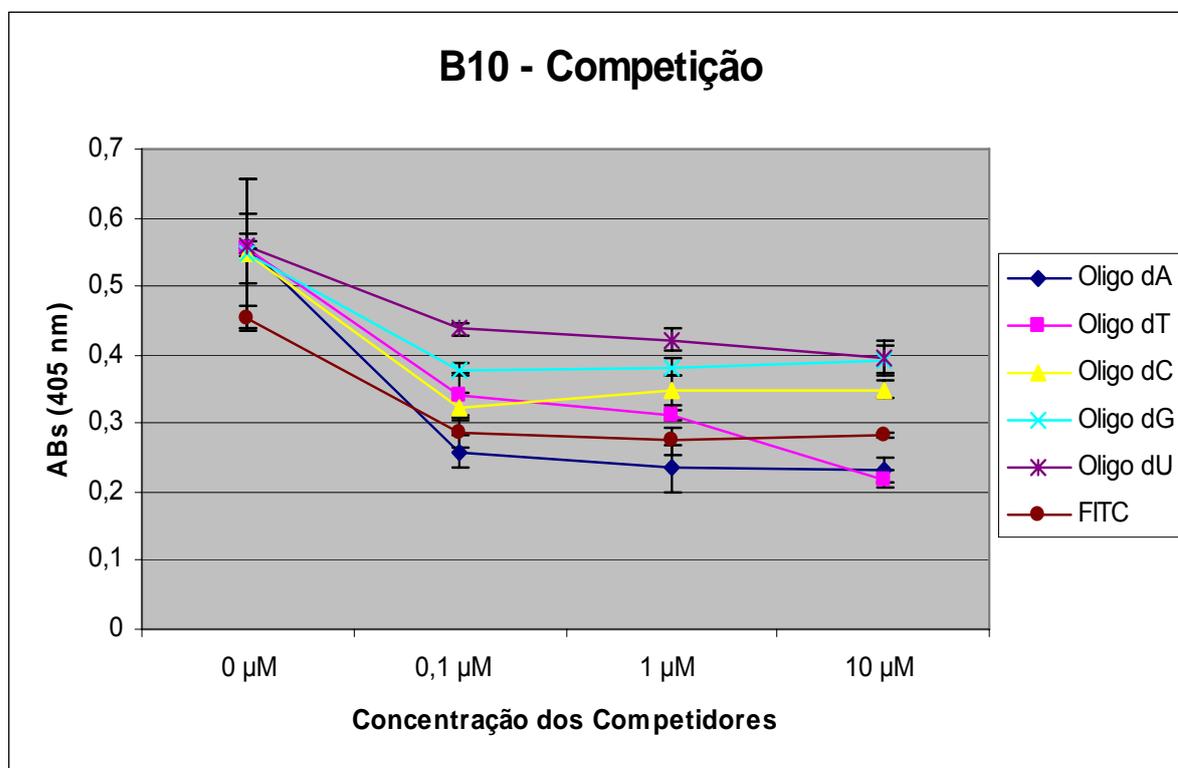


Figura 23 - B10: ensaio de competição. Imunodeteccção da ligação do scFv ao OligodT-biotinilado quando submetido aos competidores com diferentes concentrações. A deteccção do scFv foi feita utilizando IgG de coelho anti-HA seguido de um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina.

Nota-se que nos ensaios realizados, tanto o D03 como o F03 e o H07 (Figuras 24 e 25 e 26, respectivamente), tiveram resultados similares quando submetidos à ligação com Oligo dA e Oligo dT-biotina ao mesmo tempo, isto é, esses competidores foram capazes de reduzir a

ligação dos fragmentos de Ac ao Oligo dT-biotinilado. Quando Oligo dU foi utilizado como competidor, observou-se também uma redução na ligação ao antígeno original de forma equitativa para esses três scFvs, porém, de forma mais branda. O mesmo padrão não foi observado para os ensaios de competição com Oligo dC e dG, pois praticamente não houve competição, que também se comportaram de forma semelhante tanto para o D03 como para o F03 e H07.

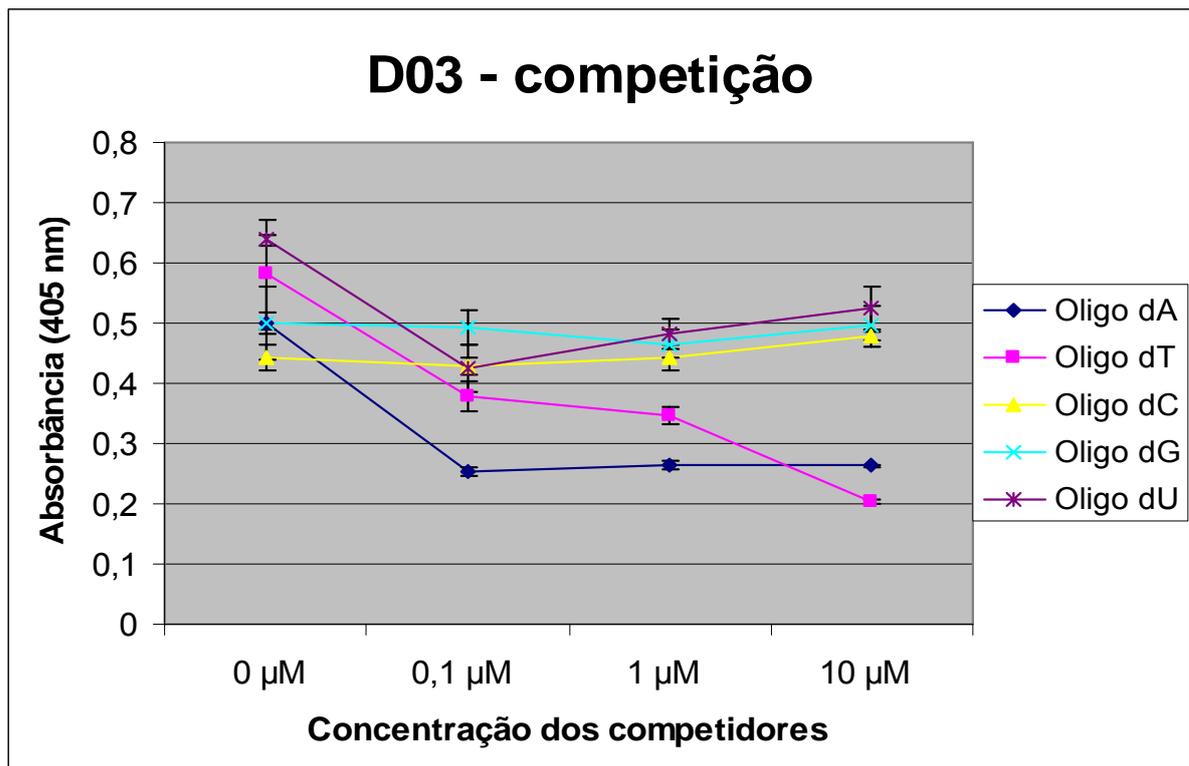


Figura 24 - D03: ensaio de competição. Imunodeteccção da ligação do scFv ao OligodT-biotinilado quando submetido aos competidores com diferentes concentrações. A deteccção do scFv foi feita utilizando IgG de coelho anti-HA seguido de um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina.

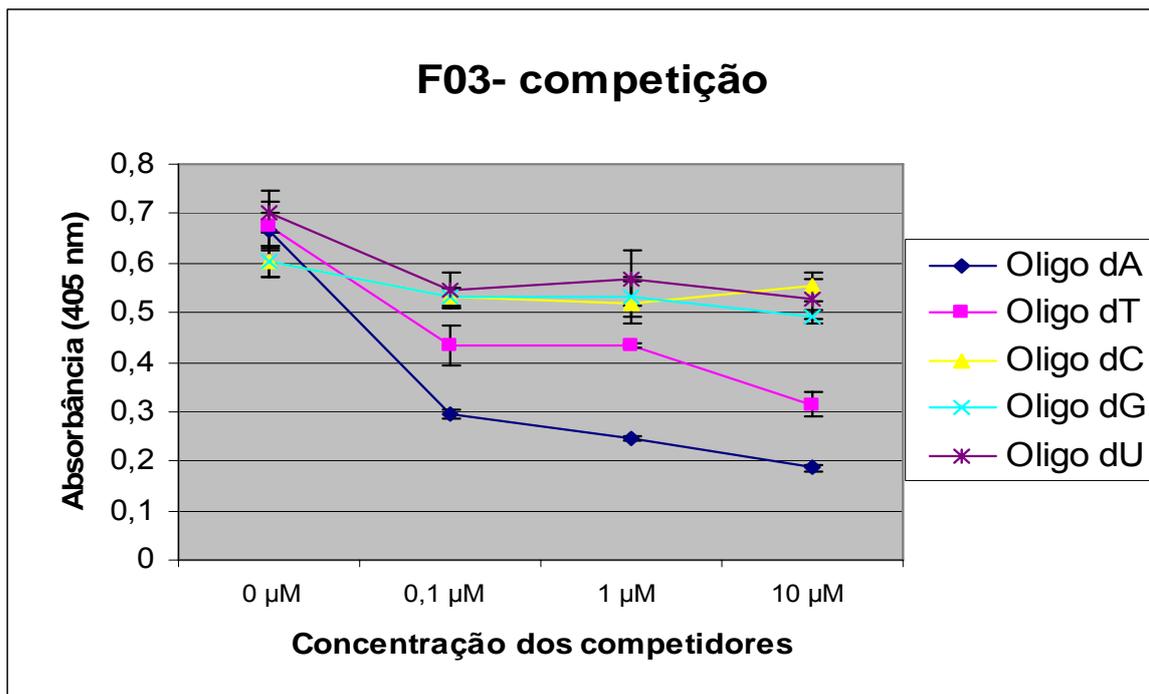


Figura 25 - F03: ensaio de competição. Imunodeteccção da ligação do scFv ao OligodT-biotilnado quando submetido aos competidores com diferentes concentrações. A deteccção do scFv foi feita utilizando IgG de coelho anti-HA seguido de um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina.

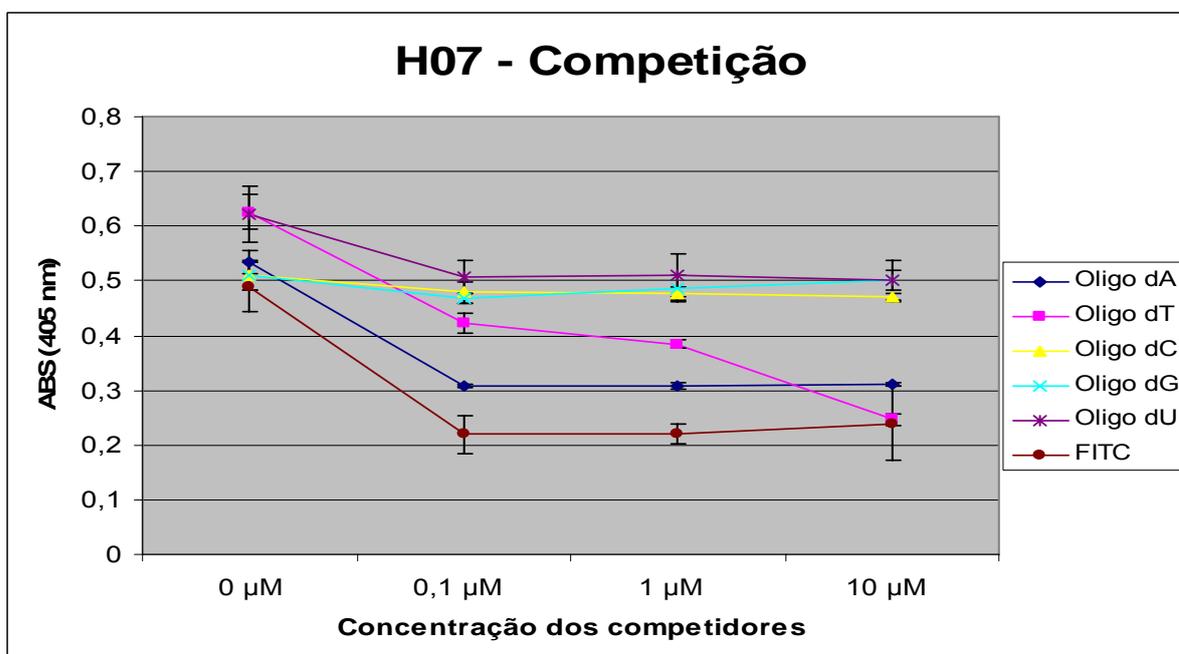


Figura 26 – H07: ensaio de competição. Imunodeteccção da ligação do scFv ao OligodT-biotilnado quando submetido aos competidores com diferentes concentrações. A deteccção do scFv foi feita utilizando IgG de coelho anti-HA seguido de um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina.

Como essa biblioteca foi feita a partir de animais previamente imunizados com o hapteno isotiocianato de fluoresceína (FITC), conjugado a BSA, testamos ainda a capacidade de inibição de FITC à ligação a Oligo-dT, apenas para os clones B10 e H07. Ambos apresentaram sua ligação ao Oligo dT-biotina inibidas, porém, de forma distinta. No ensaio realizado juntamente com o B10 observamos uma redução da ligação menor quando comparada com o H07. Além disso, no B10 a inibição do Oligo dA e do Oligo dT foram mais fortes do que a do FITC, fato não observado no H07.

Os resultados dos ensaios realizados com FITC, demonstraram que mesmo após a seleção com Oligo dT-celulose, eles ainda resguardam afinidade pelo mesmo, afinidade esta que pode ser atribuída pelo fato de ser um hapteno.

Apesar da diversidade mostrada pelas diferentes seqüências de resíduos de aminoácidos preditas para as cadeias leves e pesadas, todos os scFvs mostraram diminuição da ligação ao Oligo dT-biotilado quando foram submetidos a competir com o Oligo dA, mostrando sua baixa especificidade ao Oligo dT (Tabela 4). Além disso, em todos os ensaios de competição ocorre titulação com o Oligo dT mostrando que este Oligo tende a inibir totalmente a ligação a Oligo dT-biotina. Esta mesma inibição não pode ser observada quando qualquer scFv é submetido ao mesmo ensaio com outros competidores.

Outro aspecto importante a ser abordado, é o fato de que mesmo o B10 e H07 possuem uma mínima diferença nas seqüências de suas CDRs, se comportam de maneira completamente diferente em todos os ensaios de competição, mostrando que a mudança de um ou de poucos aminoácidos pode ser crítica no reconhecimento e na afinidade por determinadas bases nitrogenadas (Tabela 4). Um bom exemplo é o B10, que apesar de mostrar afinidade pelo Oligo dT (no ensaio de ligação direta), não mostrou especificidade pelo mesmo uma vez que no ensaios de competição havia diminuição na ligação ao Oligo dT-biotina. Já similaridade da cadeia leve entre o D03 e o F03 pode ter contribuído de alguma forma para a ligação ao oligos, pois estes apresentaram resultados compatíveis nos ensaios de competição.

Tabela 4- Quantificação da atividade de ligação residual e inibição dos scFvs quando submetidos aos competidores

Clone	Competidor	Concentração (µM)	Inibição (%)	Atividade de ligação residual (%)
B10	Oligo dT	0,1	38,33	61,67
		1	44,15	55,84
		10	39,47	60,52
	Oligo dA	0,1	46,25	53,75
		1	41,96	58,03
		10	41,60	59,39
	Oligo dC	0,1	40,87	59,12
		1	41,96	63,68
		10	41,60	63,86
	Oligo dG	0,1	30,83	69,16
		1	30,47	69,52
		10	28,28	71,71
	Oligo dU	0,1	21,71	78,28
		1	24,86	75,13
		10	29,38	70,61
FITC	0,1	36,78	63,21	
	1	39,64	60,35	
	10	37,66	62,33	
D03	Oligo dT	0,1	34,79	65,21
		1	40,30	59,70
		10	64,81	35,19
	Oligo dA	0,1	49,06	50,93
		1	46,86	50,14
		10	47,13	52,57
	Oligo dC	0,1	3	96,99
		1	0	100
		10	0	100
	Oligo dG	0,1	1,69	98,04
		1	6,92	93,07
		10	0,93	99,07
	Oligo dU	0,1	33,19	66,81
		1	24,46	75,54
		10	17,62	82,38
F03	Oligo dT	0,1	30,06	63,93
		1	35,67	64,32
		10	53,35	46,64
	Oligo dA	0,1	55,58	44,41
		1	62,95	37,04
		10	71,83	28,17
	Oligo dC	0,1	12,11	87,89
		1	13,76	82,24
		10	8,29	91,76
	Oligo dG	0,1	11,77	88,22

		1	11,94	88,06
		10	18,74	81,26
		0,1	22,58	77,42
	Oligo dU	1	19,07	80,93
		10	24,81	71,19
		0,1	32,57	67,42
	Oligo dT	1	38,74	61,25
		10	60,67	39,32
		0,1	42,57	57,42
	Oligo dA	1	42,44	57,55
		10	41,82	58,17
		0,1	5,89	94,10
	Oligo dC	1	6,09	93,90
		10	7,66	92,33
H07		0,1	8,05	91,94
	Oligo dG	1	4,32	95,67
		10	1,76	98,23
		0,1	18,28	81,71
	Oligo dU	1	18,06	81,93
		10	19,46	80,53
		0,1	55,10	44,89
	FITC	1	55,10	44,89
		10	51,02	48,97

Os clones analisados, que foram capazes de reconhecer o antígeno, não reproduziram resultados esperado nos ensaios subseqüentes de imunoprecipitação (dado não mostrado). Algumas hipóteses podem ser abordadas para explicar tal fato: **(i)** as proteínas podem apresentar instabilidade conformacional devido a um dobramento inadequado, **(ii)** estas podem estar sofrendo degradação proteolítica, **(iii)** a quantidade de Oligo dT-celulose pode ter sido insuficiente para a quantidade de sobrenadante, ou **(iv)** o tempo e a temperatura não foram adequadas para este tipo de ensaio.

Com o objetivo de equacionar estes problemas é proposto: **(i)** uma nova indução da expressão do produto recombinante, **(ii)** a preparação de frações protéicas na presença de coquetéis inibidores de proteases, **(iii)** adequar o quantidade Oligo dT-celulose a quantidade de sobrenadante utilizada, bem como **(iv)** adequar o tempo e a temperatura necessária.

Conclusão e Perspectivas

Conclusão e Perspectivas

No presente trabalho foi possível caracterizar, quanto à atividade ligante e a afinidade, quatro fragmentos de anticopos (scFvs) anti-ssDNA obtidos a partir de uma biblioteca combinatória de genes variáveis de galinha imunizadas com FITC.

Os resultados aqui obtidos mostraram que a expressão e purificação desses scFvs apresentaram níveis satisfatórios não só em quantidade mas como também em grau de pureza. A análise das seqüências das CDRs dos clones assim como os imunoenaios indicam aspectos importantes, tais como: a confirmação do reconhecimento antigênico de DNA fita simples pelo ensaio de ligação direta, uma vez que os fagos de fusão foram selecionados utilizando-se Oligo dT-celulose, mesmo a biblioteca tendo sido gerada a partir de animais imunizados com fluoresceína-BSA. Além disso, observou-se a inibição da ligação ao antígeno utilizado na seleção por competidores similares, principalmente pelo Oligo dA, e a permanência da afinidade pelo FITC, em dois dos clones testados. Podemos dizer que em geral essas proteínas recombinantes mantêm as suas propriedades imunológicas originais sendo capazes de discriminar diferentes seqüências de DNA fita simples e que diferenças pequenas de resíduos de aminoácidos encontrados em suas CDRs parecem ser capazes de conferir maior ou menor grau de especificidade e seletividade a esses Ac.

As análises realizadas sugerem que esses scFvs, produzidos em bactérias, apresentam afinidade e especificidade dependentes não só da interação deste com o esqueleto de açúcar-fosfato, mas também com as bases nitrogenadas (Tabela 4).

Como perspectivas para esse trabalho, propomos novas induções da expressão do produto recombinante para que sejam realizados novamente ensaios de imunoprecipitação de maneira otimizada. Esses ensaios deverão ser realizados com o intuito de um estudo mais refinado da afinidade e especificidade desses scFvs. Além disso, a ligação residual a FITC deve ser realizada para os scFvs D03 e F03. Outro ensaio que propomos é a determinação dos tipos de interações envolvidas no reconhecimento aos diferentes antígenos, para tanto pretendemos realizar ensaios de ligação/competição variando a força iônica. Todos os oligonucleotídeos utilizados apresentavam seqüências de 18 nucleotídeos, uma questão que também pode ser abordada no futuro é a determinação da extensão mínima do epítipo, repetindo os ensaios com oligonucleotídeos menores. A ligação ao DNA fita dupla também deve ser testada com todos os scFvs em ensaios de ligação direta.

Com essas questões solucionadas em conjunto com dados experimentais será possível fazer uma análise mais refinada de modelos de interação antígeno-anticorpo, por modelagem molecular, tomando como base estruturas tridimensionais já resolvidas, disponíveis em bancos de dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A., LICHTMAN, A., POBER, J. *Cellular and Molecular Immunology*. W. B. Saunders Company 4 ed, 2000.

ABBAS, A., LICHTMAN A. *Cellular and Molecular Immunology*. W. B. Saunders Company 5 ed, 2003.

ANDRIS- WIDHOPF, J., RADER, C., STEINBERGER, P., FÜLLER, R. E BARBAS III, C.F. Methods for preparation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *J. Immunological Methods*, v.242, p.159-181. 2000a.

ANDRIS- WIDHOPF, J., RADER, C. & BARBAS III, C.F. Generation of antibody libraries: immunization, RNA preparation, and cDNA synthesis. In: BARBAS *et al. Em Phage Display- a laboratory manual*. 1ª Edição. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2000b. p.8.1 -8.18.

ARAKAWA, H., FURUSAWA, S., EKIRO, S., YAMAGISHI, H. Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal center. *Embo. J*, v.15, p.2540-2546. 1996.

BARBOSA, C.D., LIMA, L.M., ALBUQUERQUE, F.C., COSTA, C.S., VIEIRA, P.M.M.M., BRÍGIDO, M.M., MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas combinatórias de anticorpo apresentadas em fago – construção e utilização. *Biosci. J.*, p.17-29. 2004.

BARRY, M.M., MOL, C.D., ANDERSON, W.F., LEE, J.S. Sequencing and modeling of anti-DNA immunoglobulin Fv domains. *J.Biol. Chem.*, v.269, p.3623-3632. 1994.

BRADBURY, A.R. E MARKS, J.D. Antibodies from phage antibody libraries. *J. Immunol Methods*, v. 290, n.1, p.29-49. 2004.

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

BRÍGIDO, M.M. Quantificação de ácidos nucléicos e de proteínas por métodos espectrofotométricos. In: AZEVEDO, M.O. *et al. Técnicas básicas em Biologia Molecular*. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. p. 40-14.

CARY, S.P., WAGENKNECHT, R. & SILVERMAN, G.J. Characterization of superantigen-induced clonal deletion with a novel cl III-restricted avian monoclonal antibody: exploiting evolutionary distance to create antibodies specific for a conserved VH region surface. *J. Immunol*, v.164, p.4730-4741. 2000.

CERUTTI, M.L., CENTENO, J.M., GOLDBAUM, F.A., PRAT-GAY, G. Generation of sequence specific, high affinity anti-DNA antibodies. *J. Biol. Chem*, v.378, p.12769-12773. 2001.

CHEN, Y. E., STOLLAR. B.D. DNA binding by the VH domain of anti-Z-DNA antibody and its modulation by association of the VL domain. *The Journal of Immunology*, v.162, p.4663-4670. 1999.

DAMASCENO, L.M., PLA, I., CHANG H., COHEN, L., RITTER, G.M OLD, L.J., BATT, C.A. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, v.37, p.18–26. 2004.

DAUGHERTY, P.S., CHEN, G., OLSEN, M.J., IVERSON, B.L., GEORGIU, G. Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng*, v.11 n.9, p.825-832. 1998.

DAVIES, E.L., SMITH, J.S., BIRKETT, C.R., MANSER, J.M., ANDERSON-DEAR, D.V. & YOUNG, J.R. Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. *J. immunological. Meth*, v.186, p.125-135. 1995.

DIAMOND, B., SCHARFF, M.D. Somatic mutation of the T15 heavy chain gives rise to an antibody with autoantibody specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.81, p.5841-5844. 1984.

DIAMOND, B., KATZ, J.B., PAUL, E., ARANOW, C., LUSTGARTEN, D., SCHARFF, D. The role of somatic mutation in the pathogenic anti-DNA response. *Annu. Rev. Immunol.*, v.10, p.731-57. 1992.

FARNER, N.L., DONRER, T., LIPSKY, P.E. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda repertoire. *J. Immunol.*, v.162, p.2137-2145. 1999.

GLICK, B. The bursa of Fabricius. In: FARNER, D.S., KING, J.R., PARKES, K.C. *Avian Biology*. Nova Iorque: Academic Press, v.7, 1983.

GOLDSBY, R.A., KINDT, T.J & OSBORNE, B.A. GOLDSBY. *Immunology*. W.H. Freeman and Company, 4th Ed. Nova Iorque, NY, USA, 2000. p.83-149.

HERRON, J.N., HE, X.M., BALLARD, D.W., BLIER, P.R., PACE, P.E., BOTHWELL, A.L.M., VOSS Jr, E.W., EDMUNSON, A.B. An autoantibody to single strand DNA: comparison of the three-dimensional structures of the unligated Fab and a deoxynucleotide-Fab complex. *Proteins: Struc. Func. Genet.*, v.11, p.159-175. 1991.

HOOGENBOOM, H.R.M DE BRUINE, A.P., HUFTON, S.E., HOET, R.M., ARENDS, J.W., ROOVERS, R.C. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, v.4, p.1-20. 1998.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M. E., SHLOMCHIK, M. *Immunobiology*. New York and London: Garland Publishing. 2001

KALSI, J.K., MARTIN, A.C.R., HIRABAYASHI, Y., EHRENSTEIN, M., LONGHURST, C.M., REVIRAJAN, C., ZVELEBIL, M., STOLLAR, B.D., THORNTON, J.M., ISENBERG, D.A. Functional and modelling studies of the binding of human monoclonal anti-DNA antibodies to DNA. *Mol. Immunol.*, 33, p.471-483. 1996.

KOTZIN, B.L. Systemic lupus erythematosus. *Cell*, v.85, p.303-306. 1996.

LEUNG, D.T.M., YAM, N.W.C., CHUI, Y.L., WONG, K.C., LIM, P.L. A human and a mouse anti-idiotypic antibody specific for human T14+ anti-DNA antibodies reconstructed by phage display. *Gene*, v.255, p.373-380. 2000.

LIM, K.P., LI, H. E NATHAN, S. Expression and purification of a recombinant scFv towards the exotoxin of the pathogen. *J. Microbiol*, v.42, n.2, p.126-132. 2004.

LITTLE, M., KIPRIYANOV, S., GALL, F., MOLDENHAUER, G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunology Today*, v.21, n.8, p.364-370. 2000.

LOWMAN, H.B. E WELLS, J.A. Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J Mol Biol*, v.234, p.567-78. 1993.

MAKOWSKI, L. Structural constraints of the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene*, v.128, p.5-11. 1993.

MANDAIO, M.P. The role of autoantibodies in the pathogenesis of lupus nephritis. *Semin. Nephrol*, v.19, p.48-56. 1999.

MARANHÃO, A.Q., BRÍGIDO, M.M. Anticorpos humanizados. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília-DF, v. IV, n. 23, p. 38-43. 2001.

MARANHÃO, A.Q. Utilização de bibliotecas apresentadas em fagos para a seleção de anticorpos ligantes a ácidos nucleicos. Tese de doutorado, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

MCCORMACK, W.T., TJOELKER, L.W., CARLSON, L.M., PETRYNIAK, B., BARTH, C.F., HUMPHRIES, E.H., THOMPSON, C.B. Chicken Ig_L rearrangement involves deletion of a circular episome and addition of single nonrandom nucleotides to both coding segments. *Cell*, v.56, p.785-791. 1989.

Nobelpreis. *O prêmio nobel*. [on line] Disponível em: URL: <http://www.nobelpreis.org/portugues>. 2004.

O'CONNEL, D., BECERERRIL, B., ROY-BURMAN, A., DAWS, M., MARKS, J.A. Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies. *J. Mol Biol*, v.321, p.49-56. 2002.

PADLAN, E.A. Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology*, v.31, p.169-217. 1994.

PAINTER, C., MONISTER, M., BONIN, B., BONA, C. Functional and molecular studies of V genes expressed in autoantibodies. *Immunol. Rev*, v.94, p.75-98. 1986.

PAUL, W.E. *Fundamental Immunology*. Lippincott Willians & Wilkins Publishers, 5 ed. 2003.

PLUNCKTHUN A. E SKERRA A. Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Meth. Enzimol.*, v.178, p.497-515. 1989.

POSNER, B., SMILEY, J., LEE, I & BENKOVIC, S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. *Trends Biochem. Sci*, v.19, p.145-150. 1994.

POWERS, D. B., AMERSDORFER, P., POUL, M. A., NIELSEN, U.B., SHALABY M. R., ADAMS, G.P., WEINER, L.M, MARKS, J.D. *Journal of Immunological Methods*, v.251, p.123–135. 2001.

PRESTA, L. G. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.58, p.640– 656. 2006.

PUTTERMAN, C., DIAMOND, B. Immunization with a pepetide surrogate for double-strand DNA (dsDNA) induces autoantibody production and renal immunoglobulin deposition. *J. Exp. Med*, v.188, p.29-38. 1998.

- RATCLIFFE, M.J.H & JACOBSEN, K.A. Rearrangement of immunoglobulin genes in chicken B cell development. *Seminars in Immunol*, v.6, p.175-184. 1994.
- REYNAUD, C.-A, DAHAN, A., ANQUEZ, V., WEILL, J.-C. Somatic hyperconversion diversifies the single V_H gene of chicken with a high incidence in the D region. *Cell*, v.59, p.171. 1989.
- REYNAUD, C-A, ANQUEZ, V., WEIL, J-C. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell*, v.48, p.379-388. 1987.
- RIOUX, J.D., ZDÁRSKÝ, E., NEWKIRK, M.M., RAUCH, J. Anti-DNA and anti-platelet specificities of SLE-derived autoantibodies: evidence for CDR2_H mutation and CDR3_H motifs. *Molecular Immunology*, v.32, n.10, p.638-396. 1995.
- ROBEN, P., BARBAS, S.M., SANDOVAL, L., LECERF, J-M., STOLLAR, D., SOLOMON, A., SILVERMAN, G.J. Repertoire cloning of Lupus anti-DNA autoantibodies. *J. Clin. Invest*, v.98, n.12, p.2827-2837. 1996.
- SAMBROOK, J. E RUSSEL, D.V. Molecular cloning. *A Laboratory Manual*, 3ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 2001.
- SCHROFF, R.W., FOON, K.A., BEATTY, S.M., OLDHAM, R.K., MORGAN, A.C.J. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Resarch*, v.45, p.879-885. 1985.
- SCOTT, J. Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem. Sci.*, v.17, p.241-245. 1993.
- SCOTT, J.K. E BARBAS III C.F. Phage display vectors. In: *Phage Display Laboratory Manual*, 1 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 2000. p.2.1-2.19

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

STOLLAR, B.D. Immunochemical analyses of nucleic acids. *Progress in Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, v.42, p.39-76. 1992.

SUZUKI, M., TAKEMURA, H., SUZUKI, H., SUMIDA, T. Light chain determines the binding property of human anti-dsDNA IgG autoantibodies. *Biochemical and biophysical research communications*, v.271, p.240-243. 2000.

THOMPSON, C.B. & NEIMAN, P.E. Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell*, v.48, p.369-378. 1987.

VELIZ, R.V. Alternative techniques to obtain monoclonal antibodies at a small scale: current state and future goals. *Biotechnologia aplicada*, v.19, p.119-131. 2002.

WATKINS, N.A., DU, L.M., SCOTT, J.P., OUWEHAND, W.H., HILLERY, C.A. Single-chain antibody fragments derived from a human synthetic phage display library bind thrombospondin and inhibit sickle cell adhesion. *Blood*, v.102, p.718-724. 2003.

WEILL, J-C & REYNAUD, C-A. The chicken B cell compartment. *Science*, v.238, p.1094-1098. 1987.

WEILL, J-C & REYNAUD, C-A. Generations of diversity by post-rearrangement diversification mechanisms: the chicken and the sheep antibody repertoires. *Immunoglobulin Genes*, 2 ed, Academic Press, San Diego, CA, USA, p 267-288. 1995.

WILLIAMS, S.C., FRIPIAT, J.P., TOMLINSON, I.M., IGNATOVICH, O., LEFRANC, M.P., WINTER, G. Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. *J. Mol Biol*, v.264, p.220-232. 1996.

WYNGAARDT, W.V., MALATJI, T., MASHAU, C., FEHRSEN, J., JORDAAN, F., MILTIADOU, D., PLESSIS, D. H. A large semi-sinthetic single-chain Fv phage display library based on chicken immunoglobulin genes. *Immunology division*, Onderstepoort Veterinary Institute, Republic of South Africa, pp 1-14. 2004.

YAMANAKA, H.I., INOUE, T & IKEDA-TANAKA, O. Chicken monoclonal antibody isolated by a phage display system. *J. immunol*, v.157, p.1156-1162. 1996.

ZACHAU, H.G. The immunoglobulin κ genes. In: *Immunoglobulin Genes*. Academic Press, p.173-191. 1995.

ZOUALI, M. Development of human antibody variable genes in systemic autoimmunity. *Immunol. Rev*, v.128, p.73-100. 1992.