

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

MAYKOL ADRIAN NOLL

**OBTENÇÃO DE ANTICORPOS E PEPTÍDEOS RECOMBINANTES ATRAVÉS
DE *PHAGE DISPLAY* PARA APLICAÇÃO EM IMUNODIAGNÓSTICO**

CURITIBA

2011

MAYKOL ADRIAN NOLL

OBTENÇÃO DE ANTICORPOS E PEPTÍDEOS RECOMBINANTES ATRAVÉS
DE *PHAGE DISPLAY* PARA APLICAÇÃO EM IMUNODIAGNÓSTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos
do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger
Co-orientadora: Dr^a. Daniela Parada Pavoni

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Aos meus pais Clair e Antonio, meu irmão Marlon e minha cunhada Luara;

A Daniela Parada Pavoni e Marco Aurélio Krieger, minha sincera admiração pela orientação, paciência, incentivo e caráter;

A Fernando Yamamoto, Fernanda Kugeratski, Eduardo Lemons, Ana Krieger e Adriana Ludwig, por todos os bons momentos e longas conversas;

Aos pesquisadores Alexandre Costa, Celina Poersch, Fabricio Marchini, Juliana de Moura, Larissa Alvarenga e Stenio Fragoso, pelas valiosas críticas e sugestões;

A Tahiana Brandalize e Camila Suarez, cujos esforços foram responsáveis pelo desenvolvimento de grande parte dos resultados aqui apresentados;

A Priscila Tonon e Luana Baby, pela amizade e valiosa, embora breve, contribuição a esse trabalho;

A Luciana Vandenberghe e Celina Jarletti, em nome de todos os colegas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, pelo companheirismo nesses últimos nove anos;

Aos amigos do Laboratório de Genômica: André, Ana Luisa, Andreia, Carla, Cassiano, Cheysa, Felipe, Flávia, Henrique, Juliane, Michel, Miriam, Newton, Nicole, Paola, Paulo e Rita;

Ao pessoal do Preparo – Nilson, Vanessa, Tania e Silvio – pois sem eles nenhuma pesquisa seria possível no ICC;

A todos os demais colegas do ICC pela amizade e companheirismo.

“Há três formas de ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.”

Confúcio

“Descubra a sua vocação e então, com todo o coração, dedique-se a ela.”

Sidarta Gautama

RESUMO

Neste trabalho a tecnologia de *phage display* foi empregada para selecionar: 1) anticorpos recombinantes anti-imunoglobulinas G e M humanas; e 2) mimotopos de *Treponema pallidum* e de vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). 1) Genes correspondentes às cadeias variáveis de imunoglobulinas – obtidos a partir do baço de camundongos imunizados com as frações Fc de IgG e Fc5 μ de IgM – foram unidos na forma de segmentos codificantes de anticorpos recombinantes scFv, que foram inseridos no genoma de fagos filamentosos e expressos de modo a serem expostos na superfície viral, fusionados a uma proteína do capsídeo. As bibliotecas de anticorpos assim geradas foram então selecionadas frente ao mesmo antígeno empregado na imunização: apesar de terem sido obtidos fagos expondo fragmentos scFv com forte afinidade pela porção Fc5 μ de IgM, não foi possível individualizá-los de maneira bem sucedida, o que impediu a adequada caracterização dos mesmos. 2) Bibliotecas de peptídeos Ph.D. da *New England Biolabs* foram submetidas à seleção frente a anticorpos monoclonais anti-*T. pallidum* e anti-HTLV. Embora não tenham sido encontrados peptídeos com elevada reatividade por este último, ao menos três sequências apresentando forte afinidade pelo anticorpo anti-*T. pallidum* foram selecionadas e isoladas com sucesso. Tais peptídeos podem representar excelentes alternativas aos antígenos atualmente empregados no diagnóstico de sífilis, e demonstram que a metodologia de *phage display* pode contribuir para a nacionalização da produção de reagentes para imunodiagnóstico, tornando mais eficiente a fabricação dos mesmos e impulsionando a geração de novos insumos.

Palavras-chave: *phage display*, imunodiagnóstico, anti-anticorpos, mimotopos, sífilis, HTLV.

ABSTRACT

In this work phage display technology was employed to screen: 1) antibodies against human IgG and IgM immunoglobulins; and 2) mimotopes for *Treponema pallidum* and human T-lymphotropic virus (HTLV). 1) Genes encoding the variable chains of antibodies – originated from spleen cells of mice immunized with Fc IgG and Fc5 μ IgM – were fused to generate segments encoding scFv recombinant antibodies, which were then inserted in the genome of filamentous phage and expressed so as to be displayed at the viral surface, fused to a capsid protein. The antibody libraries thus obtained were then screened against the same antigen employed in the immunization step: Although clones displaying scFv fragments with strong affinity for Fc5 μ IgM were obtained, it was not possible to successfully individualize them, preventing their proper characterization. 2) New England Biolabs' Ph.D. peptide libraries were screened against anti-*T. pallidum* and anti-HTLV monoclonal antibodies. Although peptides with high reactivity for the latter could not be found, at least three sequences showing strong affinity for the anti-*T. pallidum* antibody were successfully selected and isolated. These peptides can represent promising alternatives to the antigens currently used in the diagnosis of syphilis, and show that phage display technology can contribute to nationalize the production of diagnostic reagents, making their manufacture more efficient and stimulating the generation of novel products.

Keywords: phage display, immunodiagnosis, anti-antibodies, mimotopes, syphilis, HTLV.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – Representação de anticorpos IgG (a) e IgM pentamérico (b).....	15
FIGURA 02 – Representação de um anticorpo IgG e seus fragmentos.	17
FIGURA 03 – <i>Treponema pallidum</i> em laranja associado a um linfócito humano, em roxo (a) e classificação taxonômica do microrganismo (b).....	19
FIGURA 04 – Estrutura de um Deltaretrovirus (a) e micrografia eletrônica do HTLV-1, em verde, infectando um linfócito T humano, em amarelo (b).....	25
FIGURA 05 – Representação do genoma e do proteoma do HTLV.	26
FIGURA 06 – Representação esquemática da técnica de <i>phage display</i>	29
FIGURA 07 – Representação de um bacteriófago filamentosos.	31
FIGURA 08 – Ciclo de vida de um fago filamentosos.	32
FIGURA 09 – Representação do fagomídeo pCOMB3X.....	33
FIGURA 10 – Representação das bibliotecas de peptídeos Ph.D. (NEB).	35
FIGURA 11 – <i>Dot blot</i> do soro de camundongos BALB/c empregados na obtenção de RNA codificante de anticorpos anti-IgG e anti-IgM.....	70
FIGURA 12 – Obtenção de DNA codificante de fragmentos $V_{\kappa}L$, $V_{\lambda}L$, $V_{\kappa}S$, $V_{\lambda}S$ e V_H (a) e de anticorpos recombinantes scFv S e scFv L anti-IgM humana (b).	76
FIGURA 13 – Inserção do fragmento scFv L no fagomídeo vetor pCOMB3X.	77
FIGURA 14 – Alinhamento dos clones selecionados frente ao fragmento Fc5 μ com a região <i>stuffer</i> e pIII do fagomídeo pCOMB3X.....	82
FIGURA 15 – Alinhamento dos clones 02, 03, 04, 05, 06 e 25, selecionados frente ao fragmento Fc5 μ , com a região <i>stuffer</i> e pIII do vetor pCOMB3X.	83
FIGURA 16 – Alinhamento dos peptídeos obtidos pela seleção das bibliotecas Ph.D.-7 (a), Ph.D.-12 (b) e Ph.D.-C7C (c) frente ao anticorpo anti-HTLV.....	93
FIGURA 17 – Alinhamento dos peptídeos obtidos pela seleção das bibliotecas Ph.D.-7 (a), Ph.D.-12 (b) e Ph.D.-C7C (c) frente ao anticorpo anti- <i>T. pallidum</i>	93
FIGURA 18 – Alinhamento dos peptídeos isolados da biblioteca Ph.D.-C7C selecionada frente aos anticorpos anti- HTLV (a) e anti- <i>T. pallidum</i> (b).	99
FIGURA 19 – Expressão da etiqueta MBP (a) e do peptídeo 54 fusionado à MBP (b).....	102
FIGURA 20 – Expressão dos clones 56 (a) 62 (b) e 71 (c) fusionados à MBP, e perfil das cinco proteínas em gel corado com prata (d).....	102
FIGURA 21 – Alinhamento dos clones 54, 56 e 71 com a serina hidroximetil-transferase de <i>T. pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> cepa Nichols.....	109

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 – Titulação do soro do camundongo 2 após três inoculações com Fc5 μ IgM (todas as inoculações realizadas com alu-gel).....	71
GRÁFICO 02 – Titulação do soro do camundongo 4 após três inoculações com Fc5 μ IgM (primeira inoculação realizada com ACF).....	71
GRÁFICO 03 – Titulação do soro do camundongo 1 após três inoculações com Fc IgG (todas as inoculações realizadas com alu-gel).....	72
GRÁFICO 04 – Titulação do soro do camundongo 3 após três inoculações com Fc IgG (primeira inoculação realizada com ACF).	72
GRÁFICO 05 – Titulação do soro do camundongo 1 após seis inoculações com Fc IgG (todas as inoculações realizadas com alu-gel).....	73
GRÁFICO 06 – Titulação do soro do camundongo 3 após seis inoculações com Fc IgG (primeira inoculação realizada com ACF).	74
GRÁFICO 07 – Titulação do soro do camundongo <i>Swiss Webster</i> após três inoculações com Fc IgG (todas as inoculações realizadas com alu-gel).	74
GRÁFICO 08 – Titulação do soro do camundongo <i>Swiss Webster</i> após três inoculações com Fc IgG (primeira inoculação realizada com ACF).....	75
GRÁFICO 09 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de anticorpos scFv L anti-IgM frente ao fragmento Fc5 μ humano.....	78
GRÁFICO 10 – Monitoramento do segundo processo de seleção da biblioteca de anticorpos scFv L anti-IgM frente ao fragmento Fc5 μ humano.....	79
GRÁFICO 11 – Reatividade dos clones isolados da biblioteca de anticorpos anti-IgM humana selecionada frente ao fragmento Fc5 μ	80
GRÁFICO 12 – Reatividade dos clones 02, 03, 04, 05, 06 e 25, isolados da biblioteca de anticorpos anti-IgM humana selecionada frente ao fragmento Fc5 μ	83
GRÁFICO 13 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-7 frente ao anticorpo anti-HTLV.	85
GRÁFICO 14 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-7 frente ao anticorpo anti- <i>T. pallidum</i>	85
GRÁFICO 15 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-7; processo de referência realizado frente à estreptavidina.	86
GRÁFICO 16 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-12 frente ao anticorpo anti-HTLV.	87

GRÁFICO 17 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-12 frente ao anticorpo anti- <i>T. pallidum</i>	87
GRÁFICO 18 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C frente ao anticorpo anti-HTLV.....	88
GRÁFICO 19 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C frente ao anticorpo anti- <i>T. pallidum</i>	89
GRÁFICO 20 – Otimização dos parâmetros de imunoensaio dos clones selecionados frente ao anticorpo anti-HTLV, utilizado o clone 49 (FSPVPWR).....	94
GRÁFICO 21 – Otimização dos parâmetros de imunoensaio dos clones selecionados frente ao anticorpo anti- <i>T. pallidum</i> , utilizado o clone 50 (LYWPGHS).....	95
GRÁFICO 22 – Monitoramento do segundo processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C frente ao anticorpo anti-HTLV.....	96
GRÁFICO 23 – Monitoramento do segundo processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C frente ao anticorpo anti- <i>T. pallidum</i>	97
GRÁFICO 24 – Monitoramento do segundo processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C, realizado frente a estreptavidina.....	97
GRÁFICO 25 – Otimização dos parâmetros do imunoensaio dos clones selecionados frente ao anticorpo anti-HTLV, utilizado o clone 80 (PWYHWPN).....	99
GRÁFICO 26 – Otimização dos parâmetros do imunoensaio dos clones selecionados frente ao anticorpo anti- <i>T. pallidum</i> , utilizado o clone 54 (PLFFGHD).	100
GRÁFICO 27 – Reatividade dos clones isolados da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C selecionada frente ao anticorpo anti- <i>T. pallidum</i>	101
GRÁFICO 28 – Reatividade dos peptídeos expressos na forma solúvel com os anticorpos anti-MBP, anti- <i>T. pallidum</i> e anti-HTLV.....	103
GRÁFICO 29 – Reatividade dos peptídeos expressos na forma solúvel com um <i>pool</i> de soros positivos para sífilis.	104
GRÁFICO 30 – Reatividade de peptídeos expressos na forma solúvel com um <i>pool</i> de soros positivos para sífilis previamente incubado com MBP.	105
GRÁFICO 31 – Comparação da reatividade de peptídeos fusionados à MBP e sintéticos com o anticorpo anti- <i>T. pallidum</i> empregado na seleção.....	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Composição do <i>mix</i> de <i>primers</i> V _κ <i>sense</i>	42
TABELA 02 – Composição do <i>mix</i> de <i>primers</i> V _κ L <i>reverse</i>	42
TABELA 03 – Composição do <i>mix</i> de <i>primers</i> V _κ S <i>reverse</i>	42
TABELA 04 – Composição do <i>mix</i> de <i>primers</i> V _H <i>sense</i>	43
TABELA 05 – Composição do <i>mix</i> de <i>primers</i> V _H <i>reverse</i>	43
TABELA 06 – Sequências dos demais <i>primers</i> empregados neste trabalho.	43
TABELA 07 – Peptídeos apresentados pelos clones isolados das bibliotecas Ph.D. selecionadas frente ao anticorpo anti-HTLV.....	90
TABELA 08 – Sequências peptídicas apresentadas pelos clones isolados das bibliotecas Ph.D. selecionadas frente ao anticorpo anti- <i>T. pallidum</i>	91
TABELA 09 – Sequências peptídicas dos clones selecionados frente à estreptavidina.	92
TABELA 10 – Sequências peptídicas dos clones selecionados e isolados das bibliotecas Ph.D.-C7C frente aos diferentes ligantes empregados.....	98
TABELA 11 – Reatividade (λ_{450}) dos peptídeos solúveis frente ao <i>pool</i> de soros positivos para sífilis previamente incubado com MBP.	105
TABELA 12 – Alinhamento de peptídeos obtidos frente ao anticorpo anti- <i>T. pallidum</i> com o proteoma de <i>T. pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> cepa Nichols.	108

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE GRÁFICOS.....	8
LISTA DE TABELAS	10
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 IMUNOGLOBULINAS	15
2.2 SÍFILIS E <i>Treponema pallidum</i>	18
2.2.1 <i>Treponema pallidum</i>	19
2.2.2 Patogenia.....	20
2.2.3 Diagnóstico laboratorial.....	22
2.3 HTLV E INFECÇÕES ASSOCIADAS.....	24
2.3.1 Vírus linfotrópico de células T humanas	25
2.3.2 Patologias associadas	26
2.3.3 Diagnóstico laboratorial.....	28
2.4 PHAGE DISPLAY.....	29
2.4.1 Fagos filamentosos	30
2.4.2 Fagomídeos	32
2.4.3 Bibliotecas de anticorpos	33
2.4.4 Bibliotecas de peptídeos	34
3 OBJETIVOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 REAGENTES	37
4.1.1 Acetato de sódio 3M pH 5,2.....	37
4.1.2 Acrilamida 33/0,9%	37
4.1.3 Antibióticos.....	37

4.1.4 Brometo de etídeo 0,5 µg/mL.....	38
4.1.5 <i>Coating buffer</i>	38
4.1.6 <i>Column buffer</i>	38
4.1.7 EDTA 500 mM pH 8	38
4.1.8 Fenol : clorofórmio : álcool isoamílico	39
4.1.9 Géis de poliacrilamida.....	39
4.1.10 IPTG 1 mol/L.....	40
4.1.11 Marcadores de DNA.....	40
4.1.12 Meios de cultivo	40
4.1.13 PBS (<i>phosphate-buffered saline</i>) 10X.....	41
4.1.14 PEG / NaCl	41
4.1.15 <i>Primers</i>	42
4.1.16 SDS 10%	44
4.1.17 Solução anestésica para camundongos	44
4.1.18 Solução salina (NaCl 150 mM)	44
4.1.19 Soluções para coloração de géis de proteína	44
4.1.20 Tampão de amostra 4x para eletroforese de proteínas	45
4.1.21 Tampão de corrida 5X para eletroforese de proteínas.....	45
4.1.22 Tampão de eluição ácida	45
4.1.23 Tampão de fosfatase alcalina	46
4.1.24 Tampão glicerol 5X para eletroforese de DNA.....	46
4.1.25 Tampão iodeto	46
4.1.26 TBE (tris-borato-EDTA) 10X	46
4.1.27 Tampão TBS (<i>tris-buffered saline</i>)	47
4.1.28 Tampão TE (tris-EDTA)	47
4.1.29 Tampão Tris 1 mol/L pH 6,8-11	47
4.1.30 X-Gal 4%.....	47
4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	48
4.2.1 Obtenção de anticorpos anti-IgM e anti-IgG humanas.....	48
4.2.1.1 Imunização de camundongos	48
4.2.1.2 Obtenção e processamento do RNA	50
4.2.1.3 Obtenção de <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue eletrocompetente	52
4.2.1.4 Amplificação do fago <i>helper</i>	53
4.2.1.5 Construção das bibliotecas.....	54
4.2.1.6 Seleção das bibliotecas de anticorpos.....	57
4.2.1.7 Análise do processo de seleção	58

4.2.2 Seleção de mimotopos de <i>Treponema pallidum</i> e HTLV	60
4.2.2.1 Seleção das bibliotecas de peptídeos.....	61
4.2.2.2 Isolamento e análise de clones.....	63
4.2.2.3 Obtenção de <i>Escherichia coli</i> ER 2738 eletrocompetente	65
4.2.2.4 Expressão dos peptídeos na forma solúvel	65
4.2.2.5 Análise dos peptídeos solúveis.....	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-IgG E ANTI-IgM HUMANAS	70
5.1.1 Imunização de camundongos	70
5.1.2 Construção das bibliotecas	75
5.1.3 Seleção da biblioteca de anticorpos.....	77
5.1.4 Repetição do processo de seleção.....	78
5.1.5 Análise do processo de seleção	79
5.2 SELEÇÃO DE MIMOTOPOS DE <i>Treponema pallidum</i> E HTLV	84
5.2.1 Seleção das bibliotecas de peptídeos.....	84
5.2.2 Isolamento e análise dos clones	89
5.2.3 Repetição do processo de seleção	95
5.2.4 Expressão e análise dos peptídeos na forma solúvel	101
5.2.5 Investigação da especificidade do anticorpo anti- <i>T. pallidum</i>	107
6 CONCLUSÃO.....	110
7 PRÓXIMAS ETAPAS E PERSPECTIVAS.....	111
REFERÊNCIAS.....	111
ANEXO A – Especificações do fragmento Fc de IgG humana	125
ANEXO B – Especificações do fragmento Fc ₅ μ de IgM humana.....	126
ANEXO C – Licença CEUA / FIOCRUZ para manipulação de camundongos	127
ANEXO D – Sequência nucleotídica e mapa do fagomídeo pCOMB3X	128
ANEXO E – Clones isolados da biblioteca de anticorpos scFv L	130
ANEXO F – Especificações do anticorpo monoclonal anti-HTLV.....	136
ANEXO G – Especificações do anticorpo monoclonal anti- <i>T. pallidum</i>	137
ANEXO H – Painel de soros positivos para sífilis.....	138

1 INTRODUÇÃO

A produção de kits e reagentes para diagnóstico é um segmento econômico que movimenta mundialmente cerca de 25 bilhões de dólares por ano, e se caracteriza pelo intenso desenvolvimento e incorporação de novas tecnologias e estratégias de pesquisa. A balança comercial brasileira apresenta, no entanto, um saldo negativo da ordem de US\$ 200 milhões nesse mercado, e a indústria nacional de insumos para diagnóstico é caracterizada por produtos de baixo valor agregado e reduzida densidade tecnológica, cuja fabricação se concentra em um número restrito de empresas, em geral instituições públicas de ciência e tecnologia (GADELHA, 2008). Considerando que diversos programas nacionais de saúde pública se fundamentam em análises laboratoriais para o adequado desenvolvimento de suas ações, tal cenário torna evidente a dependência do país por reagentes importados.

Nesse sentido, o presente trabalho se propõe a contribuir com a nacionalização da produção de reagentes moleculares empregados em diagnóstico sorológico de doenças. A tecnologia do DNA recombinante é aqui utilizada em conjunto com a técnica de *phage display* na seleção e caracterização de anticorpos recombinantes contra imunoglobulinas IgG e IgM humanas, e também peptídeos que mimetizam determinantes antigênicos de *Treponema pallidum* e de vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). Além de demonstrar a aplicabilidade da estratégia adotada na obtenção de reagentes de elevada afinidade e especificidade, os insumos obtidos podem vir a representar excelentes alternativas aos antígenos atualmente empregados em diagnóstico.

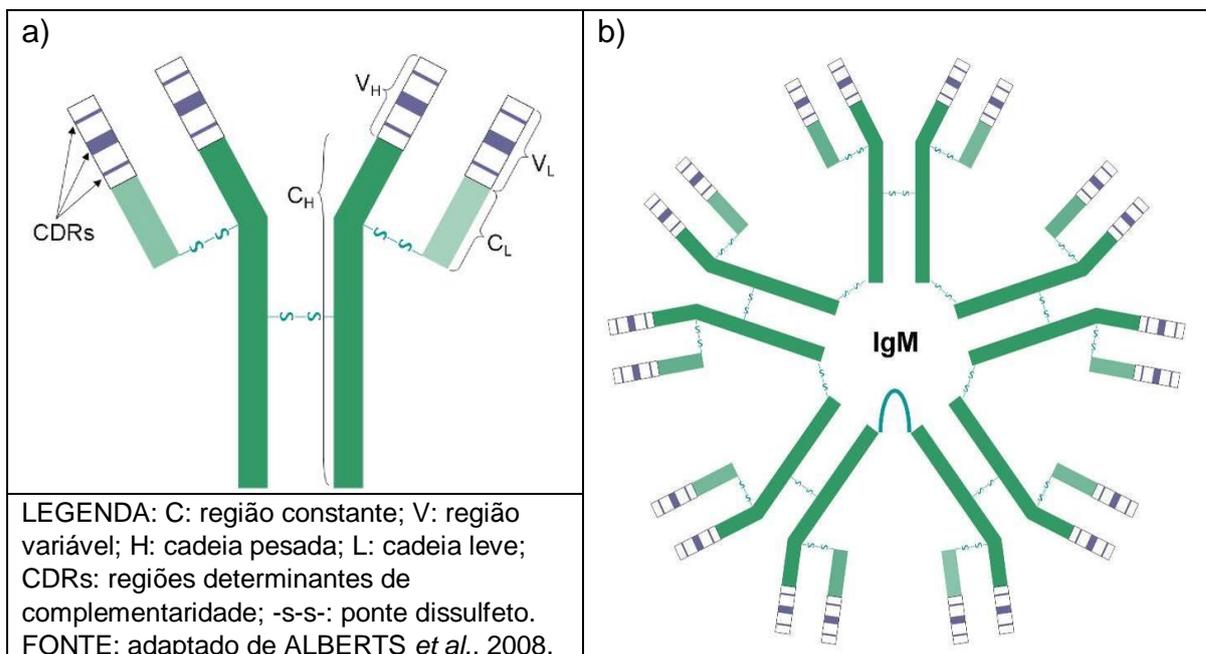
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMUNOGLOBULINAS

Anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos, papel fundamental para o adequado desenvolvimento da resposta imune de organismos vertebrados (revisado por ABBAS *et al.*, 2008). Sintetizadas por plasmócitos, células derivadas de linfócitos B, essas moléculas são formadas por duas cadeias leves (L, *light*) e duas cadeias pesadas (H, *heavy*), ligadas entre si por pontes dissulfeto. Cada cadeia pode ainda ser dividida em regiões constantes (C) e variáveis (V) (Figura 01).

Apesar de não covalente, a interação entre um anticorpo e um epítipo (porção do antígeno com potencial para desencadear uma resposta imunológica) é normalmente forte e extremamente específica. Cada indivíduo apresenta uma imensa variedade de anticorpos, capazes de interagir com uma infinidade de antígenos: essa diversidade é gerada por eventos de recombinação nos genes que codificam as regiões V, particularmente em três segmentos hipervariáveis compostos cada um por 5 a 17 aminoácidos (RUBINSTEIN *et al.*, 2008). São estes segmentos, denominados regiões determinantes de complementaridade (CDRs), que formam o sítio de ligação com o antígeno (revisado por ROITT *et al.*, 2002).

FIGURA 01 – Representação de anticorpos IgG (a) e IgM pentamérico (b).



A porção constante da cadeia leve é responsável pela interação da imunoglobulina com receptores do sistema imune. Mamíferos apresentam cinco isotipos de C_H (α , δ , ϵ , γ e μ) que definem cinco classes de anticorpos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), cada uma com papéis distintos. Em humanos e camundongos são encontrados ainda dois isotipos de C_L (κ e λ), em princípio não relacionados a funções específicas. Qualquer cadeia L pode se associar a qualquer cadeia H, mas em um dado anticorpo as duas cadeias H são sempre as mesmas, bem como as duas regiões L (revisado por ABBAS *et al.*, 2008).

Imunoglobulinas M podem ser encontradas na superfície de células B, na forma monomérica, ou secretadas como pentâmeros (Figura 01) (GEISBERGER *et al.*, 2006). São os primeiros anticorpos produzidos em resposta a qualquer antígeno, mas permanecem no organismo por um curto período. Já as imunoglobulinas G são produzidas em quantidades superiores às das demais classes, e são consideradas as principais responsáveis pela imunidade humoral (mediada por anticorpos) de um organismo (PIER *et al.*, 2004). Em comparação a IgM, a produção de IgG se inicia mais tardiamente e se estende por períodos mais longos, muitas vezes pelo resto da vida do indivíduo (revisado por ABBAS *et al.*, 2008).

Dessa forma, altas concentrações de IgM estão relacionadas a infecções agudas ou recentes, enquanto quantidades elevadas de IgG, sem traços de IgM, indica infecção crônica ou tardia. Portanto, a detecção e a dosagem desses anticorpos no soro de infectados pode indicar o estágio em que se encontra uma determinada doença, permitindo estabelecer mais adequadamente as estratégias de tratamento (JIN *et al.*, 2005; GOMEZ *et al.*, 2010).

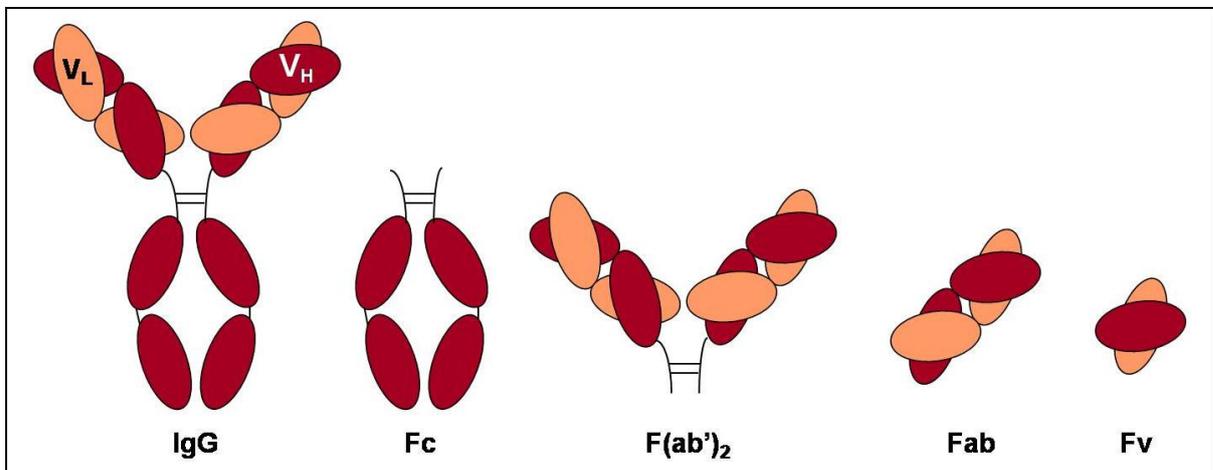
O interesse no estudo da estrutura de anticorpos e de sua interação com antígenos, bem como sua aplicabilidade em diagnóstico e terapêutica, estimulou o desenvolvimento de técnicas *in vivo* e *in vitro* para produção dessas moléculas. Um avanço nesse sentido foi a tecnologia do hibridoma (KÖHLER & MILSTEIN, 1975) que permite a obtenção de anticorpos monoclonais, moléculas capazes de interagir com um único epitopo – diferente de *pools* de anticorpos policlonais, com especificidades diversas. Entretanto, custos elevados e o longo tempo de produção ainda limitam a ampla utilização dessa estratégia (CABILLY *et al.*, 1984).

Outra possibilidade é a produção de anticorpos em bactérias (CABILLY *et al.*, 1984) e leveduras (WOOD *et al.*, 1985), envolvendo a clonagem do gene que codifica a imunoglobulina em um vetor adequado, inserção do vetor no

microrganismo, indução da expressão e purificação do produto final. Anticorpos inteiros produzidos dessa forma geralmente apresentam baixa eficiência de montagem e reduzida atividade, mas para aplicações que não requerem a função efetora do sistema imune que é desencadeada por C_H , é possível expressar somente V_L e V_H (HUSTON *et al.*, 1991).

Ao clonar as porções variáveis em um mesmo plasmídeo e expressá-las em *Escherichia coli*, SKERRA e PLÜCKTHUN (1988) obtiveram a molécula Fv (*Fragment, variable*), o menor domínio de imunoglobulina capaz de interagir com o antígeno (Figura 02). Como V_L e V_H não interagem covalentemente, a estabilidade desse fragmento é geralmente baixa (ARNDT *et al.*, 1998), problema que pode ser contornado pela geração de um fragmento variável de cadeia única (scFv – *single-chain Fragment, variable*). Essa molécula é obtida por meio de uma PCR de fusão, com a inserção de uma sequência que codifica um *linker* de 7 a 20 aminoácidos (BIRD *et al.*, 1988) ou pela adição de cisteínas para formação de uma ponte dissulfeto (YOUNG *et al.*, 1995; WÖRN & PLÜCKTHUN, 2001).

FIGURA 02 – Representação de um anticorpo IgG e seus fragmentos.



LEGENDA: Fc: fragmento cristalizável; Fab: fragmento de ligação ao antígeno (*antigen-binding*); F(ab')₂: dois Fabs unidos por pontes dissulfeto; Fv: fragmento variável. FONTE: LEPREVOST, 2006.

O desenvolvimento de terapias e diagnósticos *in vivo* de tumores é um campo de pesquisa que vem sendo imensamente beneficiado pelo emprego de anticorpos recombinantes. A fusão de Fv com moléculas fluorescentes (RAMJAWAN *et al.*, 2000) e quimioterápicos (HEITNER *et al.*, 2001) permite o direcionamento dessas moléculas para células-alvo específicas, facilitando a detecção e evitando possíveis efeitos adversos. Destaca-se ainda o emprego de

fragmentos scFv na neutralização de toxinas de veneno de animais (DEVAUX *et al.*, 2001), detecção de poluentes orgânicos (BROMAGE *et al.*, 2007) e análise de qualidade na indústria alimentícia (VICO *et al.*, 2010).

Além disso, em imunoenaios sorológicos a substituição de anticorpos originados de hibridomas por moléculas recombinantes pode, em muitos casos, reduzir custos e refinar a reatividade. Nesse sentido merecem destaque o emprego de moléculas scFv no diagnóstico da raiva (RAY *et al.*, 2001), hepatite B (SANCHEZ *et al.*, 1999) doenças virais (FEHRSEN *et al.*, 2005), e na detecção de príons (NAKAMURA *et al.*, 2004) e metabólitos de drogas (MOGHADDAM *et al.*, 2003).

2.2 SÍFILIS E *Treponema pallidum*

A sífilis é uma doença infecciosa crônica que vem há séculos traz prejuízos à humanidade e, apesar de haver tratamento eficaz e de baixo custo, permanece ainda hoje como grave problema de saúde pública, (AVELLEIRA & BOTTINO, 2006). É transmitida majoritariamente por meio de relações sexuais – o que a caracteriza como doença sexualmente transmissível (DST) – e também pela via vertical, que ocorre da mãe para o feto e ocasiona a sífilis congênita. Transfusões sanguíneas também podem transmitir a doença caso não sejam adotados os devidos procedimentos de hemovigilância (BRASIL, 2004).

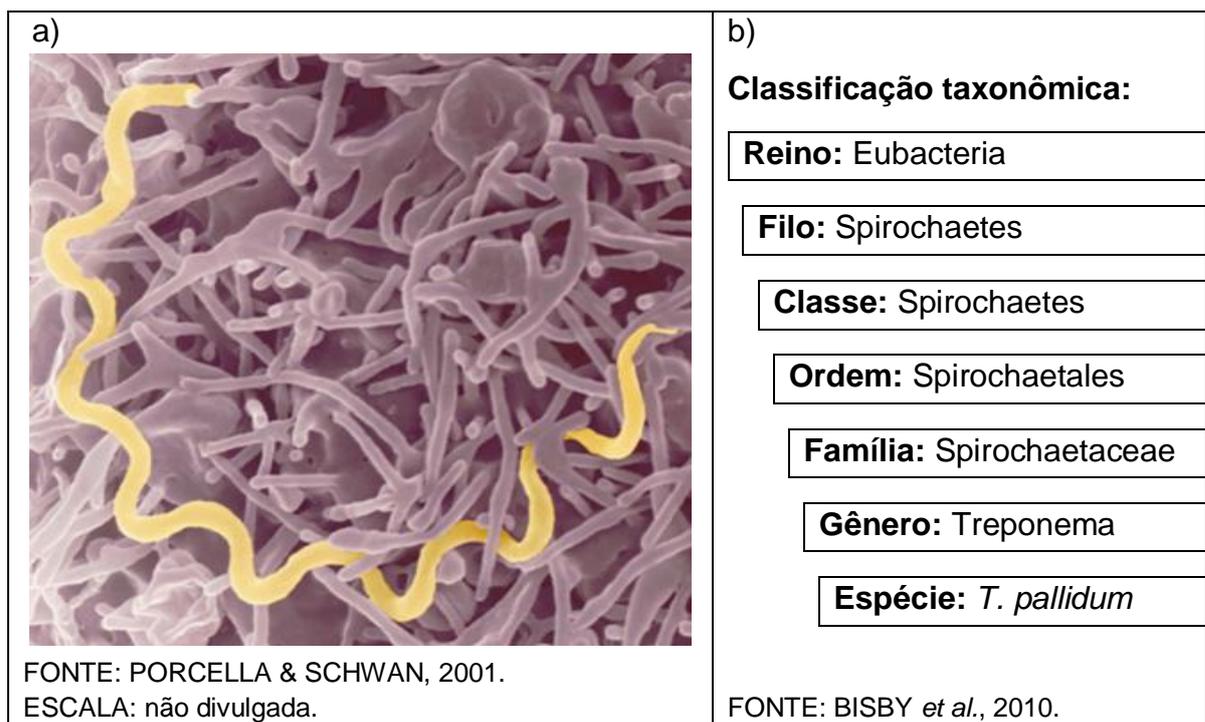
A sífilis se disseminou rapidamente pela Europa no século XV, tornando-se uma praga mundial nos séculos seguintes. A descoberta da penicilina no início do século XX possibilitou que a doença fosse devidamente tratada e controlada, até que mudanças no comportamento sexual da população ocorridas a partir da década de 1960 ocasionaram uma onda de disseminação de DSTs, com destaque para o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Este cenário renovou o interesse pelo estudo da sífilis e tornou evidente a necessidade de se desenvolver estratégias eficientes para seu controle (ROMPALO *et al.*, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2001), no mundo todo surgem anualmente 340 milhões de novos casos de DSTs passíveis de cura (sífilis, gonorreia, clamídia e tricomoníase). No Brasil são 12 milhões de novos casos a cada ano, com uma incidência geral de sífilis de 496 infectados para 100 mil habitantes, número que evidencia a gravidade da enfermidade no país (BRASIL, 2005).

2.2.1 *Treponema pallidum*

A sífilis é causada pela bactéria gram-negativa *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, ou simplesmente *T. pallidum* conforme a classificação taxonômica atual (Figura 03). É um organismo pertencente ao filo Spirochaetes e à família Treponemataceae, que inclui também os gêneros *Leptospira* e *Borrelia*, ambos de grande importância para a saúde humana (AVELLEIRA & BOTTINO, 2006). O gênero *Treponema* engloba mais três espécies de relevância médica: *T. endemicum*, agente causador da sífilis endêmica; *T. pertenue*, associado à boubia ou framboesia; e *T. carateum*, patógeno que causa a pinta; (NORRIS & WEINSTOCK, 2006).

FIGURA 03 – *Treponema pallidum* em laranja associado a um linfócito humano, em roxo (a) e classificação taxonômica do microrganismo (b).



T. pallidum possui forma espiral / helicoidal, com 6 a 15 µm de comprimento e aproximadamente 0,2 µm de espessura. Estas dimensões estão abaixo do poder de resolução de microscópios ópticos de campo claro, de forma que os treponemas são observáveis somente por métodos como microscopia eletrônica ou de campo escuro (LAFOND & LUKEHART, 2006). Esses organismos são fracamente corados pelas técnicas convencionais de coloração de bactérias; desse fato surgiu a designação *pallidum*, pálido em latim (AVELLEIRA & BOTTINO, 2006).

Treponemas apresentam duas membranas celulares (LEWIS & YOUNG, 2006). A externa é composta por ácido N-acetil-murâmico e N-acetil-glucosamina, como as de outras bactérias gram-negativas (AVELLEIRA & BOTTINO, 2006), mas apresenta baixa antigenicidade devido à ausência de lipopolissacarídeos (LAFOND & LUKEHART, 2006). Já a camada interna é formada por lipoproteínas (YELTON *et al.*, 1991), proteínas de ligação à penicilina (RADOLF *et al.*, 1989) e fosfolipídios ácidos denominados cardiolipinas (MADIGAN *et al.*, 2003). Apesar da grande proporção de elementos antigênicos, essa membrana possui fraca imunogenicidade pelo fato de ser envolvida pela camada externa (CASTRO, 2004). A resposta imunológica do hospedeiro é induzida principalmente pelas proteínas constituintes dos flagelos, que percorrem o microrganismo de uma extremidade a outra e são responsáveis pela sua locomoção (IZARD & LIMBERGER, 2006).

T. pallidum possui um cromossomo circular formado por 1138006 pares de base (pb) e que apresenta 1041 sequências codificantes preditas (FRASER *et al.*, 1998). Sessenta e sete destas sequências são genes associados à patogenicidade (CASTRO, 2004), com destaque para os genes *tpr*, que codificam proteínas de superfície como porinas e adesinas (GRAY *et al.*, 2006). A quantidade, organização e variabilidade desses elementos indica que os mesmos constituem um sistema de variação antigênica capaz de dificultar o reconhecimento do patógeno pelos anticorpos do hospedeiro, sendo caracterizado, portanto, como um mecanismo de evasão imunológica (CENTURION-LARA, 2006).

2.2.2 Patogenia

A sífilis se desenvolve em múltiplos estágios e apresenta uma grande variedade de manifestações clínicas, acometendo praticamente todos os órgãos do hospedeiro. A infecção se inicia quando o treponema, presente em lesões contagiantes na região anogenital de um organismo contaminado, infecta outro indivíduo através das mucosas e pequenas abrasões dérmicas decorrentes da relação sexual (AVELLEIRA & BOTTINO, 2006).

O patógeno inicia então sua difusão pelo organismo hospedeiro por meio dos vasos sanguíneos e linfáticos, processo conhecido como disseminação hematogênica (RADOLF *et al.*, 2006). O estágio primário da sífilis se manifesta nas

três semanas seguintes e é caracterizado pelo aparecimento de pequenas lesões (cancros) no local da inoculação e pelo crescimento anormal de linfonodos (linfadenopatia) nas regiões adjacentes (LAFOND & LUKEHART, 2006).

A sífilis secundária se inicia cerca de três meses após a infecção e seus sintomas são decorrentes da disseminação hematogênica. Lesões pálidas surgem na região torácica, e erupções mucocutâneas avermelhadas (exantemas) aparecem nas palmas das mãos e solas dos pés. Podem também surgir lesões necróticas (DON *et al.*, 1995), condilomas (verrugas infecciosas na região anogenital) e linfadenopatia generalizada (HIRA *et al.*, 1987), além de complicações renais, gástricas e hepatite (MULLICK *et al.*, 2004).

Caso não haja tratamento, esse estágio geralmente cessa em cerca de três meses, mas a infecção permanece latente por tempo indeterminado. Podem ocorrer manifestações secundárias recorrentes e complicações neurológicas que caracterizam um quadro clínico denominado neurosífilis, associado a dores de cabeça, náuseas, vômitos, rigidez na nuca, perda de audição e distúrbios visuais, entre outros sintomas (HOOK & MARRA, 1992).

Graças à difusão do tratamento com penicilina, manifestações tardias da sífilis são incomuns atualmente, mas segundo GJESTLAND (1955) *apud* LAFOND & LUKEHART (2006), um terço dos infectados latentes podem vir a desenvolver o estágio terciário da doença. Os sintomas aparecem de 20 a 40 anos após a contaminação e incluem inflamações progressivas que causam gomas, lesões nodulares e granulomatosas com necrose central que acometem pele e ossos. As mortes são decorrentes principalmente de complicações cardiovasculares, como insuficiência aórtica e aneurisma (sífilis cardiovascular) (ROSAHN, 1947 *apud* LAFOND & LUKEHART, 2006).

Além desses estágios, merece também destaque a condição clínica denominada sífilis congênita. A transmissão de *T. pallidum* da mãe para o feto pela via placentária pode ocorrer em qualquer momento da gravidez ou estágio da doença materna, embora seja mais frequente durante o primeiro ano da infecção, quando é maior a quantidade de treponemas na circulação sanguínea da gestante (SHEFFIELD *et al.*, 2002). A criança também pode ser contaminada durante o parto, pelo contato com lesões genitais maternas (SILVA, 2009).

O tratamento nos primeiros seis meses da gravidez geralmente previne a transmissão e o nascimento prematuro, aborto ou óbito fetal. Recém-nascidos

infectados desenvolvem sintomas semelhantes à sífilis secundária, e podem falecer nas primeiras semanas de vida devido a infecções bacterianas, hemorragia pulmonar e hepatite (CHAPEL, 1988). Manifestações tardias, a partir dos dois anos de vida, incluem malformações ósseas (fronte olímpica, palato em ogiva), surdez, deficiência mental, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e anemia (SILVA, 2009).

2.2.3 Diagnóstico laboratorial

A sífilis pode ser diagnosticada por métodos laboratoriais diretos ou indiretos. Os primeiros permitem evidenciar a presença do patógeno em amostras clínicas, enquanto os últimos detectam anticorpos contra o patógeno no soro dos indivíduos infectados.

A microscopia de campo escuro é um método direto que permite diferenciar *T. pallidum* de outras bactérias em amostras teciduais de lesões úmidas e aspirados de linfonodo devido a características morfológicas e de mobilidade distintas (DYCK *et al.*, 1999, RODRIGO & SILVA, 2003). É um exame de execução simples, mas que apresenta limitações particularmente quanto à sua especificidade. Resultados positivos não confirmam necessariamente a doença, pois *T. pallidum* pode ser confundido com outras espiroquetas, enquanto falso-negativos podem ser decorrentes de fatores técnicos (CASTRO, 2004).

Outro método direto, o *Direct Fluorescent Antibody Treponema pallidum* (DFA-TP), é um ensaio de imunofluorescência capaz de evidenciar a presença do treponema em amostras clínicas pela marcação com anticorpos específicos conjugados à isotiocianato de fluoresceína e subsequente observação em microscópio de fluorescência (CASTRO, 2004). O DFA-TP é um teste mais complexo que a microscopia de campo escuro, mas apresenta maior sensibilidade e especificidade e não requer que as amostras sejam analisadas imediatamente após a coleta (BASEMAN & HAYES, 1980).

Os métodos indiretos para diagnóstico da sífilis são classificados em treponêmicos e não treponêmicos. Os primeiros são em geral mais sensíveis e específicos (RODRIGO & SILVA, 2003), mas também mais complexos e custosos, e podem conferir resultados positivos com títulos baixos por toda a vida do paciente, mesmo após a resolução da sífilis; esta condição é denominada *cicatriz sorológica*

(AVELLEIRA & BOTTINO, 2006). Assim, a prática laboratorial corrente recomenda a utilização de um teste não treponêmico e de um treponêmico para confirmação do diagnóstico de sífilis (BRASIL, 2004).

Exames não treponêmicos, como o *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL) e o *Rapid Plasma Reagin* (RPR), são testes de floculação de fácil execução e baixo custo, indicados para acompanhamento e avaliação da eficácia do tratamento da sífilis. São capazes de detectar no soro dos pacientes anticorpos não específicos que interagem com cardiolipina e lipoproteínas de *T. pallidum* (DYCK *et al.*, 1999). No entanto, tais ensaios podem fornecer resultados falso-positivos para gestantes e pacientes com doenças virais e doenças autoimunes como lúpus e artrite reumatoide, pelo fato de também reagirem com fosfolipídios liberados pela destruição do endotélio vascular do indivíduo (SILVA, 2009).

O VDRL emprega como antígeno uma solução alcoólica composta por cardiolipina, lecitina e colesterol, e seu resultado é analisado em microscópio (LAFOND & LUKEHART, 2006). O RPR é uma modificação do VDRL que utiliza também cloreto de colina, reagente que elimina a necessidade de uma etapa prévia de inativação da amostra (JENUN & OTT, 1991), e partículas de carvão que permitem a visualização direta da floculação, dispensando a necessidade de observação em microscópio (DYCK *et al.*, 1999).

Exames treponêmicos, como o *Treponema pallidum Hemagglutination Assay* (TPHA) e o *Fluorescent Treponema Antibody Absorbed* (FTA-Abs), detectam imunoglobulinas específicas contra *T. pallidum* no soro de infectados, e utilizam como antígeno o próprio microrganismo ou algumas de suas moléculas constituintes. O TPHA emprega eritrócitos de galinha sensibilizados com extratos de *T. pallidum*: caso estejam presentes no soro analisado, anticorpos anti-treponema aglutinam com os eritrócitos formando uma rede difusa; na ausência de anticorpos não ocorre aglutinação e os eritrócitos sedimentam (DYCK *et al.*, 1999).

O FTA-Abs é um método de imunofluorescência indireta que se torna reativo cerca de quinze dias após o início da infecção. Quando anticorpos anti-*T. pallidum* estão presentes no soro, a interação com o antígeno é observada em microscópio de fluorescência pela adição de um anticorpo anti-humano conjugado à fluoresceína (LAFOND & LUKEHART, 2006). O FTA-Abs é passível de automação e a interpretação de seu resultado não depende do operador, o que diminui a

possibilidade de erro. No entanto, resultados falso-positivos podem ocorrer em pacientes com hanseníase, malária, leptospirose e lúpus (BRASIL, 2004).

Cinco proteínas de *T. pallidum* vêm sendo amplamente utilizadas para captura de anticorpos nos testes de diagnóstico sorológico da sífilis: TpN15, TpN17, TpN47, TmpA e TpN37 (revisado por SAMBRI *et al.*, 2001). Esta última é um componente estrutural do flagelo, enquanto as demais foram caracterizadas como proteínas de membrana – TpN15, TpN17 e TpN47 são lipoproteínas (revisado por SATO *et al.*, 1999). Conforme a configuração do método de detecção, estas moléculas podem ser empregadas na forma nativa ou recombinante, em diferentes combinações e proporções (SAMBRI *et al.*, 2001).

2.3 HTLV E INFECÇÕES ASSOCIADAS

O vírus linfotrópico de células T humanas (*human T-lymphotropic virus*, HTLV) foi descrito pela primeira vez por POIESZ e colaboradores em 1980. Dois anos mais tarde, KALYANAMARAN e colaboradores identificaram uma segunda variante do vírus, denominada HTLV-2 – a primeira passou então a ser chamada HTLV-1. Este foi o primeiro retrovírus associado a uma neoplasia em humanos, o linfoma de células T (BORDUCCHI *et al.*, 1999), além de ser responsável pela paraparesia espástica tropical (GESSAIN *et al.*, 1985).

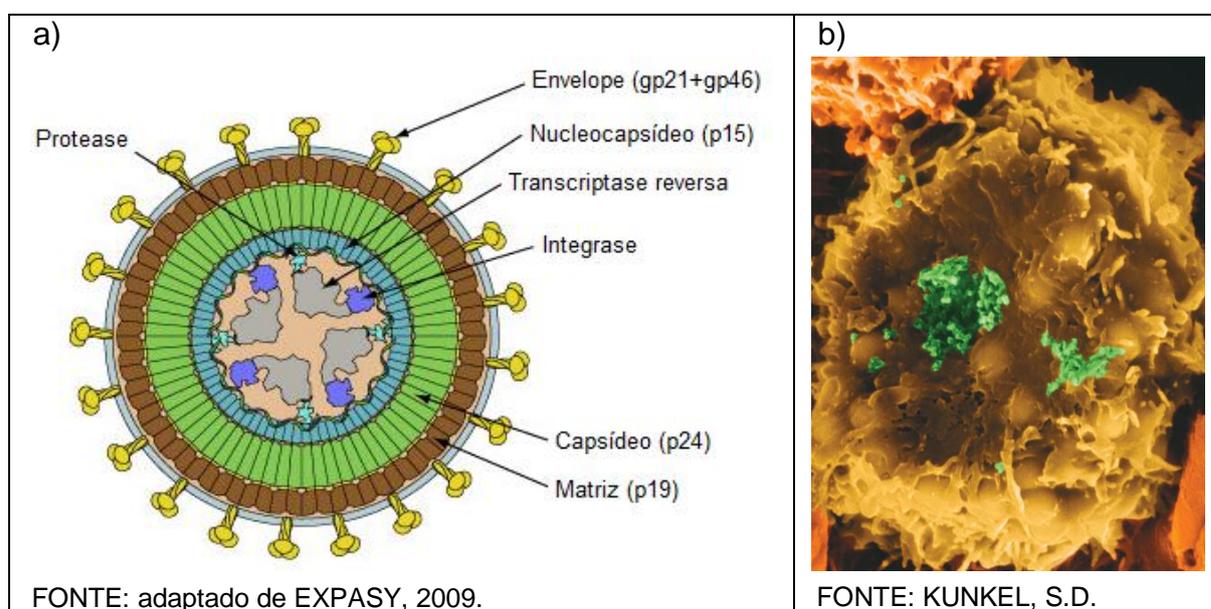
Atualmente a infecção por HTLV-1 apresenta focos de endemicidade distribuídos por todo o mundo (KAZANJI & GESSAIN, 2003), com destaque para o sudoeste do Japão, ilhas do Caribe, América do Sul e África equatorial (BRASIL, 2004). O HTLV-2 é mais encontrado no ocidente, principalmente em usuários de drogas injetáveis e grupos indígenas no continente americano. No Brasil há focos endêmicos do HTLV-1 na Região Nordeste e do HTLV-2 na Amazônia (LIMA, 2006).

Diversos estudos indicam a via sanguínea como a mais eficiente forma de transmissão do HTLV (revisado por MANNNS *et al.*, 1999). O vírus também pode ser transmitido verticalmente – via placenta, durante o parto natural e pelo aleitamento (BRASIL, 2004) – e ainda sexualmente – sendo mais eficiente do homem para a mulher do que o inverso, fato possivelmente devido à quantidade de linfócitos infectados liberada durante a ejaculação (MANNNS *et al.*, 1999).

2.3.1 Vírus linfotrópico de células T humanas

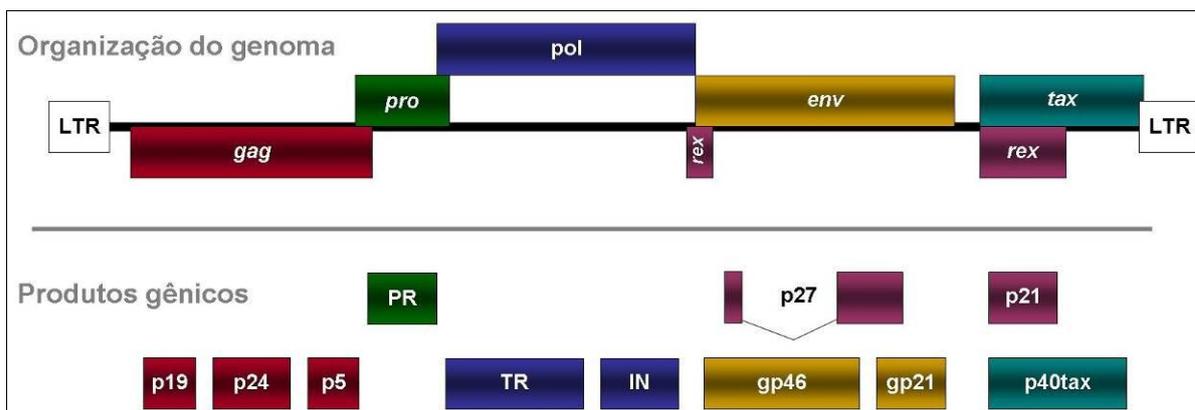
O HTLV (Figura 04) é um retrovírus da subfamília Orthoretrovirinae (a mesma do HIV) e do gênero Deltaretrovirus. Seu núcleo (*core*) possui diâmetro aproximado de 90 nm e é composto pelas proteínas do capsídeo, do nucleocapsídeo e da matriz (respectivamente p24, p15 e p19, com os números correspondendo à massa molar das proteínas, em kDa). Essa estrutura é envolvida por um envelope lipoprotéico formado pelas glicoproteínas transmembrana (gp21) e de superfície (gp46), conferindo ao vírion cerca de 120 nm de diâmetro (LIMA, 2006).

FIGURA 04 – Estrutura de um Deltaretrovirus (a) e micrografia eletrônica do HTLV-1, em verde, infectando um linfócito T humano, em amarelo (b).



Os genomas de HTLV-1 e 2 possuem respectivamente 8507 e 8952 pb (COFFIN *et al.*, 1997; SHIMOTOHNO *et al.*, 1985) e compartilham 65% da sequência de nucleotídeos (BRASIL, 2004). O material genético do HTLV é formado por duas fitas de RNA de polaridade positiva e é constituído pelos genes *gag*, *pol* e *env* e pelas sequências reguladoras LTR (*long terminal repeat*) (Figura 05). A região *env* codifica uma proteína de 67 kDa que origina os componentes do envelope p46 e gp21, enquanto o gene *gag* codifica uma poliproteína de 53 kDa que, ao ser clivada pelo produto do gene *pro*, gera as proteínas p19, p24 e p15. Essa protease é também responsável pelo processamento do produto do gene *pol*, dando origem a uma transcriptase reversa e uma integrase (LIMA, 2006).

FIGURA 05 – Representação do genoma e do proteoma do HTLV.



LEGENDA: LTR: repetições longas terminais; *gag*: codifica as proteínas da matriz (p19), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p15); *pol*: codifica uma transcriptase reversa (TR) e uma integrase (IN); *pro*: codifica a protease (PR) que atua no processamento dos produtos de *gag* e *pol*; *rex*: codifica p27 e p21, que regulam a expressão gênica viral; *env*: codifica as glicoproteínas transmembrana (gp21) e de superfície (gp46); *tax*: codifica a fosfoproteína p40tax, indutora da transcrição.

FONTE: adaptado de EXPASY, 2009.

O genoma do HTLV difere do material genético dos demais retrovírus pela presença dos genes *tax* e *rex*. O primeiro codifica a fosfoproteína p40Tax, que induz o início da transcrição ao interagir com a LTR da extremidade 3' do material genético, enquanto o segundo codifica duas proteínas, de 21 e 27 kDa, que regulam a expressão dos demais genes (SANTOS & LIMA, 2005).

A replicação do HTLV segue o ciclo lisogênico, processo que se inicia com a adesão do vírus à membrana da célula hospedeira e penetração do RNA viral no citoplasma, prosseguindo com a transcrição reversa, transporte do DNA viral de fita dupla para o núcleo e inserção no genoma da célula pela ação da integrase. Esse material genético (provírus) é eventualmente processado pela maquinaria celular, dando origem a RNA viral de fita simples e às proteínas virais. As etapas de montagem e encapsulação são seguidas pela associação do nucleocapsídeo com a membrana e liberação da partícula viral (BORDUCCHI *et al.*, 1999).

2.3.2 Patologias associadas

A manifestação clínica da infecção por HTLV depende do tipo e da magnitude da resposta imune do hospedeiro frente aos antígenos virais e do local ou órgão onde ocorre a reação inflamatória. O vírus apresenta um período de latência

prolongado: o tempo decorrente entre a infecção e o aparecimento dos sintomas pode compreender muitos anos, e apenas cerca de 5% dos portadores acabam por manifestar enfermidades correlatas (KAZANJI & GESSAIN, 2003). A transmissão da mãe para o feto através da via placentária é associada a maiores riscos de desenvolvimento de patologias (BRASIL, 2004).

O HTLV-1 infecta linfócitos T maduros, particularmente células T CD4+, estimulando sua proliferação exacerbada. Além da leucemia / linfoma de células T e da paraparesia espástica tropical, essa variante está relacionada a outras enfermidades, como polimiosites, artropatias e dermatite infectiva (BRASIL, 2004). O subtipo 2 infecta principalmente linfócitos T CD8+ (SANTOS & LIMA, 2005), mas sua associação com as patologias mencionadas ainda não foi claramente evidenciada (revisado por LIMA, 2006).

Pacientes com linfoma de células T normalmente são imunodeficientes, com predisposição ao desenvolvimento de infecções oportunistas (MANNNS *et al.*, 1999). Nas formas mais graves da doença ocorre síndrome tumoral caracterizada por linfadenomegalias, lesões viscerais, hepatoesplenomegalia, infiltração pulmonar e lesões dérmicas e ósseas. Metade dos indivíduos infectados desenvolve hipercalcemia, manifestação clínica pelo aumento de reabsorção óssea que ocasiona arritmia / taquicardia, sonolência, confusão mental, letargia, diminuição do fluxo urinário e insuficiência renal. Nesses casos a sobrevida geralmente não ultrapassa 12 meses, mesmo quando os pacientes são submetidos a tratamentos quimioterápicos agressivos (SILVA *et al.*, 2002).

A paraparesia espástica tropical, também conhecida como mielopatia associada ao HTLV, é uma infecção de evolução lenta e progressiva ocasionada pelo processo de desmielinização de neurônios que é desencadeado pela infiltração parenquimatosa de linfócitos T. A inflamação acomete principalmente a medula espinhal causando fraqueza e tensão muscular permanente, que comprometem a motricidade do indivíduo infectado. Essa condição, denominada espasticidade, acomete principalmente músculos da cintura pélvica e dos membros inferiores, causando fadiga e diminuição de velocidade e equilíbrio durante a caminhada. Os movimentos das pernas se tornam lentos, arrastados e perdem seletividade, destacando-se ainda uma acentuada imobilidade da articulação sacro-ilíaca (LANNES *et al.*, 2006). Outros sintomas incluem distúrbios nos esfíncteres da bexiga e do intestino (RIBAS & MELO, 2002).

2.3.3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de rotina de infecção por HTLV emprega imunoenaios enzimáticos (*enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) para detecção de anticorpos gerados pelo organismo infectado contra antígenos do *core* e do envelope viral (SANTOS & LIMA, 2005). Os primeiros testes desenvolvidos para este fim empregavam apenas antígenos de HTLV-1; devido à similaridade genética entre as duas variantes, anticorpos anti-HTLV-2 eram detectados em 70% dos casos.

Os ensaios atuais utilizam antígenos recombinantes específicos, capazes de diferenciar entre as infecções causadas pelas duas variantes (BRASIL, 2004). O diagnóstico de infecção por HTLV-1 emprega lisados virais do mesmo; para detecção de HTLV-2, a esse lisado são adicionadas proteínas recombinantes dessa segunda variante (HJELLE *et al.*, 1993; SANTOS & LIMA, 2005).

O ELISA é um método de elevada sensibilidade, mas que com frequência fornece resultados falso-positivos (POIESZ *et al.*, 2000), o que torna necessária a confirmação de seu resultado por *western blot* ou técnicas moleculares. Como há elevada concordância dos resultados obtidos pelas duas técnicas, o primeiro é mais utilizado pelo fato de o diagnóstico molecular exigir reagentes caros e infraestrutura especial (BRASIL, 2004). O *western blot* emprega como antígeno um lisado viral acrescido da porção N-terminal da proteína gp21 de uma das variantes, conforme especificidade do ensaio, o que reduz o número de reações inespecíficas e resultados falso-positivos (VARMA *et al.*, 1995).

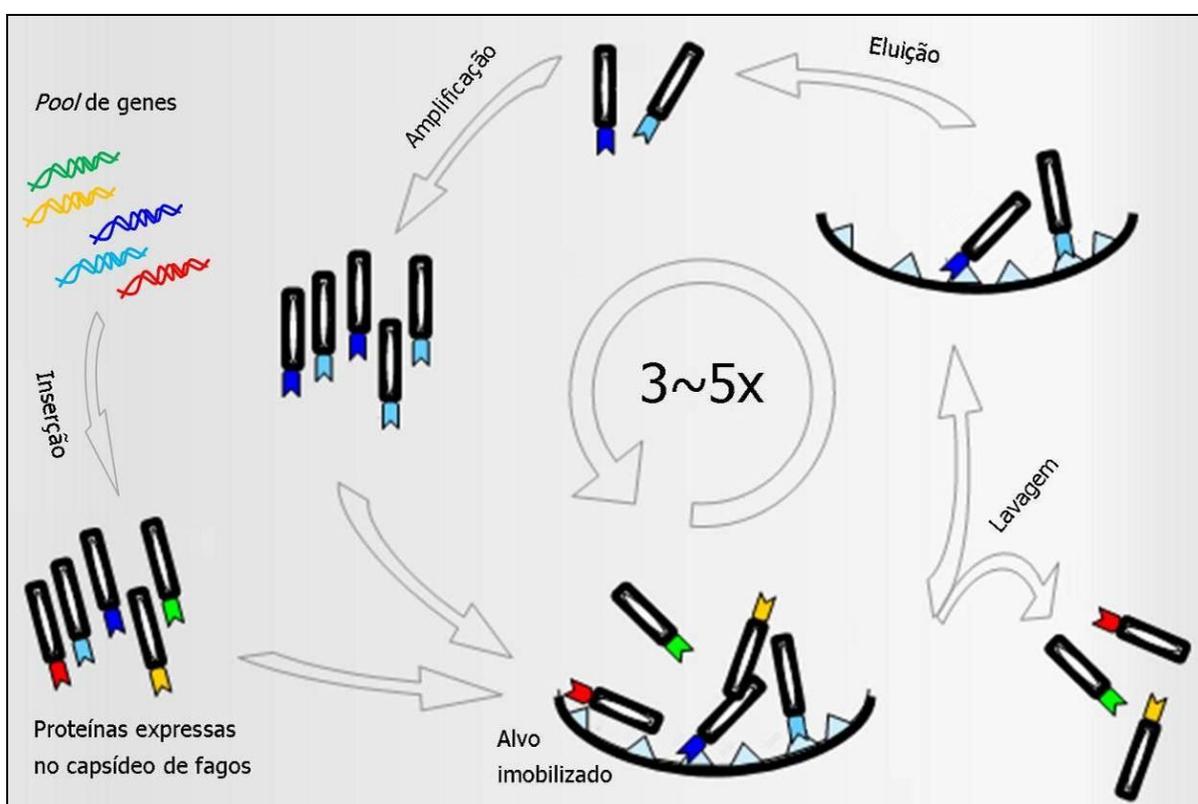
O diagnóstico molecular de infecção por HTLV emprega a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polimerase chain reaction*) para amplificar o DNA viral presente em células sanguíneas (HASHIMOTO *et al.*, 1998). Esta metodologia é geralmente utilizada para esclarecer resultados indeterminados dos ensaios de *western blot*, ou quando este é incapaz de distinguir entre as infecções causadas pelos dois subtipos – nesse caso são usados *primers* específicos, que amplificam exclusivamente uma das variantes (SANTOS & LIMA, 2005). O diagnóstico molecular é também empregado para confirmar a infecção de crianças em fase de amamentação, já que nesse caso provas sorológicas podem detectar anticorpos maternos transferidos por meio do aleitamento (ANDO *et al.*, 2003).

2.4 PHAGE DISPLAY

Descrita inicialmente por SMITH (1985), o termo *phage display* se refere à exposição de moléculas na superfície de vírus bacteriófagos e à seleção destas com base na sua afinidade por uma molécula-alvo (BENHAR, 2001). Aliada à tecnologia do DNA recombinante, esta técnica representa uma poderosa ferramenta para obtenção de moléculas com grande potencial de aplicação biotecnológica. Além disso, desenvolvimentos recentes vêm tornando a técnica compatível com sistemas de produção e análise *high-throughput* (DIAS-NETO *et al.*, 2009).

A metodologia (Figura 06) envolve inicialmente a inserção de genes que codificam milhões de proteínas no genoma de bacteriófagos, gerando assim uma biblioteca. A inserção é realizada de modo que essas proteínas sejam expressas na superfície viral, fusionadas a uma proteína do capsídeo. Quanto maior a variedade representada na biblioteca, maior é a probabilidade de se encontrar fagos expondo proteínas que interajam com o alvo (POSNER *et al.*, 1994).

FIGURA 06 – Representação esquemática da técnica de *phage display*.



FONTE: adaptado de HOOGENBOOM, 2002.

Em um processo denominado *panning* (PARMLEY & SMITH, 1988), a biblioteca é então apresentada à molécula-alvo, que geralmente se encontra imobilizada em suporte sólido (placa de imunoensaio, imunotubo, membrana, microesfera). Fagos expressando proteínas que interagem fracamente com o alvo são eliminados por lavagens sucessivas, enquanto aqueles que expõem moléculas com elevada afinidade pelo mesmo são recuperados por eluição.

Nessa etapa são geralmente utilizados tampões ácidos ou de elevada força iônica, que desestabilizam de modo inespecífico interações entre proteínas. Caso um ligante específico pelo alvo seja conhecido, é possível utilizá-lo para competir com os vírus pela interação com o sítio de ligação. Essa estratégia de eluição competitiva aumenta a probabilidade de se obter fagos expondo moléculas que interajam especificamente pelo alvo, descartando-se aqueles que se ligam ao suporte ou à proteína empregada no bloqueio do mesmo (VODNIK *et al.*, 2011).

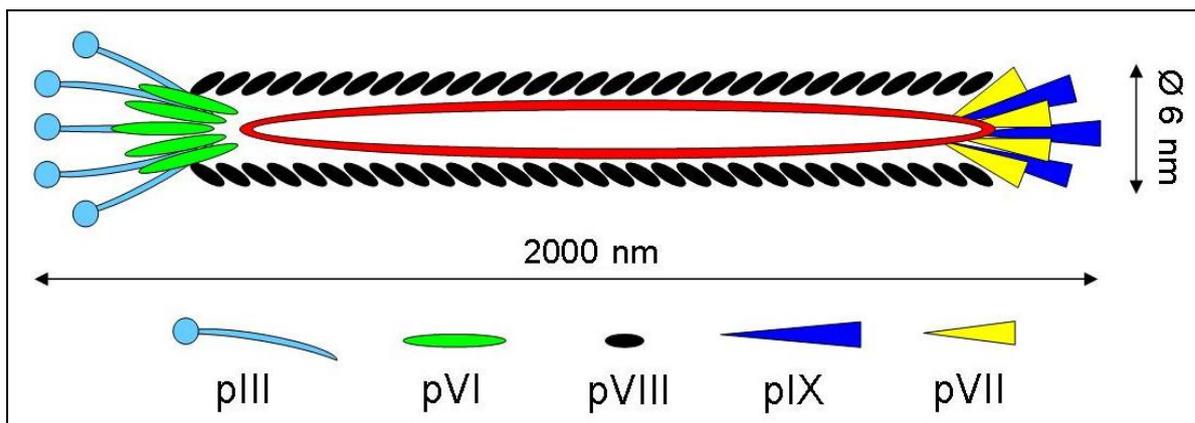
Depois de eluídos, os fagos são amplificados em cultivo bacteriano e submetidos a novos ciclos de seleção (ligação, eluição e amplificação). Esse processo é monitorado através da titulação dos fagos adicionados (*input*) e recuperados (*output*) em cada ciclo, e também pela realização de imunoensaios. Em geral três a cinco ciclos são suficientes para obter um *output* composto por uma grande proporção de fagos expondo moléculas com elevada afinidade pelo ligante. Clones são então isolados desse *output*, sequenciados, analisados quanto à afinidade e especificidade, e eventualmente obtidos na forma solúvel (não fusionada a um fago) e destinados às mais diversas aplicações (BARBAS *et al.*, 2001).

2.4.1 Fagos filamentosos

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus da família Inoviridae que são capazes de infectar bactérias gram-negativas, e cujo estudo contribuiu de significativamente para o avanço da biologia molecular (MCAULIFFE *et al.*, 2007). Em *phage display* destaca-se o emprego de fagos filamentosos, que pertencem ao gênero *Inovirus* e infectam enterobactérias como *E. coli*. Tal uso se justifica pelo fato de esses vírus não causarem uma infecção lítica na célula, mas induzirem um estado no qual ela produz e secreta continuamente partículas virais sem sofrer lise, possibilitando a obtenção de um grande número de fagos (BARBAS *et al.*, 2001).

Fagos filamentosos, como os vírus f1, fd e M13, são formados por uma fita simples e circular de DNA de cerca de 6400 bases, envolta em um capsídeo composto pelas proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX (SMITH & PETRENKO, 1997) (Figura 07). Embora estas cinco proteínas possam ser utilizadas para apresentação de moléculas, pVIII e pIII são mais empregadas para este fim (RUSSEL *et al.*, 2004).

FIGURA 07 – Representação de um bacteriófago filamentososo.

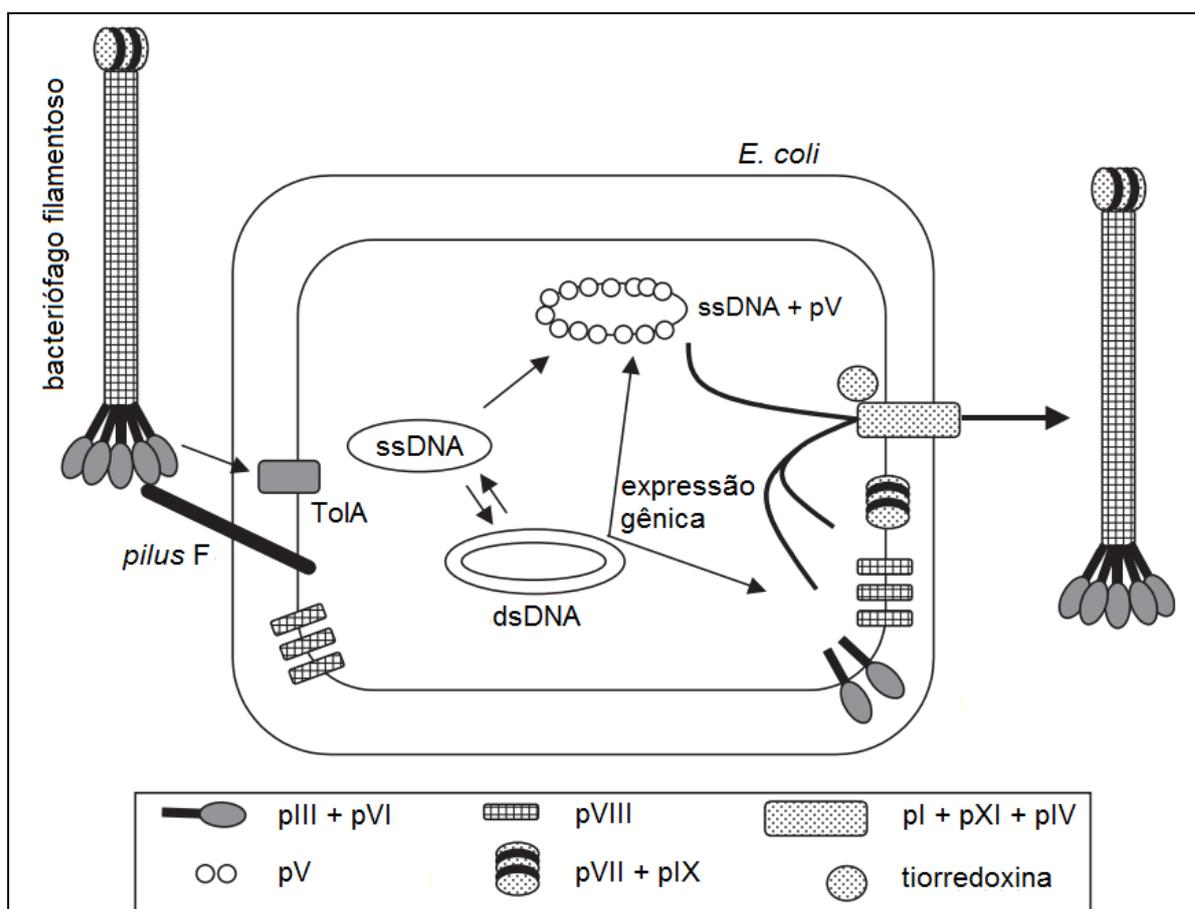


FONTE: adaptado de KONTHUR & WALTER, 2002.

Presente em milhares de cópias por vírion, a proteína pVIII permite a apresentação de grandes quantidades da molécula de interesse, mas a inserção de seqüências maiores que oito aminoácidos pode desestabilizar a partícula viral. Já a proteína pIII, presente em três a cinco cópias por fago, suporta a inserção de proteínas tão grandes quanto um anticorpo scFv (250 aminoácidos, 27kDa); no entanto, a infectividade do vírus pode ser comprometida (RUSSEL *et al.*, 2004).

A infecção de *E. coli* pelo fago filamentososo (Figura 08) se inicia pela interação de pIII com o *pilus* sexual da célula e pela despolimerização do capsídeo, processo que é desencadeado pelo complexo bacteriano TolA. O genoma do fago penetra no citoplasma e é convertido em DNA de fita dupla, que serve de molde para a replicação e a produção das proteínas virais (RUSSEL *et al.*, 2004). O acúmulo de pII e pX reprime a geração e a expressão de DNA viral, além de induzir a montagem do vírion, em um processo que ocorre junto à membrana plasmática (AZZAY & HIGHSMITH, 2002). A proteína bacteriana tiorredoxina, em conjunto com pI, pIV e pXI, atuam no empacotamento do genoma viral – substituindo pV pelas proteínas do capsídeo, que se encontram previamente ancoradas à membrana – e na secreção das partículas virais (BARBAS *et al.*, 2001).

FIGURA 08 – Ciclo de vida de um fago filamentosso.



LEGENDA: ssDNA: DNA de fita simples; dsDNA: DNA de fita dupla; pI a pXI: proteínas virais.

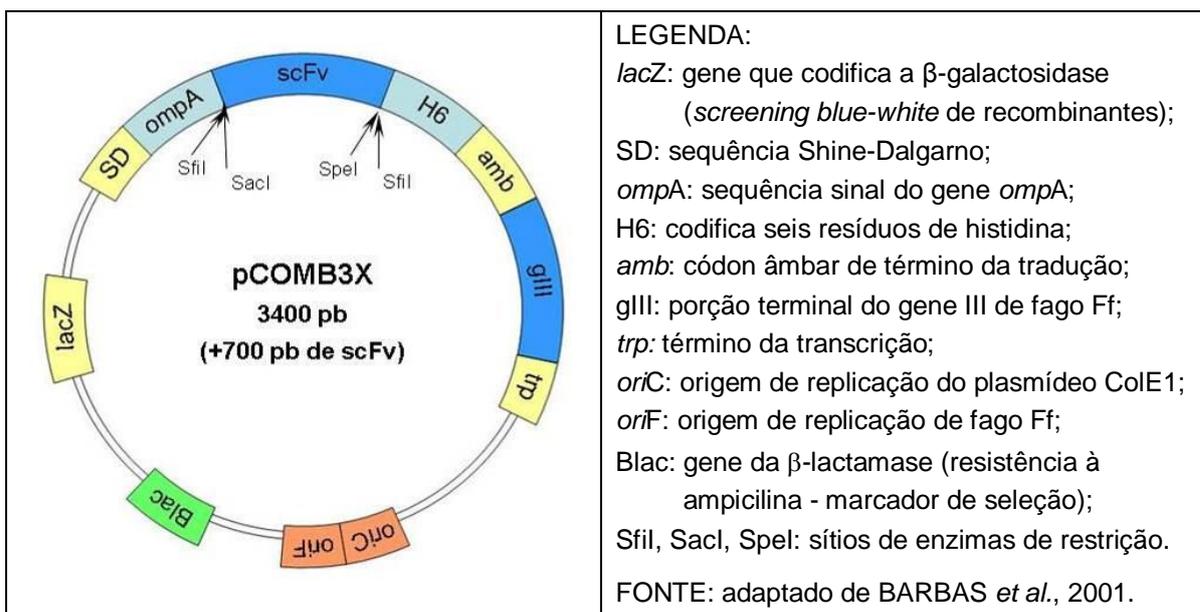
FONTE: adaptado de RUSSEL *et al.*, 2004.

2.4.2 Fagomídeos

Como alternativa ao emprego de bacteriófagos contendo toda a informação genética viral, em *phage display* é possível também utilizar fagomídeos. Esses vetores codificam apenas uma proteína do capsídeo viral, cujo gene se localiza próximo a um sítio de clonagem – onde o gene da molécula a ser apresentada é inserido –, e também genes de seleção apropriados e as origens de replicação de plasmídeos e de fagos filamentosos (Figura 09).

O emprego de fagomídeos permite a exposição de proteínas maiores e possibilita a geração de bibliotecas com maior diversidade (HOOGENBOOM, 2002). No entanto, é necessário que as culturas bacterianas empregadas na amplificação desses elementos sejam infectadas por um fago auxiliar (*helper phage*) que codifica todas as proteínas virais indispensáveis à replicação (VIEIRA & MESSING, 1987).

FIGURA 09 – Representação do fagomídeo pCOMB3X.



O genoma do fago *helper* apresenta uma origem de replicação defectiva que reduz suas chances de ser empacotado durante a montagem dos vírions, garantindo assim que seja preferencialmente encapsulado o DNA do fagomídeo. Além disso, pelo fato de codificarem todas as proteínas virais, fagos auxiliares permitem a geração de capsídeos formados por um misto de proteínas nativas (originárias do fago *helper*) e recombinantes (originárias do fagomídeo) em uma proporção que possibilita a exposição de proteínas maiores sem que a infectividade e a integridade da partícula viral sejam comprometidas (RUSSEL *et al.*, 2004).

2.4.3 Bibliotecas de anticorpos

A seleção de imunoglobulinas recombinantes é uma das mais disseminadas e bem-sucedidas aplicações da metodologia de *phage display* (BREKKE & LOSET, 2003; HOOGENBOOM, 2005). É possível construir bibliotecas de fagos que expressam o anticorpo integral ou somente as porções Fab e scFv, que interferem minimamente na estabilidade da partícula viral (HOOGENBOOM, 2002).

O repertório da biblioteca é geralmente criado a partir de RNAs codificantes de imunoglobulinas obtidos de camundongos (MAKVANDI-NEJAD *et al.*, 2010), galinhas (NAKAMURA *et al.*, 2004), coelhos (RADER, 2009), camelídeos (ARBABI-GHAHROUDI *et al.*, 2009) e humanos (DOUGUCHI *et al.*, 2009). Os transcritos são

extraídos de órgãos produtores de linfócitos B, como baço (URUSHIBATA *et al.*, 2010), medula óssea (CHEN *et al.*, 2008) e amídalas (SCHOFIELD *et al.*, 2007), ou ainda de células do sangue periférico (JUNG *et al.*, 2008).

A imunização dos animais com o antígeno de interesse induz a produção de anticorpos específicos e aumenta significativamente as chances de sucesso da seleção (BURTON *et al.*, 1991). São geralmente realizadas quatro inoculações, acrescidas ou não de adjuvantes, e a resposta imune do animal é monitorada por meio de imunoenaios: caso seja considerada adequada, o órgão fonte de células B é extraído três a quatro dias após a última inoculação, quando se observa a máxima produção de RNA codificante de anticorpos (HARLOW & LANE, 1988).

2.4.4 Bibliotecas de peptídeos

Bibliotecas de fagos expondo peptídeos de 4 a 50 aminoácidos têm sido amplamente utilizadas na identificação de motivos de ligação de receptores bioquímicos (FUCHS *et al.*, 2003), no mapeamento de superfícies de células e tecidos (WANG & YU, 2009) e em aplicações funcionais de genômica e proteômica (SIDHU & KOIDE, 2007). São também empregadas na obtenção de medicamentos (LI & CHO, 2010), vacinas (GNANASEKAR *et al.*, 2004) e inibidores de enzimas (PARADIS-BLEAU *et al.*, 2008).

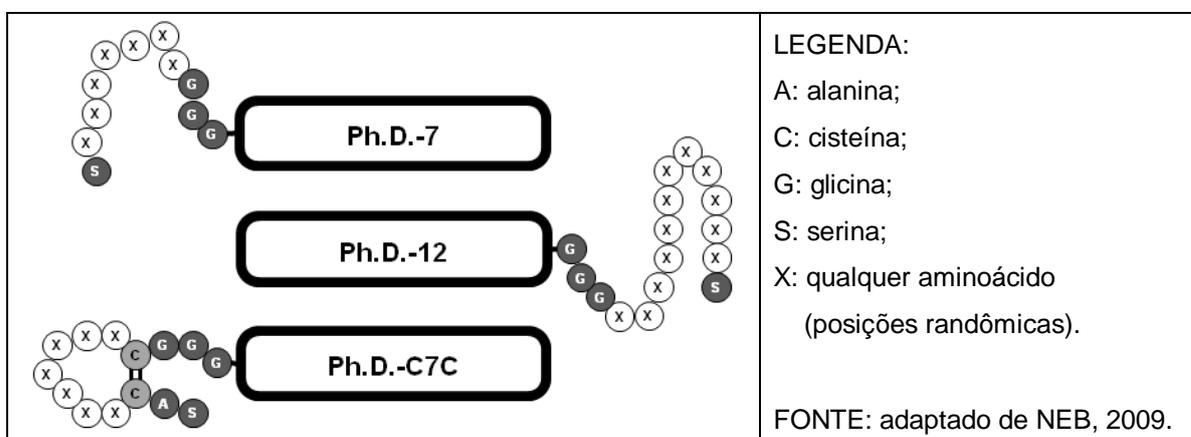
Os aminoácidos que constituem esses peptídeos são codificados pelos códons degenerados NNK e NNS (N: A, C, T ou G; K: G ou T; S: G ou C), que representam 32 códons e todos os 20 aminoácidos naturais: há três códons para arginina, leucina, e serina, dois para valina, prolina, treonina, alanina e glicina, e um para os demais aminoácidos (BARBAS *et al.*, 2001). Depois de selecionados, os peptídeos podem ser sintetizados quimicamente ou clonados e expressos em um sistema adequado (ZWICK *et al.*, 1998). É possível ainda submeter à seleção bibliotecas originadas pela mutagênese dos peptídeos previamente selecionados e caracterizados, de forma a aprimorar a afinidade pelo alvo (PANDE *et al.*, 2010).

Além das aplicações previamente citadas, bibliotecas de peptídeos podem ainda ser empregadas na identificação de determinantes antigênicos (VILLARD *et al.*, 2003). Nesse sentido, SCOTT & SMITH (1990) selecionaram peptídeos frente a anticorpos monoclonais previamente caracterizados e verificaram que as sequências

obtidas eram similares, mas não idênticas, à do epitopo correspondente (revisado por MOURA, 2005). Denominadas mimotopos (GEYSEN *et al.*, 1986), tais sequências as mesmas propriedades imunogênicas do determinante que deu origem à especificidade do anticorpo em questão e podem, portanto, ser destinados a aplicações de diagnóstico (CASEY *et al.*, 2009) e terapêutica (LIU *et al.*, 2005).

Devido ao seu tamanho reduzido, peptídeos geralmente não apresentam estrutura tridimensional definida; no entanto, análises de complexos antígeno-anticorpo indicam que imunoglobulinas interagem preferencialmente com epitopos não lineares (DAVIES *et al.*, 1990 *apud* MOURA, 2005). Com base nessa observação, é possível aumentar a probabilidade de sucesso de um processo de seleção ao se limitar a gama de conformações que um peptídeo pode tomar. A formação de uma ponte dissulfeto pela introdução de cisteínas nas extremidades da sequência randômica, por exemplo, impõe ao peptídeo uma conformação circular (SMITH & PETRENKO, 1997). Esta estratégia é utilizada pela biblioteca comercial Ph.D.-C7C, da NEW ENGLAND BIOLABS (NEB) (Figura 10).

FIGURA 10 – Representação das bibliotecas de peptídeos Ph.D. (NEB).



3 OBJETIVOS

Este trabalho possui como objetivo geral evidenciar a aplicabilidade da técnica de *phage display* na obtenção de anticorpos e antígenos recombinantes destinados à aplicação em testes de diagnóstico, e abrange, portanto, duas linhas:

- 1) Seleção e caracterização de anticorpos anti-imunoglobulinas humanas; e
- 2) Triagem e caracterização de mimotopos de *T. pallidum* e HTLV.

A primeira linha apresenta como objetivos específicos:

- Construir bibliotecas de fagos expondo anticorpos scFv anti-IgG e anti-IgM humanas a partir de RNA extraído de camundongos imunizados com fragmentos Fc das respectivas imunoglobulinas;
- Selecionar essas bibliotecas através de processos de *panning* frente às mesmas moléculas empregadas na imunização;
- A partir das bibliotecas selecionadas, isolar e sequenciar fagos expressando anticorpos scFv que apresentem interação pela molécula-alvo;
- Caracterizar esses anticorpos recombinantes quanto à sua afinidade e especificidade pelo ligante.

Já os objetivos da linha de obtenção de peptídeos são:

- Submeter bibliotecas de peptídeos obtidas comercialmente a um processo de seleção frente a anticorpos anti-*T. pallidum* e anti-HTLV;
- A partir das bibliotecas selecionadas, isolar e sequenciar fagos expressando peptídeos que interajam com o respectivo anticorpo;
- Caracterizar os peptídeos isolados quanto à sua afinidade e especificidade pelo anticorpo empregado;
- Avaliar a reatividade dos peptídeos obtidos com o soro de pacientes infectados por *T. pallidum* e HTLV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

4.1.1 Acetato de sódio 3M pH 5,2

Em 80 mL de água ultra pura foram dissolvidos 24,6 g (300 mmol) de acetato de sódio. Após ajuste de pH para 5,2 com ácido acético glacial e correção do volume para 100 mL, a solução foi esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

4.1.2 Acrilamida 33/0,9%

Por serem neurotóxicas, acrilamida e bisacrilamida em pó foram manipuladas com luvas e máscara. Em 50 mL de água ultra pura foram dissolvidos 33 g de acrilamida e 900 mg de bisacrilamida. Depois de completado o volume para 100 mL a solução foi incubada com 500 mg da resina de troca iônica *Amberlite* MB-1 por 30 minutos sob leve agitação. Depois de filtrada com membrana de 0,45 µm de porosidade (MILLIPORE), a solução foi armazenada a 4°C em frasco âmbar.

4.1.3 Antibióticos

A solução de tetraciclina 12,5 mg/mL foi preparada dissolvendo-se 125 mg de cloridrato de tetraciclina em 10 mL de etanol absoluto. Depois de esterilizada por filtração com membrana de 0,22 µm de porosidade (MILLIPORE), a solução foi dividida em alíquotas de 500 µL envolvidas em papel alumínio, e estocada a -20°C.

Para preparação de carbenicilina 100 mg/mL, ampicilina 25 mg/mL e canamicina 25 mg/mL, em 10 mL de água ultra pura foram dissolvidos respectivamente 1 g de carbenicilina dissódica, 250 mg de ampicilina sódica e 250 mg de sulfato de canamicina. Depois de esterilizadas por filtração, as soluções foram divididas em alíquotas de 500 µL e armazenadas a -20°C.

4.1.4 Brometo de etídeo 0,5 µg/mL

Por ser cancerígeno, brometo de etídeo e materiais contaminados com o mesmo foram manipulados com luvas. Em um volume final de 50 mL em água ultra pura foram dissolvidos 500 mg de brometo de etídeo. Essa solução estoque (concentração 10 mg/mL) foi armazenada em frasco escuro a 4°C, e para coloração de géis de DNA, foi diluída 10000 vezes em água deionizada (concentração final 10 µg/mL). Essa solução de uso foi armazenada em temperatura ambiente e protegida da luz, e pode ser reutilizada diversas vezes.

4.1.5 *Coating buffer*

Em 800 mL de água deionizada foram dissolvidos 1 mol (84 g) de bicarbonato de sódio. O pH foi ajustado para 8,6 e o volume completado para 1 litro. A solução foi esterilizada por filtração e estocada em temperatura ambiente.

4.1.6 *Column buffer*

Em um volume final de 1 litro em água deionizada foram dissolvidos 20 mL de Tris 1 mol/L pH 7,5, 11,7 g de cloreto de sódio e 2 mL de EDTA 500 mM. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

4.1.7 EDTA 500 mM pH 8

Em 800 mL de água deionizada foram dissolvidos 146,1 g (500 mmol) de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Depois do ajuste do pH para 8 o volume foi completado para 1 litro. Essa solução foi esterilizada por autoclavagem (121°C, 15 minutos), armazenada em temperatura ambiente e diluída conforme a necessidade no momento do uso.

4.1.8 Fenol : clorofórmio : álcool isoamílico

Devido à toxicidade, todas as soluções contendo fenol foram manipuladas com luvas e em capela de exaustão química. Em banho-maria a 65°C, 100 mL de fenol foram aquecidos até a liquefação, adicionando-se em seguida 1 volume de água ultra pura. A solução foi vigorosamente agitada por cerca de 10 segundos e incubada em repouso por um dia para decantação da fase orgânica.

Após descarte da fase aquosa (fração superior) o procedimento foi repetido mais 3 vezes, primeiramente com água ultra pura, depois com Tris 100 mM pH 11 e finalmente com Tris 100 mM pH 8. Caso após esse processo o pH do fenol (medido com fita indicadora) não estivesse entre 7,5 e 8, o fenol era novamente incubado com Tris 100 mM pH 8. A solução foi então dividida em alíquotas de 12,5 mL, e a essas foram adicionados 12 mL de clorofórmio e 500 µL de álcool isoamílico. As alíquotas foram estocadas a -20°C protegidas da luz e de oxigênio. A solução só pode ser utilizada se apresentar coloração incolor; tons róseos ou amarelados indicam oxidação. Depois do uso, soluções e frascos com resíduos de fenol foram mantidos em etanol 70% por um dia antes de serem descartados.

4.1.9 Géis de poliacrilamida

Para eletroforese de DNA, um gel de poliacrilamida a 8% foi preparado com 2,4 mL de acrilamida 33/0,9%, 1 mL de TBE 10X, 6,6 mL de água deionizada, 70 µL de persulfato de amônio 10% e 7 µL de tetrametil-etilenodiamina (TEMED).

Para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), o gel de corrida a 13% foi constituído por 4,6 mL de água ultra pura, 3,8 mL de acrilamida 33/0,9%, 1,6 mL de Tris 2,5 mol/L pH 8,8, 100 µL de SDS 10%, 70 µL de persulfato de amônio 10% e 7 µL de TEMED. Esse gel foi preparado com espessura de 1,5 mm e cerca de 5 cm de altura. O gel de empacotamento foi composto por 3,7 mL de água ultra pura, 700 µL de acrilamida 33/0,9%, 600 µL de Tris 1 mol/L pH 6,8, 50 µL de SDS 10%, 35 µL de persulfato de amônio 10% e 7 µL de TEMED. A solução foi adicionada sobre o gel de corrida solidificado, para uma altura aproximada de 2,5 cm.

4.1.10 IPTG 1 mol/L

Em um volume final de 21 mL em água ultra pura foram dissolvidos 5 g (21 mmol) de isopropil-1-tio- β -D-galactosídeo (IPTG). A solução foi esterilizada por filtração e dividida em alíquotas de 500 μ L, e estas foram estocadas a -20°C.

4.1.11 Marcadores de DNA

A solução de marcador *1 kb plus* 50 ng/ μ L foi preparada adicionando, em 375 μ L de TE, 100 μ L de glicerol 5X e 25 μ L de *1 kb plus DNA Ladder* 1 μ g/ μ L (INVITROGEN). Para a preparação do marcador 50 pb 100 ng/ μ L, em 350 μ L de TE foram adicionados 100 μ L de glicerol 5X e 50 μ L de *50 pb DNA Ladder* 1 μ g/ μ L (INVITROGEN). Ambas as soluções foram divididas em alíquotas de 10 μ L e armazenadas a -20°C. Para eletroforese de DNA, 4 μ L de uma das soluções de marcador são aplicados em uma das colunas do gel.

4.1.12 Meios de cultivo

O meio LB (*Luria Broth*) foi preparado dissolvendo 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de cloreto de sódio em 900 mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 7 com hidróxido de sódio e o volume completado para 1 litro. Depois de autoclavado o meio foi estocado a 4°C.

Para formulação de meio LB sólido, logo após o ajuste de volume foram adicionados à solução 15 g de ágar. Depois de esterilizado, o meio foi resfriado a 42°C e vertido sobre placas de *Petri* (cerca de 20 mL por placa) contendo antibióticos ou reagentes na concentração requerida. Após solidificação do meio as placas foram estocadas a 4°C protegidas da luz.

O meio LB top ágar foi preparado dissolvendo-se 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio, 1 g de cloreto de magnésio hexahidratado e 7 g de agarose em 900 mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 7

com NaOH e o volume completado para 1 litro. Logo após a autoclavagem o meio foi dividido em alíquotas de 50 mL e estocado a 4°C.

O meio SB (*Super Broth*) foi preparado dissolvendo 30 g de triptona, 20 g de extrato de levedura e 10 g do agente tamponante MOPS (ácido 3-[N-morfolino]-propano-sulfônico) em 900 mL de água deionizada. Depois do ajuste de pH para 7 o volume foi completado para 1 litro, e o meio foi autoclavado e estocado a 4°C.

O meio SOC (*Super Optimal Broth with catabolite repression*) foi preparado dissolvendo 20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 500 mg de cloreto de sódio, 186 mg de cloreto de potássio, 10 mL de cloreto de magnésio 1 mol/L e 10 mL de sulfato de magnésio 1 mol/L. Depois do ajuste de pH para 7 o volume foi completado para 1 litro, e o meio foi autoclavado e estocado a 4°C. No momento do uso foi adicionado 1 mL de glucose 1 mol/L estéril a 50 mL de meio.

O meio *Rich broth* enriquecido com glucose foi preparado dissolvendo-se, em um volume final de 1 litro em água deionizada, 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de cloreto de sódio e 2 g de glucose. Depois de autoclavado o meio foi estocado a 4°C.

4.1.13 PBS (*phosphate-buffered saline*) 10X

Em 800 mL de água deionizada foram dissolvidos 80 g (1,37 mol) de cloreto de sódio, 2 g (21 mmol) de cloreto de magnésio, 17 g (120 mmol) de fosfato dibásico de sódio e 1,63 g (12 mmol) de fosfato monobásico de potássio. O pH foi ajustado para 7,4 com ácido clorídrico e o volume completado para 1 litro. Depois de autoclavada a solução foi armazenada em temperatura ambiente, e diluída 10 vezes com água deionizada no momento do uso.

4.1.14 PEG / NaCl

Em 600 mL de água deionizada foram dissolvidos 200 g de polietileno glicol de elevada massa molar (PEG-8000) e 150 g de cloreto de sódio (concentrações finais (PEG 20% [m/v] e NaCl 15% [m/v])). Depois de completado o volume para 1 litro, a solução foi esterilizada por filtração e estocada em temperatura ambiente.

4.1.15 Primers

Nas Tabelas 01 a 06 são apresentadas a composição das soluções e as sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados no presente trabalho. As soluções foram preparadas em água livre de ribonucleases e armazenadas a -20°C . Nas tabelas é usada a simbologia definida pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) para representação de nucleotídeos: A: adenina – C: citosina – G: guanina – T: timina – R: A ou G – Y: C ou T – M: A ou C – K: C ou T – S: C ou G – W: A ou T – B: C, G ou T – D: A, G ou T – V: A, C ou G – N: qualquer nucleotídeo.

TABELA 01 – Composição do *mix* de *primers* V_{κ} sense.

Designação	Sequência	Volume (μL de solução $10 \mu\text{M}$)
MCSVK-1	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TCC AGC TGA CTC AGC C 3'	10
MCSVK-2	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TTC TCW CCC AGT C 3'	20
MCSVK-3	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGM TMA CTC AGT C 3'	50
MCSVK-4	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGY TRA CAC AGT C 3'	35
MCSVK-5	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TRA TGA CMC AGT C 3'	40
MCSVK-6	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTM AGA TRA MCC AGT C 3'	70
MCSVK-7	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTC AGA TGA YDC AGT C 3'	60
MCSVK-8	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TYC AGA TGA CAC AGA C 3'	15
MCSVK-9	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TTC TCA WCC AGT C 3'	20
MCSVK-10	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG WGC TSA CCC AAT C 3'	35
MCSVK-11	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTS TRA TGA CCC ART C 3'	80
MCSVK-12	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYR TTK TGA TGA CCC ARA C 3'	80
MCSVK-13	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TGA CBC AGC C 3'	60
MCSVK-14	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TAA CYC AGG A 3'	20
MCSVK-15	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TGA CCC AGW T 3'	20
MCSVK-16	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TGA CAC AAC C 3'	10
MCSVK-17	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTT TGC TGA CTC AGT C 3'	10

TABELA 02 – Composição do *mix* de *primers* V_{κ} L reverse.

Designação	Sequência	Volume (μL de solução $10 \mu\text{M}$)
MSCJK12-BL	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TTT KAT TTC CAG YTT GGT CCC 3'	200
MSCJK4-BL	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC 3'	100
MSCJK5-BL	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC 3'	100

TABELA 03 – Composição do *mix* de *primers* V_{κ} S reverse.

Designação	Sequência	Volume (μL de solução $10 \mu\text{M}$)
MSCJK12-B	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TTT KAT TTC CAG YTT GGT CCC 3'	200
MSCJK4-B	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC 3'	100
MSCJK5-B	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC 3'	100

TABELA 04 – Composição do *mix de primers V_H sense*.

Designação	Sequência	Volume (µL de solução 10 µM)
MSCVH1	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTR MAG CTT CAG GAG TC 3'	40
MSCVH2	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTB CAG CTB CAG GAG TC 3'	40
MSCVH3	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAG CTG AAG SAS TC 3'	30
MSCVH4	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC 3'	40
MSCVH5	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTY CAG CTB CAG CAR TC 3'	70
MSCVH6	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTY CAR CTG CAG CAG TC 3'	20
MSCVH7	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTC CAC GTG AAG CAG TC 3'	10
MSCVH8	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAS STG GTG GAA TC 3'	20
MSCVH9	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AWG YTG GTG GAG TC 3'	50
MSCVH10	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAG SKG GTG GAG TC 3'	20
MSCVH11	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAM CTG GTG GAG TC 3'	20
MSCVH12	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC 3'	20
MSCVH13	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAR CTT GTT GAG TC 3'	10
MSCVH14	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTR AAG CTT CTC GAG TC 3'	20
MSCVH15	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAR STT GAG GAG TC 3'	20
MSCVH16	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTT ACT CTR AAA GWG TST G 3'	50
MSCVH17	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTC CAA CTV CAG CAR CC 3'	35
MSCVH18	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAC TTG GAA GTG TC 3'	7
MSCVH19	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAG GTC ATC GAG TC 3'	7

TABELA 05 – Composição do *mix de primers V_H reverse*.

Designação	Sequência	Volume (µL de solução 10 µM)
MSCG1ab-B	5' CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CAG ATG GGG STG TYG TTT TGG C 3'	200
MSCG3-B	5' CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CAG ATG GGG CTG TTG TTG T 3'	100
MSCM-B	5' CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CAT TTG GGA AGG ACT GAC TCT C 3'	100

TABELA 06 – Sequências dos demais *primers* empregados neste trabalho.

Designação	Sequência	Referência
MSCVL-1 <i>V_λ sense</i>	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG ATG CTG TTG TGA CTC AGG AAT C 3'	BARBAS <i>et al.</i> , 2001
MSCJL-B <i>V_λS reverse</i>	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC GCC TAG GAC AGT CAG TTT GG 3'	BARBAS <i>et al.</i> , 2001
MSCJL-BL <i>V_λL reverse</i>	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA GCC TAG GAC AGT CAG TTT GG 3'	BARBAS <i>et al.</i> , 2001
RSC-F	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGG CGG CCG AGC TC 3'	BARBAS <i>et al.</i> , 2001
RSC-B	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TG 3'	BARBAS <i>et al.</i> , 2001
MKFLOMP	5' AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G 3'	BARBAS <i>et al.</i> , 2001
-96Giii	5' CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG 3'	NEB, 2009
PC3X	5' CGG ATA ACA ATT GAA TTC AGG AGG A 3'	-
M13KE <i>extension</i>	5' CAT GCC CGG GTA CCT TTC TAT TCT C 3'	NEB, 2009
pMAL-F	5' TGT GTG GAA TTG TGA GCG GAT AAC 3'	-
pMAL-R	5' TGT GCC CAG AAG ATA ATG TCA GG 3'	-

4.1.16 SDS 10%

Devido ao risco de irritação de olhos, pele e vias respiratórias, o dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) foi manipulado com luvas e máscara. Em um volume final de 500 mL em água ultra pura foram dissolvidos 50 g de SDS. Depois de filtrada em membrana de 0,45 μm a solução foi armazenada em temperatura ambiente.

4.1.17 Solução anestésica para camundongos

Em 10 mL de deionizada foram dissolvidos 100 mg de cloridrato de quetamina e 10 mg de cloridrato de xilazina. A solução deve ser preparada momentos antes da administração.

4.1.18 Solução salina (NaCl 150 mM)

Em 95 mL de água deionizada foram dissolvidos 876 mg (15 mmol) de cloreto de sódio. Depois de completado o volume para 100 mL, a solução foi esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

4.1.19 Soluções para coloração de géis de proteína

A solução de coloração com *coomassie* foi preparada dissolvendo 300 mg de azul de *coomassie* R-250 em 135 mL de metanol, e adicionando em seguida 30 mL de ácido acético e 135 mL de água deionizada. Esses 300 mL foram filtrados em papel WHATMAN e armazenados em frasco escuro à temperatura ambiente. Para coloração, o gel foi coberto com essa solução e incubado por 15 minutos sob leve agitação. Essa solução pode ser reutilizada diversas vezes.

Para descoloração, 8 mL de metanol e 15 mL de ácido acético foram adicionados a 177 mL de água deionizada, e os 200 mL finais foram armazenados em temperatura ambiente. Para descoloração, o gel foi coberto com essa solução e

incubado *overnight* sob leve agitação. Depois de filtrada com carvão ativo, a solução de descoloração pode ser reutilizada mais duas vezes.

Para coloração com prata, a solução de fixação foi constituída de 50 mL de etanol absoluto, 12 mL de ácido acético, 50 μ L de formaldeído 37% (v/v) e água deionizada para um volume final de 100 mL. A solução de coloração foi preparada adicionando 200 mg de nitrato de prata e 75 μ L de formaldeído 37% a água deionizada para um volume final de 100 mL. A solução de revelação foi preparada com 3 g de carbonato de sódio, 50 μ L de formaldeído 37%, 2 mL de tiosulfato de sódio 0,02% (m/v) e água deionizada para um volume final de 100 mL.

4.1.20 Tampão de amostra 4x para eletroforese de proteínas

Para composição do tampão de amostra para SDS-PAGE foram dissolvidos 4 mg de azul de bromofenol em uma solução de 2 mL de água ultra pura contendo 3,2 mL de Tris 1 mol/L pH 6,8, 8 mL de SDS 10%, 2 mL de β -mercaptoetanol e 4,8 mL de glicerol. O tampão foi dividido em alíquotas de 1 mL e armazenado a -20°C .

4.1.21 Tampão de corrida 5X para eletroforese de proteínas

Em um volume final de 950 mL de água ultra pura foram dissolvidos 15,1 g (125 mmol) de Tris e 72 g (960 mmol) de glicina. Após dissolução a solução foi filtrada em membrana de 0,45 μm , adicionada de 50 mL de SDS 10% e estocada em temperatura ambiente, e diluída conforme a necessidade no momento do uso.

4.1.22 Tampão de eluição ácida

Em 90 mL de água deionizada foram adicionados 1,5 g (20 mmol) de glicina, e após ajuste de pH para 2,2 com HCl foram dissolvidos 100 mg de soro albumina bovina (BSA). Depois de o volume ser ajustado para 100 mL a solução foi esterilizada por filtração e estocada em temperatura ambiente.

4.1.23 Tampão de fosfatase alcalina

Em 950 mL de Tris 100 mM pH 9,5 foram dissolvidos 5,84 g (100 mmol) de cloreto de sódio e 476 mg (5 mmol) de cloreto de magnésio. O volume foi ajustado para 1L e a solução estocada a 4°C.

4.1.24 Tampão glicerol 5X para eletroforese de DNA

Em um volume final de 40 mL em tampão TE foram dissolvidos 100 mg de azul de bromofenol e 100 mg de xileno cianol FF. Após adição de 1 volume de glicerol 50% (v/v) preparado em água deionizada, a solução foi dividida em alíquotas de 1 mL e estocada a 4°C. Para eletroforese, 1 volume do tampão era adicionado a 4 volumes da amostra.

4.1.25 Tampão iodeto

Em um volume final de 100 mL em água ultra pura foram adicionados 1 mL de Tris 1 mol/L pH 8, 200 µL de EDTA 500 mM pH 8 e 60 g (400 mmol) de iodeto de sódio. A solução foi armazenada em temperatura ambiente e protegida da luz. Caso apresentasse coloração mais intensa que um amarelo pálido, o tampão iodeto deveria ser descartado.

4.1.26 TBE (tris-borato-EDTA) 10X

A 890 mL de Tris 100 mM pH 8 foram adicionados 40 mL de EDTA 500 mM pH 8 e 55 g (890 mmol) de ácido bórico. Após dissolução o volume foi ajustado para 1 litro e a solução filtrada em membrana com porosidade de 0,45 µm. Para evitar a precipitação do ácido bórico, a solução foi estocada a 4°C.

4.1.27 Tampão TBS (*tris-buffered saline*)

Em um volume final de 1 litro em água deionizada foram adicionados 50 mL de Tris 1 mol/L pH 7,5 e 8,76 g de cloreto de sódio (concentrações finais: 20mM de Tris e 150 mmol de NaCl). Depois de esterilizada por autoclavagem a solução foi armazenada em temperatura ambiente.

4.1.28 Tampão TE (*tris-EDTA*)

Em um volume final de 100 mL em água ultra pura foram adicionados 1 mL de Tris 1 mol/L pH 8 e 200 μ L de EDTA 500mM (concentrações finais em 100 mL: 10mM de Tris e 1 mM de EDTA). A solução foi autoclavada e estocada a 4°C.

4.1.29 Tampão Tris 1 mol/L pH 6,8-11

Em 800 mL em água deionizada foram dissolvidos 121,12 g (1 mol) de tris-hidroximetil-aminometano. O pH foi ajustado para o valor requerido (usando fita indicadora de pH para medição) e o volume completado para 1 litro. Após autoclavagem a solução foi estocada em temperatura ambiente, e diluída conforme a necessidade no momento do uso.

4.1.30 X-Gal 4%

Em 90 mL de dimetil-formamida foram dissolvidos 4 g do reagente 5-bromo-4-cloro-3 indolil- β -galactosídeo (X-Gal). Após ajuste de volume para 100 mL, a solução foi dividida em alíquotas de 500 μ L e estocada a 4°C, e protegida da luz.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Obtenção de anticorpos anti-IgM e anti-IgG humanas

As bibliotecas de anticorpos scFv anti-IgG e anti-IgM humanas foram construídas a partir de RNA extraído do baço de camundongos imunizados com fragmentos Fc de IgG (BETHYL LABORATORIES – ANEXO A) e Fg5 μ de IgM (FITZGERALD INDUSTRIES – ANEXO B). O protocolo de manipulação dos animais foi elaborado conforme normas da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ (2008), e devidamente aprovado pelo mesmo órgão (ANEXO C). Os procedimentos para construção, seleção das bibliotecas, isolamento e análise dos clones foram baseados no trabalho de BARBAS e colaboradores (2001).

4.2.1.1 Imunização de camundongos

No processo aqui descrito foram empregados inicialmente camundongos da linhagem isogênica BALB/c. Se após as inoculações esses animais não apresentassem resposta satisfatória frente ao antígeno inoculado, o procedimento seria repetido com animais da linhagem não isogênica *Swiss Webster*.

Antes de iniciado o protocolo de imunização, os camundongos foram avaliados quanto à sua resposta imune prévia às proteínas a serem inoculadas. Para essa análise 100 μ L de sangue de cada animal foram coletados por meio do corte de cerca de 2 mm da extremidade da cauda, realizado com bisturi. A amostra de sangue foi incubada em banho-maria (37°C) e em seguida em gelo – ambas as etapas por 10 minutos –, e então centrifugada a 3000 g por mais 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado por 2 minutos a 8000 g, e o sobrenadante resultante (cerca de 30 μ L de soro) foi recolhido e armazenado a -20°C.

Em seguida o soro pré-imune foi analisado em um ensaio de *dot blot*. Membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com 1 μ g de cada proteína a ser inoculada e então bloqueadas, por 1 hora em temperatura ambiente e leve agitação, com 50 mL de PBS 1X contendo 5% (m/v) de leite em pó desnatado. Após descarte da solução de bloqueio as membranas foram lavadas duas vezes por 5 minutos e

leve agitação com 50 mL de PBS 1X contendo *Tween* 20 0,1% (v/v), e incubadas por mais 1 hora com 1 mL de soro pré-imune diluído 250 vezes em PBS 1X. O soro foi descartado e após nova lavagem as membranas foram incubadas com 2 mL de anticorpo anti-*mouse* conjugado à fosfatase alcalina, diluído 10000 vezes em PBS.

Depois do descarte da solução de bloqueio e nova etapa de lavagem, as membranas foram incubadas em 10 mL de tampão de fosfatase alcalina contendo 66 μ L de NBT (50 mg/mL de *nitroblue tetrazolium*) e 33 μ L de BCIP (50 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato). A reação foi interrompida após 2 minutos pela transferência da membrana para uma solução de EDTA 10 mM. A formação de uma mancha ou ponto (*dot*) no local de sensibilização evidencia a presença de anticorpos Fc IgG ou Fc IgM no soro.

No processo de imunização, iniciado pelo menos sete dias após a coleta de sangue, foram usados apenas animais que não apresentaram resposta imune prévia à proteína a ser inoculada (ou seja, o soro não apresentou reatividade no *dot blot*). As inoculações foram realizadas com agulha de 13 mm de comprimento e 0,45 mm de diâmetro, e eram compostas por 25 μ g de proteína, 77 μ L de adjuvante e solução salina para um volume final de 200 μ L – com exceção da última inoculação, que não empregou adjuvante. A fim de verificar a o desenvolvimento da resposta imune dos animais frente a diferentes adjuvantes, para cada proteína foram empregados dois camundongos: um deles recebeu a primeira inoculação com adjuvante completo de Freund (ACF, SIGMA), e o outro com hidróxido de alumínio (Alu-gel, SERVA). As inoculações seguintes empregaram somente Alu-gel como adjuvante, exceto a última inoculação, que não empregou adjuvante.

Após três inoculações realizadas pela via intraperitoneal (com intervalo de 14 e 21 dias entre elas), a resposta imune dos animais foi avaliada em um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, empregando soro obtido sete dias após a terceira inoculação, conforme descrito anteriormente. Os poços da placa de imunensaio (marca CORNING, modelo COSTAR 3590) foram sensibilizados com 100 ng de Fc IgG, Fc₅ μ IgM ou BSA (controle negativo) diluídos em 50 μ L de PBS 1X, e a placa foi incubada *overnight* a 4°C e leve agitação. Após descarte da solução e lavagem com 50 μ L de PBS 1X acrescido de *Tween* 20 0,5%, os poços foram bloqueados por 1 hora em temperatura ambiente e leve agitação com 100 μ L de PBS 1X contendo 5% de leite em pó desnatado.

Depois de novas lavagens a placa foi incubada nas mesmas condições com 50 μ L de diluições seriadas de soro em solução de bloqueio, partindo-se de 1:200 e diluindo-se 1:2 até 1:204800 (11 diluições no total). Após dez lavagens os poços foram incubados nas mesmas condições com 50 μ L de anticorpo anti-*mouse* conjugado à peroxidase diluído 10000 vezes em solução de bloqueio. Depois de mais dez lavagens a placa foi incubada com 50 μ L de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, substrato da peroxidase) por 15 minutos em repouso e protegida da luz.

A reação foi então interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico 2 mol/L, e a absorbância no comprimento de onda de 450 nm foi medida para cada diluição avaliada. O título do soro foi então definido como a maior diluição na qual a absorbância frente à proteína inoculada é distinguível (maior ou igual ao dobro) da reatividade com um antígeno não inoculado, nesse caso o BSA (BARBAS *et al.*, 2001). Caso não fosse observada forte reatividade, seriam realizadas duas inoculações extras pela via subcutânea 21 dias após a terceira inoculação, com intervalo de mesmo período entre as duas.

Vinte e oito dias após a terceira / quinta inoculação, os animais receberam uma última injeção pela via intravenosa (veia caudal), e quatro dias depois foi realizado o isolamento do baço. Inicialmente foram administrados, pela via intraperitoneal, 100 μ L de solução anestésica para cada 10 g de peso do animal, com agulha de 13 mm de comprimento e 0,45 mm de diâmetro. Após verificação do plano anestésico – que se estabelece 5 a 10 minutos após a injeção e se caracteriza por dificuldade de locomoção, aceleração cardiorrespiratória e redução da resposta a impulsos sensitivos – foi realizada a punção cardíaca com agulha de 25 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro. Cerca de 1 mL de sangue foi coletado, processado para obtenção de soro e empregado em eventuais imunoenaios.

4.2.1.2 Obtenção e processamento do RNA

Logo após a inoculação, e empregando materiais livres de ribonucleases, o baço dos camundongos foi isolado, dividido em quatro partes de mesma massa e submetido ao protocolo de extração de RNA total de tecidos animais do Kit RNeasy (QUIAGEN, 2006). Nesse processo as porções do órgão foram homogeneizadas em

600 μL de Tampão RLT contendo 6 μL de β -mercaptoetanol 14,3 mol/L, e o lisado obtido foi centrifugado por 3 minutos a 20000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado de 1 volume de etanol 70%, e a solução resultante foi transferida para uma coluna de filtração acoplada a um tubo de coleta.

Após centrifugação a 8000 g por 2 minutos, foram adicionados 700 μL de tampão RW1 à coluna, que foi novamente centrifugada nas mesmas condições. Depois da adição de 500 μL de tampão RPE e centrifugação por 15 segundos, o filtrado foi descartado e a coluna centrifugada por 2 minutos para remoção de resíduos das soluções anteriores. A coluna foi então acoplada a um novo tubo de coleta e o RNA foi eluído pela adição de 30 μL de água e centrifugação por 1 minuto a 8000 g. Antes de ser armazenado a -80°C , o RNA obtido foi quantificado: o valor da absorbância a 260 nm (A_{260}) multiplicado por 40 corresponde à concentração de RNA em ng/ μL . A razão entre A_{260} e A_{280} é indicativa da contaminação por proteínas: valores de 1,94 e 1,99 apontam que a amostra é composta respectivamente por 70% e 95% de ácido nucléico, enquanto valores inferiores a 1,73 sugerem a presença de mais de 70% de proteína (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

O RNA extraído foi empregado como molde para a síntese de DNA complementar (cDNA) através de reações de transcrição reversa. Uma solução de 9,6 μL contendo 300 ng de RNA total e 10 pmol do *primer* Oligo(dT)₁₅ em água livre de ribonucleases foi incubada a 70°C por 10 minutos, e depois em gelo por 2 minutos. A seguir foram adicionados 2,4 μL cloreto de magnésio 50 mM, 1 μL de *mix* de dNTPs 10 mM (2,5 mM de cada nucleotídeo), 2 μL de transcriptase reversa ImProm-II (PROMEGA) e 4 μL de tampão ImProm-II 5X, além de 40 unidades de RNase OUT (INVITROGEN) para inibição de ribonucleases.

Após 2 horas de reação a 42°C , foi adicionado 1 unidade da enzima RNase H (USB), realizando-se a seguir nova incubação a 37°C por 20 minutos para degradação de RNA. Depois de um processo de purificação, realizado por meio de filtração em membrana Microcon YM-30 (MILLIPORE), e ressuspensão em 50 μL de água ultra pura, a quantidade e pureza do cDNA foram estimadas através da leitura de absorbância em espectrofotômetro: o valor de A_{260} multiplicado por 33 corresponde à concentração de DNA simples fita (ng/ μL). Essa solução foi então aliqüotada e armazenada a -20°C .

4.2.1.3 Obtenção de *Escherichia coli* XL1-Blue eletrocompetente

Nos procedimentos de transformação e amplificação descritos a seguir foram empregadas culturas de células eletrocompetentes da cepa *E. coli* XL1-Blue, de genótipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) supE44 relA1 lac F'[proAB lac^F Δ(lacZ)M15 Tn10 (Tet^R)]. Para obtenção das células eletrocompetentes, 15 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C com 10 µg/mL de tetraciclina (marcador de resistência da cepa) foram inoculados com uma colônia de XL1- Blue, previamente plaqueada no dia anterior em meio LB sólido com tetraciclina.*

Após incubação *overnight* a 37°C e 250 rpm, alíquotas de 1,25 mL dessa cultura foram transferidas para seis frascos *Erlenmeyer* de 1 litro contendo 250 mL de meio SB acrescido de 20% (m/v) de glucose e 10 mM de cloreto de magnésio, e incubadas nas mesmas condições até a densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀) alcançar o valor aproximado de 0,7 (3 a 4 horas).

As culturas foram então incubadas em gelo por 15 minutos, transferidas para tubos de centrífuga de 400 mL (previamente resfriados) e centrifugadas por 20 minutos a 3000 g e 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 12,5 mL de uma solução previamente resfriada de glicerol 10% (v/v) em água deionizada, utilizando pipetas também resfriadas. As alíquotas foram combinadas duas a duas, completando-se o volume para 250 mL com glicerol 10%, e centrifugadas novamente. Após descarte do sobrenadante os *pellets* foram ressuspensos em 250 mL de glicerol 10% e centrifugados mais uma vez.

O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* de células precipitadas foi ressuspensado em 12,5 mL de glicerol 10% e transferido para frascos de 50 mL previamente resfriados. Após centrifugação a 4°C e 2500 g por 15 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado com uma pipeta resfriada, e os *pellets* foram ressuspensos em 2,5 mL de glicerol 10% e alíquotados em tubos de 1,5 mL previamente incubados em banho de gelo seco e etanol (300 µL por tubo). Essas alíquotas foram imediatamente armazenadas a -80°C.

Para avaliar a competência da suspensão celular obtida, uma alíquota armazenada foi inicialmente incubada em gelo para descongelamento por cerca de 10 minutos, juntamente com a cubeta de eletroporação (com 0,2 cm de distância entre os eletrodos de alumínio) e 1 µL de uma solução contendo 10 pg do plasmídeo

pUC18 (resistente a ampicilina e carbenicilina). Ao tubo contendo o plasmídeo foram então adicionados 50 μ L da alíquota de células, e depois de homogeneização por pipetagem (uma única aspiração e liberação) a solução foi transferida para a cubeta, incubada em gelo por 1 minuto e submetida à eletroporação (2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω) em um pulso com duração estimada de 4,5 a 4,8 milissegundos.

A cubeta foi imediatamente lavada três vezes com 1 mL de meio SOC, e os 3 mL resultantes foram incubados por 1 hora a 37°C e 250 rpm. Depois da adição de 7 mL de meio SB, 100 μ L de diluições 10^0 , 10^{-1} a 10^{-2} da cultura foram plaqueadas em meio LB sólido com 100 μ g/mL de carbenicilina. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C e a competência foi calculada multiplicando o número de colônias contadas nas placas por 10^7 , e dividindo o valor obtido pela respectiva diluição. A competência requerida é de pelo menos 1×10^9 transformantes por μ g de plasmídeo.

4.2.1.4 Amplificação do fago *helper*

Para obtenção do fago *helper* VCSM13, 2 mL de meio SB pré-aquecido foram inoculados com 2 μ L de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetente e incubados a 37°C e 250 rpm por 1 hora. Alíquotas de 50 μ L dessa cultura foram então infectadas com 1 μ L de diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} de uma solução estoque de VCSM13 e incubadas em repouso e em temperatura ambiente por 15 minutos. Cada alíquota foi transferida para 3 mL de LB top ágar derretido (e previamente resfriado a 42°C), plaqueada em LB sólido e incubada *overnight* a 37°C.

Na manhã seguinte, 10 mL de meio SB pré-aquecido foram inoculados com 10 μ L de células eletrocompetentes e incubados por 1 hora a 37°C e 250 rpm. Essa cultura foi então infectada com uma placa de lise isolada de meio sólido incubado no dia anterior, e incubada por 2 horas nas mesmas condições. Depois de transferida para 500 mL de meio SB pré-aquecido contendo 70 μ g/mL de canamicina (marcador de seleção do fago *helper*) e incubada *overnight* a 37°C e 250 rpm, a cultura infectada foi centrifugada a 2500 g por 15 minutos e o sobrenadante dividido em frascos de 50 mL. Após incubação a 4°C por 20 minutos e centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e estocado a 4°C.

Para titulação, a suspensão viral obtida foi plaqueada conforme descrito, e o título foi calculado multiplicando o número de placas de lise formadas em cada placa de Petri por 10^4 e dividindo pela diluição. Para os procedimentos realizados a seguir, o título requerido é de pelo menos 10^{11} pfu (*plaque-forming units*) por mL.

4.2.1.5 Construção das bibliotecas

Para amplificar os genes das regiões V_L (V_{κ} e V_{λ}) e V_H , foram empregados 150 ng de cDNA, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 10 μ L de *Taq reaction buffer* 10X, 3 μ L de cloreto de magnésio 50 mM, 8 μ L de *mix* de dNTPs 10 mM, 60 pmol dos *mixes* de *primers sense* e *reverse*, e água ultra pura para um volume final de 100 μ L. Foram amplificadas as seguintes sequências:

- ♣ V_H , empregando os *mixes* de *primers* V_H *sense* e V_H *reverse*;
- ♣ V_{κ} com inserção de um *short linker* (sequência: GGSSRSS) na extremidade 3', utilizando os *mixes* de *primers* V_{κ} *sense* e V_{κ} S *reverse*;
- ♣ V_{κ} com inserção de um *long linker* (SSGGGSGGGGGSSRSS) em 3', empregando os *mixes* de *primers* V_{κ} *sense* e V_{κ} L *reverse*;
- ♣ V_{λ} com adição do *short linker*, utilizando os *primers* MSCVL-1 e MSCJL-B;
- ♣ V_{λ} com adição do *long linker*, empregando os *primers* MSCVL-1 e MSCJL-BL.

A PCR foi realizada com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos) e extensão final a 72°C por 10 minutos. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) preparado em TBE 0,5X. A eletroforese foi conduzida a 100 mV em TBE 0,5X. Os fragmentos amplificados possuem entre 400 e 450 pb.

Foram realizadas pelo menos dez reações de amplificação para cada um dos fragmentos. O material resultante foi concentrado para 100 μ L utilizando a membrana Microcon YM-30 e submetido a um processo de eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting*) (70 mV, 4°C, gel a 1%). A porção do gel correspondente à banda de interesse foi então excisada, adicionada a 5 volumes de tampão TE e incubada a 65°C por 10 minutos, para derretimento da agarose. Em

seguida foi adicionado 1 volume de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico, seguido de centrifugação a 20000 g por 1 minuto. A fração aquosa (superior) foi recolhida e acrescida de 1/10 do volume de acetato de sódio 3 mol/L pH 5,2, três volumes de etanol absoluto e 1 μ L de glicogênio 20 ng/mL.

Após incubação a -20°C até o dia seguinte para precipitação do DNA, a solução foi centrifugada a 20000 g e 4°C por 30 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 20000 g e 4°C por 5 minutos. Este procedimento foi realizado mais uma vez para remoção de qualquer resíduo de fenol, e o precipitado foi incubado a 42°C por 30 a 60 minutos para secagem. Em seguida o *pellet* foi adicionado de 30 μ L de tampão TE e incubado *overnight* a 4°C para ressuspensão.

A quantidade e pureza das amostras foram estimadas em espectrofotômetro – o valor de A_{260} multiplicado por 50 corresponde à concentração de DNA dupla fita, em ng/ μ L. Quantidades equivalentes de V_{κ} e V_{λ} com *short linker* foram combinadas, bem como V_{κ} e V_{λ} com *long linker*, formando respectivamente as amostras V_{LS} e V_{LL} , e essas soluções foram então armazenadas a -20°C . O processo de purificação foi repetido até a obtenção de 20 μ g de cada uma das amostras (V_{LS} e V_{LL} , e V_H).

Os segmentos V_H e V_L purificados foram então submetidos a uma PCR de fusão para geração dos fragmentos scFv S e scFv L (*single chain Fragment, variable, with short / long linker*). Nessa reação as extremidades 3' de V_L e 5' de V_H se anelam através de sequências complementares introduzidas durante a amplificação anterior. A fusão empregou 200 ng de V_H e V_{LS} (ou V_{LL}) e 60 pmol dos *primers* RSC-F e RSC-B, com os demais reagentes nas mesmas concentrações da reação anterior, e foi conduzida nas seguintes condições: desnaturação inicial (94°C , 5 minutos), 20 ciclos de desnaturação (94°C , 15 segundos), anelamento (56°C , 30 segundos) e extensão (72°C , 2 minutos), e extensão final (72°C , 10 minutos). Alíquotas de 4 μ L da reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da fusão, e os fragmentos foram produzidos, concentrados e purificados, até a obtenção de pelo menos 10 μ g de cada fusão.

Os *primers* empregados nas ampliações de V_H e V_L introduziram nestas sequências sítios de restrição da enzima Sfil (5' GGCCN \blacktriangledown NNNNGGCC 3', onde o símbolo " \blacktriangledown " indica o local da clivagem) a fim de permitir a inserção do fragmento scFv no vetor pCOMB3X, que apresenta os mesmos sítios (ANEXO D). Nas porções

5' de V_L e 3' de V_L foram inseridos os segmentos 5' GGCCC ∇ AGGCGGCC 3' e 5' GGCCG ∇ GCCTGGCC 3'. Como as sequências apresentam sítios diferentes, o fragmento scFv é inserido no vetor somente em um único sentido, o que dispensa o emprego uma segunda enzima de restrição.

A digestão utilizou 10 μ g de scFv, 360 unidades de SfiI (NEB), 20 μ L de NEBuffer4 10X e água ultra pura para um volume final de 200 μ L, e foi conduzida a 50°C por 8 horas. Em seguida 20 μ g de pCOMB3X foram digeridos nas mesmas condições, mas empregando 120 unidades de SfiI. Depois de purificados conforme descrito anteriormente, 700 ng de cada fragmento foram submetidos à ligação com 1,4 μ g de fagomídeo digerido, empregando 1 unidade de ligase (INVITROGEN), 40 μ L de tampão ligase 5X e água ultra pura para um volume final de 200 μ L. Após incubação *overnight* em temperatura ambiente, o DNA foi precipitado com etanol, ressuspenso em 15 μ L de água ultra pura e armazenado a -20°C.

Esse material foi então adicionado a 300 μ L de células eletrocompetentes e submetido à eletroporação. A cubeta foi lavada cinco vezes com 1 mL de meio SOC a 37°C, e os 5 mL resultantes foram incubados a 37°C e 250 rpm por 1 hora. À cultura foram então adicionados 10 mL de meio SB pré-aquecido contendo (para um volume de 15 mL) 20 μ g/mL de carbenicilina e 10 μ g/mL de tetraciclina. A cultura foi incubada por mais 1 hora, e após adição de 4,5 μ L de carbenicilina 100 mg/mL (concentração final 50 μ g/mL) e nova incubação, foram adicionados 20 mL de fago *helper* 10¹¹ pfu/mL. O volume total foi adicionado a 165 mL de meio SB pré-aquecido contendo 92,5 μ L de carbenicilina 100 mg/mL e 148 μ L de tetraciclina 12,5 mg/mL (concentrações finais em 200 mL: 50 μ g/mL e 10 μ g/mL) e incubado por 2 horas.

Após adição de 70 μ g/mL de canamicina, a cultura foi incubada até o dia seguinte e então centrifugada a 3000 g e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido, acrescido de 25 mL de PEG / NaCl e incubado a 250 rpm e 37°C por 10 minutos. A solução foi incubada em gelo por 60 minutos e centrifugada a 15000 g e 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o tubo de centrífuga deixado invertido sobre papel-toalha por 10 minutos para remoção de qualquer resíduo de PEG-8000. Os fagos precipitados foram ressuspenso em 2 mL de TBS contendo BSA 1% (m/v), transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados a 20000 g e 4°C por 5 minutos. O sobrenadante (biblioteca) foi filtrado em membrana de 0,22 μ m para remoção de células e estocado a 4°C.

4.2.1.6 Seleção das bibliotecas de anticorpos

Cada biblioteca gerada foi submetida a quatro ciclos de seleção, iniciados pela sensibilização de um imunotubo (NALGE NUNC) com Fc IgG ou Fc5 μ IgM diluídos em 1 mL de *coating buffer*. A fim de aumentar a estringência da seleção, em cada ciclo o imunotubo foi sensibilizado com quantidades decrescentes de proteína (20, 10, 5 e 2,5 μ g, respectivamente). Após incubação *overnight* a 4°C e leve agitação, a solução foi descartada e o imunotubo bloqueado com 2 mL de TBS contendo 3% de BSA por 1 hora a 37°C e leve agitação. Nesse período foi preparada uma cultura de 10 mL de *E. coli* XL1-Blue em meio LB contendo 10 μ g/mL de tetraciclina, incubada a 37°C e 250 rpm até a DO₆₀₀ atingir 1,0 (4 a 5 horas).

Após descarte da solução de bloqueio, o imunotubo foi incubado por 2 horas com 1 mL da biblioteca de fagos (*input* do ciclo) na concentração de 10¹² fagos/mL. Depois de descartada essa solução, o imunotubo foi lavado cinco vezes – adição de 2 mL de TBS contendo *Tween* 20 0,5%, homogeneização por inversão (10 segundos) e descarte – para remoção dos fagos fracamente ligados. A lavagem foi repetida 10 vezes no segundo ciclo, 15 vezes no terceiro e 20 vezes no quarto. Os fagos ligados foram então recuperados pela adição de 1 mL de tampão de eluição ácida e incubação em repouso e temperatura ambiente por 10 minutos, com agitação em *vortex* por 5 segundos a cada minuto. Após neutralização com 150 μ L de Tris 1 mol/L pH 9, cerca de 150 μ L dessa solução (*output* do ciclo) foram armazenados a 4°C, e o volume restante foi armazenado em gelo até que a cultura bacteriana alcançasse a DO₆₀₀ estipulada.

Para titulação do *input*, 2 μ L de diluições 10⁻⁷, 10⁻⁸ e 10⁻⁹ da biblioteca adicionada ao imunotubo foram incubadas por 15 minutos em repouso com 198 μ L da cultura de *E. coli* previamente incubada por 4 a 5 horas. Enquanto isso, 3 mL da cultura foram infectados com o *output* (1 mL). A essa cultura foram adicionados 4 mL de meio SB pré-aquecido contendo 12,5 μ g/mL de tetraciclina e 40 μ g/mL de carbenicilina (concentrações finais em 8 mL: 10 e 20 μ g/mL, respectivamente). Para titulação do *output*, 100 μ L de diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ da cultura bacteriana foram plaqueadas em LB sólido contendo 100 μ g/mL de carbenicilina. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, as diluições para titulação do *input* também foram plaqueadas, e as seis placas foram incubadas *overnight* a 37°C.

A cultura de 8 mL foi incubada em temperatura ambiente e repouso por 15 minutos, e a seguir a 37°C e 250 rpm por 1 hora. Foram então adicionados 30 µg/mL de carbenicilina na concentração final de 50 µg/mL, e o cultivo foi incubado por mais 1 hora. Depois da adição de fago *helper* (10 mL a 10¹¹ pfu/mL) a cultura foi transferida para 82 mL de meio SB pré-aquecido com 46 µL de carbenicilina 100 mg/mL e 73,6 µL de tetraciclina 12,5 mg/mL (concentrações finais em 100 mL: 10 µg/mL e 50 µg/mL) e incubada por mais 2 horas. Em seguida foram adicionados 70 µg/mL de canamicina, e a cultura foi incubada *overnight*. Um novo imunotubo foi sensibilizado para o próximo ciclo e incubado *overnight* a 4°C e leve agitação.

No dia seguinte foram contadas as colônias crescidas nas placas incubadas *overnight*. As titulações correspondem ao número de colônias de cada placa dividido pela diluição e multiplicado por 80 para o *output* ou 500 para o *input*. A cultura incubada no dia anterior foi centrifugada a 15000 g e 4°C por 15 minutos, e o sobrenadante recolhido, acrescido de 25 mL de PEG / NaCl e incubado a 250 rpm e 37°C por 10 minutos. A solução foi incubada em gelo por 60 minutos e centrifugada a 15000 g e 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o tubo deixado invertido sobre papel-toalha por 10 minutos para remoção de qualquer resíduo de PEG-8000. O *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de TBS contendo 1% de BSA, transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugado a 20000 g e 4°C por 5 minutos. O sobrenadante (*output* amplificado) foi filtrado para remoção de células e estocado a 4°C até ser empregado como *input* no *panning* seguinte.

4.2.1.7 Análise do processo de seleção

Todos os *inputs* e *outputs* obtidos foram então analisados através de ELISA para análise da afinidade pelo alvo empregado na seleção. Aos poços da placa de imunensaio foram adicionados 1 µg de proteína (Fc IgG, Fc5µ IgM ou BSA) diluída em 100 µL de *coating buffer*. Após incubação *overnight* a 4°C e leve agitação, a solução de sensibilização foi descartada e os poços foram bloqueados com 200 µL de TBS + BSA 1% por 2 horas em temperatura ambiente e leve agitação. A solução de bloqueio foi descartada e foram então adicionados 100 µL de diluições 1:4 (em solução de bloqueio) dos *inputs* e *outputs* amplificados.

Após incubação por 1 hora os poços foram lavados seis vezes com 200 μ L de TBS acrescido de 0,5% de *Tween* 20 e incubados nas mesmas condições com 200 μ L do anticorpo murino anti-M13 conjugado à peroxidase (GE HEALTHCARE) diluído 10000 vezes em solução de bloqueio. Depois das lavagens para remoção de anticorpos secundários não ligantes, foram adicionados aos poços 100 μ L de TMB. Após 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de ácido sulfúrico 2 mol/L, e a absorbância (λ_{450}) de cada poço foi determinada.

Em seguida foram isolados aproximadamente 25 clones de uma das placas de titulação correspondentes ao *output* que apresentou maior reatividade em ELISA (geralmente o quarto). Os clones foram cultivados em 5 mL de meio SB acrescido de 50 μ g/mL de carbenicilina por 5 horas e 37°C e 250 rpm, e então 500 μ L de fago *helper* (10^{11} pfu/mL) foram adicionados a cada cultura. Após incubação por 2 horas foram adicionados 70 μ g/mL de canamicina, e as culturas foram incubadas até o dia seguinte, quando foram centrifugados a 3000 g por 15 minutos.

O sobrenadante obtido foi misturado vigorosamente com 1/4 de volume de PEG / NaCl, incubado em gelo por 30 minutos e centrifugado a 20000 g e 4°C por 15 minutos. Após descarte do sobrenadante o tubo foi novamente centrifugado, e o novo sobrenadante aspirado para remoção de qualquer resíduo de PEG-8000. O *pellet* (clones amplificados) foi ressuscitado em 50 μ L de TBS acrescido de 1% de BSA e armazenado a 4°C. Esse mesmo procedimento foi seguido para eventual reamplificação dos estoques de *inputs*, *outputs* e clones isolados, mas empregando 5 μ L do estoque correspondente para infecção de 5 mL da cultura bacteriana.

Os clones isolados foram então submetidos a um imunoenensaio para análise da afinidade com o alvo – conforme protocolo descrito para os *inputs* e *outputs* – e seu DNA foi extraído para sequenciamento. Durante a amplificação dos clones conforme descrito acima e após a primeira centrifugação, 500 μ L do sobrenadante obtido foram separados, misturados a 200 μ L de PEG / NaCl e incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugação por 10 minutos a 20000 g e descarte do sobrenadante, o tubo foi brevemente centrifugado (*spin*) e o sobrenadante aspirado para remoção de qualquer resíduo de PEG.

O precipitado foi ressuscitado em 100 μ L de tampão iodeto adicionado de 250 μ L de etanol e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Neste intervalo é precipitado preferencialmente DNA de fita simples, com a maior parte das

proteínas virais permanecendo em solução. Após centrifugação por 1 minuto a 20000 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%, centrifugado novamente e incubado a 42°C por até 1 hora para secagem. O *pellet* foi então ressuspensionado em 30 µL de TE, e após quantificação em espectrofotômetro a solução foi estocada a -20°C. Cerca de 1 µg do DNA extraído de cada clone foi enviado para sequenciamento (MACROGEN) com 50 pmol do *primer* MKFLOMP, para amplificação de todo o fragmento scFv inserido em pCOMB3X.

4.2.2 Seleção de mimotopos de *Treponema pallidum* e HTLV

A triagem de mimotopos de HTLV e sífilis empregou as bibliotecas Ph.D. da NEB (Figura 10), formadas por hepta e dodecapeptídeos lineares (Ph.D.-7 e Ph.D.-12) e heptapeptídeos circulares (Ph.D.-C7C) expressos na porção N-terminal da proteína pIII do bacteriófago M13KE. Cada vírion apresenta cinco peptídeos idênticos, e cada biblioteca apresenta 2×10^9 peptídeos distintos. As sequências randômicas das bibliotecas Ph.D.-7 e Ph.D.-12 são flanqueadas por uma serina na porção N-terminal e três glicinas na região C-terminal. Na biblioteca Ph.D.-C7C as extremidades dos peptídeos apresentam as sequências SAC e CGGG, com as cisteínas formando uma ponte dissulfeto responsável pela conformação circular.

Os anticorpos monoclonais anti-HTLV e anti-*Treponema pallidum* (FITZGERALD – ANEXOS F e G) utilizados nessa linha de trabalho são de isotipo IgG1 e foram produzidos em camundongos, empregando como imunógenos a proteína p40Tax de HTLV-1 e um lisado de *T. pallidum*, respectivamente. Foram os únicos anticorpos contra esses patógenos encontrados disponíveis comercialmente no momento da aquisição dos reagentes a serem utilizados neste trabalho.

Para amplificação das soluções de fagos e expressão de proteínas foi utilizada a cepa ER 2738 de *E. coli*, que apresenta o genótipo F'[*proA*⁺*B*⁺ *lacI*^f Δ(*lacZ*)M15 *zzf*::Tn10(Tet^R)] *fhuA2 glnV* Δ(*proAB-lac*) *thi-1* Δ(*hsdS-mcrB*)5. O planejamento experimental para seleção, isolamento, análise e expressão dos peptídeos foi baseado no Manual das Bibliotecas Ph.D. (NEB, 2009) e no trabalho desenvolvido por ZWICK e colaboradores (1998).

4.2.2.1 Seleção das bibliotecas de peptídeos

Para cada anticorpo utilizado foram realizados três ciclos de seleção contra cada uma das três bibliotecas, totalizando seis processos. No primeiro ciclo o imunotubo foi sensibilizado com 1,5 mL de *coating buffer* contendo 5 µg/mL do anticorpo. Nos dois *pannings* seguintes a sensibilização foi realizada com 1 e 0,5 µg/mL da proteína, respectivamente.

O imunotubo foi selado com parafilme e incubado *overnight* a 4°C sob leve agitação. Depois de descartada a solução de sensibilização, o imunotubo foi completamente preenchido com *coating buffer* contendo 5 mg/mL de BSA, e incubado para bloqueio por 1 hora a 4°C e leve agitação. Em seguida foi preparada uma cultura bacteriana para o procedimento de titulação: uma colônia de *E. coli* cepa ER 2738 (cultivada em placa no dia anterior) foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo 10 µg/mL de tetraciclina e incubada a 37°C e 220 rpm por 1,5 a 2,5 horas, até a DO₆₀₀ atingir aproximadamente 0,5.

Após descarte da solução de bloqueio o imunotubo foi lavado seis vezes com TBS contendo *Tween* 20 0,1% e incubado com 1 mL do *input* de fagos (10^9 fagos/mL, diluídos na solução de lavagem) por 1 hora a 25°C e 100 rpm. Durante esse período foi preparada uma cultura bacteriana para o processo de amplificação do *output*: uma colônia de *E. coli* ER 2738 foi inoculada em 20 mL de meio LB contendo 10 µg/mL de tetraciclina e incubada a 37°C e 220 rpm por cerca de 30 minutos, até a DO₆₀₀ atingir 0,01 a 0,05.

Após descarte da solução de fagos, os imunotubos foram lavados (homogeneização por inversão seguida de descarte da solução de lavagem) dez vezes para remoção de fagos fracamente ligados. Essa etapa foi repetida 15 vezes no segundo ciclo e 20 vezes no terceiro. Os fagos ligados fortemente ao alvo foram recuperados pela adição de 1 mL de tampão de eluição ácida e incubação por 10 minutos a 100 rpm e temperatura ambiente, seguida de neutralização com 150 µL de Tris 1 mol/L pH 9. Cerca de 100 µL da solução neutralizada foram armazenados a 4°C para titulação e futuros ensaios. O restante foi adicionado aos 20 mL da cultura bacteriana incubada por 30 minutos e incubado por 5 horas a 37°C e 250 rpm.

Quando a DO₆₀₀ desse cultivo atingiu 0,5, alíquotas de 90 µL foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos com 10 µL de diluições 10^{-1} , 10^{-2}

e 10^{-3} do *output* preparadas em LB. Cada alíquota infectada foi adicionada a 3 mL de meio LB top ágar derretido (e previamente resfriado a 42°C) e plaqueada em meio LB sólido contendo 50 µg/mL de IPTG e 40 µL/mL de X-Gal 4% (placas pré-aquecidas por pelo menos 1 hora a 37°C). Após incubação *overnight* a 37°C, foram contadas as colônias azuladas crescidas em cada placa, e o título dos *outputs* (pfu/10µL) foi determinado multiplicando a contagem pela diluição.

Depois de 5 horas a cultura incubada para amplificação dos fagos foi centrifugada a 12000 g e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo frasco e centrifugado nas mesmas condições, e o sobrenadante obtido foi novamente transferido e acrescido de 3,5 mL (1/6 do volume) de PEG / NaCl. A solução foi vigorosamente agitada e incubada *overnight* a 4°C para precipitação de fagos, e no dia seguinte centrifugada a 12000 g e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* rapidamente centrifugado para remoção de qualquer resíduo de PEG, aspirando-se o sobrenadante com pipeta. O *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de TBS, transferido para um tubo de 1,5 mL e centrifugado a 20000 g e 4°C por 5 minutos para remoção de células.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e os fagos foram novamente precipitados pela adição de 1/6 do volume (cerca de 167 µL) de PEG / NaCl e incubação em gelo por 60 minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos a 20000 g e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* rapidamente centrifugado para remoção de PEG, aspirando-se o sobrenadante com pipeta. O *pellet* foi ressuscitado em 200 µL de TBS, e essa solução (*output* amplificado) foi titulada, armazenada a 4°C e utilizada no *panning* seguinte.

Para a titulação do *output* amplificado, uma colônia de *E. coli* ER 2738 foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo 10 µg/mL de tetraciclina e incubada a 37°C e 250 rpm. Após 1,5 a 2,5 horas (DO_{600} próxima a 0,5) alíquotas de 200 µL da cultura foram incubadas com 10 µL de diluições 10^{-8} a 10^{-11} da solução de fagos ressuscitada em TBS. Após incubação em repouso por 5 minutos, as alíquotas infectadas foram adicionadas a 3 mL de meio LB top ágar derretido (e previamente resfriado a 42°C), plaqueadas em meio LB sólido contendo 40 µL/mL de X-Gal e 50 µg/mL de IPTG (placas pré-aquecidas por pelo menos 1 hora a 37°C) e incubadas *overnight* a 37°C. Em seguida um imunotubo foi sensibilizado e incubado *overnight* para utilização no próximo *panning*.

No dia seguinte foram contadas as colônias azuladas crescidas em cada placa de titulação. O título do *output* amplificado (estimado em 10^{11} pfu/10 μ L) foi determinado multiplicando a contagem pela diluição.

A fim de avaliar a eficiência dos *pannings*, a biblioteca Ph.D.-7 também foi submetida a um processo de seleção frente à estreptavidina. Exaustivamente analisado e caracterizado por DEVLIN e colaboradores (1990), esse processo é amplamente empregado como referência para seleção de bibliotecas de peptídeos. Caso os procedimentos sejam corretamente realizados e os parâmetros de sensibilização e lavagem sejam adequados, essa seleção deve resultar na obtenção de peptídeos que apresentam a sequência consenso HPQ.

A seleção da biblioteca frente à estreptavidina foi conduzida conforme descrito para os demais processos, exceto pela etapa de eluição dos fagos ligantes: em vez de empregar um tampão ácido para desestabilização da interação peptídeo-alvo, o imunotubo foi incubado por 30 minutos com TBS contendo 100 μ M de biotina, molécula que apresenta forte afinidade pelo alvo empregado. Outra alteração foi a adição de 100 ng/mL de estreptavidina na solução de bloqueio, com o intuito de impedir a interação do alvo com biotina ou qualquer proteína biotinilada contaminante que eventualmente estivesse presente no BSA empregado.

4.2.2.2 Isolamento e análise de clones

Dois frascos *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 20 mL de meio LB foram inoculados com uma colônia de *E. coli* ER 2738 e incubados a 37°C e 200 rpm até a DO_{600} da cultura atingir 0,01 e 0,05 (30 minutos de incubação). Nesse momento aproximadamente 24 colônias de uma das placas do terceiro *output* (10 clones no caso da seleção frente à estreptavidina) foram transferidas para alíquotas de 1 mL do cultivo. Após incubação por 4 a 5 horas a 37°C, as culturas infectadas com fagos foram centrifugadas a 20000 g por 30 segundos para remoção de células.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente centrifugado, e 80% (v/v) do sobrenadante (clones isolados e amplificados) foram transferidos para novos tubos e estocados a 4°C. Para eventuais reamplificações dos estoques de *inputs*, *outputs* e clones selecionados, foi seguido o mesmo procedimento

descrito acima, mas utilizando 5 μL do estoque obtido anteriormente para infecção de 1 mL da cultura bacteriana.

A seguir o DNA dos clones isolados foi extraído para sequenciamento. Durante a amplificação e após a primeira centrifugação, 500 μL da solução de fagos amplificada foram acrescidos de 200 μL de PEG / NaCl, incubados em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugados por 10 minutos a 20000 g. Após descarte do sobrenadante o tubo foi brevemente centrifugado (*spin*) e qualquer resíduo de PEG foi aspirado com o auxílio de uma pipeta.

O precipitado foi ressuscitado em 100 μL de tampão iodeto, adicionado de 250 μL de etanol e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Depois de centrifugado por 1 minuto a 20000 g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70%, centrifugado novamente, incubado a 55°C por 20 minutos para secagem e finalmente ressuscitado em 30 μL de TE. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro, e 1 μg de DNA de cada clone foi enviado para sequenciamento (MACROGEN) juntamente com 50 pmol do *primer* -96gIII. O restante do DNA extraído foi estocado a -20°C.

A afinidade dos clones pelo anticorpo empregado na seleção foi então avaliada por meio de um ensaio imunoenzimático. Os poços da placa de ELISA foram sensibilizados com 0,5 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do anticorpo diluído em 100 μL de *coating buffer*. Após incubação *overnight* a 4°C e leve agitação, a solução de sensibilização foi descartada e os poços bloqueados com 250 μL de *coating buffer* acrescido de 0,5% de BSA. Depois de a placa ser incubada por 1 a 2 horas nas mesmas condições, a solução de bloqueio foi descartada e os poços foram lavados com 200 μL de TBS contendo *Tween* 20 0,1%.

Após adição de 100 μL de soluções contendo 1×10^8 a 1×10^{12} fagos, (preparadas em solução de lavagem) e incubação por 1 a 2 horas, os poços foram lavados e incubados por 1 hora com 200 μL de anticorpo anti-M13 pIII conjugado à peroxidase (NEB) diluído 25000 vezes em solução de bloqueio. Depois de repetida a etapa de lavagem para remoção de anticorpos secundários não ligantes, 100 μL de TMB foram adicionados aos poços. Após 10 minutos a reação de revelação foi interrompida pela adição de 100 μL de ácido sulfúrico 2 mol/L, e a absorbância no comprimento de onda de 450 nm foi determinada em espectrofotômetro.

4.2.2.3 Obtenção de *Escherichia coli* ER 2738 eletrocompetente

Para produção de células eletrocompetentes de *E. coli* ER 2738, 15 mL de meio LB foram inoculados com uma colônia da cepa (isolada de uma placa preparada no dia anterior) e incubados *overnight* a 37°C e 250 rpm. Seis frascos *Erlenmeyer* de 1 litro contendo 250 mL de meio LB foram então inoculados com alíquotas de 2,5 mL dessa cultura, e incubados nas mesmas condições até a DO₆₀₀ alcançar o valor aproximado de 0,7 (cerca de 2 a 3 horas).

As culturas foram incubadas em gelo por 30 minutos, transferidas para frascos de centrífuga de 400 mL previamente resfriados e centrifugadas a 5000 g e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* ressuspensos em 250 mL de uma solução previamente resfriada de glicerol 10% (v/v) em água deionizada, e centrifugados novamente. Depois de descartado o sobrenadante, os *pellets* foram novamente ressuspensos em 125 mL de glicerol 10%, combinados dois a dois e centrifugados novamente.

Após descarte do sobrenadante, cada *pellet* foi ressuspensado em 30 mL de glicerol 10%, combinados em um único frasco centrifugados a 8000 g e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 3 mL de glicerol 10% e aliqotado em tubos de 1,5 mL previamente incubados em banho de gelo seco e etanol – 100 µL por tubo, num total aproximado de 30 tubos. Ao final as alíquotas foram imediatamente armazenadas a -80°C. O teste de competência da cultura foi realizado conforme descrito para a cepa XL1-Blue, mas empregando ampicilina como marcador de seleção.

4.2.2.4 Expressão dos peptídeos na forma solúvel

A seguir os clones que apresentaram considerável afinidade pelos anticorpos empregados na seleção foram submetidos a um processo de expressão na forma solúvel, desvinculados de partículas virais. Inicialmente, as sequências nucleotídicas que codificam os peptídeos selecionados foram inseridas no plasmídeo pMAL-pIII. Esse sistema, desenvolvido por ZWICK e colaboradores (1998), permite que sequências selecionadas por meio de *phage display* sejam expressas fusionadas à proteína ligante de maltose (*maltose-binding protein*, MBP).

Em pMAL-pIII o gene de interesse é inserido à jusante de uma sequência que codifica um peptídeo sinal responsável por direcionar a proteína correspondente para o espaço periplasmático de *E. coli*, o que facilita a extração da mesma a partir da cultura bacteriana. E como a etiqueta MBP interage fortemente com amilose, a proteína de fusão pode ser purificada por cromatografia de afinidade frente a uma resina composta pelo polissacarídeo.

As sequências nucleotídicas que codificam os peptídeos foram amplificadas dos clones selecionados utilizando 20 ng de DNA extraído, 1 unidade de *Platinum Taq High Fidelity* (INVITROGEN), 5 µL de Tampão Taq HF, 2 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de *mix* de dNTPs 10 mM, 10 µM dos *primers* M13KE e -96gIII, e água ultra pura para um volume final de 50 µL. A PCR foi conduzida com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos (desnaturação a 94°C, anelamento a 50°C e extensão a 68°C – cada etapa por 30 segundos) e extensão final a 68°C por 10 minutos. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, sendo que o tamanho dos fragmentos obtidos é de 50 a 60 pb.

O DNA obtido foi então quantificado em espectrofotômetro, e em seguida submetido à digestão pelas endonucleases de restrição EagI (5' C[▼]GGCCG 3') e Acc65I (5' G[▼]GTACC 3'). Cada reação empregou 1 µg do produto de PCR da reação anterior, 10 unidades das enzimas EagI e Acc65I (NEB), 5 µL de Tampão *NEBuffer 3* 10X e água ultra pura para um volume final de 50 µL. A digestão foi conduzida por 7 horas a 42°C, e após esse período a solução foi incubada a 65°C por 20 minutos para inativação das enzimas.

Os fragmentos digeridos foram então submetidos a um processo de purificação que empregou eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e precipitação com etanol. Os 50 µL de cada digestão foram acrescidos de 10 µL de tampão glicerol 5X, e a eletroforese foi conduzida a 100 mV em TBE 0,5X. Durante esse processo, ponteiros com filtro para micropipetas de 1 mL tiveram suas pontas cortadas de modo a possibilitar seu encaixe sobre tubos de 1,5 mL, e os filtros foram lavados duas vezes com 500 µL de água ultra pura e rápida centrifugação.

A porção do gel correspondente à banda de interesse foi excisada e dividida em porções menores, e estas foram transferidas para os filtros acoplados sobre os tubos de 1,5 mL. O conjunto foi centrifugado a 6000 g por 5 minutos para separar o DNA (liberado juntamente com o tampão TBE) do gel (retido pelo filtro). À solução de

DNA obtida foram acrescidos 1/10 do volume de acetato de sódio 3 mol/L, 3 volumes de etanol absoluto e 1 µL de glicogênio 20 ng/mL.

A solução foi incubada a -20°C *overnight* para precipitação do DNA, e após centrifugação a 20000 g por 15 minutos e descarte do sobrenadante, o *pellet* formado foi ressuscitado em 1 mL de etanol 70% e centrifugado novamente. A lavagem com etanol 70% foi repetida e o precipitado incubado a 42°C por 30 a 60 minutos para secagem. O *pellet* foi acrescido de 20 µL de TE e incubado *overnight* a 4°C para ressuspensão e por mais 10 minutos a 56°C. A recuperação dos fragmentos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2%, e após quantificação em espectrofotômetro as amostras foram armazenadas a -20°C.

Cerca de 10 µg de plasmídeo pMAL-pIII (NEB) foram também digeridos com 10 unidades de EagI e Acc65I, 20 µL de *NEBuffer* 3 10X e água ultra pura para um volume de 200 µL. Após incubação a 37°C por 5 horas, a digestão foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e o plasmídeo foi purificado pelo kit *High Pure* (ROCHE). A seguir 50 ng do vetor e 5 equivalentes molares (2,2 ng) de inserto, ambos digeridos, foram ligados em uma reação *overnight* a 16°C que empregou 1 unidade de ligase (INVITROGEN), 5 µL de tampão ligase 5X, e água ultra pura para um volume final de 20 µL. Essa solução foi armazenada a -20°C até sua utilização.

Em seguida 10 µL das soluções de vetores pMAL-pIII contendo os insertos foram submetidos ao processo de eletroporação conforme descrito anteriormente, utilizando 100 µL de *E. coli* ER 2738. Cinco colônias correspondentes a cada clone foram isoladas e submetidas à amplificação para confirmar a inserção dos fragmentos. Essa PCR de colônia empregou 1,5 unidades de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 1,5 µL de *Taq reaction buffer* 10X, 0,45 µL de cloreto de magnésio 50 mM, 1,5 µL de *mix* de dNTPs 10 mM e 3 pmol dos *primers* pMAL-F e pMAL-R.

A reação foi conduzida com desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 25 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C, anelamento a 55°C e extensão a 72°C, cada um por 30 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Em seguida o material foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida a 8%: se a inserção dos fragmentos em pMAL-pIII foi bem sucedida, o fragmento amplificado nessa reação teria 348 pb, contra 303 pb do amplicon sem o inserto.

Para o processo de expressão, uma colônia de *E. coli* ER 2738 transformada com um vetor pMAL-pIII contendo um dos insertos foi inoculada em 10 mL de meio

LB acrescido de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e incubada *overnight* a 37°C e 250 rpm. A cultura foi transferida para 1 litro de *rich broth* enriquecido com glucose e 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e incubada a 37°C e 250 rpm, até a DO_{600} atingir 0,5 (2 a 3 horas). Após adição 0,3 mM de IPTG e incubação por mais 3 horas para expressão, a cultura foi centrifugada por 20 minutos a 4000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 400 mL de Tris 30 mM pH 8 contendo sacarose 20% (m/v).

Em seguida foram adicionados 800 μL de EDTA 500 mM (para uma concentração final de 1 mM), e a solução foi incubada por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente sob agitação, sendo em seguida centrifugada a 8000 g e 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 400 mL de sulfato de magnésio 5 mM previamente resfriado e incubado por 10 minutos sob leve agitação em um banho de água e gelo. Depois de novamente centrifugado, o sobrenadante foi recolhido e acrescido de 8 mL de Tris pH 7,5.

Essa solução (extrato de choque osmótico) foi então submetida à cromatografia de afinidade frente a 15 mL de resina de amilose (NEB) contidos em uma coluna com 2,5 cm de diâmetro e 10 cm de altura. Inicialmente a coluna foi lavada com 8 volumes de *column buffer*, e em seguida o extrato de choque osmótico foi adicionado nas vazões aproximadas de entrada e saída de 5 mL por minuto. Após lavagem com 12 volumes de *column buffer* na mesma vazão, o peptídeo ligado à coluna foi eluído com três frações de 10 mL de *column buffer* contendo 10 mM de maltose. Depois de regenerada por meio de lavagens sucessivas com 3 volumes de água e de SDS 0,1%, 1 volume de água e finalmente 3 volumes de *column buffer*, a coluna foi armazenada a 4°C em 3 volumes de *column buffer*. Desta forma ela pode ser utilizada mais quatro vezes.

A expressão das proteínas de fusão foi confirmada por SDS-PAGE 13%. As amostras foram incubadas primeiramente a 100°C por 5 minutos e logo em seguida em gelo por 2 minutos, e então centrifugadas a 20000 g por 1 minuto. Os poços do gel foram carregados com 20 μL de cada amostra (com o cuidado de não perturbar os *pellets* durante a pipetagem) e a corrida foi conduzida a 30 mA.

Além da expressão de proteínas fusionadas aos peptídeos obtidos por meio de *phage display*, foi produzida também a etiqueta MBP não fusionada a nenhum peptídeo, a ser empregada em eventuais ensaios de controle.

4.2.2.5 Análise dos peptídeos solúveis

Como forma de verificar a eficiência da purificação e a integridade da proteína de fusão, os extratos de choque osmótico obtidos foram submetidos a SDS-PAGE 13% seguida de coloração com prata. Embora mais laborioso que o método que emprega *coomassie*, a coloração com prata é mais sensível e possibilita a visualização de bandas que não seriam aparentes pela coloração tradicional.

Logo após a eletroforese o gel foi imerso em solução de fixação e incubado *overnight* em temperatura ambiente e leve agitação. A seguir o gel foi incubado três vezes em etanol 50% por 5, 10 e 15 minutos sob leve agitação, e então incubado em solução contendo tiosulfato de sódio 0,02% (m/v) por 30 segundos. Depois de três lavagens com água em abundância, o gel foi incubado em solução de prata por 30 minutos e, após novas lavagens com água, incubado em solução de revelação por cerca de 2 a 5 minutos. Quando as bandas se tornaram aparentes a reação foi interrompida com etanol 50%.

Os peptídeos solúveis foram então analisados por ELISA. Os poços da placa foram sensibilizados com 1 µg da proteína fusionada em 100 µL de *coating buffer*. Após incubação *overnight* a 4°C e leve agitação, a solução de sensibilização foi descartada e os poços foram bloqueados com 200 µL de *coating buffer* acrescido de BSA 1%. Após incubação por 1 hora nas mesmas condições a solução de bloqueio foi descartada e os poços foram lavados com 200 µL de TBS contendo 0,5% de *Tween* 20. Em seguida foram adicionados 200 µL de soluções contendo o anticorpo primário (anticorpo monoclonal ou soro infectado por *T. pallidum* ou HTLV) diluído em solução de bloqueio.

Após incubação por 2 horas os poços foram lavados mais seis vezes e em seguida incubados nas mesmas condições por 1 hora com 200 µL de anticorpo anti-*mouse* ou anti-*human* conjugado à peroxidase, diluído 1000 vezes em solução de bloqueio (25000 vezes para o anti-*human*). Depois de repetidas as lavagens para remoção de anticorpos secundários não ligantes, foram adicionados 100 µL de TMB. Após 10 minutos, a reação de revelação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 2 mol/L, e a absorbância no comprimento de onda de 450 nm foi determinada em espectrofotômetro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-IgG E ANTI-IgM HUMANAS

5.1.1 Imunização de camundongos

A Figura 11 apresenta os resultados do ensaio de *dot blot* dos soros pré-imune de quatro camundongos BALB/c. Os animais 2 e 4 apresentaram leve reatividade com a proteína Fc IgG, e dessa forma foram destinados ao procedimento de imunização com Fc5 μ IgM. Já o soro dos animais 1 e 3 não reagiram com as duas proteínas, e eles foram então submetidos à inoculação com Fc IgG.

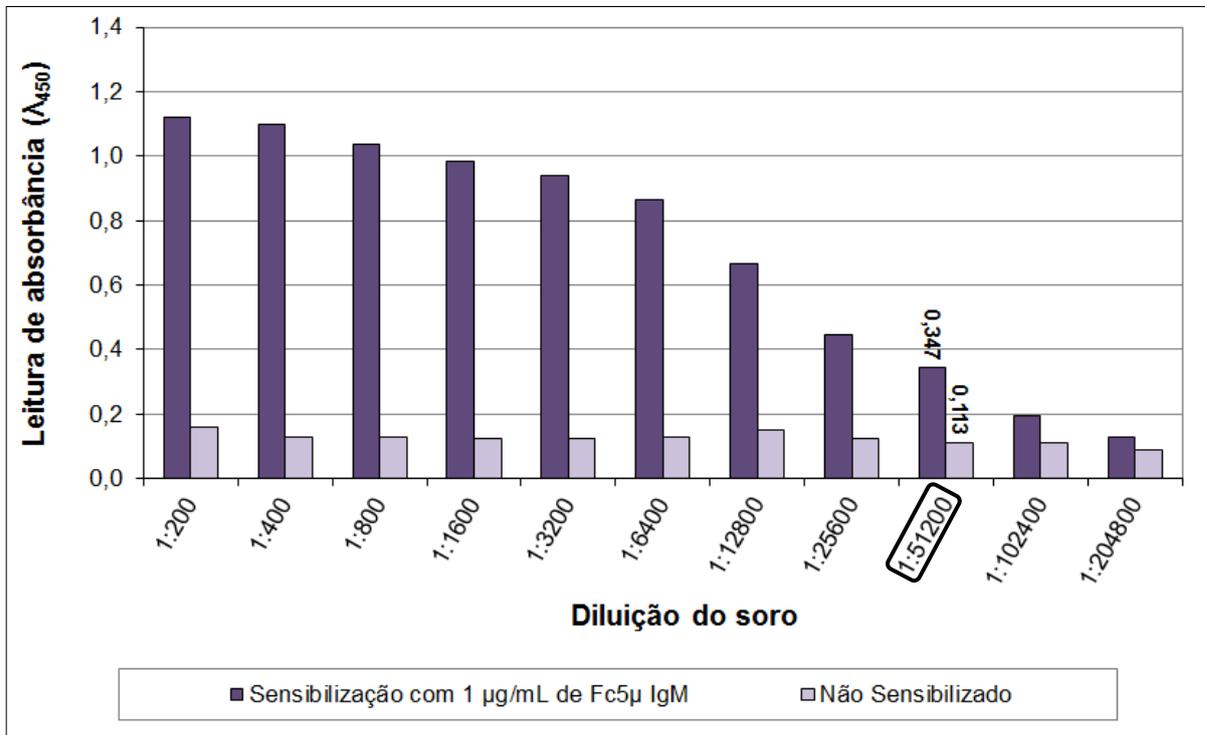
Após três inoculações os camundongos 2 e 4 desenvolveram forte resposta contra o fragmento Fc5 μ de IgM, alcançando títulos de 1:51200 (Gráficos 01 e 02). Já os animais 1 e 3 apresentaram baixa reatividade frente a Fc IgG, com títulos de 1:1600 e 1:6400, respectivamente (Gráficos 03 e 04). Vale lembrar que o título foi aqui definido como a maior diluição na qual a reatividade do soro frente ao antígeno é igual ou maior ao dobro da reatividade contra o BSA. Para os propósitos deste trabalho, é mais importante determinar se o título é alto ou baixo do que obter um valor preciso (BARBAS *et al.*, 2001).

FIGURA 11 – *Dot blot* do soro de camundongos BALB/c empregados na obtenção de RNA codificante de anticorpos anti-IgG e anti-IgM.

Sensibilização	Soro pré-imune				Soro pós terceira inoculação	
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 1	Animal 2
Fc IgG						
Fc5 μ IgM						

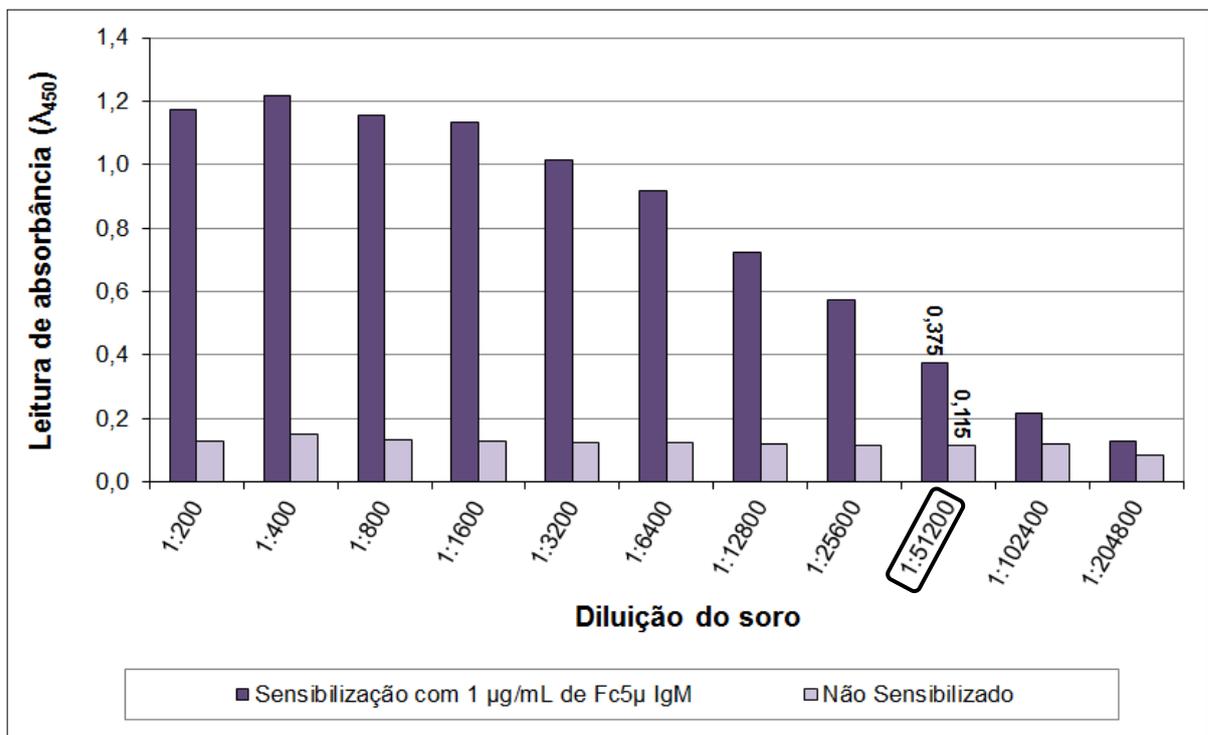
NOTA: A título de comparação, é apresentada também a reatividade dos soros dos camundongos 1 e 2 coletados uma semana após a terceira inoculação.

GRÁFICO 01 – Titulação do soro do camundongo 2 após três inoculações com Fc5 μ IgM (todas as inoculações realizadas com alu-gel).



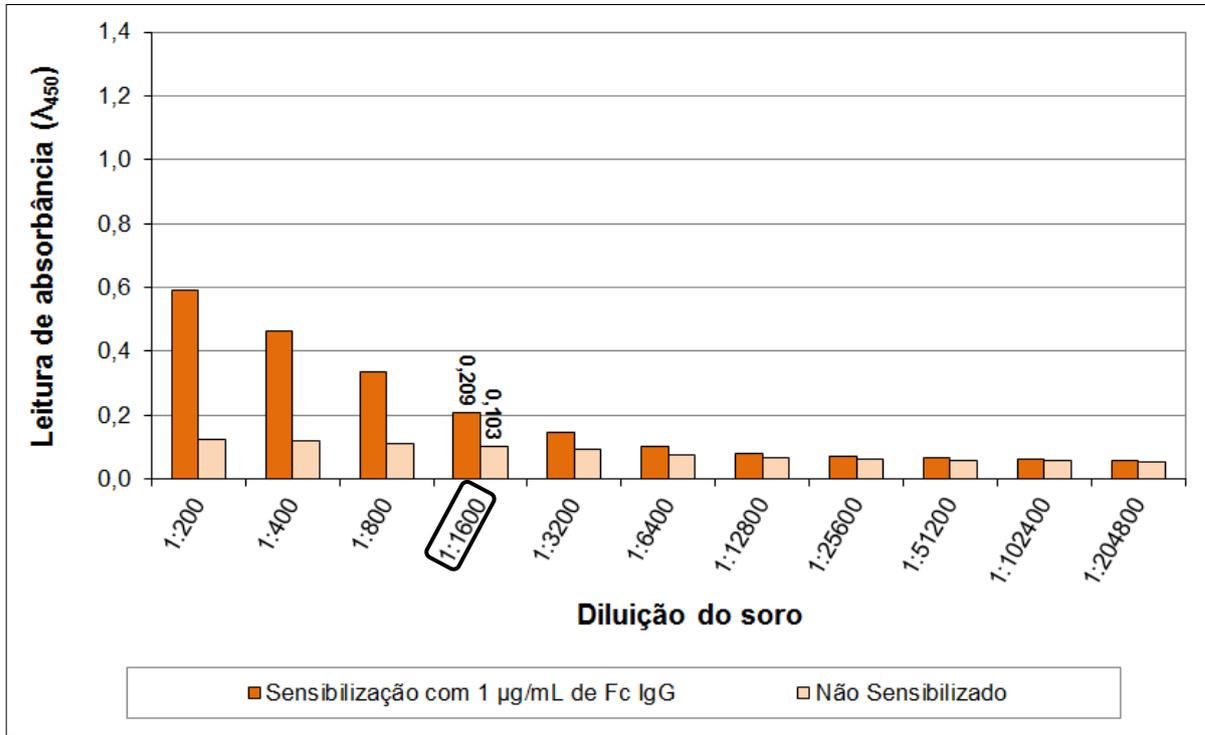
NOTA: Os valores correspondentes ao título estão destacados.

GRÁFICO 02 – Titulação do soro do camundongo 4 após três inoculações com Fc5 μ IgM (primeira inoculação realizada com ACF).



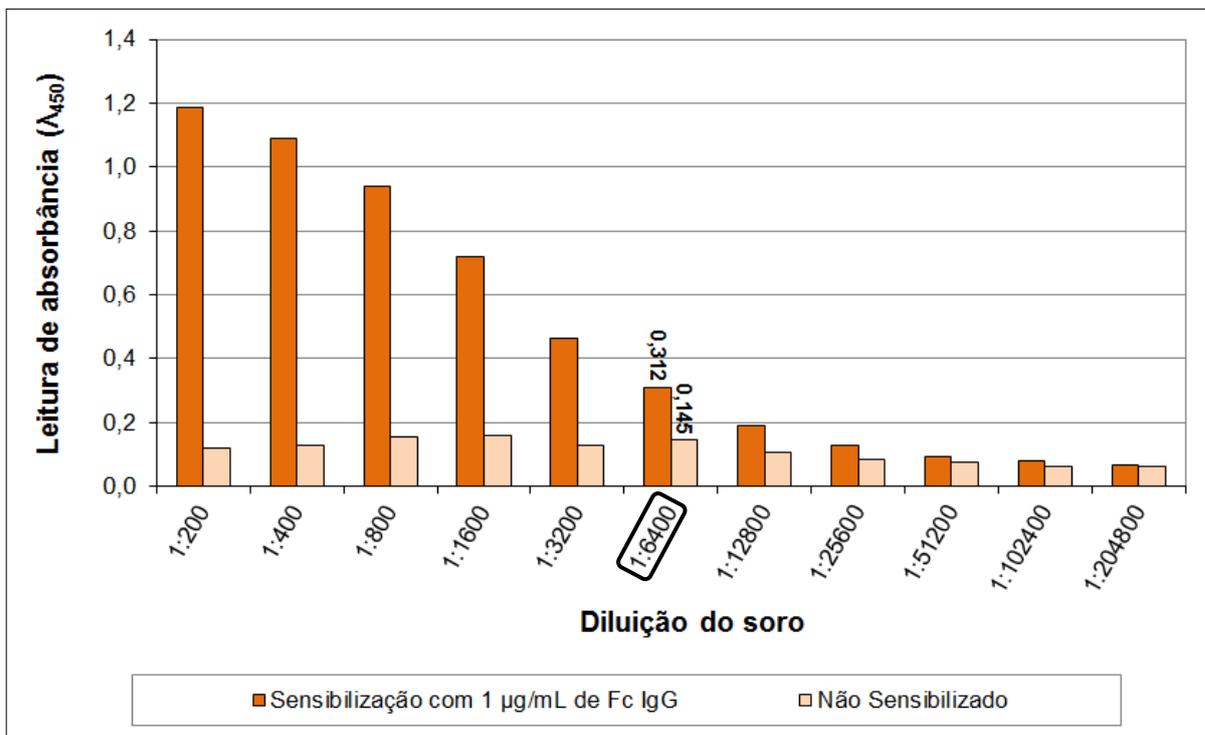
NOTA: Os valores correspondentes ao título estão destacados.

GRÁFICO 03 – Titulação do soro do camundongo 1 após três inoculações com Fc IgG (todas as inoculações realizadas com alu-gel).



NOTA: Os valores correspondentes ao título estão destacados.

GRÁFICO 04 – Titulação do soro do camundongo 3 após três inoculações com Fc IgG (primeira inoculação realizada com ACF).

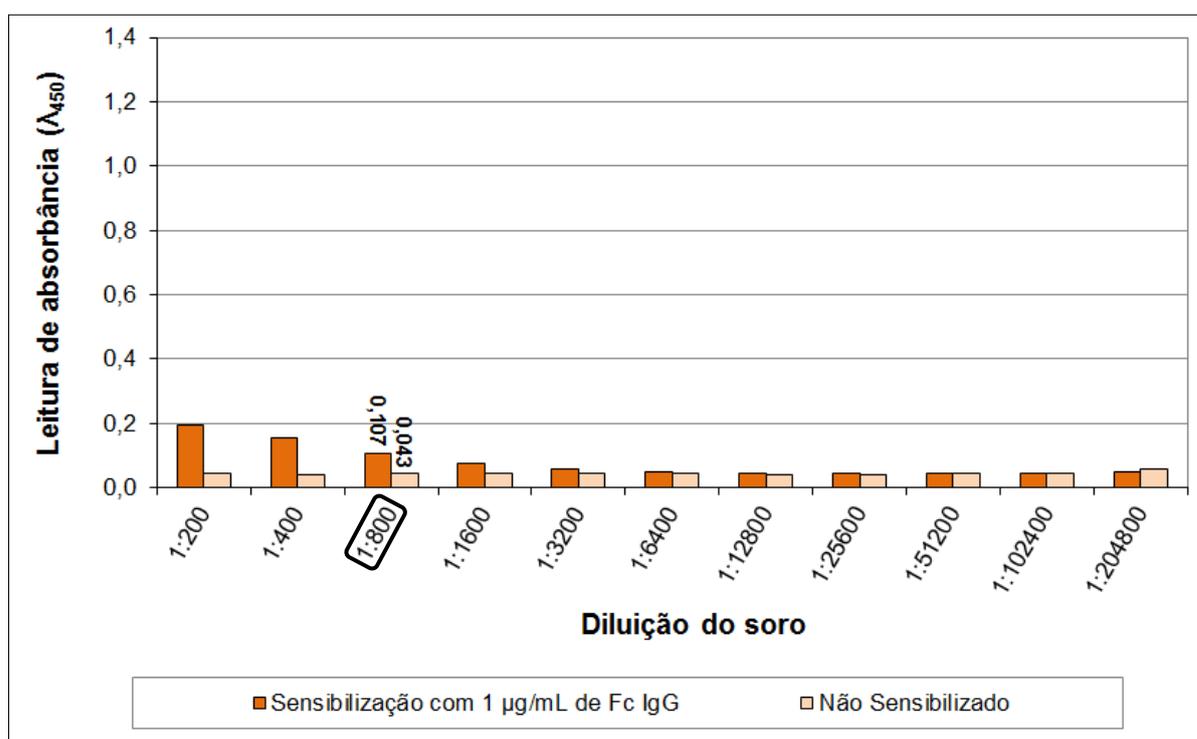


NOTA: Os valores correspondentes ao título estão destacados.

Os camundongos inoculados com Fc5 μ IgM foram submetidos ao procedimento de extração do baço e obtenção de RNA, enquanto os animais inoculados com Fc IgG receberam mais duas injeções extras como tentativa de se estimular o desenvolvimento de uma resposta imune frente ao antígeno. Entretanto, o soro obtido do sangue extraído pela punção cardíaca apresentou reatividade menor que a anteriormente observada (Gráficos 05 e 06).

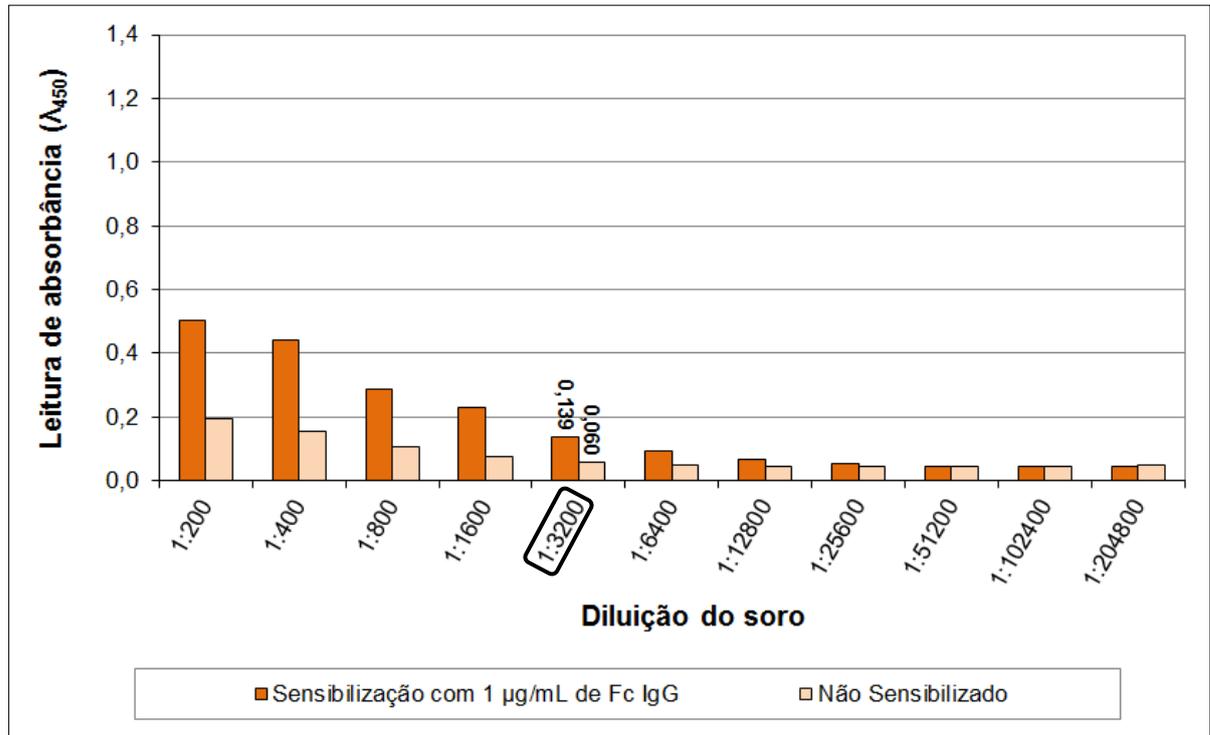
Com base nisso, decidiu-se submeter animais da linhagem *Swiss Webster* ao protocolo de imunização com Fc IgG. A definição dessa estratégia partiu do princípio de que essa linhagem – por não ser isogênica e apresentar, portanto, maior variabilidade imunogênica que os animais BALB/c – pudesse gerar anticorpos mais reativos do que aqueles produzidos pelos camundongos inicialmente empregados. Após três inoculações, o título correspondente ao soro do animal que recebeu a primeira inoculação com ACF foi de 1:12800, enquanto aquele que recebeu todas as inoculações com alu-gel apresentou título de 1:3200 (Gráficos 07 e 08). Apesar de superiores aos observados anteriormente, esses valores são ainda menores que os observados para os camundongos imunizados com Fc5 μ IgM.

GRÁFICO 05 – Titulação do soro do camundongo 1 após seis inoculações com Fc IgG (todas as inoculações realizadas com alu-gel).



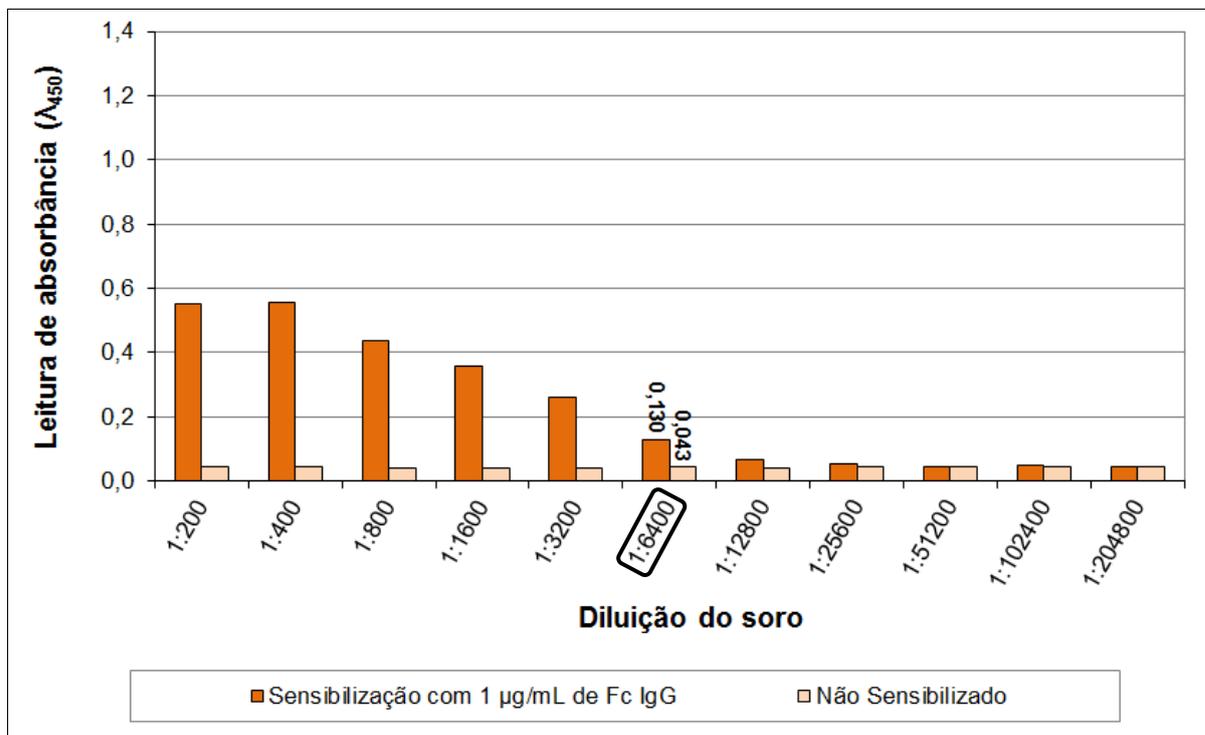
NOTA: Os valores correspondentes ao título estão destacados.

GRÁFICO 06 – Titulação do soro do camundongo 3 após seis inoculações com Fc IgG (primeira inoculação realizada com ACF).



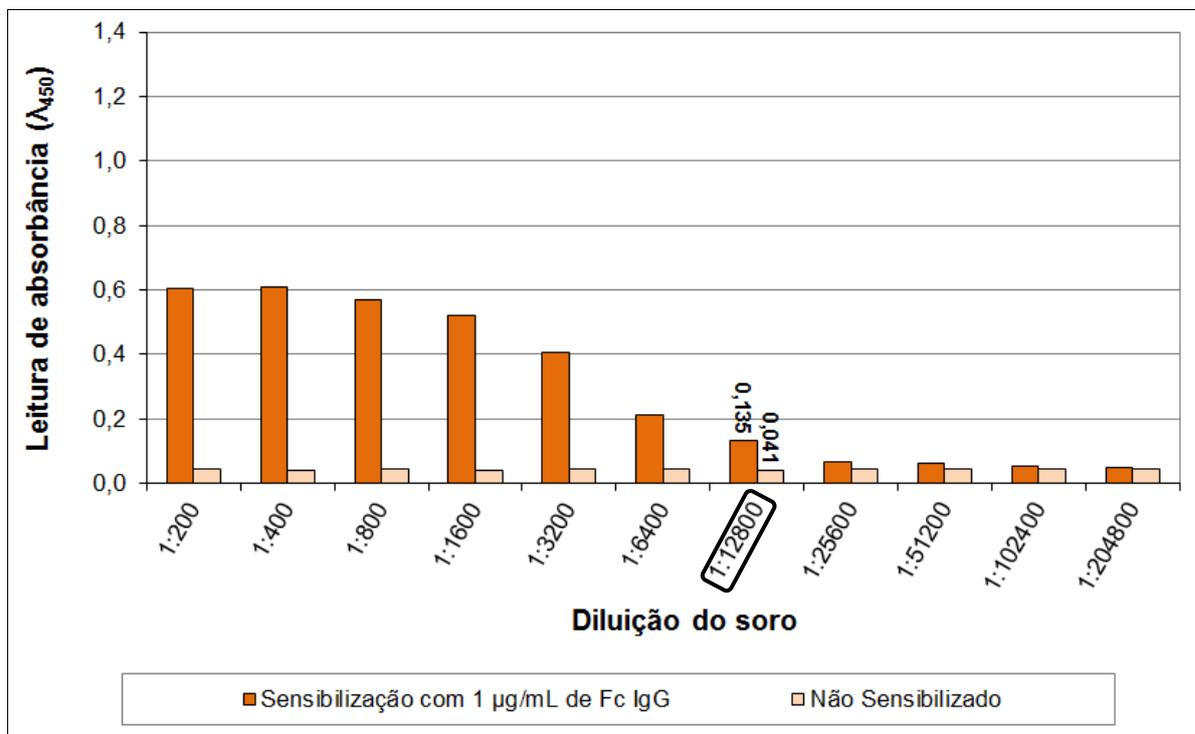
NOTA: Os valores correspondentes ao título estão destacados.

GRÁFICO 07 – Titulação do soro do camundongo *Swiss Webster* após três inoculações com Fc IgG (todas as inoculações realizadas com alu-gel).



NOTA: Os valores correspondentes ao título estão destacados.

GRÁFICO 08 – Titulação do soro do camundongo *Swiss Webster* após três inoculações com Fc IgG (primeira inoculação realizada com ACF).



NOTA: Os valores correspondentes ao título estão destacados.

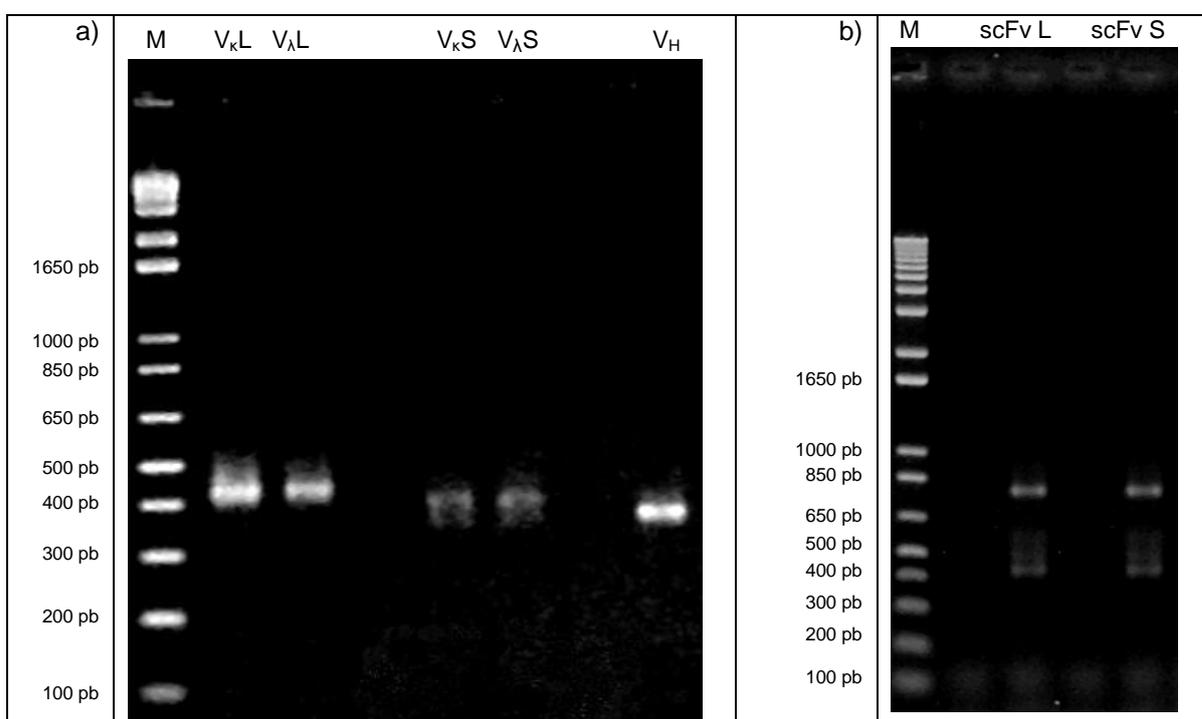
Embora não tenham sido encontrados estudos comparando a imunogenicidade de anticorpos IgG humanos e murinos, é possível que as sequências protéicas dessas duas imunoglobulinas sejam semelhantes a ponto de os camundongos não serem capazes de desenvolver uma resposta imunológica robusta frente à fração Fc de IgG humana. Assim, optou-se por dar continuidade somente com a linha de seleção de anticorpos anti-IgM humana.

5.1.2 Construção das bibliotecas

Com o intuito de aproveitar o *pool* de variabilidade imunogênica dos dois camundongos BALB/c imunizados com Fc5µ IgM, o RNA total extraído do baço de ambos foi combinado em proporções iguais, e submetido ao processo de transcrição reversa. A partir do cDNA foram amplificadas as regiões V_KL, V_λL, V_KS, V_λS e V_H. Estas sequências foram então fusionadas para obtenção dos segmentos que codificam os anticorpos recombinantes scFv S (*short linker*) e scFv L (*long linker*).

Essas reações de amplificação e fusão são evidenciadas nos géis de agarose 1% apresentados na Figura 12. No gel referente à PCR de fusão foi verificada a presença de bandas de cerca de 800 pb correspondentes aos fragmentos scFv, embora sejam visíveis também segmentos V_H e V_L de cerca de 400 pb não fusionados, que podem indicar que a reação de fusão não foi completamente eficiente.

FIGURA 12 – Obtenção de DNA codificante de fragmentos $V_{\kappa L}$, $V_{\lambda L}$, $V_{\kappa S}$, $V_{\lambda S}$ e V_H (a) e de anticorpos recombinantes scFv S e scFv L anti-IgM humana (b).

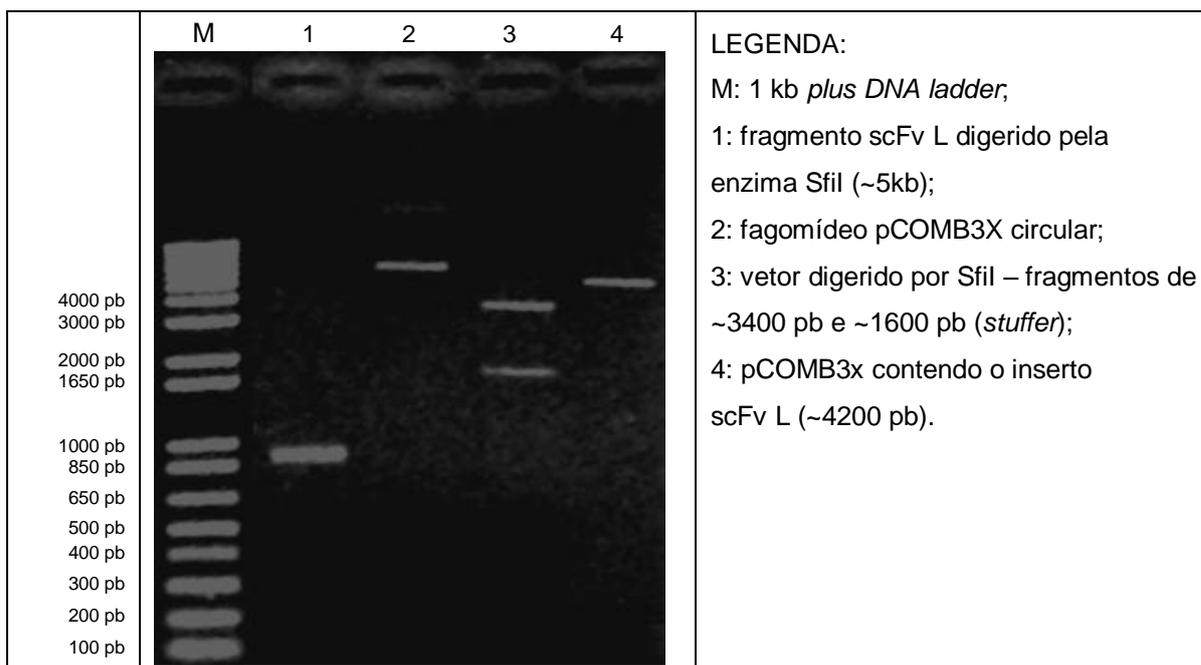


LEGENDA: M: Marcador 1 kb *plus* DNA ladder (INVITROGEN).

NOTA: tamanho aproximado dos amplicons: fragmentos variáveis: 400 pb; segmentos scFv: 800 pb.

Na Figura 13 é evidenciada a inserção de scFv L no fagomídeo pCOMB3X. Não foi verificado o crescimento, em meio seletivo, de colônias de *E. coli* XL1-Blue transformadas com o vetor pCOMB3X contendo o inserto scFv S, o que sugere a ocorrência de algum revés durante a digestão do fragmento ou durante a ligação. Em virtude disso, e como seria dispendioso construir novamente a biblioteca – partindo da produção de cDNA e seguindo até a inserção de scFv S no vetor pCOMB3X, passando pela amplificação e purificação de 20 μ g dos segmentos variáveis e pela obtenção e purificação de 10 μ g do fragmento fusionado –, optou-se por dar continuidade apenas com a seleção da biblioteca de anticorpos anti-IgM.

FIGURA 13 – Inserção do fragmento scFv L no fagomídeo vetor pCOMB3X.



5.1.3 Seleção da biblioteca de anticorpos

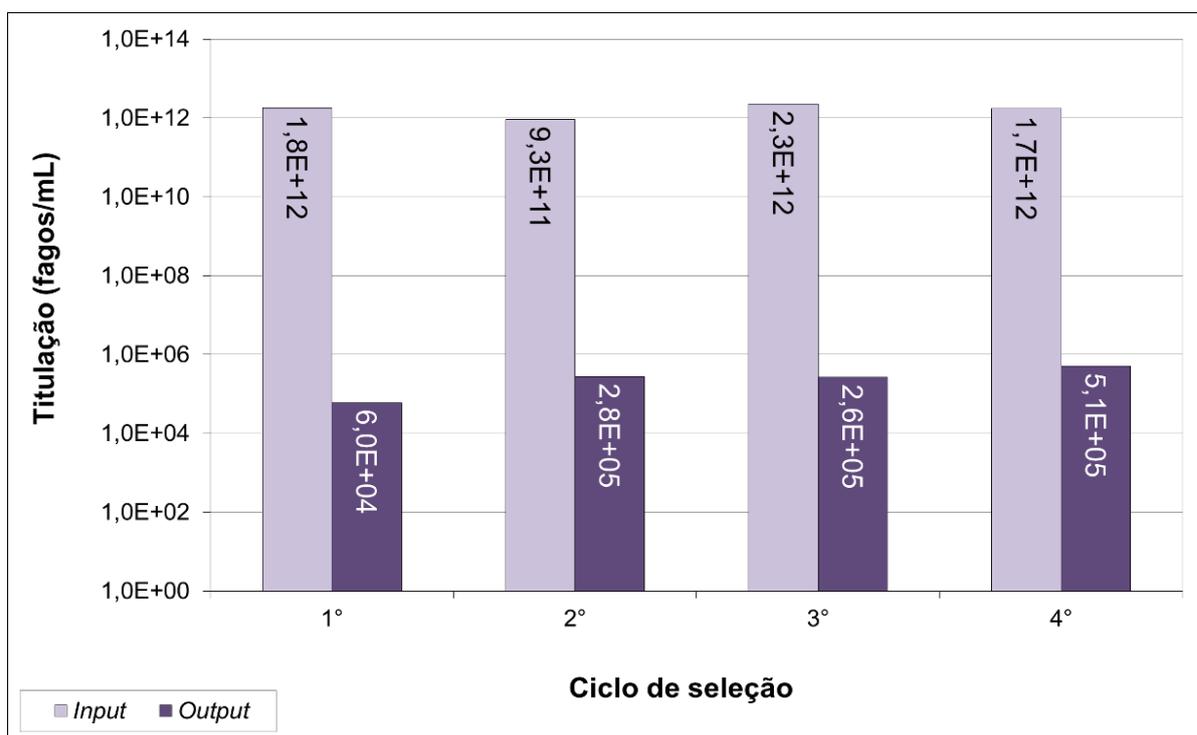
Os resultados referentes ao monitoramento do processo de seleção da biblioteca de anticorpos scFv L anti-IgM são apresentados no Gráfico 09. Todos os valores de *input* se encontram próximo a 10^{12} fagos/mL, conforme recomendado por BARBAS e colaboradores (2001). De acordo com a mesma fonte, era esperado que o *output* do primeiro *panning* apresentasse valores próximos a 10^5 a 10^6 fagos/mL e que esse valor aumentasse gradativamente nas etapas seguintes, alcançando títulos iguais ou superiores a 10^8 fagos/ mL no quarto ciclo

Entretanto, no processo aqui realizado todos os títulos de *output* ficaram abaixo do previsto, sem apresentar um perfil característico de enriquecimento de fagos. Além disso, a reatividade de todos os *inputs* e *outputs* com a molécula-alvo, avaliada em imunensaio, foi consideravelmente baixa (λ_{450} inferior a 0,2) e não distinguível da reatividade dos mesmos com BSA (controle negativo) (dados não apresentados). Esse fato reforça a possibilidade de a seleção ter sido ineficiente.

O sucesso de um processo de seleção de moléculas através de *phage display* depende de uma adequada definição dos parâmetros experimentais. No ensaio de seleção aqui realizado é possível que as condições de lavagens estabelecidas (10, 15, 20 e 25 vezes no 4º, respectivamente do 1º ao 4º ciclo)

tenham sido excessivamente estridentes, a ponto de eliminar fagos com forte interação pelo alvo. Além disso, a quantidade de proteína empregada na sensibilização (20, 10, 5 e 2,5 μg por imunotubo, respectivamente do primeiro ao quarto *panning*) pode ter sido insuficiente para proporcionar a ligação de fagos expondo anticorpos scFv L ligantes.

GRÁFICO 09 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de anticorpos scFv L anti-IgM frente ao fragmento Fc5 μ humano.

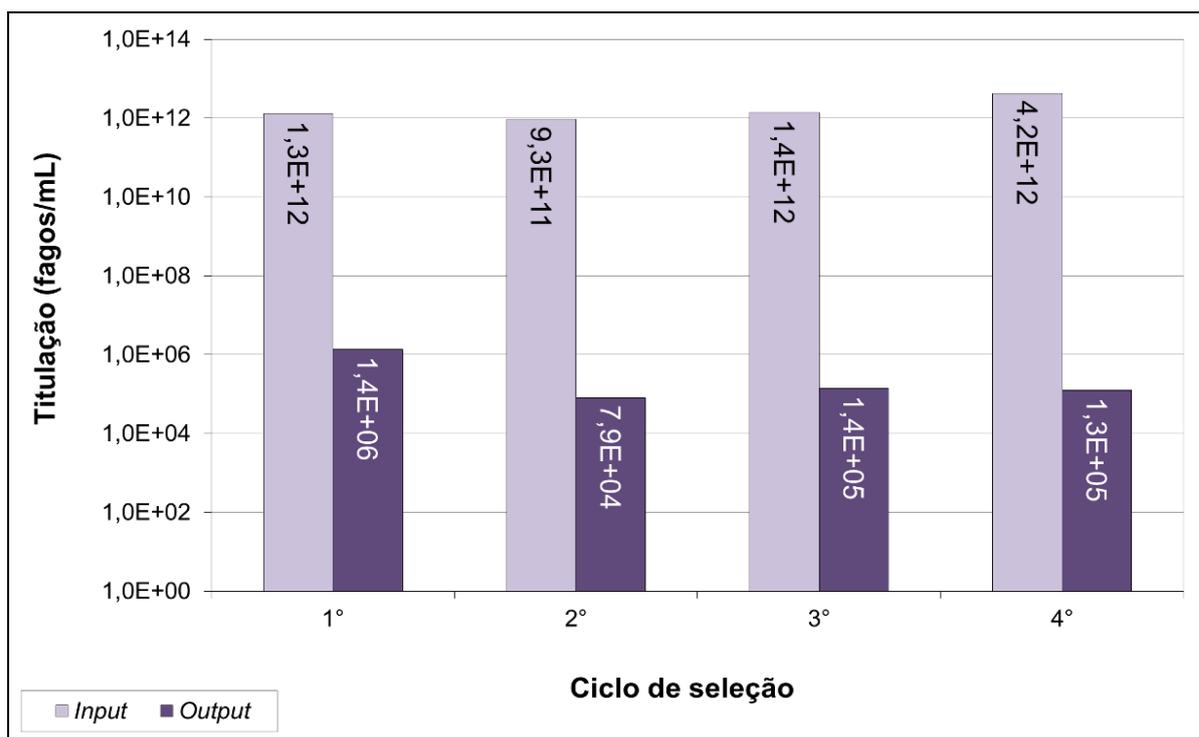


5.1.4 Repetição do processo de seleção

Assim, decidiu-se realizar um novo processo de seleção, estabelecendo duas modificações em relação à triagem inicial. A fim de aumentar as chances de ligação de fagos ao alvo, em cada ciclo os imunotubos foram sensibilizados com o dobro da quantidade de Fc5 μ IgM originalmente estabelecida (40, 20, 10 e 5 μg , respectivamente do primeiro ao quarto *panning*). E para aumentar a estringência da seleção e eliminar ligantes fracos, após o descarte da solução de fagos (*input*), o imunotubo passou a ser lavado 10 vezes no 1º ciclo, 15 vezes no 2º, 20 vezes no 3º e 25 vezes no 4º, sendo agitado em *vortex* por 10 a 15 segundos em cada lavagem.

Entretanto, o monitoramento desse segundo processo novamente não apresentou um perfil que indicasse seleção eficiente (Gráfico 10). Além disso, os *inputs* e *outputs* não apresentaram reatividade com a molécula-alvo em ELISA (dados não apresentados).

GRÁFICO 10 – Monitoramento do segundo processo de seleção da biblioteca de anticorpos scFv L anti-IgM frente ao fragmento Fc5 μ humano.



5.1.5 Análise do processo de seleção

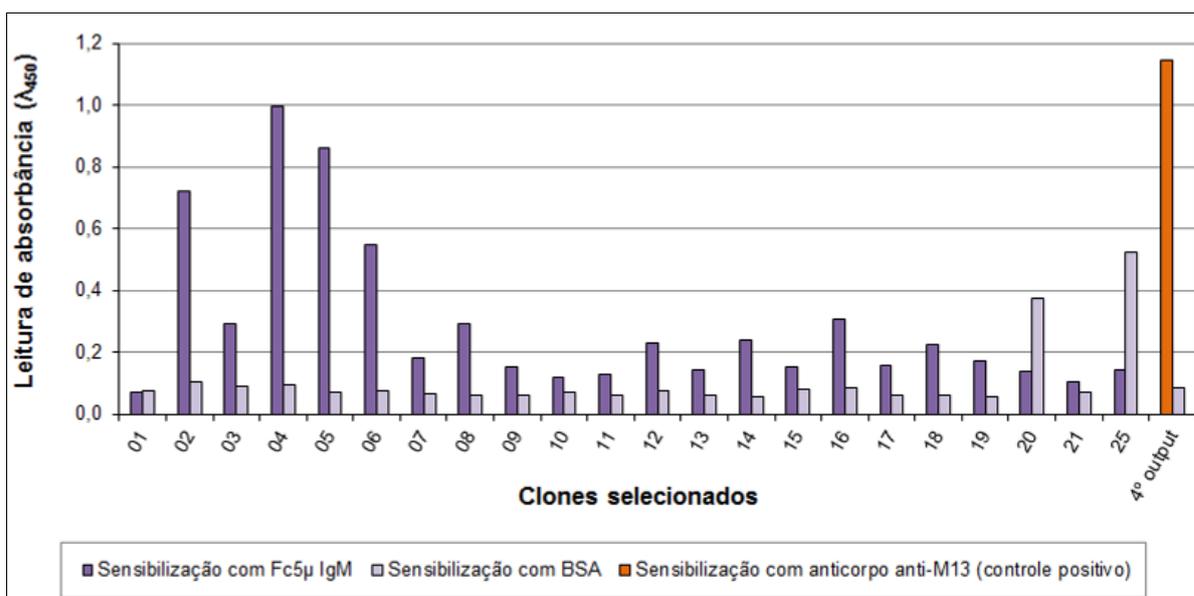
Embora o monitoramento dos ciclos de triagem apresentasse resultados pouco satisfatórios, optou-se por dar continuidade à linha de obtenção de anticorpos recombinantes scFv L anti-IgM humana com o isolamento de clones do 4º *output* do segundo processo de seleção realizado. Essa decisão foi baseada na ideia de que ainda seria possível isolar clones com elevada afinidade pela molécula-alvo mesmo em uma seleção que não apresenta o perfil de enriquecimento de fagos nem a reatividade esperada.

A princípio foram isolados 25 clones, mas três deles (IgM22, IgM23 e IgM24) não foram capazes de crescer em meio seletivo. As demais amostras tiveram sua

afinidade com Fc5 μ analisada em imunensaio. Para comparação, nesse experimento foi utilizado um controle positivo no qual um poço da placa de imunensaio foi sensibilizado com anticorpo anti-M13, e o *output* do quarto *panning* foi adicionado como solução de fagos.

Esse imunensaio (Gráfico 11) indicou que os clones IgM02, IgM04, IgM05 e IgM06 apresentavam significativa afinidade por Fc5 μ IgM quando comparados com o controle positivo e com a reatividade dos mesmos frente ao BSA. Os clones 20 e 25 apresentaram maior reatividade com o BSA do que com o fragmento de anticorpo: como aquela molécula foi utilizada no bloqueio do imuntubo durante a triagem, não é surpreendente que tenha ocorrido seleção de anticorpos frente a ela.

GRÁFICO 11 – Reatividade dos clones isolados da biblioteca de anticorpos anti-IgM humana selecionada frente ao fragmento Fc5 μ .



O DNA desses 22 clones obtidos foi então extraído e enviado para sequenciamento (MACROGEN), juntamente com o *primer* MKFLOMP, que anela na região *ompA* do vetor pCOMB3X e permite a amplificação de cerca de 900 a 950 bases à jusante desse local, compreendendo todo o fragmento scFv inserido. As sequências de nove clones não apresentaram o tamanho esperado (ANEXO E), devido provavelmente à degradação ou contaminação da amostra, que pode ter ocorrido durante o isolamento, extração de DNA ou envio para sequenciamento.

As outras 13 amostras isoladas e sequenciadas foram submetidas a um processo de alinhamento com o banco de dados VBASE2, composto por porções

variáveis de imunoglobulinas humanas e murinas (RETTTER *et al.*, 2005) (<http://www.vbase2.org/>). Nesse processo foi empregado o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) desenvolvido por ALTSCHUL e colaboradores (1997) e disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

A ferramenta BLAST é capaz de evidenciar correspondências (*matches*) de nucleotídeos ou aminoácidos entre uma dada sequência consultada (*query*) e sequências constituintes de um banco de dados. A fim de estimar a significância desses alinhamentos, empregou-se o parâmetro estatístico denominado *expected value* (*e-value*) (KARLIN & ALTSCHUL, 1990): quanto menor esse valor para um determinado alinhamento, menor a probabilidade de que ele tenha ocorrido por acaso. Na análise aqui realizada foi empregada especificamente a ferramenta BLASTn, para alinhamento de sequências nucleotídicas

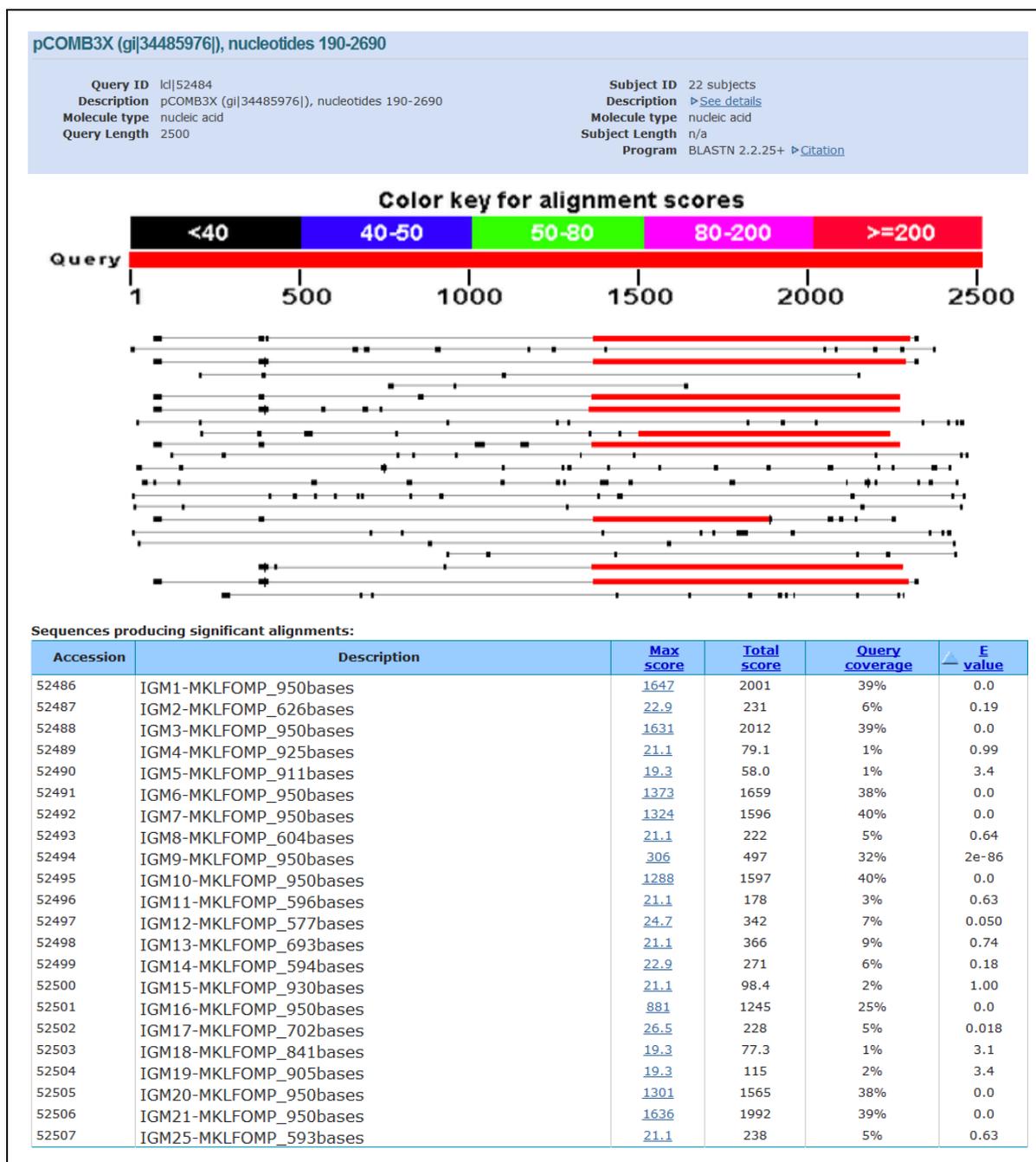
Os treze clones submetidos a essa análise não foram capazes de alinhar com nenhuma das sequências constituintes do banco VBASE2. Nove sequências, no entanto, alinharam quase que inteiramente com a porção do fagomídeo pCOMB3X correspondente ao *stuffer* e à região codificante do gene pIII (Figura 14). Como o *stuffer* deveria ter sido removido do vetor durante a digestão com a enzima Sfil, esse resultado sugere que o fragmento scFv L pode não ter sido corretamente inserido no vetor pCOMB3X. No entanto, tal observação entra em conflito com os resultados do imunoensaio realizado (Gráfico 11), em que os clones IgM02, IgM04, IgM05 e IgM06 interagiram fortemente com a molécula-alvo.

Para confirmar esses resultados, os quatro clones acima mencionados, juntamente com IgM03 e IgM25, foram reamplificados e sua reatividade frente a Fc5 μ IgM foi novamente avaliada (Gráfico 12). Em seguida, o DNA destes clones foi novamente extraído e sequenciado, redobrando-se os cuidados para evitar contaminação e degradação. Além disso, como havia a desconfiança de que o *primer* MKFLOMP empregado no sequenciamento pudesse ter alinhado com uma região do vetor diferente da esperada (ANEXO D), os clones também foram sequenciados em uma reação que empregava o iniciador PC3X, que alinha 38 nucleotídeos à montante da região de anelamento de MKFLOMP.

Os clones reamplificados apresentaram reatividade equivalente àquela observada no primeiro imunoensaio realizado (Gráfico 11) e o emprego do *primer* PC3X indicou que o MKFLOMP estava realmente anelando na região esperada. No entanto, apenas cinco das doze amostras enviadas apresentaram o tamanho

esperado de 900 a 950 pb (ANEXO E), indicando que novamente houve degradação ou contaminação. E conforme observado anteriormente, nenhuma das amostras foi capaz de alinhar com as sequências constituintes do banco de dados VBASE2, embora duas tenham alinhado com a região *stuffer* e pIII do vetor (Figura 15).

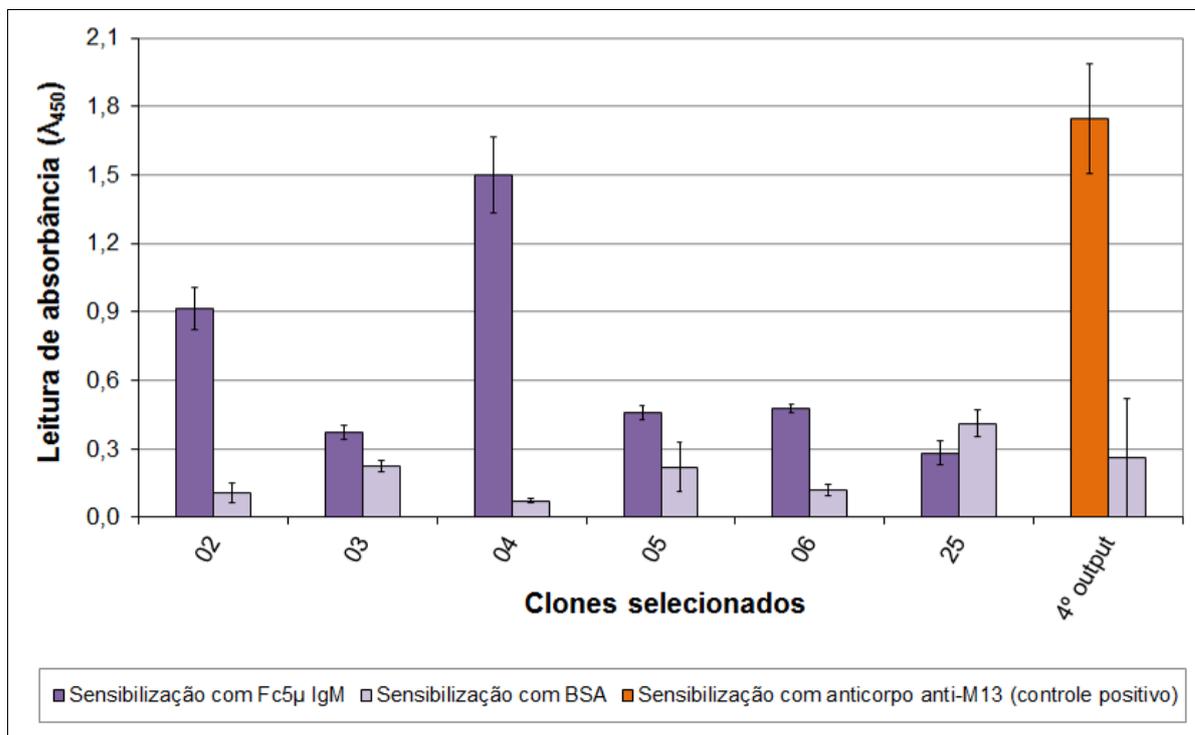
FIGURA 14 – Alinhamento dos clones selecionados frente ao fragmento Fc5 μ com a região *stuffer* e pIII do fagomídeo pCOMB3X.



NOTA: a região de 2500 nucleotídeos que contém o *stuffer* e o gene codificador da proteína pIII abrange os nucleotídeos de 275 a 2775 do vetor pCOMB3X (ANEXO D);

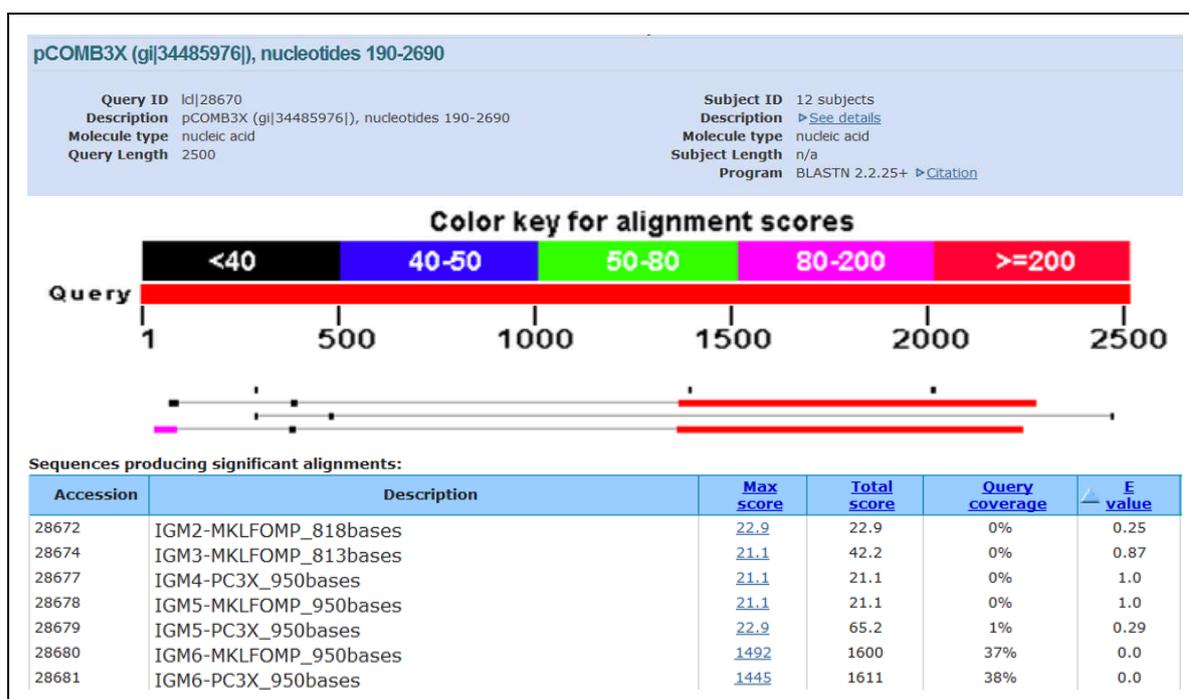
LEGENDA: a designação MKFLOMP se refere ao *primer* empregado no sequenciamento (Tabela 06).

GRÁFICO 12 – Reatividade dos clones 02, 03, 04, 05, 06 e 25, isolados da biblioteca de anticorpos anti-IgM humana selecionada frente ao fragmento Fc5 μ .



NOTA: experimento em triplicata – barras de erro correspondem ao desvio padrão das réplicas.

FIGURA 15 – Alinhamento dos clones 02, 03, 04, 05, 06 e 25, selecionados frente ao fragmento Fc5 μ , com a região *stuffer* e pIII do vetor pCOMB3X.



NOTA: a região de 2500 nucleotídeos que contém o *stuffer* e o gene codificador da proteína pIII abrange os nucleotídeos de 275 a 2775 do vetor pCOMB3X (ANEXO D);

LEGENDA: as designações MKFLOMP e PC3X se referem aos *primers* empregados (Tabela 06).

É possível que, durante as etapas de digestão e ligação para construção da biblioteca, vetores contendo o inserto tenham sido contaminados com plasmídeos nos quais o *stuffer* não tenha sido removido, o que pode ter sido ocasionado por problemas de reatividade ou especificidade das enzimas empregadas. Assim, em cada amostra de fagos isolada haveria duas populações distintas de clones: uma contendo o fragmento scFv e responsável pela reatividade da amostra com Fc5 μ IgM no imunoenensaio, e outra contendo a região *stuffer*, provavelmente presente em maior quantidade, que pode ter interferido nos resultados. No entanto, uma das populações deveria ter sido individualizada durante a etapa de isolamento, o que não foi verificado conforme dados sequenciamento e imunoenensaio.

Outra possibilidade é a de que o fago *helper* VCSM13 empregado estivesse sendo encapsulado na mesma proporção que o vetor contendo o inserto, e que os *primers* empregados estivessem sequenciando segmentos do genoma desse vírus. Entretanto, não foram encontrados na literatura acadêmica registros que fundamentem essa conjectura.

Como considerações finais a esta linha de trabalho, embora tenham sido obtidos fagos expondo anticorpos scFv L com forte afinidade por Fc5 μ IgM, não foi possível isolá-los de modo eficiente, o que impossibilitou a caracterização dos clones e comprometeu a continuidade do processo. Verificou-se, portanto, a necessidade de se analisar de forma mais aprofundada os resultados obtidos e de se investigar estratégias que permitam isolar de forma adequada os fagos selecionados.

5.2 SELEÇÃO DE MIMOTOPOS DE *Treponema pallidum* E HTLV

5.2.1 Seleção das bibliotecas de peptídeos

Nos Gráficos 13 a 19 são apresentados os resultados referentes ao monitoramento dos *pannings* de cada uma das três bibliotecas de peptídeos selecionadas frente aos anticorpos anti-*T. pallidum* e anti-HTLV e à estreptavidina. Os três processos de seleção da biblioteca Ph.D.-7 apresentaram o perfil característico de uma seleção bem sucedida (Gráficos 13 a 15) (NEB, 2009): observa-se o aumento da titulação de *output*, de 10⁴ a 10⁵ fagos/mL no 1^o *output* para valores da maiores que 10⁸ fagos/mL no terceiro ciclo.

GRÁFICO 13 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-7 frente ao anticorpo anti-HTLV.

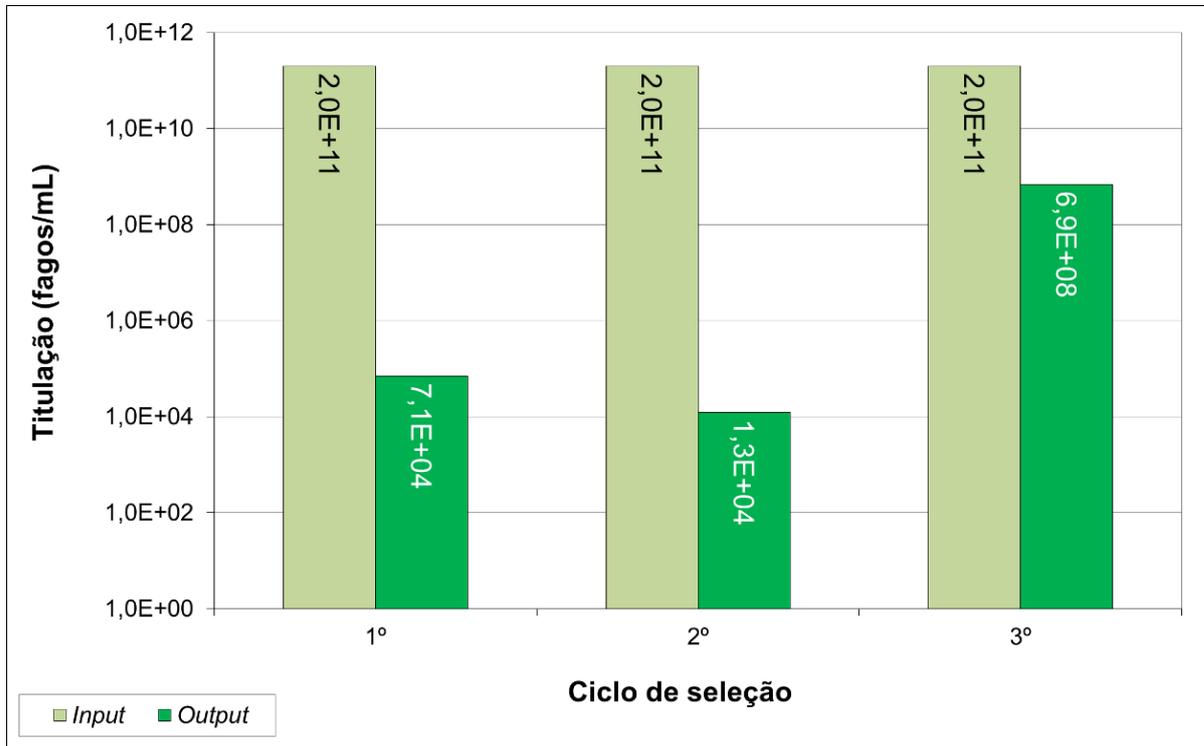


GRÁFICO 14 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-7 frente ao anticorpo anti-*T. pallidum*.

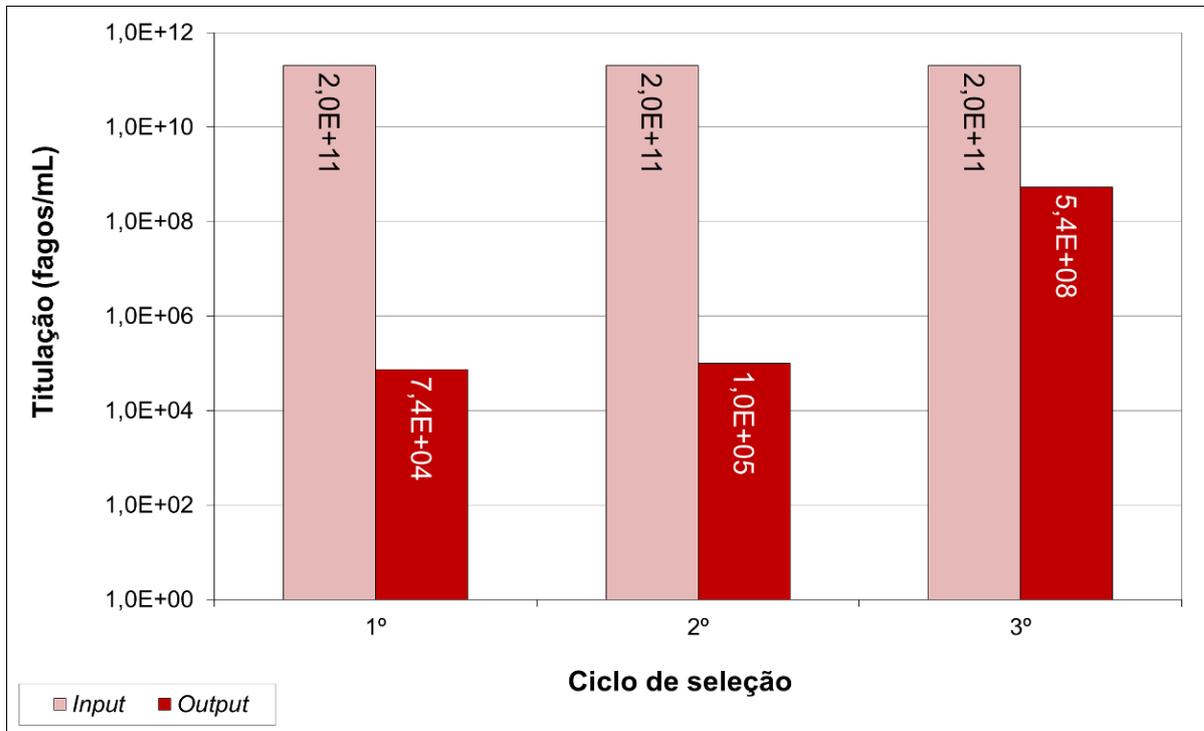
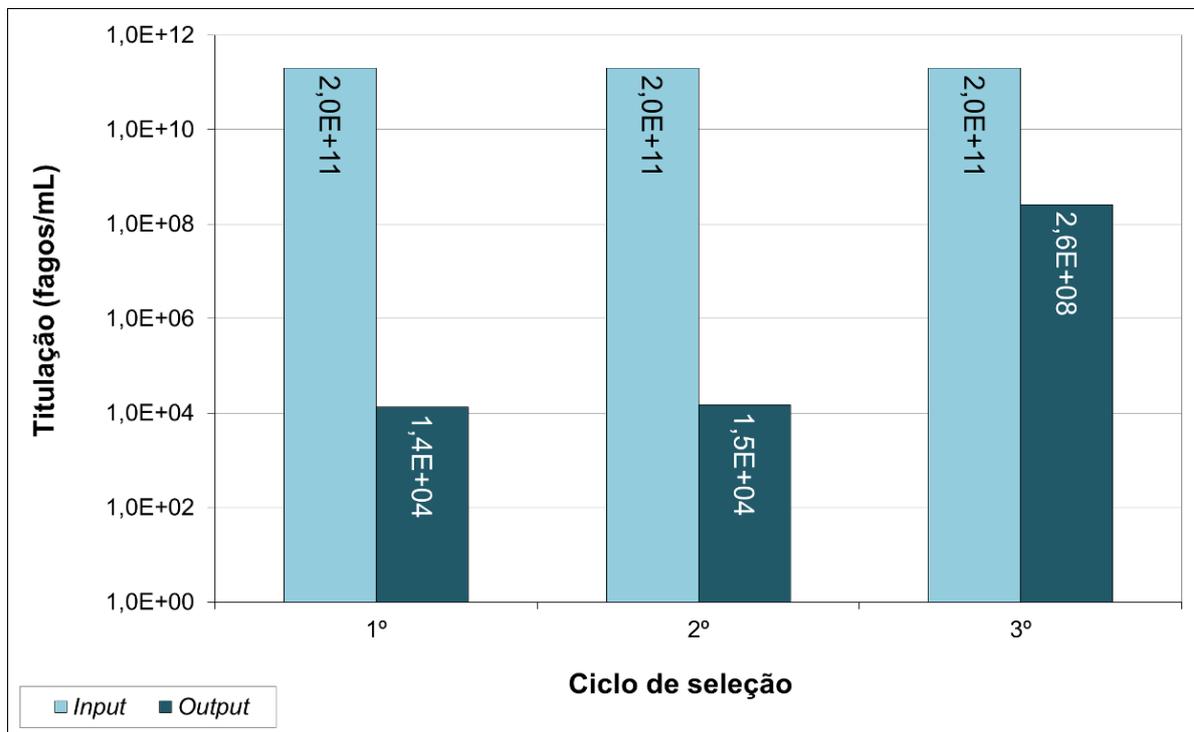


GRÁFICO 15 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-7; processo de referência realizado frente à estreptavidina.



Na triagem frente ao anticorpo anti-HTLV (Gráfico 13), o decréscimo do segundo *output* em relação ao primeiro é um comportamento já descrito na literatura (BARBAS *et al.*, 2001) e está possivelmente associado a um aumento abrupto da estringência do processo. Como o *output* se eleva no terceiro *panning*, seria possível que no segundo ciclo fagos expondo peptídeos com forte afinidade pelo alvo tivessem sido selecionados mesmo após o aumento descompensado de estringência, de modo que a eficiência da triagem não fosse prejudicada.

A seleção da biblioteca Ph.D.-12 frente aos dois anticorpos (Gráficos 16 e 17), apresentaram decréscimo de *output* no terceiro ciclo em relação ao segundo. Apesar de esta biblioteca expor peptídeos com cinco posições randômicas a mais que as outras duas, as três bibliotecas Ph.D. possuem a mesma diversidade (2×10^9 peptídeos distintos). O emprego de dodecapeptídeos se mostra vantajoso quando são necessários espaçamentos entre os aminoácidos que interagem com o alvo, e quando o mesmo requer ligantes estruturais, pois o tamanho desses elementos permite a adoção de conformações tridimensionais. No entanto, esse comprimento pode também acarretar a seleção de sequências com múltiplos pontos de ligação fraca com o alvo, em detrimento de pontos com forte interação (NEB, 2009).

GRÁFICO 16 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-12 frente ao anticorpo anti-HTLV.

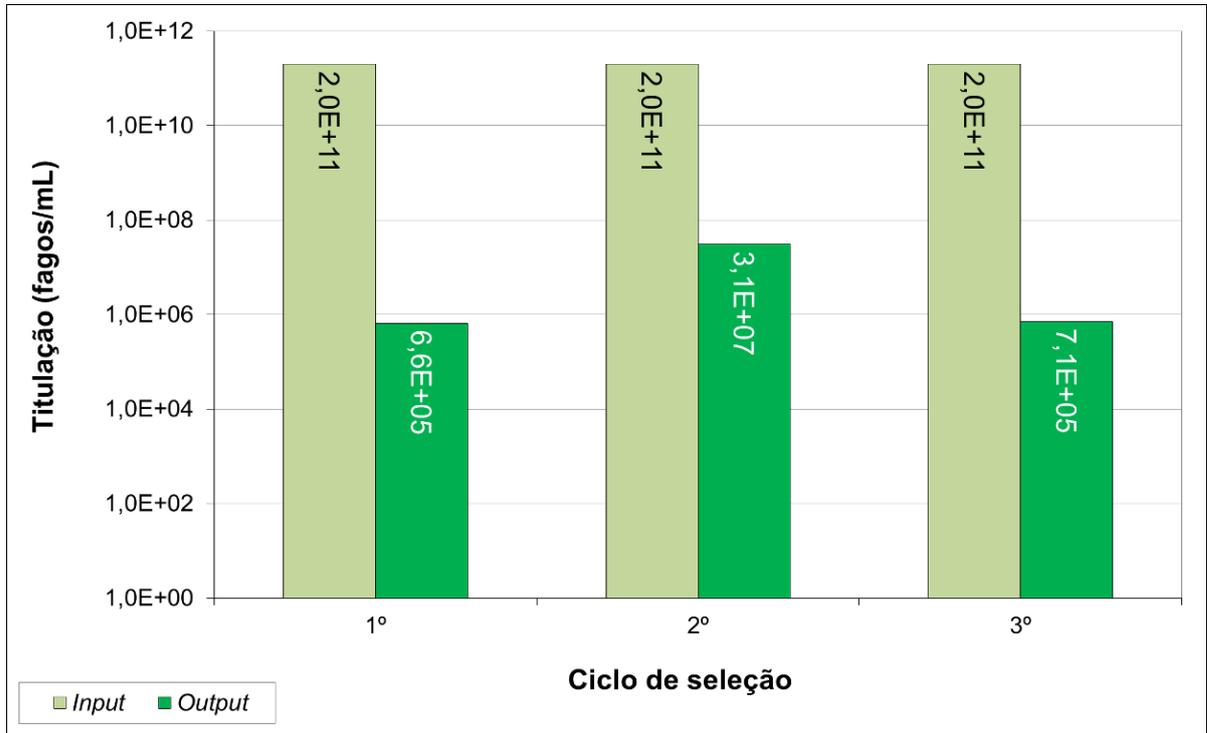
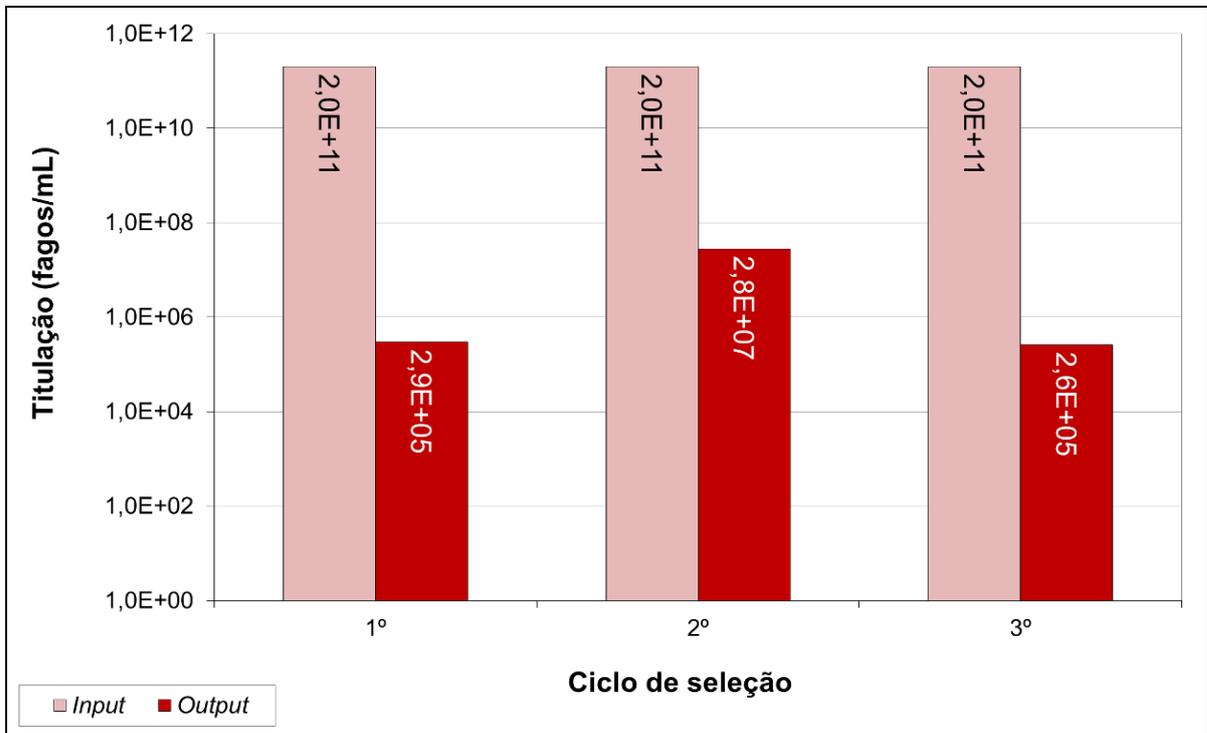


GRÁFICO 17 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-12 frente ao anticorpo anti-*T. pallidum*.



No que se refere aos *pannings* aos quais a biblioteca Ph.D.-C7C foi submetida (Gráficos 18 e 19), os valores de *output* do terceiro ciclo foram semelhantes aos do segundo. O emprego dessa biblioteca é particularmente útil quando os alvos de interesse requerem ligantes conformacionais, como é normalmente o caso de anticorpos. Em alguns casos, no entanto, a imposição de uma conformação impede que o peptídeo adote outra estrutura que poderia interagir fortemente com o alvo (MCCONNELL *et al.*, 1994).

Em resumo, os processos aos quais as bibliotecas Ph.D.-12 e Ph.D.-C7C foram submetidas não apresentaram um perfil característico que indicasse enriquecimento de fagos, fato que a princípio indicaria uma seleção pouco eficiente (BARBAS *et al.*, 2001). Mesmo assim, optou-se por dar continuidade à linha de obtenção de mimotopos de *T. pallidum* e HTLV com o isolamento de clones dos sete processos de seleção realizados, partindo-se da premissa de que ainda seria possível isolar fagos expondo moléculas com elevada afinidade pelo alvo mesmo em triagens que não apresentam o perfil esperado (NEB, 2009).

GRÁFICO 18 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C frente ao anticorpo anti-HTLV.

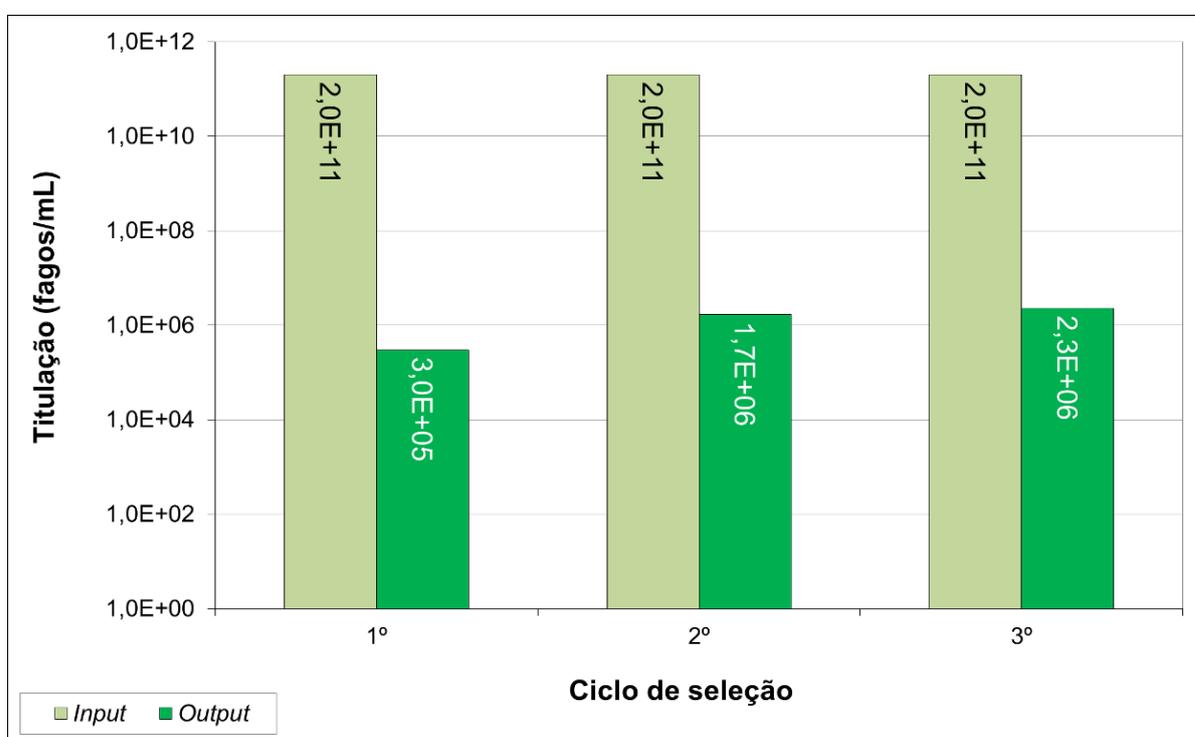
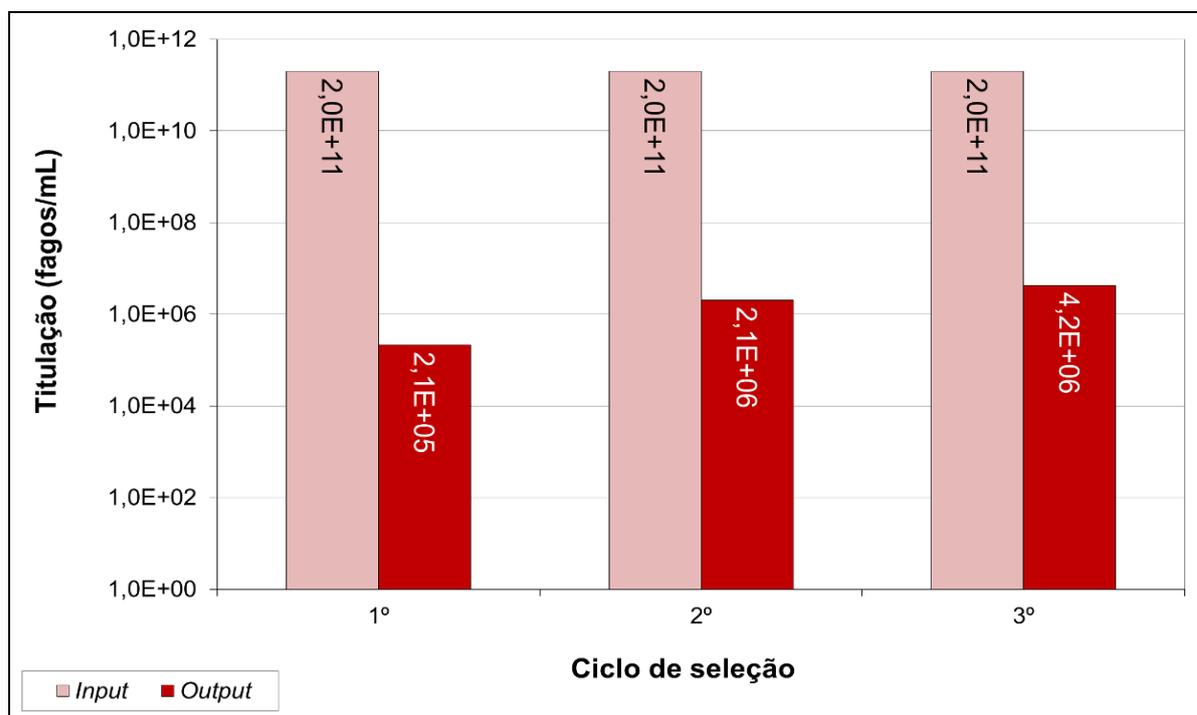


GRÁFICO 19 – Monitoramento do processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C frente ao anticorpo anti-*T. pallidum*.



5.2.2 Isolamento e análise dos clones

Em seguida foram isolados aproximadamente 24 clones do terceiro *output* de cada um dos processos de seleção realizados frente aos dois anticorpos, e 10 clones no caso da triagem da biblioteca Ph.D.-7 frente à estreptavidina. O peptídeo exposto em cada clone isolado foi então determinado por sequenciamento (MACROGEN), e esse resultado é apresentado nas Tabelas 07 a 09.

Alguns clones idênticos foram obtidos de triagens conduzidas frente a alvos distintos. As sequências TPSASIP, VMQATHD, WHTNYEP e YLTSSAT (originadas da biblioteca Ph.D.-7) e LPFVEWSGISYF (biblioteca Ph.D.-12), por exemplo, foram selecionadas frente aos dois anticorpos. Tais peptídeos foram obtidos possivelmente por interagirem com porções constantes das imunoglobulinas, e não com a região variável responsável pela especificidade das mesmas.

Além destes, o peptídeo FHENWPS foi obtido da biblioteca Ph.D.-7 selecionada frente ao anticorpo anti-HTLV e à estreptavidina, e o clone LPPNPTK foi selecionado a partir da mesma biblioteca frente aos três alvos. O primeiro peptídeo é um conhecido ligante de plásticos, como o poliestireno constituinte dos imunotubos

empregados (VODNIK *et al.*, 2011). Uma sequência semelhante, FHENWPT, foi obtida na triagem realizada frente à estreptavidina. Já o segundo peptídeo é quase idêntico à sequência LPPNPTN, caracterizado como ligante de BSA, bem como AEPVAML, obtido na triagem frente à estreptavidina (DESJOBERT *et al.*, 2004).

É possível que a seleção dessas sequências fosse evitada caso os fagos tivessem sido recuperados por meio de um processo de eluição competitiva, que aumenta a probabilidade de obtenção somente de fagos expondo sequências com afinidade pelas CDRs do anticorpo. Entretanto, os antígenos correspondentes aos anticorpos empregados não foram encontrados disponíveis comercialmente, o que impossibilitou a adoção dessa estratégia.

TABELA 07 – Peptídeos apresentados pelos clones isolados das bibliotecas Ph.D. selecionadas frente ao anticorpo anti-HTLV.

Biblioteca Ph.D.-7		Biblioteca Ph.D.-12		Biblioteca Ph.D.-C7C	
Clone	Peptídeo	Clone	Peptídeo	Clone	Peptídeo
1	SVDTFPGSGGG	25	SDLVQDWKVVQATGGG	49	SACFSPVPWRCGGG
4		26	SATWSHHLSFAGLGGG	50	
16		27	SDEIVLHWYQMSAGGG	53	
22		28	SDIDTRHRDHTKQGGG	55	
2	SVMQATHDGGG	29	SNMSFDRYLDALWGGG	61	SACFSPVPWRCGGG
6		30	SEHMALTYPFPPGGG	64	
7		31	SGATRNTVQDANWGGG	65	
8		32	SVSTPPEHYHTDLGGG	67	
10		33	SSHPSHLSTYPASGGG	68	
21		34	SQALSIRTSLAPSGGG	51	
3	SLVFHPPRGGG	35	SSGYWNGEATWTFGGG	52	SACSVSGLHVCGGG
5	SLPPNPTKGGG	36	SDANVVKTERKDHGGG	54	SACWLRQFHNCGGG
14	SVPWYQLAGGG	37	SLPFVEWSGISYFGGG	56	SACSSSPPTPCGGG
9		38	SLMPTRAWYSYPAGGG	57	SACDSAYSPSCGGG
11	SYLTSSATGGG	39	STIYDQTYPRNDSGGG	58	SACPFSISPSCGGG
12	SWHTNYEPGGG	40	SDRMLLPFNLLALGGG	59	SACVHPRPDLCCGGG
13	STPSASIPGGG	41	SFSAPSYWTNDTPGGG	60	SACSSYLFPFCGGG
15	SFHENWPSGGG	42	SYNHQSAAYFTEGGG	62	SACYLPFAHSCGGG
17	SGMPAPHEGGG	43	STQNSQQHPDWTGGG	63	SACNLSSSWICGGG
18	SRPPSGYQGGG	44	SYPFSLEAWSLLAGGG	66	SACLDPAAFFCCGGG
19		45	SSMFQTISSNSYLAGGG	69	SACFAASRPFCCGGG
20	SYVPLPSPGGG	46	SIPWTQHMAMSPMGGG	70	SACLPSHWLACGGG
23	STPTLSNPPGGG	47	SNLLIPENVPLRHGGG	71	não determinado
24	SLLAHSTWGGG	48	SLATRSITTASINGGG		

NOTA: As regiões flangeantes dos peptídeos selecionados são representadas em cinza claro.

TABELA 08 – Sequências peptídicas apresentadas pelos clones isolados das bibliotecas Ph.D. selecionadas frente ao anticorpo anti-*T. pallidum*.

Biblioteca Ph.D.-7		Biblioteca Ph.D.-12		Biblioteca Ph.D.-C7C	
Clone	Peptídeo	Clone	Peptídeo	Clone	Peptídeo
01		25	STAMNLGPALFRTGGG	01/50	
10	SLPPNPTKGGG	26	SLRLEVTLSPSPGGG	02	
15		27	SGTSFALLSPVRPGGG	03	
02		28	SNVWFPPPLMFWQGGG	04	
05		42		05	
06		29	STDGIPVGKQKPPGGG	07	
07		30	SHHNFRLYFQAYGGG	08	
09		31	SFATTNPGYASYAGGG	11	SACLYWPGHSCGGG
04	STPSASIPGGG	32	não determinado	12	
16		33	SLPFVEWSGISYFGGG	14	
19		34	SDNTPEFEYTTDNGGG	15	
20		35	não determinado	16	
21		36	não determinado	18	
03		37	SNYLPLESSLQYGGG	21	
12		38	SSDQLLLLSSANWGGG	24	
17	SWHTNYEPGGG	39	SSTPINPTPTAQGGG	06/51	
23		40	SVHIQSTLPSWPYGGG	09	
04	SDTPPRSEGGG	41	SKIGLWPGPSGLVGGG	10	
08	SITPENSTGGG	43		17	SACPLFFGHDCGGG
11	SYLTSSATGGG	44	SYDSAKSRPPTSQGGG	18	
13	SFHEQLYGGG	45	SSYSWGVYLSILPGGG	19	
18		46	SHSAVPLALPSVYGGG	22	
24	SVMQATHDGGG	47	SSLYSWWTVSPMYGGG	23	
22	SNPLLPLHGGG	48	SQLTGADEGRAKGGG	13/52	SACLPLFHGLCGGG
		49	SWDEHRYSSAKINGGG		

NOTA: As regiões flanqueantes dos peptídeos selecionados são representadas em cinza claro.

Em relação à seleção frente ao anticorpo anti-*T. pallidum*, verificou-se a prevalência dos peptídeos LYWPGHS e PLFFGH, presentes respectivamente em 15 e 8 dos 24 clones isolados da biblioteca Ph.D.-C7C. Na seleção frente ao anticorpo anti-HTLV, destacam-se nove clones que apresentaram a sequência FSPVPWR – originários da biblioteca Ph.D.-7 – e 4 clones expondo o peptídeo VDTFPGS, obtidos da biblioteca C7C.

Em princípio, o fato de tais sequências terem sido obtidas em grande número indicaria que elas possuem forte interação com o alvo. No entanto, havia também a possibilidade de elas possuírem baixa afinidade pelo mesmo e terem sido selecionadas devido à definição de parâmetros de seleção inadequados. O processo

de referência frente à estreptavidina pareceu reforçar essa segunda hipótese, visto que nenhum dos clones isolados e sequenciados (Tabela 09) apresentou o consenso HPQ esperado.

TABELA 09 – Sequências peptídicas dos clones selecionados frente à estreptavidina.

Clone	Peptídeo	Clone	Peptídeo
01	SFHENWPSGGG	06	SFHEFWPTGGG
02	SGPDSTPSGGG	07	SAEPVAMLGGG
03	SSPWALINGGG	08	SWPPNYNAGGG
04	SAEPVAMLGGG	09	SLPPNPTKGGG
05	não determinado	10	SWLSLTDAGGG

NOTA: As regiões flanqueantes dos peptídeos selecionados são representadas em cinza claro.

A fim de verificar se os peptídeos selecionados apresentavam padrões de conservação, eles foram submetidos a um processo de alinhamento múltiplo empregando a ferramenta Clustal, desenvolvida por LARKIN e colaboradores (2007) e disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Nesse alinhamento não foram consideradas sequências repetidas, bem como aquelas selecionadas frente a mais de um ligante, e foram empregados os parâmetros padrão do método.

O alinhamento realizado não foi capaz de evidenciar padrões bem definidos de conservação, exceto para os peptídeos selecionados a partir da biblioteca C7C frente ao anticorpo anti-*T. pallidum* (Figuras 16 e 17). Embora três sequências representem um espaço amostral muito reduzido para definir de forma adequada uma sequência consenso, vale destacar a manutenção do padrão *PLF--GH*. Vale notar também a presença de porções aromáticas nos aminoácidos fenilalanina e tirosina: tal fato justificaria o alinhamento da tirosina do clone 50 (LYWPGHS) com a fenilalanina dos clones 13 (LPLFHGL) e 51 (PLFFGHD).

A afinidade dos clones pelo anticorpo empregado na seleção também foi avaliada. Inicialmente foram conduzidos testes para definição das concentrações ótimas de anticorpos a serem utilizados na etapa de sensibilização (0,5 a 20 µg/mL), e de fagos a serem adicionados na etapa de ligação (10^6 , 10^8 e 10^{10} fagos/mL). Nesses testes foram empregados os clones 49 de HTLV, que apresenta a sequência FSPVPWR, e 50 de sífilis, expondo o peptídeo LYWPGHS. Tais clones foram utilizados por terem sido isolados em maior proporção, o que poderia indicar forte afinidade pelos respectivos alvos.

FIGURA 16 – Alinhamento dos peptídeos obtidos pela seleção das bibliotecas Ph.D.-7 (a), Ph.D.-12 (b) e Ph.D.-C7C (c) frente ao anticorpo anti-HTLV.

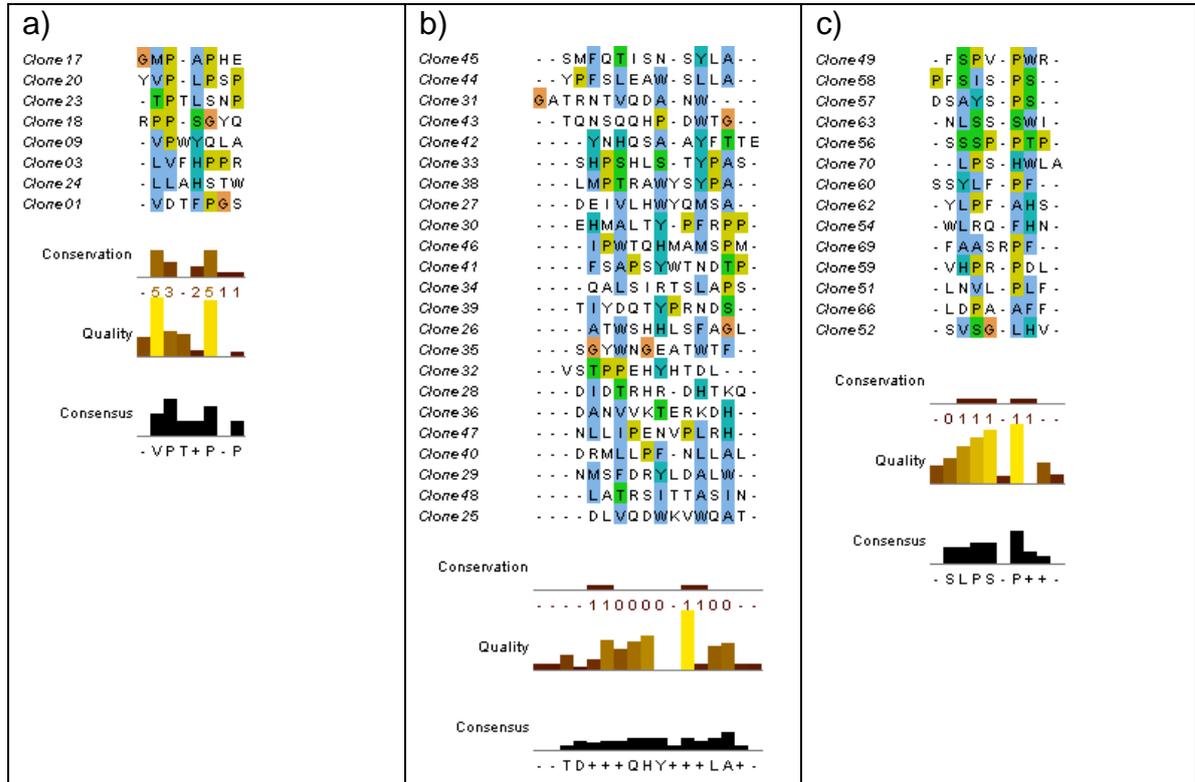
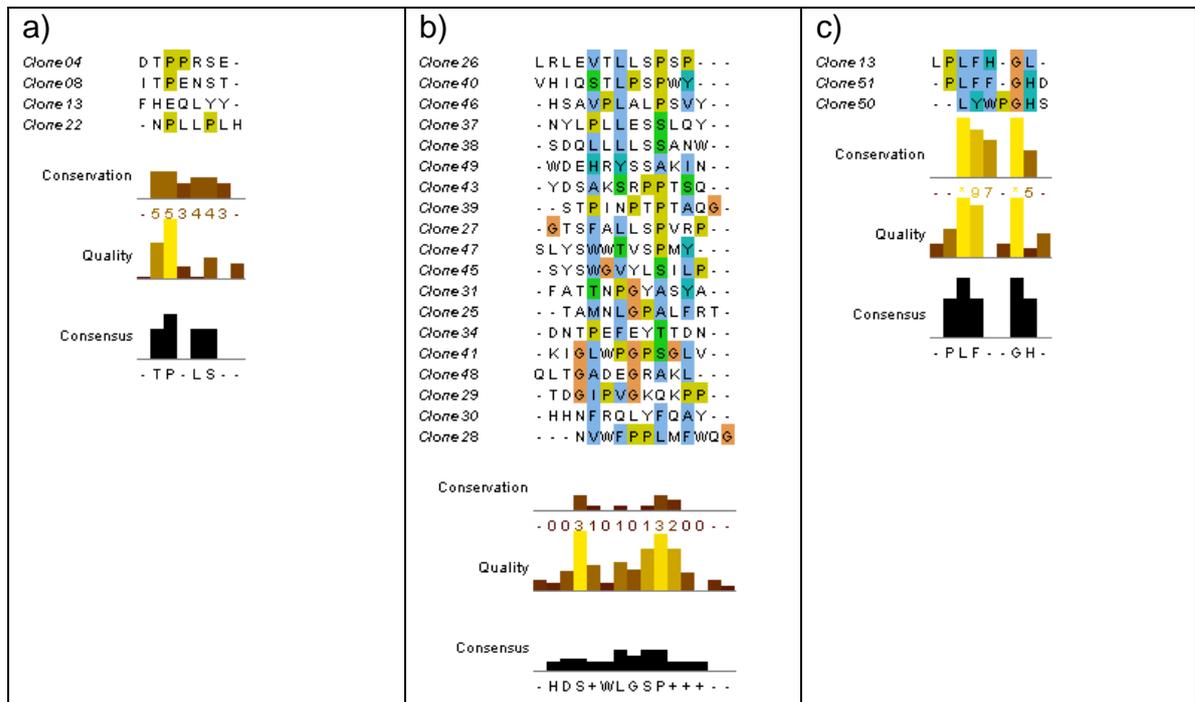


FIGURA 17 – Alinhamento dos peptídeos obtidos pela seleção das bibliotecas Ph.D.-7 (a), Ph.D.-12 (b) e Ph.D.-C7C (c) frente ao anticorpo anti-*T. pallidum*.



Em todas as condições avaliadas nos ensaios de definição dos parâmetros para o imunoenensaio (Gráficos 20 e 21) a reatividade dos clones empregados foi considerada fraca e não distinguível da resposta de um controle negativo, em que os clones foram adicionados a um poço não sensibilizado com a molécula-alvo (apenas bloqueado com BSA). Somente o clone 49 apresentou reatividade considerável com o alvo ($A_{450} = 0,598$), mas quando adicionado na concentração de 10^{10} fagos/mL, e para uma quantidade relativamente elevada de anticorpo (20 $\mu\text{g/mL}$), que tornaria inviável a realização das demais análises.

Os resultados desses imunoenensaio indicaram que, embora apresentem especificidade pelos anticorpos frente aos quais eles foram selecionados, os clones 49 e 50 possuem fraca capacidade de interação com os mesmos, ao contrário do que apontava a análise do sequenciamento. Em conjunto com os resultados observados na seleção frente à estreptavidina, esses dados sugeriram, portanto, que os parâmetros de processo podem não ter sido adequadamente estabelecidos de forma a possibilitar uma seleção eficiente.

GRÁFICO 20 – Otimização dos parâmetros de imunoenensaio dos clones selecionados frente ao anticorpo anti-HTLV, utilizado o clone 49 (FSPVPWR).

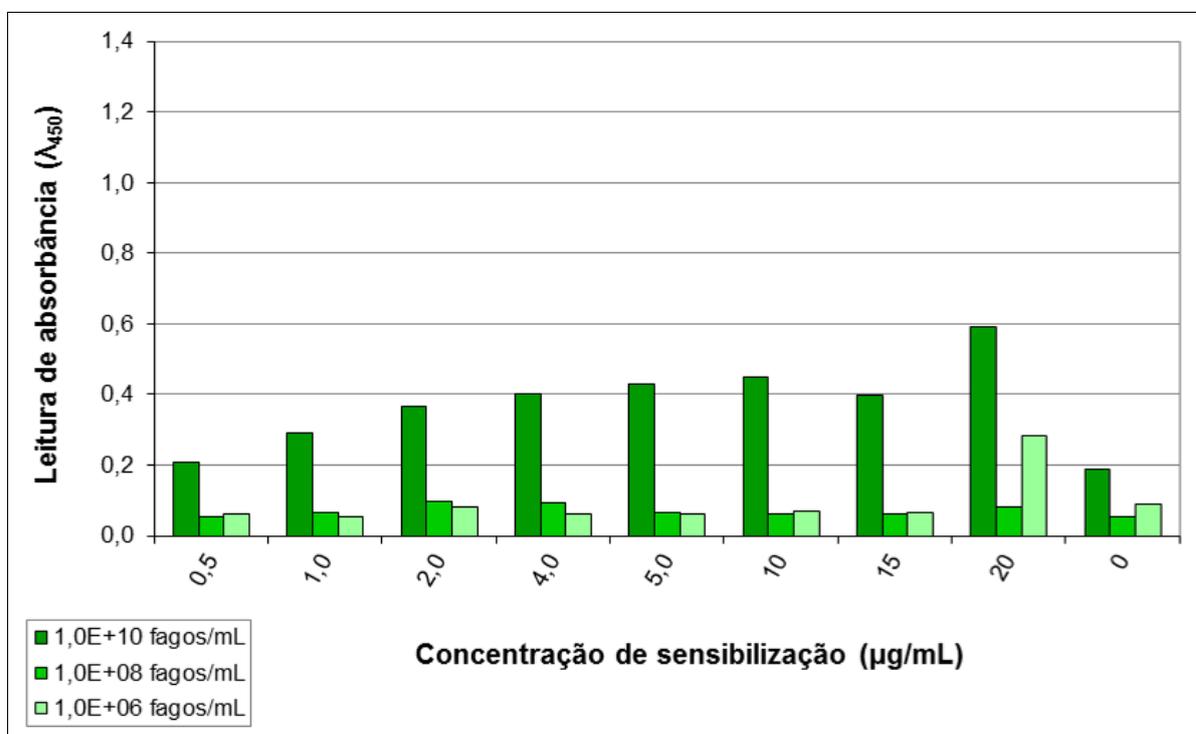
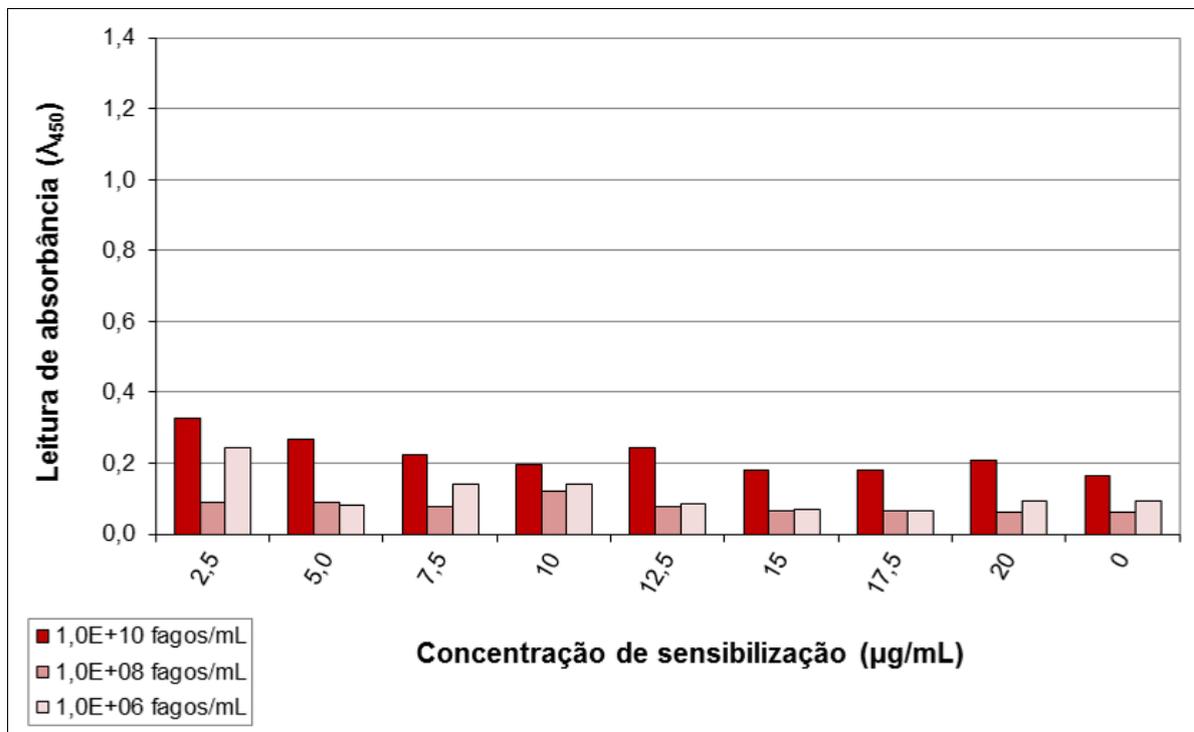


GRÁFICO 21 – Otimização dos parâmetros de imunoenensaio dos clones selecionados frente ao anticorpo anti-*T. pallidum*, utilizado o clone 50 (LYWPGHS).



5.2.3 Repetição do processo de seleção

Diante dos resultados obtidos, foi considerada a possibilidade de conduzir um quarto ciclo de seleção para os sete processos realizados. No entanto, a literatura científica indica que a realização de *pannings* adicionais possivelmente resultaria no enriquecimento de fagos já isolados (NEB, 2009), e haveria também risco de contaminação da biblioteca (RODI *et al.*, 1999). Além disso, conforme observado para a biblioteca de anticorpos, a eficiência do processo de seleção de uma biblioteca de peptídeos está associada a um adequado equilíbrio dos parâmetros experimentais estabelecidos, em particular a estringência da lavagem e a quantidade de proteína alvo empregada na sensibilização do iminotubo.

Assim, optou-se por conduzir um novo processo de triagem, empregando nas etapas de lavagem uma solução de TBS contendo *Tween* 20 na concentração de 0,5% (v/v) – cinco vezes mais concentrado em relação ao utilizado na seleção anterior – a fim de garantir a remoção eficiente de fagos expressando peptídeos com fraca interação pelo anticorpo. E para aumentar a probabilidade de interação dos

peptídeos com o alvo, os imunotubos foram sensibilizados com soluções de anticorpos nas concentrações de 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente do primeiro ao terceiro ciclo, o dobro da quantidade inicialmente definida.

Num primeiro momento somente a biblioteca Ph.D.-C7C foi submetida a esse novo processo, pois esta forneceu a menor quantidade de clones inespecíficos (isto é, peptídeos de mesma sequência selecionados frente a ligantes diferentes), além de apresentar um grande número de clones repetidos, fato que indica maior probabilidade de que a seleção tenha ocorrido de modo eficiente. Vale destacar que essas duas observações estão possivelmente relacionadas à conformação tridimensional dos peptídeos apresentados na biblioteca, o que corrobora as observações de DAVIES e colaboradores (1990) de que anticorpos geralmente interagem com epítopos de conformação não linear.

Quanto a esse segundo processo de seleção realizado frente ao anticorpo anti-HTLV (Gráfico 22), o valor do terceiro *output*, da ordem de 10^6 fagos / mL, foi semelhante ao do segundo *output* e abaixo do esperado. Já as seleções frente ao anticorpo anti-*T. pallidum* e à estreptavidina (Gráficos 23 e 24) apresentaram, conforme descrito anteriormente, o perfil esperado para uma triagem bem sucedida.

GRÁFICO 22 – Monitoramento do segundo processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C frente ao anticorpo anti-HTLV.

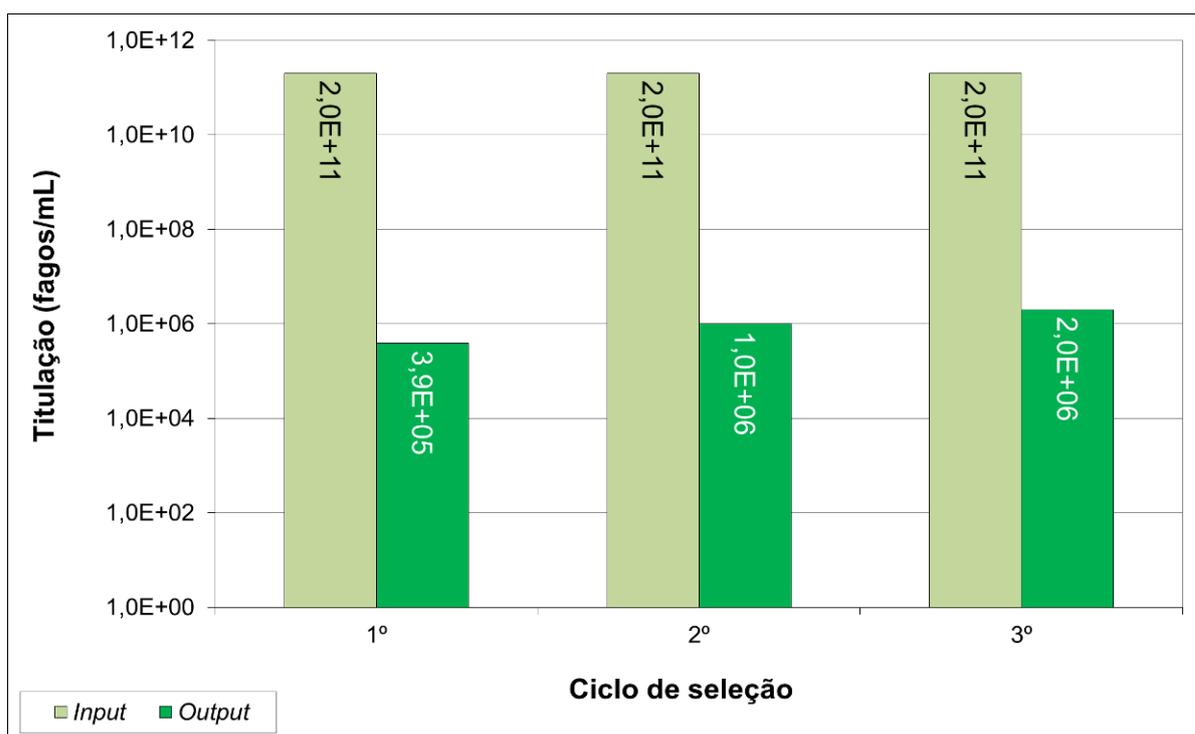


GRÁFICO 23 – Monitoramento do segundo processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C frente ao anticorpo anti-*T. pallidum*.

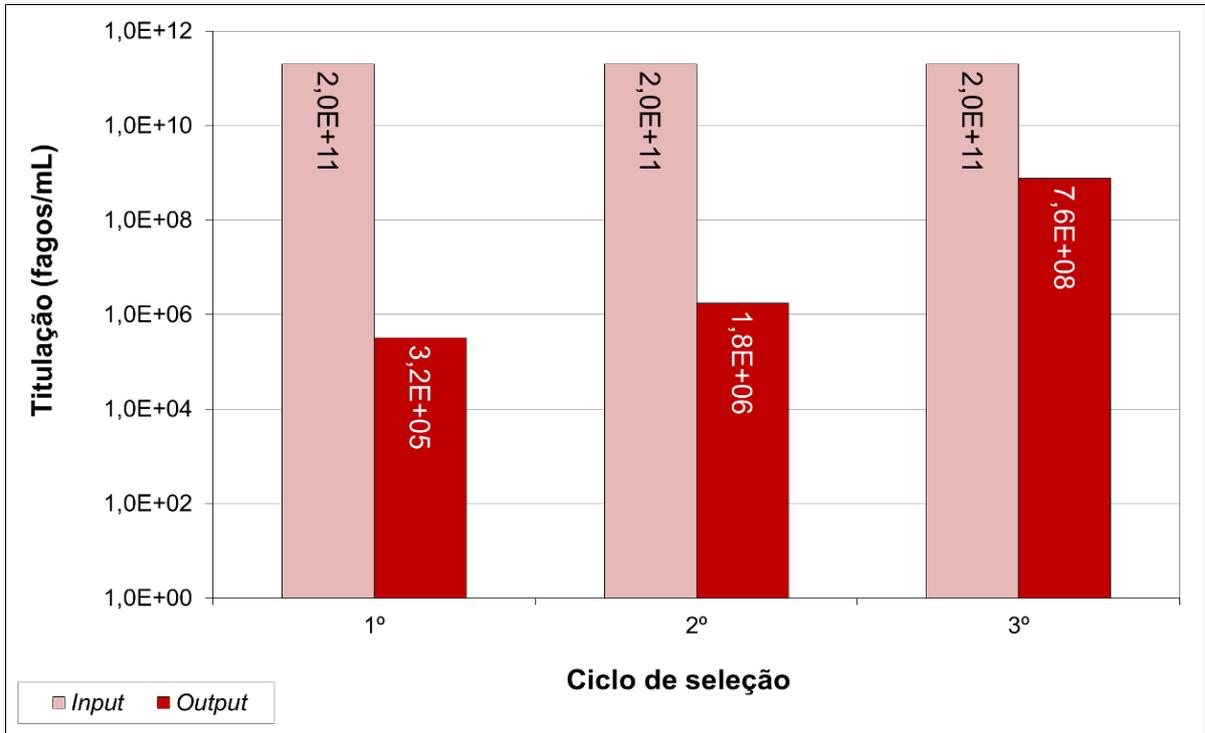
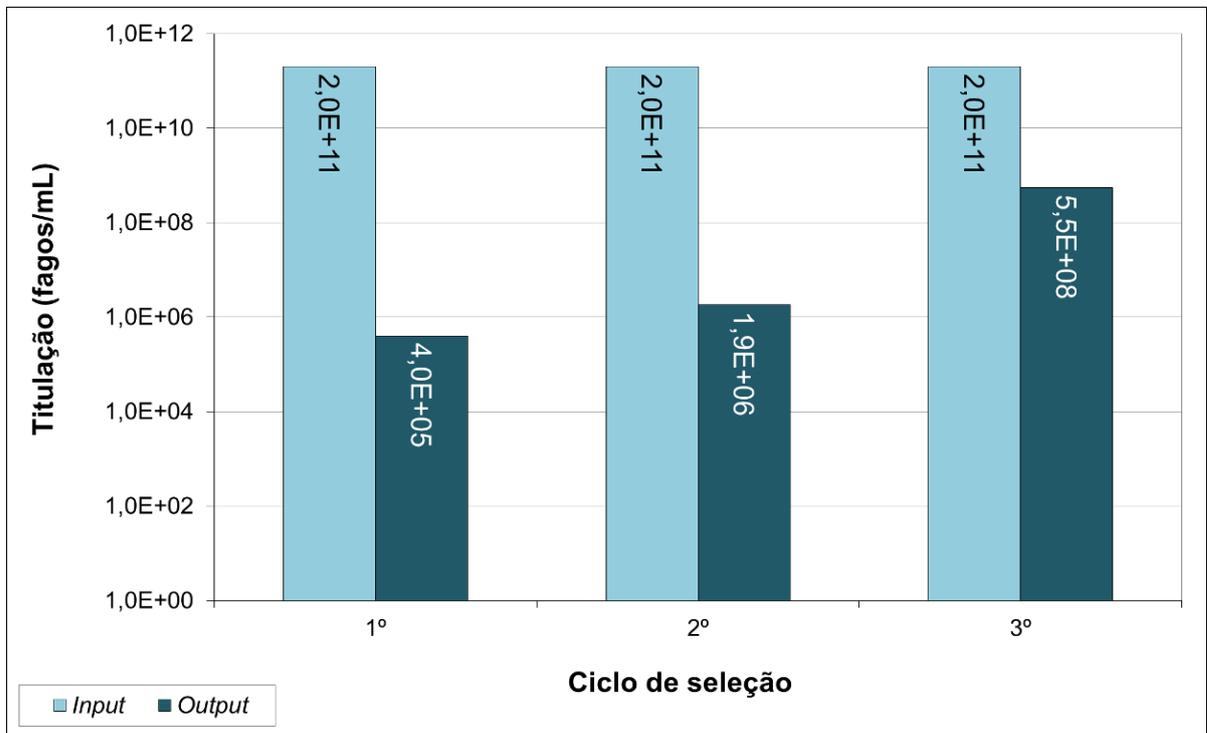


GRÁFICO 24 – Monitoramento do segundo processo de seleção da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C, realizado frente a estreptavidina.



Em seguida foi realizado o isolamento e sequenciamento de clones a partir do terceiro *output* dos processos de seleção conduzidos. Nove dos dez clones isolados da triagem frente à estreptavidina (Tabela 10) apresentaram a sequência consenso HPQ esperada, fato que fornece maior confiança de que a seleção tenha ocorrido de forma eficiente.

Dos clones selecionados frente ao anticorpo anti-HTLV, verificou-se a prevalência da sequência PWYHWPN. No entanto, tal peptídeo não desenvolveu reatividade em imunensaio (Gráfico 25), da mesma forma que os clones isolados anteriormente. O alinhamento das sequências (Figura 18) também não foi capaz de evidenciar a presença de posições conservadas.

TABELA 10 – Sequências peptídicas dos clones selecionados e isolados das bibliotecas Ph.D.-C7C frente aos diferentes ligantes empregados.

Anticorpo anti-HTLV		Anticorpo anti- <i>T. pallidum</i>		Estreptavidina	
Clone	Peptídeo	Clone	Peptídeo	Clone	Peptídeo
72		53	SACSPFFLTACGGG	11	
89	SACGLRMGDPCGGG	54		18	SACHPQFLSLCGGG
73	SACGRAPSELCGGG	55		22	
74	SACLLHPLLRCGGG	59		12	
75	SACPPRSWLLCGGG	60		13	
76	SACHSGTSAPCGGG	61		16	SACHPQFWSICGGG
77	SACTPFSVLGCGGG	63		17	
78		65	SACPLFFGHDCGGG	14	
80		68		15	SACGTYSHPQCGGG
82		69		19	
87	SACPWYHWPNCGGG	72		20	SACHPQFLPLCGGG
90		74		21	não determinado
92		75			
93		76			
79	SACSVPFDAFCGGG	56	SACPDEPSNWCAGGG		
81	SACSPGAGHACGGG	57	SACPLFFGRDCGGG		
83	SACITPLLGPCGGG	58	não determinado		
84	não determinado	62	SACPLFFGHHCAGGG		
85	SACGLRTHAVCGGG	64	SACHRPPPHDCAGGG		
86	SACPIGLLNVCAGGG	66	não determinado		
88	SACSFFTWSACGGG	67	SACFLAPSAQCGGG		
91	não determinado	70	SACTSPFFFCAGGG		
94	SACAPGRGTACGGG	71	SACLPLFAGLCAGGG		
95	não determinado	73	SACSPYLFSFCAGGG		

NOTA: As regiões flanqueantes dos peptídeos selecionados são representadas em cinza claro.

GRÁFICO 25 – Otimização dos parâmetros do imunoensaio dos clones selecionados frente ao anticorpo anti-HTLV, utilizado o clone 80 (PWYHWPN).

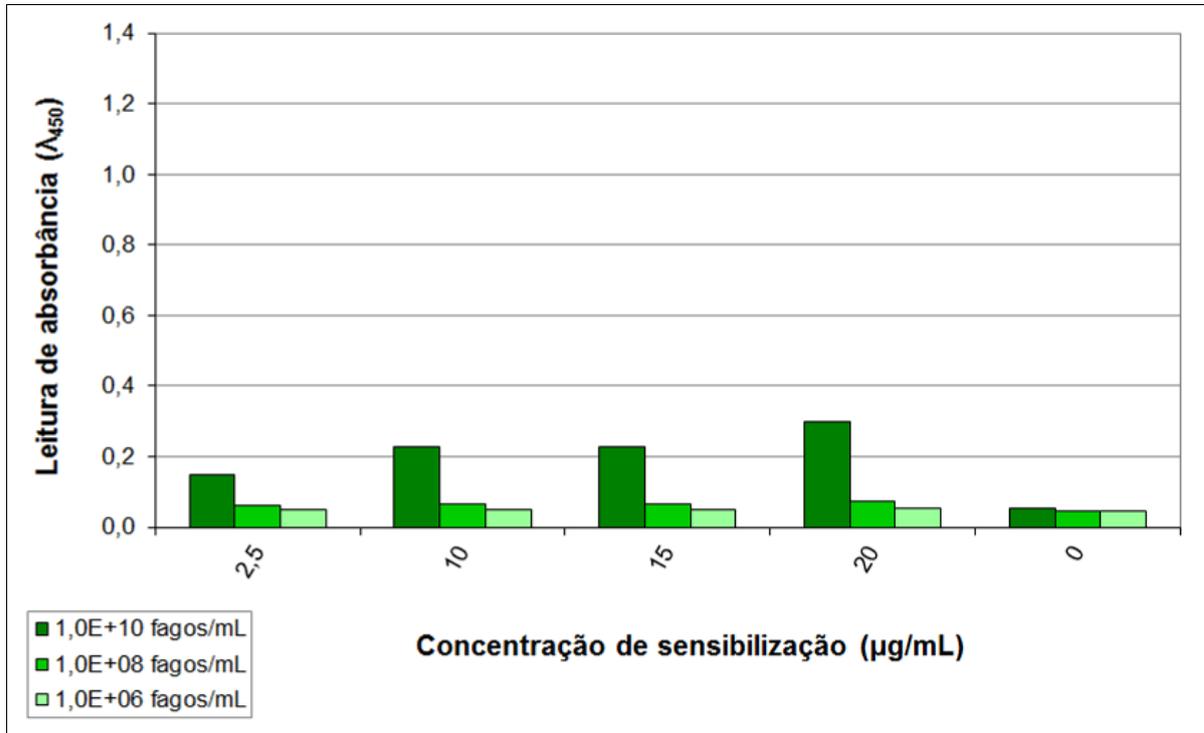
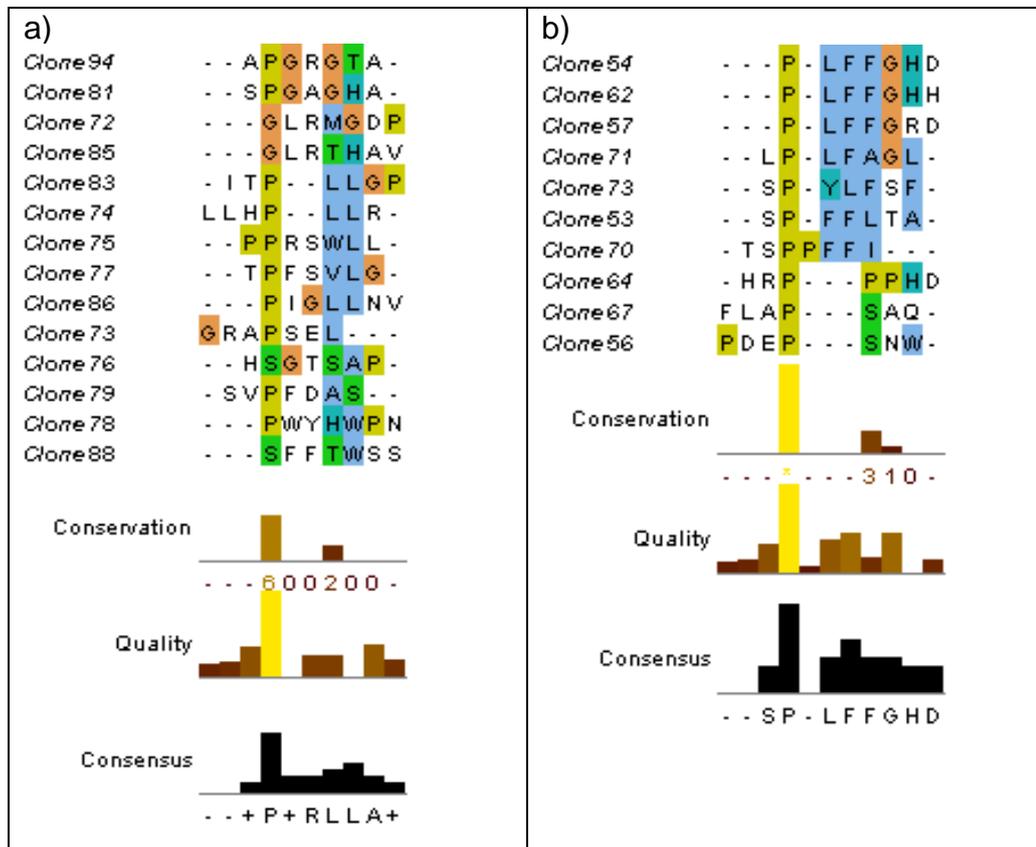
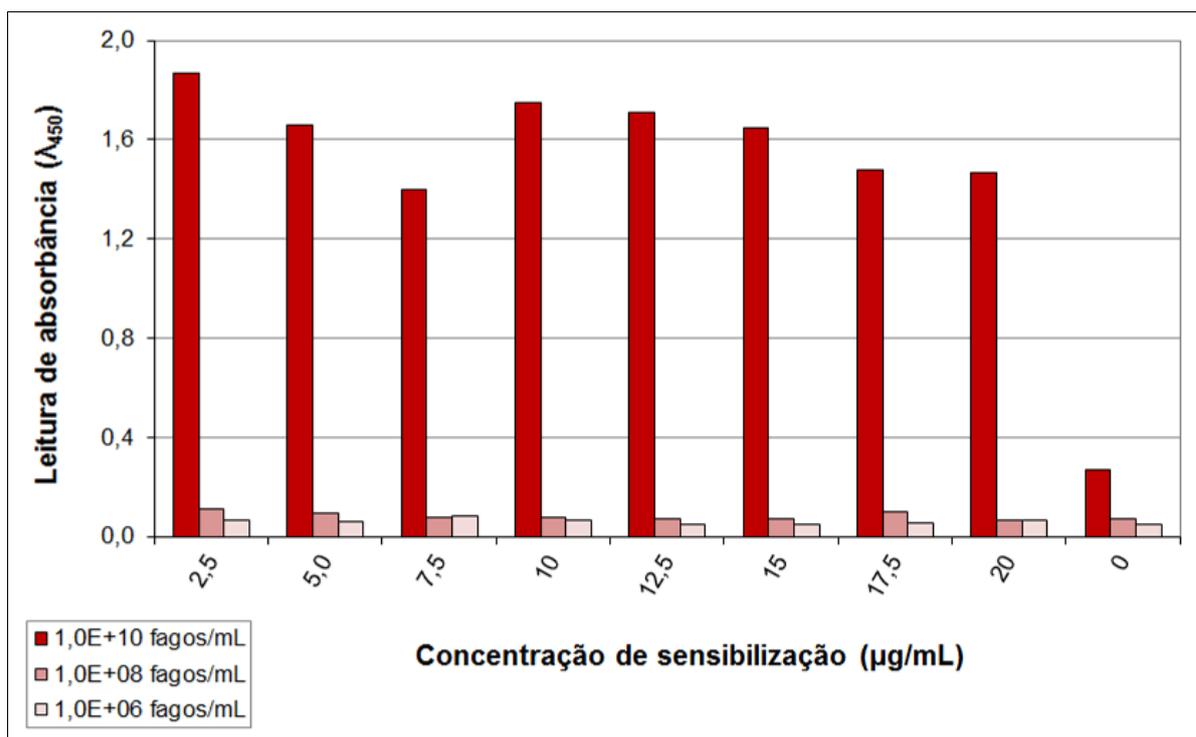


FIGURA 18 – Alinhamento dos peptídeos isolados da biblioteca Ph.D.-C7C selecionada frente aos anticorpos anti- HTLV (a) e anti-*T. pallidum* (b).



Treze dos vinte e quatro clones isolados na triagem realizada frente ao anticorpo anti-*T. pallidum* apresentaram o peptídeo PLFFGHD, que já havia sido obtido no processo anterior. Naquele momento tal sequência não teve sua reatividade avaliada em imunoenensaio por ter sido preterida em relação ao peptídeo LYWPGHS, obtido em maior número. Nessa nova oportunidade, no entanto, o peptídeo PLFFGHD apresentou forte afinidade pelo alvo (Gráfico 26). Além dele, foram selecionadas duas sequências semelhantes, PLFFGHH e PLFFGRD (clones 57 e 62), além do peptídeo LPLFAGL (clone 71) semelhante ao clone 13 obtido no processo de seleção anterior. Diante dos resultados desfavoráveis do imunoenensaio do clone PWYHWPN selecionado frente ao anticorpo anti-HTLV, optou-se por concentrar os esforços na análise nesses potenciais mimotopos de *T. pallidum*.

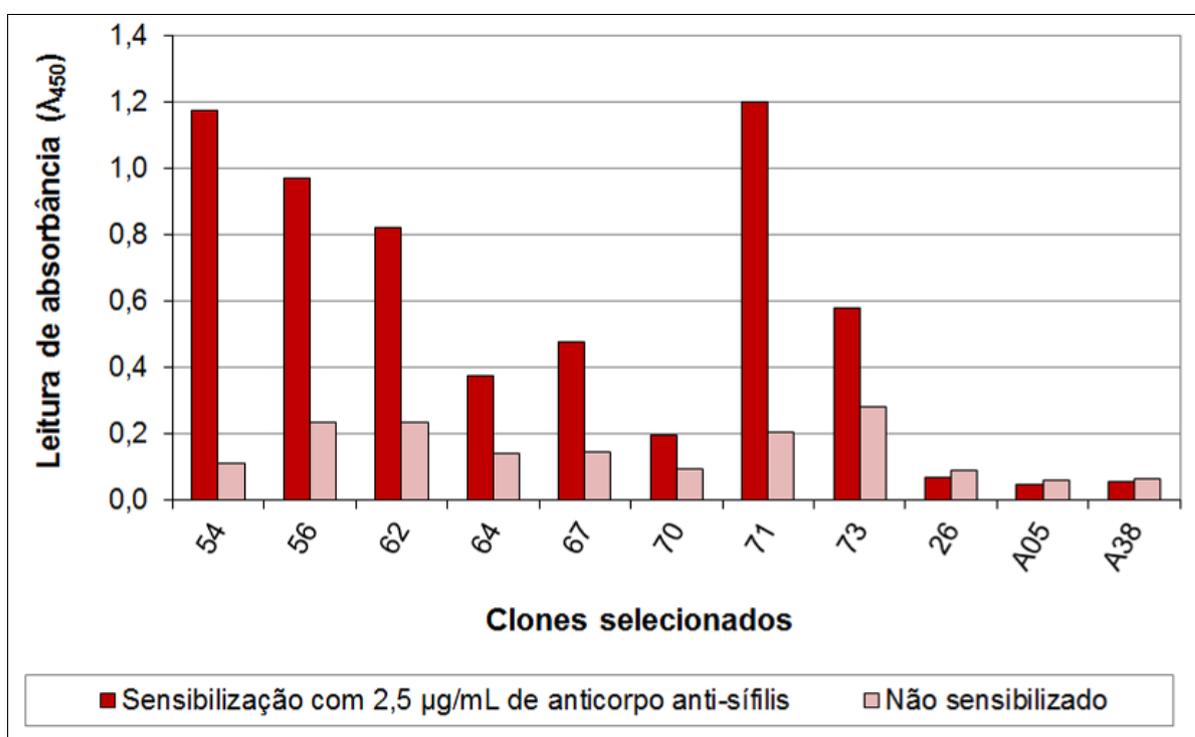
GRÁFICO 26 – Otimização dos parâmetros do imunoenensaio dos clones selecionados frente ao anticorpo anti-*T. pallidum*, utilizado o clone 54 (PLFFGHD).



Os clones selecionados frente ao anticorpo anti-*T. pallidum* nessa segunda oportunidade foram submetidos a um imunoenensaio nas condições definidas no ensaio com o clone PLFFGHD (sensibilização com 2,5 µg/mL de anticorpo e adição de 10¹⁰ fagos/mL na etapa de ligação). Para avaliar a especificidade da interação entre os peptídeos e o alvo, foram empregados como controles negativos peptídeos

selecionados frente a outros ligantes, obtidos por SUAREZ (2011): o clone 26, com a sequência ATWSHHLSFAGL, foi obtido da biblioteca Ph.D.-12 frente ao anticorpo anti-HTLV, e os clones A05 (TRVPQSF; Ph.D.-7) e A38 (DTGPNEPRSSTT; Ph.D.-12) são potenciais mimotopos de HBV e HCV, respectivamente. Os clones 54, 56, 62 e 71 demonstraram forte reatividade com o anticorpo anti-*T. pallidum* (Gráfico 27), diferente dos mimotopos obtidos frente a outros alvos. Tal resultado indica que a interação dos referidos peptídeos com o anticorpo seja efetivamente específica.

GRÁFICO 27 – Reatividade dos clones isolados da biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C selecionada frente ao anticorpo anti-*T. pallidum*.

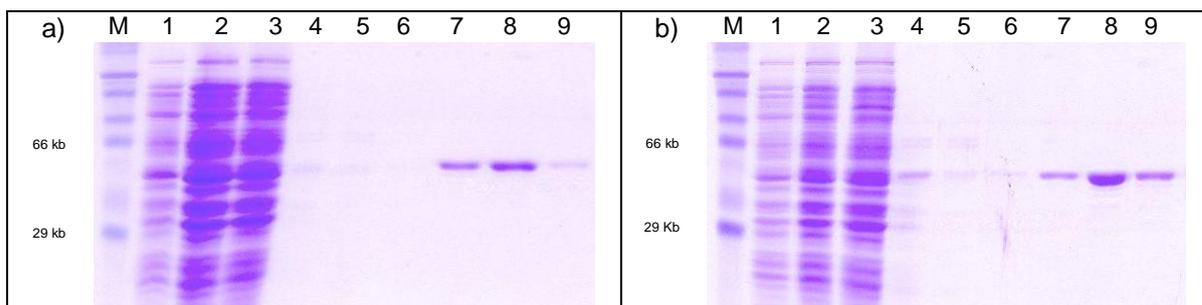


NOTA: controle negativo: clones 26, A05 e A38, respectivamente mimotopos de HTLV, HBV e HCV.

5.2.4 Expressão e análise dos peptídeos na forma solúvel

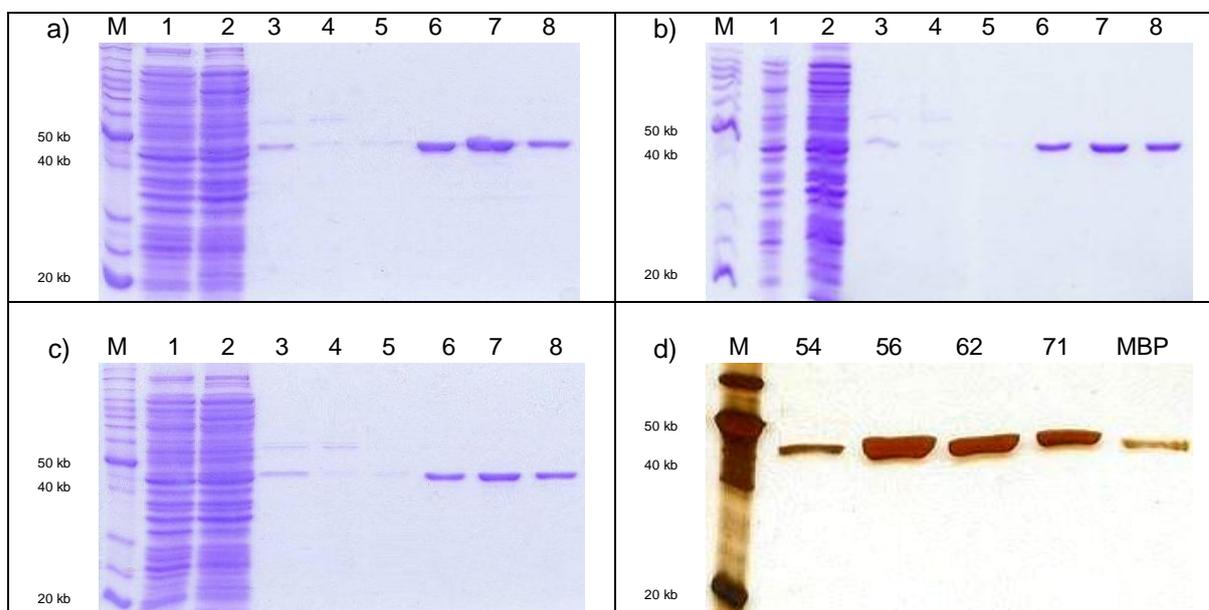
Embora os dez peptídeos obtidos nesse último processo de triagem sejam potenciais mimotopos de *T. pallidum*, num primeiro momento optou-se por analisar e caracterizar aqueles com maior afinidade pelo alvo empregado. Assim, os genes que codificam os peptídeos 54, 56, 62 e 71 foram amplificados do genoma de seus respectivos clones isolados, inseridos no vetor pMAL-pIII e expressos na forma solúvel, fusionados à etiqueta MBP (Figuras 19 e 20).

FIGURA 19 – Expressão da etiqueta MBP (a) e do peptídeo 54 fusionado à MBP (b).



LEGENDA: M: *high molecular weight standard mixture* (SIGMA); 1: cultura não induzida; 2-3: cultura após 2 e 3 horas de indução com IPTG; 4: extrato de choque osmótico; 5 e 6: *flow through* e lavagem da purificação em coluna de amilose; 7-9: frações eluídas da resina de amilose.

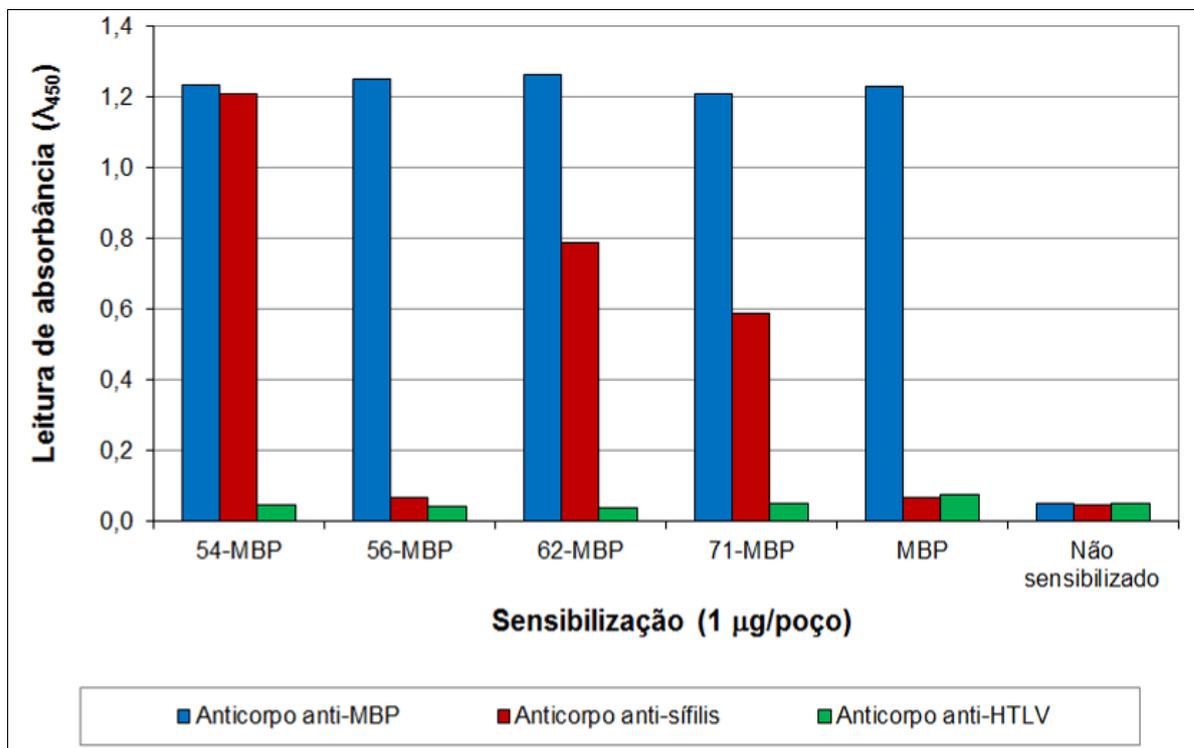
FIGURA 20 – Expressão dos clones 56 (a) 62 (b) e 71 (c) fusionados à MBP, e perfil das cinco proteínas em gel corado com prata (d).



LEGENDA M: *benchmark protein ladder* (INVITROGEN); 1: cultura não induzida; 2: cultura induzida por 3 horas com IPTG; 3: extrato de choque osmótico; 4 e 5: *flow through* e lavagem da purificação em resina de amilose; 6 a 8: frações eluídas da resina; 54, 56, 62, 71, MBP: primeira fração eluída.

Após o processo de purificação, a reatividade das proteínas de fusão com o alvo foi avaliada em um ensaio imunoenzimático (Gráfico 28). Os peptídeos 54, 62 e 71 mantiveram a afinidade com o anticorpo anti-*T. pallidum* mesmo em um sistema de exposição diferente dos fagos, confirmando que a interação se dá realmente entre o anticorpo e a sequência apresentada, e não com outras moléculas virais. Não houve reatividade da proteína 56-MBP com o alvo, fato possivelmente decorrente de alterações conformacionais ocasionadas pela interação do peptídeo com MBP, comprometendo a adequada apresentação do mesmo.

GRÁFICO 28 – Reatividade dos peptídeos expressos na forma solúvel com os anticorpos anti-MBP, anti-*T. pallidum* e anti-HTLV.

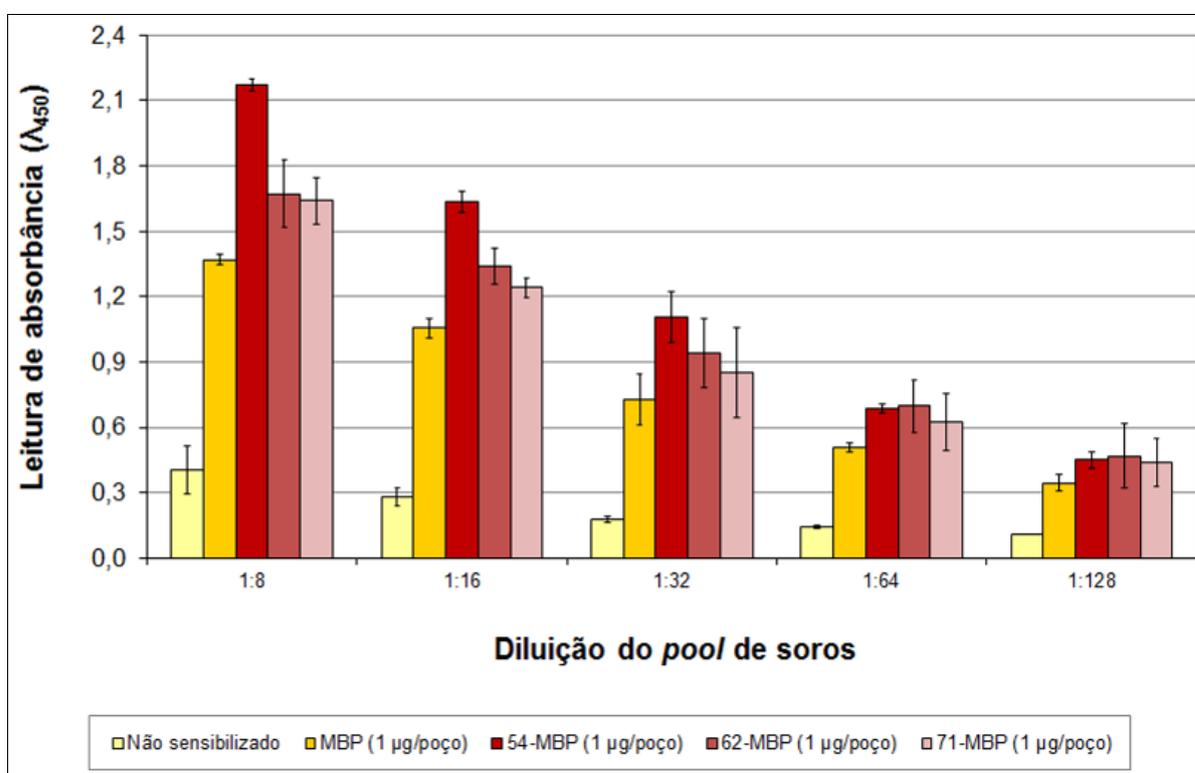


Esse experimento também permitiu verificar a afinidade das proteínas de fusão por um anticorpo anti-MBP – confirmando a expressão da etiqueta ligante de maltose – e a ausência de reatividade das mesmas pelo anticorpo anti-HTLV – de mesmo isotipo (IgG1) que o anti-*T. pallidum* – indicando que a seleção não ocorreu frente à fração C_H da imunoglobulina. Para confirmar se os peptídeos obtidos realmente interagem com a região V específica para *T. pallidum*, seria necessário ainda verificar se eles apresentam afinidade pela porção C_L; no entanto, não há informações sobre o isotipo de cadeia leve constituinte do anticorpo empregado, e não foram encontradas cadeias κ e λ disponíveis para a condução dessa análise.

Até esta etapa os peptídeos obtidos foram testados somente contra anticorpos monoclonais. No entanto, havia o risco de que a especificidade do anticorpo usado na triagem não seja gerada em humanos sífilíticos, o que invalidaria o emprego desses mimotopos em diagnóstico sorológico. Para verificar essa possibilidade, as proteínas 54-MBP, 62-MBP, 71-MBP e MBP sem fusão foram submetidas a um imunoenensaio contra um *pool* de soros formado pela combinação, em proporções iguais, de 20 amostras infectadas por *T. pallidum* fornecidas pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos / FIOCRUZ) (Anexo H).

Nesse ensaio (Gráfico 29) foi observada forte reatividade dos peptídeos fusionados com diferentes diluições do *pool* de soros (realizadas em *coating buffer* + BSA 1%). Entretanto, a reatividade com a proteína MBP sem fusão também foi alta, sugerindo que nos soros utilizados havia anticorpos anti-MBP que interferiam na resposta específica contra os mimotopos de sífilis. Tais anticorpos podem ter sido gerados como resposta a alguma proteína de *T. pallidum* equivalente ou semelhante à MBP, ou podem ser decorrentes de outras infecções bacterianas.

GRÁFICO 29 – Reatividade dos peptídeos expressos na forma solúvel com um *pool* de soros positivos para sífilis.

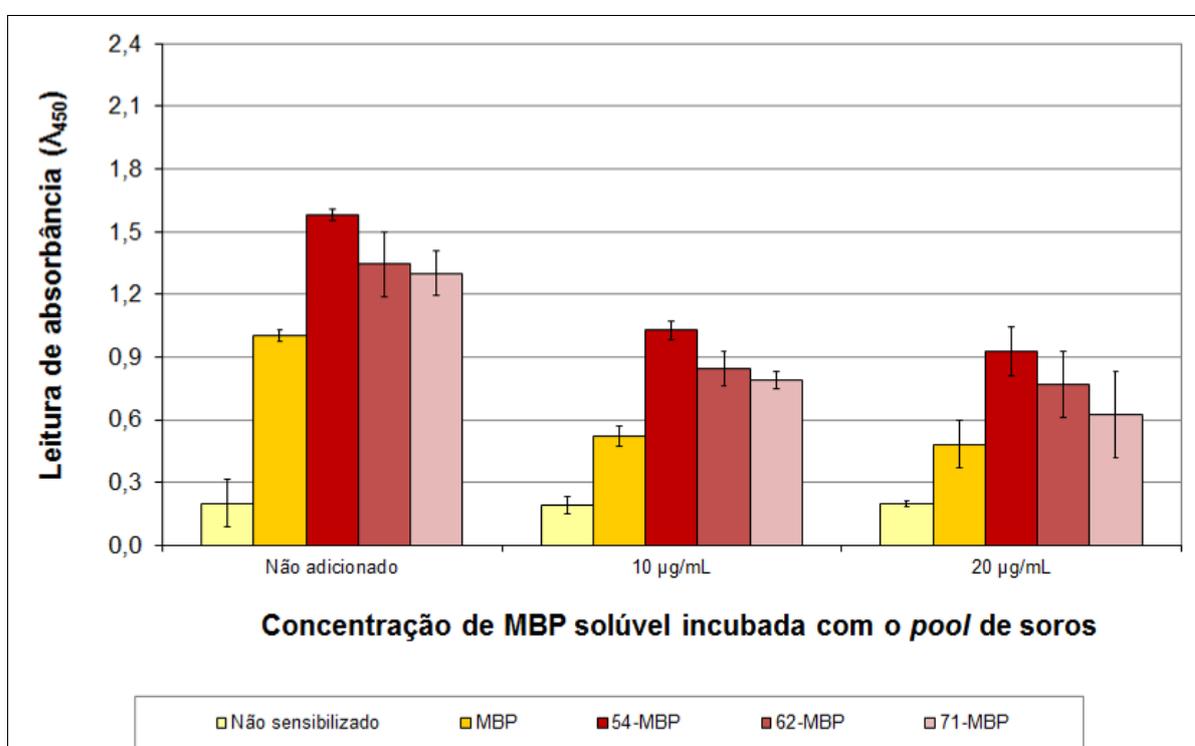


NOTA: experimento em triplicata – barras de erro correspondem ao desvio padrão das réplicas.

O imunoensaio sorológico foi então repetido, mas desta vez incubando o *pool* de soros (diluído 1:16) com 10 ou 20 µg/mL de MBP solúvel por 2 horas a 37°C e leve agitação, antes da adição aos poços da placa. Essa estratégia reduziu a interferência da etiqueta na resposta do soro contra os peptídeos (Gráfico 10 e Tabela 11). A condução de um Teste T de STUDENT (bi-caudal, duas amostras em par para médias) indicou que há diferenças estatisticamente relevantes entre a reatividade do *pool* previamente incubado com MBP (em ambas as concentrações) e a reatividade do soro não tratado, considerando um nível de significância de 1%.

Mesmo assim, a reatividade do *pool* de soros contra MBP imobilizada continuou elevada se comparada com a das proteínas de fusão, o que sugere que não foi possível remover todos os anticorpos interferentes. Além disso, o teste T realizado apontou que não havia diferenças significativas de reatividade entre os tratamentos com MBP nas duas concentrações avaliadas, indicando que tais anticorpos provavelmente não seriam removidos pela incubação do soro com quantidades mais elevadas de MBP solúvel.

GRÁFICO 30 – Reatividade de peptídeos expressos na forma solúvel com um *pool* de soros positivos para sífilis previamente incubado com MBP.



NOTAS: *pool* diluído 1:16; experimento em triplicata – barras de erro correspondem ao desvio padrão.

TABELA 11 – Reatividade (λ_{450}) dos peptídeos solúveis frente ao *pool* de soros positivos para sífilis previamente incubado com MBP.

Sensibilização	MBP solúvel								
	Não adicionada			10 $\mu\text{g/mL}$			20 $\mu\text{g/mL}$		
54-MBP	1,604	1,568	1,567	1,029	1,050	1,005	0,969	0,974	0,836
62-MBP	1,351	1,338	1,343	0,883	0,872	0,774	0,742	0,693	0,876
71-MBP	1,321	1,301	1,281	0,754	0,846	0,762	0,700	0,561	0,604
MBP	1,011	0,991	1,005	0,529	0,541	0,495	0,438	0,460	0,549
Não sensibilizado	0,210	0,186	0,205	0,199	0,193	0,181	0,202	0,218	0,173

NOTAS: experimento realizado em triplicata.

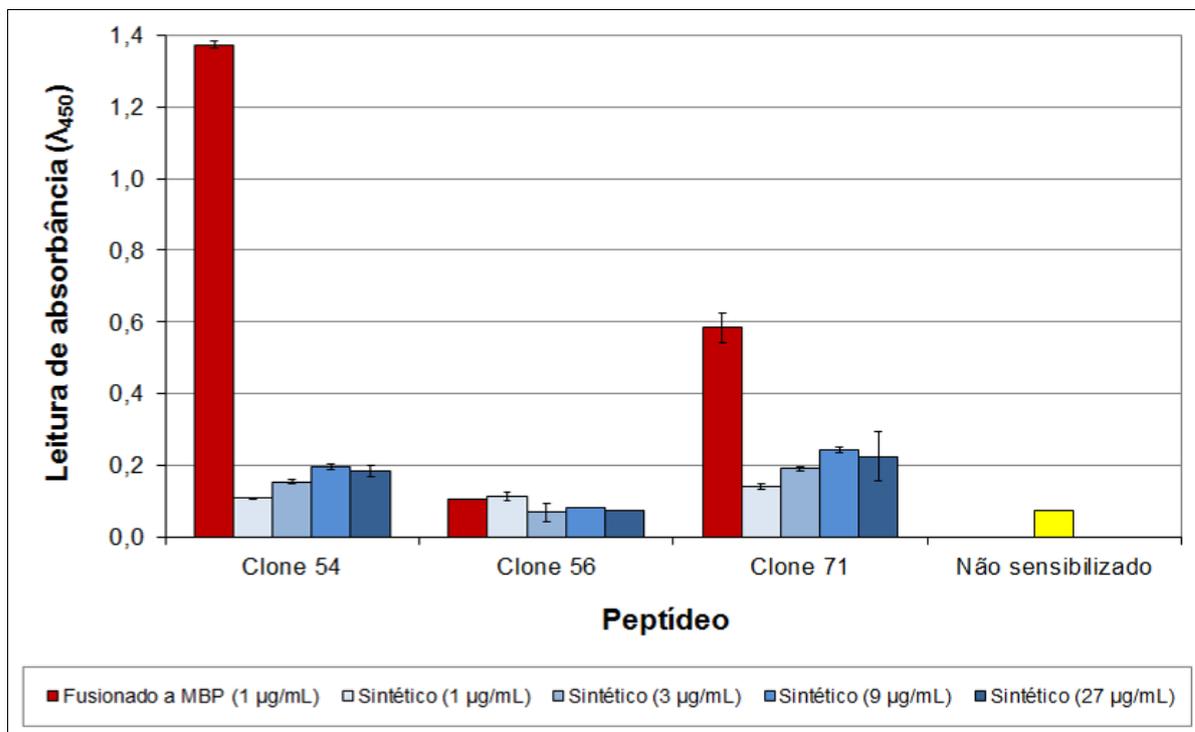
O plasmídeo pMAL-pIII, desenvolvido por ZWICK e colaboradores (1998), é amplamente empregado para expressão solúvel e purificação de peptídeos obtidos por *phage display*. Entretanto, não foram encontrados relatos da utilização dessa estratégia para obtenção de peptídeos destinados a ensaios sorológicos, de modo que não havia sido previsto o risco de interferência da etiqueta MBP. Assim, os resultados aqui obtidos evidenciaram a necessidade de investigar novas estratégias para apresentação desses peptídeos. Uma opção, avaliada a seguir, é o emprego de sequências sintetizadas quimicamente, não fusionadas a nenhuma etiqueta.

A síntese foi realizada pela GENSCRIPT, utilizando a tecnologia FlexPeptide (http://www.genscript.com/peptide_tech.html). Os peptídeos foram sintetizados com as extremidades flanqueantes SAC e CGGG, que contém as cisteínas necessárias para a formação da ponte dissulfeto responsável pela manutenção da conformação tridimensional. As sequências foram entregues liofilizadas, e ressuspensas em solventes orgânicos conforme recomendações do fabricante, para uma concentração final de 1 mg/mL. O clone 56 foi ressuspensado em água ultra pura, enquanto as sequências 54 e 71, por apresentarem perfil hidrofóbico, foram ressuspensas respectivamente em uma solução de metanol 30% (v/v) e em uma solução de dimetil-formamida 20% (v/v) e metanol 50% (v/v). Não foi possível sintetizar o clone 62 devido a dificuldades técnicas decorrentes de sua elevada hidrofobicidade.

Antes de serem submetidos a um ensaio imunoenzimático frente ao *pool* de soros de pacientes sífilíticos, as sequências sintéticas tiveram avaliadas suas afinidades pelo anticorpo monoclonal anti-*T. pallidum* empregado na triagem. Em comparação com o peptídeo fusionado à MBP, os peptídeos sintéticos apresentaram baixa afinidade com o alvo, mesmo quando empregados em concentrações muito elevadas em comparação à concentração da proteína de fusão (Gráfico 31).

Esse resultado pode ter sido ocasionado pelos solventes orgânicos empregados na ressuspensão dos peptídeos: embora presentes em pequena quantidade devido à diluição realizada para o imunoensaio, tais compostos podem ter interferido na interação dos mimotopos sintéticos com o anticorpo. Outra possibilidade é de que tanto a etiqueta quanto o fago atuam como uma espécie de suporte necessário para que o peptídeo seja adequadamente exposto ao ligante. Assim, como foram incapazes de reagir com o anticorpo monoclonal, as sequências sintetizadas quimicamente não chegaram a ser avaliadas em ensaios sorológicos.

GRÁFICO 31 – Comparação da reatividade de peptídeos fusionados à MBP e sintéticos com o anticorpo anti-*T. pallidum* empregado na seleção.



NOTA: experimento em triplicata – barras de erro correspondem ao desvio padrão das réplicas.

5.2.5 Investigação da especificidade do anticorpo anti-*T. pallidum*

A única informação disponível a respeito da especificidade do anticorpo monoclonal anti-*T. pallidum* empregado neste trabalho era que o imunógeno utilizado na sua geração foi a linhagem N8 de *T. pallidum* inativada por formalina, e que a imunoglobulina é específica para lisados sonicados de *Treponema pallidum* e *Treponema reiter*. Para tentar identificar o antígeno que originou esse anticorpo, os mimotopos obtidos por meio de *phage display* foram submetidos a um alinhamento com as 1036 proteínas preditas curadas (*ref seq*) de *T. pallidum* subsp. *pallidum* cepa Nichols disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dos Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

Além de *matches* exatos, ferramentas de alinhamento de proteínas como o BLASTp aqui empregado consideram também correspondências não exatas de aminoácidos, definidas com base em características químicas e funcionais dos mesmos. No procedimento realizado, o *word-size* – sequência curta de *matches* usada para iniciar extensões que podem resultar em alinhamentos plenos – foi

definido em 2 (o menor valor permitido) para favorecer o alinhamento de oligopeptídeos. A Tabela 12 apresenta um resumo dos resultados obtidos, destacando o *e-value* de cada alinhamento. São listadas apenas proteínas capazes de alinhar (sem qualquer restrição de *e-value*) com os peptídeos 54, 62 e 71, que apresentaram as maiores afinidades pelo anticorpo anti-*T. pallidum*.

Embora técnicas de análise *in silico* de peptídeos triados por meio de *phage display* tenham sido descritas (HUANG *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2011), o tamanho reduzido dos mesmos prejudica a interpretação dos resultados obtidos. Isso é evidenciado pelos altos *e-values* registrados neste trabalho, que tornam difícil estimar a confiabilidade dos alinhamentos. Mesmo assim, chama atenção a enzima serina hidroximetil transferase (SHMT – EC 2.1.2.1), que foi capaz de alinhar com o peptídeo 54 (aquele com a maior afinidade pelo anticorpo anti-*T. pallidum*) fornecendo o *e-value* de 11, o menor encontrado nesta análise.

TABELA 12 – Alinhamento de peptídeos obtidos frente ao anticorpo anti-*T. pallidum* com o proteoma de *T. pallidum* subsp. *pallidum* cepa Nichols.

Proteína (gi designação)	Clone 54 PLFFGHD	Clone 62 PLFFGHH	Clone 71 LPLFAGL	Clone 52 LPLFHGL	Clone 53 SPFFLTA	Clone 57 PLFFGRD
15639320 serine hydroxymethyltransferase	11	20	606		553	105
15639857 flagellar hook-associated protein	64	3863	1096	912	2790	3863
15639748 hypothetical protein TP0761	5862	2721	517	85	6163	4234
15639673 methylgalactoside ABC transporter, permease protein	193	193	535	1663	3736	223
15639032 regulatory protein (pfoS/R)	4269	860	201	2421		396
15639646 flagellar hook- associated protein FlgL	311	311	201	1016		
15639525 preprotein translocase subunit SecG	267	244	1900	728	10425	316
15639137 thiamine ABC transporter, permease, putative	904	1124	449	562	265	1069
15639942 dicarboxylate transporter (dctM)	4199	3553	399	1096	653	2860
15639492 rod shape-determining protein	530	3674	1252	6756	5717	3215
15639378 cell division protein (ftsW)	4305	3495	1543	6589	653	3960
15639693 hypothetical protein TP0706	3643	1191	1181	1373	1284	875
15639227 preprotein translocase subunit SecE	4758	5438	904	1649		8971
15639542 hypothetical protein TP0553	4305	5304	991	904	5623	5438

NOTA: os valores constituintes da tabela correspondem ao *e-value* do alinhamento entre o peptídeo (coluna) e o gene de *T. pallidum* (linha).

Também conhecida como glicina hidroximetil transferase, a SHMT é uma enzima de 574 aminoácidos que desempenha importante papel no metabolismo de carbono ao catalisar a conversão de serina em glicina. Em procariotos ela apresenta localização citoplasmática (USHA *et al.*, 1994; RAO *et al.*, 2003). O clone 71 alinhou com a porção intermediária da SHMT, entre os aminoácidos 260 e 263, enquanto os peptídeos 54 e 62 alinharam com a extremidade C-terminal da enzima, entre as posições 566 e 572 (Figura 21). Essa extremidade não é encontrada nas SHMTs de outros organismos, indicando que os mimotopos obtidos podem apresentar certa especificidade imunogênica.

Vale destacar também que nenhum dos clones obtidos foi capaz de alinhar com os antígenos geralmente empregados no diagnóstico da sífilis – Tp47 (gi|15639563|), Tp37A gi|(15639779|), TmpA (gi|15639755|), Tp15 (gi|15639164|) e Tp17 (gi|15639426|) – o que sugere que a SHMT pode representar um novo imunógeno com potencial aplicação em testes sorológicos.

FIGURA 21 – Alinhamento dos clones 54, 56 e 71 com a serina hidroximetil-transferase de *T. pallidum* subsp. *pallidum* cepa Nichols.

name	begin	alignment	end	name	begin	alignment	end	name	begin	alignment	end
SHMT	566	PLFFSHE	572	SHMT	566	PLFFSHE	572	SHMT	260	MAHFAGL	263
Conservation		PLFF H+		Conservation		PLFF H		Conservation		FAGL	
Clone54	1	PLFFGHD	7	Clone56	1	PLFFGHH	7	Clone71	1	LPLFAGL	7

6 CONCLUSÃO

Apesar das dificuldades técnicas encontradas no decorrer do presente trabalho, foi possível evidenciar que a técnica de *phage display* pode ser utilizada com sucesso na obtenção de reagentes moleculares com potencial aplicabilidade em imunodiagnóstico.

A seleção de anticorpos anti-imunoglobulinas humanas rendeu a seleção de fagos expondo moléculas scFv com forte afinidade pelo fragmento Fc5 μ de IgM. No entanto, não foi possível isolar esses fagos de maneira eficiente, em princípio devido à contaminação ou degradação das amostras. A resolução desta situação, bem como a definição dos próximos passos a serem seguidos nessa linha de trabalho, requer estudos adicionais.

Com relação à triagem de peptídeos, foram obtidos ao menos três clones, de conformação circular, que interagiram fortemente com o anticorpo anti-*T. pallidum* empregado. Para confirmar a empregabilidade desses mimotopos no diagnóstico da sífilis, é necessário ainda definir a especificidade dos mesmos, avaliando sua reatividade com soros de indivíduos saudáveis e de pacientes infectados por outros patógenos. Deve-se também eliminar dos ensaios sorológicos a interferência da etiqueta MBP fusionada com os peptídeos solúveis, bem como investigar mais detalhadamente o emprego de peptídeos sintéticos.

Novos mimotopos podem ainda ser obtidos pela triagem das bibliotecas Ph.D.-7 e Ph.D.-12 utilizando os parâmetros que resultaram na seleção bem sucedida da biblioteca C7C, e pelo emprego de novos alvos, como outros anticorpos monoclonais e soros de pacientes sífilíticos – devidamente submetidos a processos de purificação que eliminem imunoglobulinas não específicas para *T. pallidum*. Além desses experimentos, análises conformacionais podem conduzir à obtenção de moléculas com afinidade refinada pelo alvo.

Por fim, vale ressaltar que o emprego desses peptídeos isoladamente no diagnóstico da sífilis é desaconselhável, pois devido ao seu pequeno reduzido, tais sequências podem ser encontradas em proteínas de diversos patógenos, de forma que não há garantias de especificidade. Uma estratégia mais adequada, e que será analisada na continuidade deste trabalho, é construir um antígeno quimérico específico com base em diversos peptídeos selecionados frente a diferentes anticorpos anti-*T. pallidum*.

7 PRÓXIMAS ETAPAS E PERSPECTIVAS

- Investigar metodologias que permitam isolar de modo eficiente os fagos expondo anticorpos anti-IgM, a fim de permitir a continuidade da linha de anticorpos;
- Remover a interferência da etiqueta MBP na reatividade dos mimotopos com o soro de indivíduos infectados por *T. pallidum*. As possibilidades incluem:
 - clivar a etiqueta após a purificação;
 - substituir MBP por outra etiqueta, que permita a adequada purificação do peptídeo e apresente mínimo potencial de reatividade com o soro;
 - analisar de forma mais detalhada o emprego de peptídeos sintéticos;
- Avaliar a reatividade dos peptídeos 54, 62 e 71 com soro de indivíduos saudáveis e de pacientes infectados por outros patógenos;
- Realizar processos de triagem das bibliotecas Ph.D.-7 e Ph.D.-12 empregando os parâmetros estabelecidos na seleção bem sucedida da biblioteca Ph.D-C7C;
- Selecionar as bibliotecas Ph.D. frente a outros anticorpos anti-*T. pallidum* disponíveis comercialmente, e também frente ao soro de pacientes sífilíticos;
- Refinar a afinidade dos mimotopos inicialmente obtidos, a partir da:
 - análise bioinformática e alteração de sua estrutura e sequência;
 - triagem de bibliotecas originadas pela mutagênese dos mesmos;
- Combinar diversos mimotopos selecionados e caracterizados a fim de obter um antígeno quimérico com potencial aplicabilidade no diagnóstico da sífilis.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Anticorpos e Antígenos. In: _____ (Eds.). **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, p. 75-96.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. The Adaptive Immune System. In: _____. **Molecular Biology of the Cell**. 5 ed. Nova Iorque: Garland Science, 2008. p. 1539-1600.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.; SCHÄFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDO, Y.; MATSUMOTO, Y.; NAKANO, S.; SAITO, K.; KAKIMOTO, K.; TANIGAWA, T.; EKUNI, Y.; KAWA, M.; TOYAMA, T. Long-term follow-up study of vertical HTLV-I infection in children breast-fed by seropositive mothers. **The Journal of Infection**. v. 46, n. 3, p. 177-179, 2003.

ARBABI-GHAHROUDI, M.; MACKENZIE, R.; TANHA, J. Selection of non-aggregating VH binders from synthetic VH phage-display libraries. **Methods in Molecular Biology**. v. 525, p. 187-216, 2009.

ARNDT, K. M.; MÜLLER, K. M.; PLÜCKTHUN, A. Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. **Biochemistry**. v. 37, n. 37, p. 12918-12926, 1998.

AVELLEIRA, J. C.; BOTTINO, G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 81, n. 2, p. 111-126, 2006.

AZZAY, H. M.; HIGHSMITH, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**. v.35, n. 6, p.425-445, 2002.

BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. **Phage display – a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

BASEMAN, J. B.; HAYES, E. C. Molecular characterization of receptor binding proteins and immunogens of virulent *Treponema pallidum*. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 151, n. 3, p. 573-586, 1980.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**. v.19, n. 1, p.1-33, 2001.

BIRD, R.; HARDMAN, K.; JACOBSON, J.; JOHNSON, S.; KAUFMAN, B.; LEE, S.; LEE, T.; POPE, S.; RIORDAN, G.; WHITLOW, M. Single-chain antigen-binding proteins. **Science**. v.242, n. 4877, p. 423-426, 1988.

BISBY, F.; ROSKOV, Y.; ORRELL, T.; NICOLSON, D.; PAGLINAWAN, L.; BAILLY, N.; KIRK, P.; BOURGOIN, T.; BAILLARGEON, G. **Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2010 Annual Checklist**. Disponível em: <<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2010/details/species/id/4261491>>. Acesso em: 15/07/2011.

BORDUCCHI, D. M.; KERBAUY, J.; OLIVEIRA, J. S. Linfoma/Leucemia de células T do adulto. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 45, n. 1, p. 63-70, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. **Diretrizes de Controle da Sífilis Congênita**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BREKKE, O. H.; LOSET, G. A. New technologies in therapeutic antibody development. **Current Opinion in Pharmacology**. v.3, n. 5, p. 544-550, 2003.

BROMAGE, E. S.; VADAS, G. G.; HARVEY, E.; UNGER, M. A.; KAATTARI, S. L. Validation of an antibody-based biosensor for rapid quantification of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) contamination in ground water and river water. **Environmental Science & Technology**. v. 41, n. 20, p. 7067-7072, 2007.

BURTON, D. R.; BARBAS, C. F.; PERSSON, M. A.; KOENIG, S.; CHANOCK, R. M.; LERNER, R. A. A Large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 88, n. 10, p. 134-137, 1991.

CABILLY, S.; RIGGS, A. D.; PANDE, H.; SHIVELY, J. E.; HOMES, W. E.; REY, M.; PERRY, L. J.; WETZEL, R.; HEYNEKER, H. L. Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 81, n. 11, p. 3273-3277, 1984.

CASEY, J. L.; COLEY, A. M.; PARISI, K.; FOLEY, M. Peptide mimics selected from immune sera using phage display technology can replace native antigens in the diagnosis of Epstein-Barr virus infection. **Protein Engineering, Design & Selection**. v. 22, n. 2, p. 85-91, 2009.

CASTRO, R. M. **Contribuição para o estudo de infecção por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*: resposta serológica, diagnóstico molecular e genotipagem**. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 2004. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Higiene e Medicina Tropical, UNL, 2004.

CENTURION-LARA, A. Antigenic variation in *Treponema pallidum*. In: RADOLF, J. D.; LUKEHART, S. A. (Eds). **Pathogenic Treponema: Molecular and Cellular Biology**. Wymondham: Caister Academic Press, 2006. p. 267-84.

CHAPEL, T. Congenital syphilis. **Comprehensive Therapy**. v. 14, p. 25-28, 1988.

CHEN, W.; ZHONGYU, Z.; FENG, Y.; XIAO, X.; DIMITROV, D. S. Construction of a large phage–displayed human antibody domain library with a scaffold based on a newly identified highly soluble, stable heavy chain variable domain. **Journal of Molecular Biology**. v. 382, n. 3, p. 779-789, 2008.

COFFIN, J.; HUGHES, S.; VARMUS, H. (Eds.). **Retroviruses**. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. 843p.

DAVIES, D. R.; PADLAN, E. A.; SHERIFF, S. Antibody-antigen complexes. **Annual Review of Biochemistry**. v. 59, p. 439-473, 1990.

DEVAUX, C.; MOREAU, E.; GOYFFON, M.; ROCHAT, H.; BILLIALD, P. Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that neutralizes toxin Aahl from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. **European Journal of Biochemistry**. v. 268, n. 3, p. 694-702, 2001.

DEVLIN, J.; PANGANIBAN, L.; DEVLIN, P. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. **Science**. v. 249, n. 4967, 404-406, 1990.

DESJOBERT, C.; SOULTRAIT, V. R.; FAURE, A.; PARISSI, V.; LITVAK, S.; TARRAGO-LITVAK, L.; FOURNIER, M. Identification by Phage Display Selection of a Short Peptide Able To Inhibit Only the Strand Transfer Reaction Catalyzed by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase. **Biochemistry**. v. 43, n. 41, p. 13097-13105, 2004.

DIAS-NETO, E.; NUNES, D. N.; GIORDANO, R. J.; SUN, J.; BOTZ, G. H.; YANG, K.; SETUBAL, J. C.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Next-Generation Phage Display: Integrating and Comparing Available Molecular Tools to Enable Cost-Effective High-Throughput Analysis. **PLoS ONE**. v. 4, n. 12, e8338, 2009.

DON, P. C.; RUBINSTEIN, R.; CHRISTIE, S. Malignant syphilis (lues maligna) and concurrent infection with HIV. **International Journal of Dermatology**. v. 34, n. 6, p. 403-407, 1995.

DOUGUCHI, J.; HASHIUCHI, A.; SAKAMOTO, M. Construction of human monoclonal single-chain Fv antibodies against small-cell lung cancer by phage display libraries derived from cell-immunized SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes. **Proteomics Clinical Applications**. v. 3, n. 11, p. 1265-1272, 2009.

DYCK, E.; MEBEUS, A.; PIOT, P. Syphilis. In: _____. (Eds.). **Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases**. Geneva: World Health Organization, 1999. p. 36-49.

EXPASY. Representação esquemática de um Deltaretrovirus. Ilustração. **Swiss Institute of Bioinformatics**. 2009. Disponível em: <http://expasy.org/viralzone/all_by_species/91.html>. Acesso em: 15/07/2011.

FEHRSEN, J.; WYNGAARDT, W.; MASHAU, C.; POTGIETER, A.; CHAUDHARRY, V.; GUPTA, A.; JORDAAN, F.; PLESSIS, D. Serogroup-reactive and type-specific detection of bluetongue virus antibodies using chicken scFvs in inhibition ELISAs. **Journal of Virological Methods**. v. 129, n. 1, p. 31-39, 2005.

FRASER, C.; NORRIS S.; WEINSTOCK, G.; WHITE, O.; SUTTON, G.; DODSON, R.; GWINN, M.; HICKEY, E.; CLAYTON, R.; KETCHUM, K.; SODERGREN, E.; HARDHAM, J.; MCLEOD, M.; SALZBERG, S.; PETERSON, J.; KHALAK, H.; RICHARDSON, D.; HOWELL, J.; CHIDAMBARAM, M.; UTTERBACK, T.; MCDONALD, L.; ARTIACH P.; BOWMAN, C.; COTTON, M.; FUJII, C.; GARLAND, S.; HATCH, B.; HORST, K.; ROBERTS, K.; SANDUSKY, M.; WEIDMAN, J.; SMITH, H.; VENTER J. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. **Science**. v. 281, n. 5375, p. 375-388, 1998.

FUCHS, S.; KASHER, R.; BALASS, M.; SCHERF, T.; HAREL, M.; FRIDKIN, M.; SUSSMAN, J.; KATCHALSKI-KATZIR, E. The binding site of acetylcholine receptor: from synthetic peptides to solution and crystal structure. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 998, p. 93-100, 2003.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação. **Manual de Utilização de Animais**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. 54 p.

GADELHA, C. A. G. **Inovação em Saúde no Contexto da Política Nacional de Desenvolvimento**. Trabalho apresentado ao 1º Workshop de Inovação Tecnológica em Saúde da Fiocruz / Pernambuco. Recife, 2008.

GEISBERGER, R.; LAMERS, M.; ACHATZ, G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. **Immunology**. v. 118, n. 4, p. 429-437, 2006.

GESSAIN, A.; BARIN, F.; VERNANT, J. C.; GOUT, O.; MAURS, L.; CALENDER, A.; THÉ, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-1 in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**. v. 2, n. 8452, p. 407-410, 1985.

GEYSEN, H. M.; RODDA, S. J.; MASON, T. J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. **Molecular Immunology**. v. 23, n. 7, p. 709-715, 1986.

GJESTLAND, T. The Oslo study of untreated syphilis; an epidemiologic investigation of the natural course of the syphilitic infection based upon a re-study of the Boeck-Bruusgaard material. **Acta dermato-venereologica. Supplementum (Stockholm)**. v. 35, s. 34, p. 3-368, 1955.

GNANASEKAR, M.; RAO, K. V.; HE, Y. X.; MISHRA, P. K.; NUTMAN, T. B.; KALIRAJ, P.; RAMASWAMY, K. Novel phage display-based subtractive screening to identify vaccine candidates of *Brugia malayi*. **Infection and Immunity**. v. 72, n. 8, p. 4707-4715, 2004.

GOMEZ, E.; JESPERSEN, D. J.; HARRING, J. A.; BINNICKER, M. J. Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 Syphilis Multiplex Flow Immunoassay for the Detection of IgM- and IgG-Class Antitreponemal Antibodies. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 17, n. 6, p. 966-968, 2010.

GRAY, R. R.; MULLIGAN, C. J.; MOLINI, B.; SUN, E. S.; GIACANI, L.; GODORNES, C.; KITCHEN, A.; LUKEHART, S. A.; CENTURION-LARA, A. Molecular evolution of the tprC, D, I, K, G and J genes in the pathogenic genus *Treponema*. **Molecular Biology and Evolution**. v. 23, n. 11, p. 2220-2233, 2006.

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

HASHIMOTO, K.; HIGUCHI, I.; OSAME, M.; IZUMO, S. Quantitative in situ PCR assay of HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TSP and asymptomatic carriers. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 159, n. 1, p. 67-72, 1998.

HEITNER, T.; MOOR, A.; GARRISON, J. L.; MARKS, C.; HASAN, T.; MARKS, J. D. Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor antibodies from a phage display library. **Journal of Immunological Methods**. v. 248, n. 1-2, p. 17-30, 2001.

HIRA, S. K.; PATEL, J. S.; BHAT, S. G.; CHILIKIMA, K.; MOONEY, N. Clinical manifestations of secondary syphilis. **International Journal of Dermatology**. v. 26, n. 2, p. 103-107, 1987.

HJELLE, B.; ZHU, S. W.; TAKAHASHI, H.; IJICHI, S.; HALL, W. W. Endemic human T-cell leukemia virus type II infection in Southwestern US Indians involves two prototype variants of virus. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 168, n. 3, p. 737-740, 1993.

HOOGENBOOM, H. R. Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications. In: O'BRIEN, P. M.; AITKEN, R. (Eds.). **Methods in Molecular Biology, vol. 178: Antibody Phage Display: Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press Inc., 2002. p. 1-37.

HOOGENBOOM, H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. **Nature Biotechnology**. v. 23, n. 9, p.1105-1116, 2005.

HOOK, E.; MARRA, C. Acquired syphilis in adults. **The New England Journal of Medicine**. v. 326, n. 16, p. 1060-1069, 1992.

HUANG, J.; GUTTERIDGE, A.; HONDA, W.; KANEHISA, M. MIMOX: a web tool for phage display based epitope mapping. **BioMed Central Bioinformatics**. v. 12, n. 7, p. 451, 2006.

_____ ; RU, B.; DAI, P. Bioinformatics Resources and Tools for Phage Display. **Molecules**. v. 16, p. 694-709, 2011.

HUSTON, J. S.; MUDGETT-HUNTER, M.; TAI, M. S.; McCARTNEY, J.; WARREN, F.; HABER, E.; OPPERMAN, H. Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. **Methods of Enzymology**. v. 203, p. 46-88, 1991.

IZARD, J.; LIMBERGER, R. J. Structural and genomic features of Treponemal Architecture. In: RADOLF, J. D.; LUKEHART, S. A. (Eds). **Pathogenic Treponema: Molecular and Cellular Biology**. Wymondham: Caister Academic Press, 2006. p. 39-59.

JENUN, P.; OTT, T. Comparison of two syphilis antibody assays based on cardiolipin antigen. **National Institute of Public Health Annals**. v. 14, n. 1, p. 3-9, 1991.

JIN, S.; CHANG, Z. Y.; MING, X.; MIN, C. L.; WEI, H.; SHENG, L. Y.; HONG, G. X. Fast Dipstick Dye Immunoassay for Detection of Immunoglobulin G (IgG) and IgM Antibodies of Human Toxoplasmosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 12, n. 1, p. 198-201, 2005.

JUNG, Y.; MATSUMOTO, S.; KATAKURA, Y.; YAMASHITA, M.; TOMIMATSU, K.; KABAYAMA, S.; TERUYA, K.; SHIRAHATA, S. Generation of human monoclonal antibodies against *Propionibacterium acnes* by applying the phage display method to human peripheral blood mononuclear cells immunized in vitro. **Cytotechnology**. v. 57, n. 2, p. 169-175, 2008.

KALYANAMARAN, V. S.; SARNGADHARAN, M. G.; ROBERT-GUROFF, M.; MIYOSHI, I.; GOLDE, D.; GALLO, R. C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**. v. 218, n. 4572, p. 571-573, 1982.

KARLIN, S.; ALTSCHUL, S. F. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 87, n. 6, p. 2264-2268, 1990.

KAZANJI, M; GESSAIN, A. Human T-cell Lymphotropic Virus Types I and II (HTLVI/II) in French Guiana: Clinical and Molecular Epidemiology. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 19, n. 5, p. 1227-1240, 2003.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KONTHUR, Z.; WALTER, G. Automation of phage display for high-throughput antibody development. **Targets**. v. 1, n. 1, p. 30-36, 2002.

KUNKEL, D. human T-cell lymphotropic virus, type I. Fotografia. **Encyclopædia Britannica**. [S.D.]. Disponível em: <<http://www.britannica.com/bps/media-view/56772/1/0/0>>. Acesso em: 15/07/2011.

LAFOND, R. E.; LUKEHART, S. A. Biological basis for syphilis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 19, n. 1, p. 29-49, 2006.

LANNES, P.; NEVES, M.; MACHADO, D.; MIANA, L.; SILVA, J.; BASTOS, V. Tropical Spastic Paraparesis – Myelopathy associated to HTLV-I virus: possible physiotherapy strategies to motor rehabilitation. **Revista Neurociências**. v. 14, n. 3, p. 153-160, 2006.

LARKIN, M.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; HIGGINS, D. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**. v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LEPREVOST, F. V. **Produção de anticorpos recombinantes contra proteínas de Trypanosoma cruzi por Phage Display**. Curitiba: Universidade Positivo, 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) – UP, 2006.

LEWIS, D. A.; YOUNG, H. Syphilis. **Sexually Transmitted Infections**. v. 82, p. 13-15, 2006.

LI, Z. J.; CHO, C. H. Development of peptides as potential drugs for cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**. v. 16, n. 10, p. 1180-1189, 2010.

LIMA, T. V. R. **Caracterização sorológica e detecção molecular do HTLV em amostras e pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, Brasil (1996-2005)**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2006. 104p. Dissertação (Mestrado em Patologia das Doenças Tropicais) – Núcleo de Medicina Tropical, UFPA, 2006.

LIU, J. K.; TENG, Q.; GARRITY-MOSES, M.; FEDERICI, T.; TANASE, D.; IMPERIALE, M. J.; BOULIS, N. M. A novel peptide defined through phage display for therapeutic protein and vector neuronal targeting. **Neurobiology of Disease**. v. 19, n. 3, p. 407-418, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Cell structure/function. In: _____ (Eds.). **Brock Biology of Microorganisms**. 10 ed. New Jersey: Pearson Education, 2003. p. 66-81.

MAKVANDI-NEJAD, S.; SHEEDY, C.; VELDHUIS, L.; RICHARD, G.; HALL, J. C. Selection of single chain variable fragment (scFv) antibodies from a hyperimmunized phage display library for the detection of the antibiotic monensin. **Journal of Immunological Methods**. v. 360, n. 1-2, p. 103-118, 2010.

MANNS, A.; HISADA, M.; LA GRENADE, L. Human T-lymphotropic virus type I infection. **Lancet**. v. 353, n. 9168, p. 1951-1958, 1999.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R.; FITZGERALD, G. F. The new phage biology: from genomics to applications. In: MCCRATH, S.; SINDEREN, D. van der (Eds.). **Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology**. Wyomndham: Caister Academic Press, 2007. p. 1-43.

MCCONNELL, S.; KENDALL, M.; REILLY, T.; HOESS R. Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. **Gene**. v. 151, n. 1-2, p.115-118, 1994.

MOGHADDAM, A.; BORGEM, T.; STACY, J.; KAUSMALLY, L.; SIMONSEN, B.; MARVIK, O. J.; BREKKE, O. H.; BRAUNAGEL, M. Identification of scFv antibody fragments that specifically recognize the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine. **Journal of Immunological Methods**. v. 280, n. 1-2, p. 139-155, 2003.

MOURA, J. F. **Caracterização imunoquímica e molecular da fração dermonecrótica do veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia***. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. 146p. Tese (Doutorado em Farmacologia Bioquímica e Molecular) – Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 2005.

MULLICK, C. J.; LIAPPIS, A. P.; BENATOR, D. A.; ROBERTS, A. D.; PARENTI, D. M.; SIMON, G. L. Syphilitic hepatitis in HIV-infected patients: a report of 7 cases and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**. v. 15, n. 39, p. 100-105, 2004.

NAKAMURA, N.; SHUYAMA, A.; HOJVO, S.; SHIMOKAWA, M.; MIYAMOTO, K.; KAWASHIMA, T.; AOSASA, M.; HORIUCHI, H.; FURUSAWA, S.; MATSUDA, H. Establishment of a chicken monoclonal antibody panel against mammalian prion protein. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 66, n. 7, p. 807-814, 2004.

NEW ENGLAND BIOLABS (NEB). **Protein Tools: Ph.D. Phage Display Libraries Instruction Manual**. Ipswich: New England Biolabs, 2009. 44p.

NORRIS, S. J.; WEINSTOCK, G. M. Comparative genomics of spirochetes. In: RADOLF, J. D.; LUKEHART, S. A. (Eds). **Pathogenic *Treponema*: Molecular and Cellular Biology**. Wyomndham: Caister Academic Press, 2006. p. 197-236.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections – overview and estimates**. Geneva: World Health Organization, 2001.

PANDE, J.; SZEWCZYK M. M.; GROVER, A. K. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**. v. 28, n. 6, p. 849-858, 2010.

PARADIS-BLEAU, C.; LLOYD, A.; SANCHAGRIN, F.; CLARKE, T.; BLEWETT, A.; BUGG, T. D. H.; LEVESQUE, R. C. Phage display-derived inhibitor of the essential cell wall biosynthesis enzyme MurF. **BMC Biochemistry**. v. 9, n. 33, p. 1-11, 2008.

PARMLEY, S. F.; SMITH, G. P. Antibody selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**. v. 73, n. 2, p. 305-318, 1988.

PIER, G. B.; LYCZAK, J. B.; WETZLER, L. M. **Immunology, Infection, and Immunity**. Washington: ASM Press. 2004. 742p.

POIESZ, B. J.; DUBE, S.; CHOI, D.; ESTEBAN, E.; FERRER, J.; LEON-PONTE, M.; PEREZ, G. E.; GLASER, J.; DEVARE, S. G.; VALLARI, A. S.; SCHOCHETMAN, G. Comparative performances of an HTLV-I/II EIA and other serologic and PCR assays on samples from persons at risk for HTLV-I/II infection. **Transfusion**. v. 40, n. 8, p. 924-930, 2000.

_____, B. J.; RUSCETTI, F. W.; GAZDAR, A. F.; BUNN, P. A.; MINNA, J. D.; GALLO, R. C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

PORCELLA, S. F.; SCHWAN, T. G. *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*: a comparison of functional genomics, environmental adaptations, and pathogenic mechanisms. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 107, n. 6, p. 651-656, 2001.

POSNER, B.; SMILEY, J.; LEE, I.; BENKOVIC, S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. **Trends in Biochemical Sciences**. v.19, n. 4, p.145-150, 1994.

QUIAGEN. RNeasy Mini Kit for purification of total RNA from animal cells, animal tissues, bacteria, and yeast, and for RNA cleanup. In: _____. **RNeasy Mini Kit**. 4 ed. [S. I.]: QUIAGEN, 2006. 84p.

RADER, C. Generation and selection of rabbit antibody libraries by phage display. **Methods in Molecular Biology**. v. 525, p. 101-128, 2009.

RADOLF, J. D.; HAZLETT, K.; LUKEHART, S. A. Pathogenesis of syphilis. In: RADOLF, J. D.; LUKEHART, S. A. (Eds). **Pathogenic Treponema: Molecular and Cellular Biology**. Wymondham: Caister Academic Press, 2006. p. 197-236.

RADOLF, J. D.; MOOMAW, C.; SLAUGHTER, C. A.; NORGARD, M. W. Penicillin-binding proteins and peptidoglycan of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. **Infection and Immunity**. v. 57, n. 4, p. 1248-1254, 1989.

RAMJIWAN, B.; MAITI, P.; AFTANAS, A.; KAPLAN, H.; FAST, D.; MANTSCH, H.; JACKSON, M. Noninvasive localization of tumors by immunofluorescence imaging using a single chain Fv fragment of a human monoclonal antibody with broad cancer specificity. **Cancer**. v. 89, n. 5, p. 1134-1144, 2000.

RAO, N.; AMBILI, M.; JALA, V.; SUBRAMANYA, H.; SAVITHRI, H. Structure-function relationship in serine hydroxymethyltransferase. **Biochimica et biophysica acta**. v. 1647, n. 1-2. p. 24-29, 2003.

RAY, K.; EMBLETON, M. J.; JAILKHANI, B. L.; BHAN, M. K.; KUMAR, R. Selection of single chain variable fragments (scFv) against the glycoprotein antigen of the rabies virus from a human synthetic scFv phage display library and their fusion with the Fc region of human IgG1. **Clinical & Experimental Immunology**. v. 125, n. 1, p. 94-101, 2001.

RETTNER, I.; ALTHAUS, H. H.; MÜNCH, R.; MÜLLER, W. VBASE2, an integrative V gene database. **Nucleic Acids Research**. v. 33; d. 671-674, 2005.

RIBAS, J. G. R.; MELO, G. C. N. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35, n. 4, p. 377-384, 2002.

RODI, D.; JANES, R.; SANGANEE, H.; HOLTON, R.; WALLACE, B.; MAKOWSKI, L. Screening of a library of phage-displayed peptides identifies human bcl-2 as a taxol-binding protein. **Journal of Molecular Biology**. v. 285, n. 1, p. 197, 203, 1999.

RODRIGO, F. G.; SILVA, A. M. Sífilis. In: _____. (Eds). **Doenças Transmitidas Sexualmente: Dermatologia e Venereologia**. Lisboa: LIBEL, 2003. p. 45-70.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunologia**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2002. 500p.

ROMPALO, A. M.; JOESOEUF, M. R.; O'DONNELL, J. A.; AUGENBRAUN, M.; BRADY, W.; RADOLF, J. D.; JOHNSON, R.; ROLFS, R. T. Clinical manifestations of early syphilis by HIV status and gender: results of the syphilis and HIV study. **Sexually Transmitted Disease**. v. 28, n. 3, p. 158-165, 2001.

ROSAHN, P. Autopsy studies in syphilis. **The Journal of Venereal Disease information**. v. 649, p. 1-67, 1947.

RUBINSTEIN, N. D.; MAYROSE, I.; HALPERIN, D.; YEKUTIELI, D.; GERSHONI, J. M.; PUPKO, T. Computational characterization of B-cell epitopes. **Molecular Immunology**. v. 45, p. 3477-3489, 2008.

RUSSEL, M.; LOWMAN, H. B.; CLACKSON, T. Introduction to phage biology and phage display. In: CLACKSON, T.; LOWMAN, H. (Org.) **Phage display**. Oxford: Oxford Unity Press, 2004. p. 1-26.

SAMBRI, V.; MARANGONI, A.; EYER, C.; REICHHUBER, C.; SOUTSCHEK, E.; NEGOSANTI, M.; D'ANTUONO, A.; CEVENINI, R. Western Immunoblotting with Five *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 8, n. 3, p. 534–539, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SANCHEZ, L.; AYALA, M.; FREYRE, F.; PEDROSO, I.; BELL, H.; FALCON, V.; GAVILONDO, J. V. High cytoplasmatic expression in *E. Coli*, purification, and in vitro refolding of a single chain Fv antibody fragment against the hepatitis B surface antigen. **Journal of Biotechnology** . v. 72, n. 1-2, p. 13-20, 1999.

SANTOS, F. L.; LIMA, F. W. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 41, n. 2, p. 105-116, 2005.

SATO, N. S.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; ZERBINI, L. C. M. S.; SILVEIRA, E. P. R.; MELO, C. S.; UEDA, M. Analysis of *Treponema pallidum* recombinant antigens for diagnosis of syphilis by western blotting technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 41, n.2, p. 115-118, 1999.

SCHOFIELD, D.; POPE, A.; CLEMENTEL, V.; BUCKELL, J.; CHAPPLE, S.; CLARKE, K.; CONQUER, J.; CROFTS, A.; CROWTHER, S.; DYSON, M.; FLACK, G.; GRIFFIN, G.; HOOKS, Y.; HOWAT, W.; KOLB-KOKOCINSKI, A.; KUNZE, S.; MARTIN, C.; MASLEN, G.; MITCHELL, J.; O'SULLIVAN, M.; PERERA, R.; ROAKE, W.; SHADBOLT, S.; VINCENT, K.; WARFORD, A.; WILSON, W.; XIE, J.; MCCAFFERTY, J. Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. **Genome Biology**. v. 8, n. 11, p. R254, 2008.

SCOTT J. K.; SMITH G. P. Searching for peptides ligands with an epitope library. **Science**. v. 249, n. 4967, p. 386-390, 1990.

SHEFFIELD, J. S.; SANCHEZ, P. J.; MORRIS, G.; MABERRY, M.; ZERAY, F.; MCINTIRE, D. D.; WENDEL, G. D. Congenital syphilis after maternal treatment for syphilis during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 186, n. 3, p. 569-573, 2002.

SHIMOTOHNO, K.; TAKAHASHI, Y.; SHIMIZU, N.; GOJOBORI, T.; GOLDE, D. W.; CHEN, I. S.; MIWA, M.; SUGIMURA, T. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 82, n. 10, p. 3101-3105, 1985.

SIDHU, S. S.; KOIDE, S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 17, n. 4, p. 481-487, 2007.

SILVA, F. A.; MEIS, E.; DOBBIN, J. A.; OLIVEIRA, M. S. Adult T cell leukemia-lymphoma in Brasil: epidemiology, treatment and controverstial aspects. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 48, n. 4, p. 585-595, 2002.

SILVA, M. I. M. **Identificação e genotipagem de Treponema pallidum subsp. pallidum em amostras clínicas**. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 2009. 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Departamento de Biologia Vegetal, UNL, 2009.

SKERRA, A.; PLÜCKTHUN, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. **Science**. v. 240, n. 4855, p. 1038-1041, 1988.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**. v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, 1985.

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage Display. **Chemical Reviews**. v. 97, n. 2, p. 391-410, 1997.

SUAREZ, C. B. **Obtenção de peptídeos recombinantes com potencial aplicabilidade para imunodiagnóstico de hepatite B e hepatite C através da técnica de phage display**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2011. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR, 2011.

URUSHIBATA, Y.; ITOH, K.; OHSHIMA, M.; SETO, Y. Generation of Fab fragment-like molecular recognition proteins against staphylococcal enterotoxin B by phage display technology. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 17, n. 11, p. 1708-1717, 2010.

USHA, R.; SAVITHRI, H.; RAO, N. The primary structure of sheep liver cytosolic serine hydroxymethyltransferase and an analysis of the evolutionary relationships among serine hydroxymethyltransferases. **Biochimica et biophysica acta**. v. 1204, n. 1, p. 75-83, 1994.

VARMA, M.; RUDOLPH, D. L.; KNUCHEL, M.; SWITZER, W. M.; HADLOCK, K. G.; VELLIGAN, M.; CHAN, L.; FOUNG, S. K.; LAL, R. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 infections by Western blot (immunoblot) assays containing recombinant glycoproteins. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, n. 12, p. 3239-3244, 1995.

VICO, J. P.; ENGEL, B.; BUIST, W. G.; MAINAR-JAIME, R. C. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. **Zoonoses Public Health**. s. 1, p. 107-114, 2010.

VIEIRA, J.; MESSING, J. Production of single-stranded plasmid DNA. **Methods in Enzymology**. v. 153, p. 3-11, 1987.

VILLARD, S.; LACROIX-DESMAZES, S.; KIEBER-EMMONS, T.; PIQUER, D.; GRAILLY, S.; BENHIDA, A.; KAVERI, S.; SAINT-REMY, J. M.; GRANIER, C. Peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor. **Blood**. v. 102, n. 3, p. 949-952, 2003.

VODNIK, M.; ZAGER, U.; STRUKELJ, B.; LUNDER, M. Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. **Molecules**. v. 16, p. 790-817, 2011.

WANG, L. F.; YU, M. Epitope mapping using phage-display random fragment libraries. **Methods in Molecular Biology**. v. 524, p. 315-332, 2009.

WOOD, C. R.; BOSS, M. A.; KENTEN, J. H.; CALVERT, J. E.; ROBERTS, N. A.; EMTAGE, J. S. The synthesis and in vivo assembly of functional antibodies in yeast. **Nature**. v. 314, n. 6010, p. 446-449, 1985.

WÖRN, A.; PLÜCKTHUN, A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragment. **Journal of Molecular Biology**. v. 305, n. 5, p. 989-1010, 2001.

YELTON, D. B.; LIMBERGER, R. J.; CURCI, K.; MALINOSKY-RUMMELL, F.; SLIVIENSKI, L.; SCHOULS, L. M.; EMDDEN, J. D.; CHARON, N. W. *Treponema phagedenis* encodes and expresses homologs of the *Treponema pallidum* TmpA and TmpB proteins. **Infection and Immunity**. v. 59, n. 10, p. 3685-3693, 1991.

YOUNG, N. M.; MACKENZIE, C. R.; NARANG, S. A.; OOMEN, R. P.; BAENZIGER, J. E. Thermal stabilization of a single-chain Fv antibody fragment by introduction of a disulphide bond. **Federation of European Biochemical Societies Letters**. v. 377, n. 2, p. 135-139, 1995.

ZWICK, M. B.; BONNYCASTLE, L. L.; NOREN, K. A.; VENTURINI, S.; LEONG, E.; BARBAS, C. F.; NOREN, C. J.; SCOTT, J. K. The Maltose-Binding Protein as a Scaffold for Monovalent Display of Peptides Derived from Phage Libraries. **Analytical Biochemistry**. v. 264, n. 1, p. 87-97, 1998.

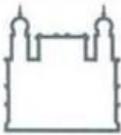
ANEXO A – Especificações do fragmento Fc de IgG humana

Human IgG-Fc fragment			
Catalog No.	P80-104		
Storage:	2 - 8 C		
Amount:	1 ml at 1 mg/ml		
Physical State:	liquid		
Buffer:	Phosphate Buffered Saline containing 0.09% Sodium Azide		
Shelf Life:	1 year from date of receipt		
Production Procedures:	<p>Purified normal human IgG is isolated using fractionation and DEAE chromatography. Fc fragments were produced by papain digestion and affinity chromatography.</p> <p>Protein concentration was determined by extinction coefficient: absorbance at 280 nm of 1.4 equals 1.0 mg of IgG.</p> <p>By immunoelectrophoresis the IgG was shown to 1) react with antiserum specific for human IgG-Fc, 2) not react with antiserum specific for IgA, IgM, kappa or lambda chain and 3) produce a single precipitin arc with antiserum against human serum identical to that produced with anti-IgG-Fc.</p> <p>By ELISA the IgG contains less than 0.1% of the other immunoglobulin classes and light chains kappa and lambda.</p>		
Country of Origin:	USA		
Notes:	<p>Centrifuge tube to remove product from lid.</p> <p>For In vitro laboratory use only. Not for any clinical, therapeutic, or diagnostic use in humans or animals. Not for animal or human consumption.</p> <p>This product may not be resold or modified for resale without the prior written approval of Bethyl Laboratories, Inc.</p>		
Applications:	Used as a positive control in immunoassays. Optimal working dilutions should be determined experimentally by the investigator. Serum or plasma from donor has been tested and found negative for HIV-1 antigen, antibodies for HIV and HCV and non-reactive		
Related Products:	Purified Human IgA, normal serum Purified Human IgG, normal serum Purified Human IgG/Kappa, normal serum Purified Human IgG/Lambda, normal serum Purified Human Fab/Kappa, IgG fragment Purified Human Fab/Lambda, IgG fragment Purified Human Bence Jones Kappa Light Chain Purified Human Bence Jones Lambda Light Chain	P80-102 P80-105 P80-111 P80-112 P80-115 P80-116 P80-126 P80-127	
Product References:	De et al., Mol Endocrinol 20 (10):2528-2538, 2006. Green et al. Cytokine 26 (5):209-216, 2004		
25043 West FM 1097 • Montgomery, TX 77356 800-338-9579 • 936-597-6111 • Fax 866-597-6105 • 936-597-6105 www.bethyl.com • bethyl@bethyl.com			

ANEXO B – Especificações do fragmento Fc5 μ de IgM humana

<i>Antibodies and Antigens are in Our Blood.</i>		Fitzgerald Industries International, Inc. 34 Junction Square Drive Concord MA 01742-3049 USA Tel: 978.371.6446 Fax: 978.371.2266
 Fitzgerald		www.fitzgerald-fii.com E-mail: antibodies@fitzgerald-fii.com
<u>Purified Immunoglobulin Data Sheet</u>		
<u>Product:</u>	<i>Human IgM Fc5mu Fragment (Myeloma)</i>	
<u>Catalog #:</u>	CH0916	
<u>New Catalog #:</u>	31C-CH0916	<u>Grade:</u>
		<u>Purity:</u>
<u>Source:</u>	Prepared from human IgM myeloma protein by digestion with Trypsin followed by column chromatography	
<u>Concentration:</u>	2.0 mg/ml (by UV absorbance at 280 nm)	
<u>Contaminants:</u>	A single precipitin arc was observed against anti - Human IgM Fc5mu, and anti - Human serum when assayed by Immunoelectrophoresis.	
<u>Form:</u>	Supplied as a liquid in 100 mM Tris Chloride and 500 mM Sodium Chloride, pH 8.0, with 0.01% Sodium Azide as a preservative.	
<u>Biohazard:</u>	This product has been tested at serum donor level by an FDA approved methods and found negative for HIV1/2, HCV antibodies and Hepatitis B surface antigen. Since no test can offer complete assurance, handle with precaution.	
<u>Storage:</u>	Store at 4oC for short term. For longer storage mix liquid with an equal volume of glycerol, aliquot contents, and store at -20°C.	
<u>Additional Remarks:</u>	No reaction was observed against anti - Trypsin, anti - Human IgG F(ab') ₂ , anti - Human IgG Fc, anti - Human kappa or anti - Human lambda.	
<u>FOR INVITRO USE ONLY</u>		
CAUTION, not for use in humans or clinical diagnosis: This product is intended for research or manufacturing use only. It is pharmaceutically unrefined, and verification of its suitability for use in humans or as clinical diagnostic reagents and the compliance with all Federal and State laws regulating such applications are the responsibility of the purchaser. There is no expressed or implied warranty. No liability is assumed for fitness of purpose and merchantability, or direct or consequential damages. The user assumes all responsibility for care, custody and control of the material, including its disposal, in accordance with all regulations.		
FM 4.15-4		

ANEXO C – Licença CEUA / FIOCRUZ para manipulação de camundongos

	Ministério da Saúde	
	FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz	Comissão de Ética no Uso de Animais
	Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência	

LICENÇA **LW-15/09**

Certificamos que o protocolo (P-59/09-2), intitulado "**Geração e seleção de anticorpos através da técnica de phage display**", sob a responsabilidade de **DANIELA PARADA PAVONI**, foi aprovado de acordo com os Princípios Éticos no Uso de Animais, atendendo, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Esta licença tem validade até 05/10/2010 e inclui o uso total de:

Mus musculus

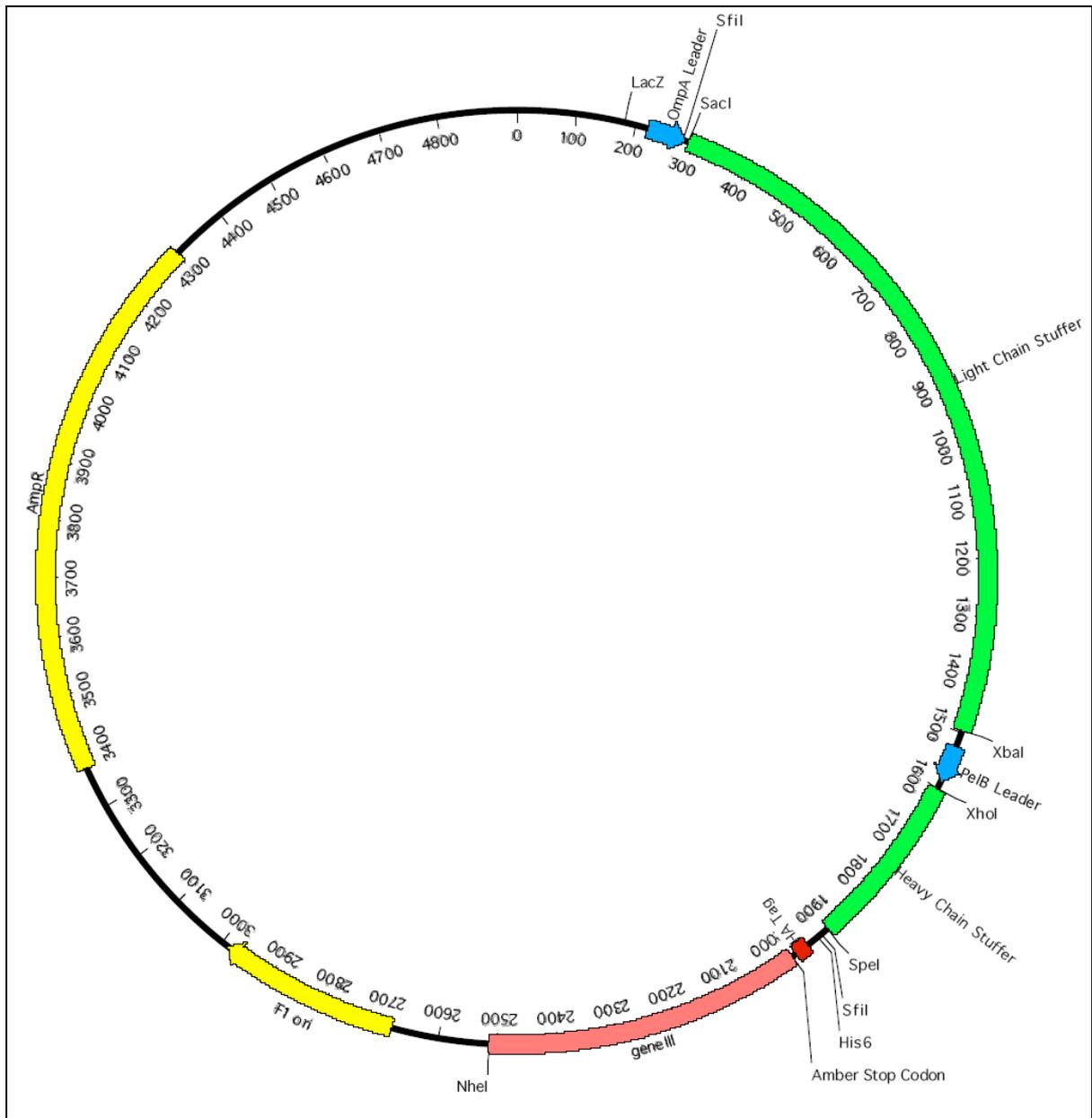
- 4 machos de Swiss Webster, idade: 45 dias, peso: 20 gramas;
- 4 machos de BALB/c, idade: 45 dias, peso: 20 gramas.

Rio de Janeiro, 05 de outubro de 2009.


Dr^a. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

Mapa do fagomídeo pCOMB3X



FONTE: http://www.scripps.edu/mb/barbas/content/pcomb_images/pcomb_images_files/pComb_Maps/pComb3X_Maps.pdf

ANEXO E – Clones isolados da biblioteca de anticorpos scFv L

Sequenciamento realizado pela MACROGEN

1º Sequenciamento – 22 clones

>IGM1-MKLFOMP_950bases

NNANGCNGCTCGCTACGTGGCAGGCGGCCGAGGTGCAGCTGCTCGAGATGAGCGATAAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGA
CACGGATGTACTCAAAGCGGACGCGGGCGATCCTCGTGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTG
GATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCA
TCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTGAGTTGAAAGA
GTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTAGGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGGCGGCTCTG
AGGGAGGCGGTCCGGTGGTGGCTCTGGTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAA
TGCCGATGAAAACGTGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTCTGCTATCGATGGTTTCATT
GGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGTACTGGTGATTTTGTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCCGGTACGGTG
ATAATTCACCTTAAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCGCTTTTGTCTTTGGCGCTGG
TAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAATTTATTCGGTGTGCTTTTGCCTTTCTTTTATA

>IGM2-MKLFOMP_626bases

TGNNATNNNAANNTAGNNNGTTAAGCGGTTCTTTGTAGTCTTCTCCAAGGGCCCCACTAACAGTCAATTCCGAAAACCTTCCCCCGA
AGGAGGACCAACTGTATATTCAGGGGGGAAAATATTATTTGGGAACCGCGGGCATAATTGCCCGTAAACATGATACTAGAAAGTAGCTT
CTTCCGCTTCTTCGGCTAGTGTAGTTCTTCAGGGAAAGGGGATGAGTATTGTGTTTCTAACACCTCAATACATGCGTTCGTATGTAT
GGCCAGCTTTCCGCATTACCACATGTTTGGAGTAAATGACATTTGGAGTTGCCCTCCGGTAGTAGGAGACCAACCGCGGCTGGCGACT
CAACACATATCCGATCCTGGTGGAAAGATTATGATAGAATGACCTATCTCTGTTAAGTCTTTGTTGGTGGGTTTCTGGTAGATAACCA
GGTGGTCCGCATATGGTTTAGTTGGATAGATTATATCGTTGAATTGAGGAAGAAGGCTGTGCTTTTGACACCTGCCCTTGAATCTAT
CTGAGAAAACCTCCCTTCTGTAACCGTGCAGACGCTTAGCAGGTATCCACGGCTTTTGTGTTGATTTTATTAAGGAGAGAGTATATCCGA
GGCAAGGGAA

>IGM3-MKLFOMP_950bases

NNNNANNNNGNNGCTTCGCTCCGTGGCCAGGCGGCCGAGGTGCAGCTGCTCGAGATGAGCGATAAAAATTATTCACCTGACTGACGACAG
TTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGCGGGCGATCCTCGTGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCG
ATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAAT
ATGGCATCCGTGGTATCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACCGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGTTCAGTT
GAAAGATTTCTCGACGCTAACCTGGCGTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTACTAGTGGCCAGGCGCCGACGACCATCAC
CATCACCATGGCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTAGGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGGCG
GCTCTGAGGGAGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGAC
CGAAAATGCCGATGAAAACGTGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGTGCTATCGATGGT
TTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGTACTGGTGATTTTGTGGCTCTAATCCCAAATGGCTCAAGTCCGGT
ACGGTGATAATTCACCTTAAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCGCTTTTGTCTTTGG
CGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAATTTATTTNGTGNNGTCTTTGCGTTTC

>IGM4-MKLFOMP_925bases

GGNANNTGGCCNNTCCCCCTAGGGAATGCCTCAATTAACCCCTGCCCTGATTTACAGTTTTTATTTGATCATGAGTTGCAGTTAG
TCAAAAATGGCAAAGGTCCTAAAAACATTTTTACCCCAAGCCCTAGCACTTGAAGGGAAGACTGACCAAAAAAGCTCTTGAATTTG
ACCATGATCTTAAAGCTTCTTTGACCAGTTTATAAGCCCCACCCTCATGGGAGTGGCCCTGTAGCCGTTGCCCTCTTCTTTCCACTCG
CCCTATTCATCTCCCCCTCAATTAATGAATAAAAAACCGAGTTGTTACCTGGAAAGCTGGTGCACCAATCACAAATACCCACAACCT
CTTTCTGCCGCTAAACCCCAAGGGCCCCAAAAGATCTTAAATAATATCCCTGCTTGTGTTATTGTTTTTCTTTTAAATAATAAGTT
TTCCTATATACTTTTACCCCAACACCCCAATCTCAAAAATATAAGAATTGCTATCCCCCTTTGAATTTATACGTTATTAATGGT
GCATACTCAACAAACCCCGCCACTTTCATCTCCTACTATAAGAGGAAAGACACATAGTGTCTTCTCCCTACATGTTATTATATAAAA
ACCAATATATTTTTACCACCCTGCTATGACTGGGGAGTACGATTAACACACCTCATCGCTGCTGGCTAGTTTGTACTTCTCCCCAC
AACAGCAGTAGTGTACTGCTTCCGTCCATGATGCTCGCATGCACACTTGTGGCTGGCGTCCCTACTAACACATACTTAATAAAA
AGAGCAAGCGCCATCCACCATTAACCTTATTTACTTTTATTCTATTGTACTGACACGAAAATGAATAAATCAACAAGCAAACGCAT
GTCTTTCGTATATAGACACNAATCACAGACCACAAAACAAACCAT

>IGM5-MKLFOMP_911bases

NNNNNNNAANNNTTTNATAGGNGGTTCTTNNAAATCNTCTCCCAAACCCAGAAAACAGTGAAGTACAAGACGTAGGCTTGGATGAT
GGGAACTGGAAGTTCTAATAGAATAAGGTTAATAGGAGACCGCGGACCACAATTTGTTGGCAGCATTTTTTCCGGGGTGAATACAAAT
ACCGTGGTGAAGGAAATGAATTTAAACATGGCCCGCTTGAAGGATTTGTTGTAACACCCCCCAAGGCCATGGTTCGAAAAAAA
GGTTATGGGTTTTAATAAAAAACAAGATTGGGAAAAAAAACACTGTGGCTCCCTGGGGTATGAACCAAGATGGGGGGGGGGTGG
TTCATTAGGCCAAAAACAGCTCTCTTATCTTTGGGGAGTGCAACCTCTATATTTTTTTATGGGGGGGGGGGGGGTGAAGGAATAAA
ATGGAGGAGAGGGTACTAAGATGAGGGGTAGCAATAAAACATGCAGGGAAAAGGAAAATAGAGCACCTTTGTGCCCCCGCGATTTAG
CGACGAAAGCTGTTGTGCTTTGTGCGTTTTTCCGCCCTCTTTTCGAGACAGCGACTCCTCTGATTTTTTTTATTTTTGAAGAGGACATT
ATTTCAATGGAAGGAAGAAAACACCCGCTCCCGCTCCCCACGCGGGGGGGGGGGTGAATTTGTTGACCAGAAAAGACCCACA
GATTCATCATCTACTTTTTGTTATTTCTTCCNCCCGCGCAGGGGGGGGGGGTATGTGATTAATAAATTTCTTCTGGCTT
TTTGACCAACAAGACTGGACACAATACATTTCTGTATATGAGGAGGCGGGGATAGGTTAGGTTGTGGCTATTGGTGGTAGTTCGCGCG
GAGTCTACAGCCCCCTACCTTCTTTGTATA

>IGM6-MKLFOMP_950bases

GNNCANNCNTCCCTCGCTNCNNNGCGNCAGGCGGCCGAGGTGCAGCTGCTCGAGATGAGCGATAAAAATTATTCACCTGACTGACGAC
 AGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCCTGCGTCCGTGCAAAATGATCGCCC
 CGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAACCCCTGGCACTGCGCCGAA
 ATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTGAG
 TTGAAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCGTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTCTACTAGTGGCCAGGCCGGCCAGCACCATC
 ACCATCACCATGGCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTAGGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGG
 CGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCGGTGGTGGCTCTGGTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCCAACGCTAATAAGGGGGCTAT
 GACCGAAAATGCCGATGAAAACGTGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTGATTCTGTGCTACTGATTACCGTGTCTGATCGAT
 GGTTCCTTGCCTGACCTTTCCCGGCTCCTGCCAATGGTAAATGGTGCCTACTGGTGATTTTGTCTGCTCTCATTTCTCAAATGGCTCCA
 GTCGGTGACGGTGATAACTCACCCCTAACGAACAACCTCCCTCCACATTTACCTCTCCCTCCCCCGATCCGGATGAATGTGCCC
 CTCTTGACTTTCTGCTGTTGAAACCACACTCAATTTTCCATTGATTGGACCAAACCTAAACTATTTCCG

>IGM7-MKLFOMP_950bases

NNAGNNNNNATCGCTCCGCTGGCCAGGCGGCCGAGGTGCAGCTGCTCGAGATGAGCGATAAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTT
 TTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCCTGCGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGAT
 TCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAATAT
 GGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTGAGTTGA
 AAGATTCTCGACGCTAACCTGGCGTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTCTACTAGTGGCCAGGCCGGCCAGCACCATCACCAT
 TCACCATGGCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTAGGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGGCGGC
 TCTGAGGGAGGCGGTTCGGTGGTGGCTCTGGCTCCCGCGATTTTGATTATGAAAAGATGGCCCACCCTAATAAGGGGGCTATGACC
 CGAAAATGCCCATGAAAACGTGCTACGCTGACGCTAAAGGCAAACCTGATTCTGCCCCCTACCGATTACNGTGTGCTATCGATGGT
 TCCTTGGTGACGTTTCCCGCTTGCTAAATGGNATGGCGCTCCCGCGACTCTCCCGGCTCTAATTCCAAATGGCCCAAGTCCGGGA
 CGGTGATAATCCCTTAAACGAATAATTTCCGTCATTATTTACCTTCCCAACCTCGATCCGGTGAATGCCCTCCCTTTTGTCTTT
 CGCGCTCGTCAGACTACAGAATTCCTCTTTGTTTGTGACAAAATAACTTTATTCCTGNGGCTTTG

>IGM8-MKLFOMP_604bases

CNNNNNNNNNNCCNCCCGCTATTGAANGCCTCATTTAAACCCCTGCCCCCTGATTAACATTTTTTTTTGGTTCATGACTGGCCCAATA
 GGCTTATTGCCAAGCCCTAAAAAAAATTTTAAACCCCGCCCTAGCACTTGAAGGGAAGACTGTCCAAAAGGCTCTTGAATT
 TGACCATGATCTTAAGCTTCTTTGACCAATTTAAAAAACCCTTTCATGGGAATGACCCGGTTAACAGGTGCCCTCTTCTTTCCAAT
 GGGCTCTATTCTATCCTCCCTCAAATGATGAGAAAACAAACGAAGTGGTACCTGGAAGGAGGTGGAACCTACCATTATACACCACC
 TCTTTTCTGCTGTAAACCCCGGGGGCAAAAAGATCTTATGTTTACCCCTGCTTGTGTTATAGCTATCCCTCATCAACAATG
 AACTCCCCCATATTTTTTTTACCCCAACCCCTTCTAATAAATAAAGGACTTTCCCCCTTTTAAATACAGAGGTTATT
 GTGGTAGATGACCAACCCACCGCCCGCCCGGGGTTTTTTTACTACAGGGGAGAGGAAAAGGTTGGTGTGCTCT

>IGM9-MKLFOMP_950bases

TNNCGNNGNNGCCTTGCTGCGAGGCCANGGGCGAGTCCGCTGGTCTGGTGGGATATGATCTAGACCTGAATGAAATTATTTCTG
 ACTGATGACCTCTTTGAGGAGATGTACATCCTCGGGAATTTCTGATCCTCGTCCATTTCTGGTGGAAAATGATCGCCCCGATTTCTGG
 ATAAATCCGATCTGGATGAAATCGCTGAGAATATTGGGGCTGAGATGTTGCCAAAACCTGGATCTGGCAAAACTAGGCCCCGTGGA
 AATATGACTTTGCTGGTGTTCGACTCTGCTGCTGTTGAAAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGGGTGCACTGAGAGTTCTCGA
 TTGAACCTGGCTACCCGCTAAACTGGCCGACTGTACGACTTTCCGGACTACGGTCTACTAGTGCATCGGCCGGCCATGGCATCAC
 CATCTACCAGGTTCCGAACCGTACTACTTAGGAGGGTGGTGTCTTCTAAGAGGGGGGGGCTGAGAGGGGGGGGCTGAGAGAGGGGGG
 TCCCTGAGGGAGTCTGGTCCCGGGGAGTTTGTGGTCCGGTGATTTTGATTATGAATAAGAGGGGCTATGACCAAAAAGGGCCTATAA
 CCCAAAATGCCGACGAACCTTGCTACAAACCTGACTTAAACGCTAACGAGATCTGTCTGCTACTGAATGGTGTGCTTGTCTATACG
 TGCTTGTGNGACGNCTAGTGGCCCTGCTAGTGGAAATGGCTGTCTCGAAGACTTTGCTGGCTCCAATTCGTGAATGTGATAAGTC
 CCTGACAGTGATAATCCCTTAAATGTATACCTTCCCTCCATAAATACCTTGACTGCCCTCCCTTGTGTGAATGGCGCTGCTTTTAC
 CCTTTGGAATCTGTCAATCCATTGGGATTTTCTATTGATTGTGACGGAAGACTTTGACTTCCCTGTTGTA

>IGM10-MKLFOMP_950bases

NNNNNNNNNNCCCTCGCTCCGCTGGCAGGCGGCCGAGGTGCAGCTGCTCGAGATGAGCGATAAAAATTATTCACCTGACTGACAACAGTTT
 TGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCCATTTCTGGGCAGAGTGGTGCCTGCGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGAT
 CTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAACCCCTGGCACTGCCCCGAAATATG
 GCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGAGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTGAGTTGAA
 AGATTCTCGACGCTAACCTGGCGTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTCTACTAGTGGCCAGGCCGGCCAGCACCATCACCAT
 CACCATGGCGCATACCCGTACCACGTTCCGGACTACGCTTCTTAGGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGGCGGCT
 CTGAGGGAGGCGGATCCGGTGGCGGCTCTGGTCCGGTGACTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGA
 AAATGCCCATGAAAACGTGCTACCGTCTGACGCTGAAGGTAACCTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTGCTATCGATGGCTTC
 ATTGGCGACGTTTACGGCTTGTCTATGGTAATGGTGTGCTGCTGATTTTGTCTGTCTAATTCCAAATGGCTACGGTTCGGAGA
 CCGTGATAATGCACCCTCTCAATGAATAAATTTCCCTCAATATACACTTCCCTCCCTCCACCCGGAATGAATGTGCACCCTT
 TGCTCTGGCTNTTGGGCAACGCATAACGCATTTTACATTTGATTGGGACCGAAAAACCTAATCCCGT

>IGM11-MKLFOMP_596bases

NNNNNTNCCNNTGNATNTTGGGGGTATTTTAGAATCCTTCTCCANGCCCTAAAAAAGTGAAGTCAAAGCGTTGCCTTTGAT
 TAAAGGAACTGAAATTTTATAGAATAAAGTTAATAGGAAAGCAGGCCCAACAATTCGTTGCGAGCTTTTATTCGGAATGAAGAC
 AAAATCCGGTTGTTGAGGAAATTTGAATTAACAATGGCCCTCTGTAAGGTTTGGTGTAAATCGAACCTCTTGCATGGTGAATAA
 AAAGCCTATTGGTTTTAATAAACAAGTATGGGGATTAACAATTTGTTTCCCGCTCGTGGTAGGGGACAAAAGTGGCGGTGGT
 GTTTTATTTTGCACAAAAGCCCTTCGTATCTTATAGAGAGTAGCAACCTATATTTTTTGGATTTGTTGGGTGGGTGTGAAATAA
 ATTTGGGAGGACGCTCTATTTGAGCGACGAAACAATCACACCTAGAAAAGGAAAAATGATCCCTTATCTGTGCGCGGGGGGGAA
 ACAGGCACGAAGATGTTTTGTGTTGGCACGGCGCCCACTTTTATAGAGAAAAACTCTGGTTTTT

>IGM12-MKLFOMP_577bases

GNNNNNGNCCNATCAACNTTTTTTTGAAAGGGNCCCNCAAACCTGGCTTTCGCCAGAAATTTTCATGGCTAAGGATTCGTGAATAAC
ATCCTTGTGACGGGGCCAGGAGATCCTTTTCGGATTTACC CGGGTCTTTCACGGTATTGTATAAAAAGAGGTATTGTGTGTGGCTGA
TCGAAATATTTTGTGCCCTTTAAAATCCCCGTACCAATAGGTTCTTCATAAAATTTGACCTTTTGTATTGTGAATCAGCATTCCTTTT
TTTTCTAAACATCGTTTTTAATTAGGGATTAACCCCTTTGGGGCCTGGCTGACACGGACTTTCCCCGAAAAATCAAGGGGTGGTCT
GGGGCTAAAAATTTTACAAAATTTCTGCCCTTAGTAGATGCTTCTCGGCACTAATCAATATGACGGCTTTTAAATTCGGGTTC
AAGGGAAATTCCTTCTCGTTCGAAGTAGGGATGCTTTTTCTTTAAATTTCCGGAGGATTAGGGGTTTTTGACCAACGTCCCCGA
GCCTTACCCCAATAAAAATATTATGTCTTTTTTCTGACTTCAATA

>IGM13-MKLFOMP_693bases

NNNNANTNAAAAATGGGTNGGGCCGAATNGTCCACCATTCTTCTNNTTTTTCCAATAAGGTTTCTCCAATAGAAAAAAGGAAGA
GTAGTCCACGGACGGAAGGGTAATATTACCGCATATACGGATTTGTCTACGATATGATTACCAAATAGTTTTAACACCGGTTGTAA
GAGAAATTTGTGTCTTTATCGGAAATGTCAAATCAGGGTGGTTCGCATCACTATTCCATTTTGGCTGGGAGTGGGGCTAACCTTTT
GTCGAAAGAGATTTACTTAAAAACAATTAATTAGTTTATAAGGCACTCGAAACCAACAGATTCTCAGCAGTAAAAATAATTCGTA
CCTGGGCCACTATTATTTTAGAACCTTCTCGGGCCATCATCGATATTACTAGCCCCCGGTGATATCGAGGTGGTTTCAAGTCC
GGTCACAGAGAAGTCTATCTTAAATGACCAACTCCAGAAGACATATACTTATGTCTAGCCCTATTATATTTTCAATCTTGACCTAATCC
TCTGCAATCCCCATAAGCCCTCACCAGCCACCCTTCCATTACGTGAAGTGTACAGACTTCTTAAAGATTTTTCGGGGTGAGGAAA
CAACTCTCATGAATGCACACCGACACGGCAGTTAGACACGGATTAGAGCTCAGCTCCATTTATCCGATATCTCC

>IGM14-MKLFOMP_594bases

ANNNNNNNNTNCCNCGNCCATTCCAGGTTTTGGGAGCNCCTTTAAATTTTTTNNNGCNAAGGATTTNTTTTTATNCGGAGGCNG
NNGCGNNNNNGGATGGCTCCAGAAAGTAGCTCACCCCTTCGCCCGGGGCACTCTCACGACAAAATAATAAAAAAAGTAGTCTCTTTA
CCCCGAAACAAGAACTTTTTCTTGTTCCTTCCAAAAAACCTTACCCCCGAGGGTGGGGCTTCATAAAATGTGACCGCTTTGAATGGG
AATGTGCATTTAGTTTTCTCGAAAAACATCGTCTAATTACAGATTAATCCTGTGGAACTGGCTGAACGAACCCATTTTAAAGG
GAAAAACGAAGTCTGGACGGGGCGAAATTAATAATTTAGACAAACTTCCCCGGCCCTCGAAGGGCCTTCCCGCCTAAGTCCAAA
ACCAAGTAAACCAATCCTGGTTTTCAGGGGAACTCATTTCATTAATAAATGGAAAGGCTCCTCCTTAATTTCCGGGCAGAAATA
TTGGGTTTTGGGCTCCAACCGGCCGAGGGCTAATACCAATAACCAACAATTTTTTGATTTTTT

>IGM15-MKLFOMP_930bases

GNNNCCANNCAANNACATTTTTCCGCTCTGCAACCAAACCTCCCGATAGCCAATAAGNGTTNCCCTCCATATGGAATTTACGGGA
GACCTTATTTCCGGAGCCGAGGCTCTATTTCTTATAAACCGGCTCCTCGCTACAATATTATGACTGGAATAGTCTAATTACGGGGA
AGAAATGTATTTATGGTCTCTTAAAAAATAGAAGACTATTTGGTCTTATCCATTTTTCCATATCTGAATGTGAATTTGTCTTAC
TTTTCTTGAACACGTTCTTCTTATAAACGATTAACATCCTTCGGAGCCTTTCTTGAACGAACACATTTTATGAAAAAATAACA
TCTTGAACCTGGGGCAAAATTTTTCAGAGGACTTTATGGGCTTCAAGGATCCTTCTTGACCATGTTTCGATAACAAGGATTCG
AATCTGGGTTCTAGGGAACTCATTTTTTGATGAAGAAATGGAAATGCCACTTAGTAAATTTCTGGCAATATTATTTAATTTTTGGT
CTCACCTGTTCAAGTATCGCTATAAACCCATTACAAACCTTTTCAATTTGCTGGGTTATCTTTCAAGAGTCTAAAAAATTCCTCC
GGGGGTAAAGGAACCAATGCTAAATGATTCTCTCCTAAGTGGGATATTCTTTACTAAGAAAATTTGAAAACCTAGTCCCCCAAT
TATTCCTCTTGTTCNACCTTTGTCTAAAAGCTTAATTTTTGTACCGTATCCCGGGCCTCCGATTACTAAGCCNATTTGGGACCGATTT
ACCAGATTGGGATATTATAAACGATTGGCCGGATATGTAGAAATCTTCTCTACTATCATAGGGGATCCTCAAAAAACGAGAGTT
TGTCCCTAAGAAGTATATACTCCACCGCTCTGTAGGGCAAGAGAAAAA

>IGM16-MKLFOMP_950bases

NNNNNNNNNGCTCGCTACGTGGCAGGCGCGAGGTGCAGCTGCTCGAGATGAGCGATAAAATATTACCTGACTGACGACAGTTTT
GACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGGATCCTCGTCGATTTCTGGGAGAGTGGTGGGTCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTC
TGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAAACCTGGCACTGCGCCGAAATATGG
CATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTGAGTTGAAA
GAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTACCCGAACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTACTAGTGCCAGGCGGGTCAACCATCACCATC
ACCATGGCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTAGGAGGGTGGTGGCTTTGAGGGTGGCGGGCCTGATGGTGTTCGTTT
CTGAGGGAGGGCGTCCCGGGCCGATCTGCTTATTATCAAATGATCTTGAATGATCGGAAACCTCATTCAAGGTGCTCTAAAACG
ATCTTCCCCAGGAAACATCCTATGCTATGACGCTCATTGCCAAATGGGTATTTTTACCAACAGATTTAGAGAGCTTCTTCTCCAAG
ATTCTCGGGGACGATCCTCGGTCTAGAGCTAAGGTTTTGTGCCGATCCGGGATCGGCTGACTCAACCCATTTGGGCCATTTAT
CAGATAGTGATATATTATCGATTTGGCCGGATATGTAGAAATCTTCTCCTATCATACTGGATCTCAAGAAAACACGCCCTTGT
TTCGATGAGGCTCTCCCCACTCTCGACTAACCCACAGAATGGGACNAATTGACTTATTCCTGGG

>IGM17-MKLFOMP_702bases

GNNNNNGTCTTTACTTTTTTTCGGGAGGCGCTTAAAACCGGGCCCGCTTCAGATCAGTTTATGGCTTCTGACGATCCGGGGGTGG
AGCTGGAGGCTGACCTCTCAAGAGCATTTTACCCTGTCTGGGACCTACTATCATTATAATCCTTCCATTAGTTATCTTTCAACGTT
CCAACAAAAATACTTGTATGCCTCAAAAACCTCGGGTTCGCCGGGTAATGCATTAAAAAAGGACAAATTTTATCGGAAGGTGCGGG
TACAGTTGGGGGGAACCTGCTTGGAGAAAAACGATTAATAGGTTATATGCCATGGGAGGTTACAATCTGAACACACCCGGTAC
TTGCCGAACGTCGGTATATGAAGTCTTTATACTTCTTCCACCCCGGGTGGTGGTATAGGTTGGCAAGCATTTCTCATGCTT
ATATGGAGGATATGAAATGGATGTTCCGGACCTTCTTCTTAGAAGCTGGTGGCATGATCGTTCTTTTGTAAACCGGGGATCCT
CGGGCTCCGTCTTTGGGGATACATCTCCGACCAACTATAGATTAAGAAAAGGGGAATGGCACACTGGCTTCTACGATCGAGGAG
GAAGAGGAAACACCCGTTACTCACAGAGGCTATGAGTCTATGTTCCGGTTCGCNCTACAAAAACGTTGCTTGTCCCGGCTTC

>IGM18-MKLFOMP_841bases

NNNNNNNCCNNNNNTCNNNNNTNNNNNNNNGNNNNNNNNNTNNNNNCCNNNNNNTAGATCNAGAANACTANNNNNGANNNAGAGATAAACGGAA
AATTACATAACCCGAAAAATGAATTTATTTTTCTAAGAAGCTAAAAATATTTTGGTTCTTACATCATCTTGTGTATCTGAATGTG
AATTTGTATTAGTTTTTCTCGAACACAATCTTCTTATTTACGATTAAGATCTTTTGGAGCCTTTCTTGAACGAACAGATTTTTATGG
AAAAATAGAACATCTTGTACTGGGCCGAAATTAATATAGGAAGACTTTATGGGTCTTCAAAGATCCTTGCATGCATATGTTTCGATAT
CAAGGTATATCGATTCTGGGTTCAGGGGAACATATTTTCTGATGAAGAAATGGAAATGCCACTTTGTATATTTCTGGCCACAATATT
TTCATTTTTGGTCTCAACCCGTACTGGATCGCTATAAAGCACATTATCCAACATTTCTTTCCATTTTGGGGGGTATGTTTTCAAGTGT
ACTAAGAGATTTCTCCGCGGTGAGGGAAACAAATGCTAGAGAAATTCATTTCTCATGGGTATTTTTACTAAGGAATTTTGATACCTTA
GTCCCATTAATTCCTCGTTGTTCCATCATTGTCTAAAGTTAAATTTTGTACCGTATCCAGGCATCCTATTTGGTAAGCCGATTTGGACC
GATTTATCATATTGTGATATTATTAATCGATTTGGCCGGGATATGTATAAATCTTCTCACATCATAGTGGATCCTCAAAAAAACGA
GTTTCGATCGAATGAGTAGATACTCGCNGTCATTATAGGGCAAAGAAA

>IGM19-MKLFOMP_905bases

NNNNNTNNNCCNANAGCNCAACGGTAGTGAAAGCCCATAAAATTTGCTTCCNCATTAAGGTTTTANNGGATAAGGCGGGGAAAAATA
GGACTAATGCCAAGGACCCAGAAAGATCCTTACTCAAGCCCCGTGGCACTTTCTATGAAAAAAGAATTAAGATATTTATCTTTCTACGC
TGAACAAAAATACCTGTGTGCATCTAAAAAATCCCGTTCCCGGGGTGGTGTATGATAAATGGAGAAATTTTGTATGAGGGTGGCGTT
TACGTGTGCGGGAAATGAATTTCTAAAAAACCGATTAGATCCTTATGACGCTTCCGCGAATACAATTTCTGAACACGGAAACTAAA
AACCGAAGGTCTGGGGCCAAAATATAGAACTTCATTTTTTGGCTCCCGGGTCCCTCCCTGGACCAAGGTCCAAAACGCCTCACAT
CGACTTTGGTTCAACGGGAACCCATTTCTGATGGAAAAGGGGAAGGGCCCTCCTTAAATTCGGGGCGAATAAATTTGGTTTTGGGA
CCAACCCGCCCCATCCTTTGTCCCCATTAACAAAAAGAACTTCAATTTTGGGCCCAATATCGGGTAATAAAAAATACATCCCGTGA
GACGAAAACTGGATAAAGGGCTTTTGACAAAGGTACCTCTCGGAGGAAGTTGAGATACCAAAACCCCCCATATCCCCCGTGTGAT
ACATGGGTACATAGGCTAAAGTTGGTCCGCTATCCGGGTGGCGATTATACTACTACAATTTGGACCCTTATACAAAAATGGGGGATATC
ATCATCCTTTTCGCCCCGGTTGTACAAATCTTCCACGATCATAGAGGATCCTCAGAAACGCACAGTCGTGCCTCCGATCTACTCT
NCTCACTNTCGAAAAA

>IGM20-MKLFOMP_950bases

NNNNNNACCTGCCTTGGCTACCGNGCGCNCGCCGCGACGTCAGCTGTCGAGATGAGCGATAATTTATTCACNTGNNAGGGGCAGT
TCGACCGGATGTCTCCAAGCGGACGGGGCTTCTCCTCGTCGATTTCTGGGCCAGTGGTGCCTCCGTCAAAAATGATCCCCCGACT
CTGGATGAAATCGTACGATTTCTTCCGGCAAACCTGACCGTGCAGAACTGATCATCTATCAAACCCCTGGTTCTGCCCAAATATG
GCTTCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAAACGGTGAAGTGGTGGCAACCAAGGTGGGGGCACTGTCTAAAGGACAGTTGAA
AGAGTTCCCCGACGCTGACCTGGCGTACCCGTACGACGCTCCGGACTACCGTTCTACTAGCGGCCAGGCCGCGCCAGCACCATCACCAT
CACCATGGCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGTTCTTAGGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCT
CTGAGGGAGGGCGCTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGAATTTGATTATGAACAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGA
ATATGCCGATGAAACGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTGATTTCTGTCGCTACTGATTACGGTGTGCTATCGATGGTTTC
ACTGTGACGCTTCCGGCTCGCTAATGGTAATGGTGTACTGCGATTTTGTGGCTCTAATTTCCCAATGGCTCAAGTTCGGTGCAG
GTGATAATTCACCTTAATGAATAATTTCCGTCCATATTTATCTCTCCCTCTCTCAATCGGGTGAATGTACCCCTTTTGTCTTTGG
CGCTGTTAACTCTACGAATTTTTCTATTGATTGTGACAAAATTAACCTTATTTCCGGGTGCTTTTGCCTT

>IGM21-MKLFOMP_950bases

NNNNNCCNCCGCTCGCTACGTGGCAGCGGCCGAGGTGCAGCTGCTCGAGATGAGCGATAAAATATTCACCTGACTGACGACAGTTT
TGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCCTCCGTCAAAAATGATCGCCCCGATT
CTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTGCAGAACTGAACATCGATCAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAATATG
GCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTGAGTTGAA
AGAGTTCCCTCGACGCTAACCTGGCGTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTACTAGTGGCCAGGCCGCGCCAGCACCATCACCAT
CACCATGGCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGTTCTTAGGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCT
CTGAGGGAGGGCGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGAATTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGA
AAATGCCGATGAAAACGCTGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTGCTATCGATGGTTTC
ATTGGTGACGTTTCCGGCTTGTAAATGGTAATGGTGTACTGTTGATTTTGTGGCTCTAATTTCCCAATGGCTCAAGTTCGGTGCAG
GTGATAATTCACCTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTGAATGTACCCCTTTTGTCTTTGGCGC
TGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATTAACCTTATTTCCCGTNGTCTTTTGCCTTTCTT

>IGM25-MKLFOMP_593bases

NNNGTNNNNNACCCNCTCCTTANNNAAGGTGGCTATGACTGGTGTGCCATCGGACGTGATGATGGAGTCTTGGAGTGGAGGG
TGCATGGTGGTGGAGGAAGCATGAAGTTGAAGCATCTCTCTCTCCCTCCCCCTACTCTCTCCAATCTCTTCCCTGGTGTGTTGA
GATTGACTAAGTGGGAAAAATCTTGGAGCCCTTTTATACTTCCAACCCCTAATCGAACACGCGTTTCTTCCGGACTGTCATCTTT
CAAATGCGGTTCCCGCACCCCGCCACTTGTCTGAAGAAAAACCAAGAAGTTACGCGGTGGCTCCGGGATTATGAGTACCACCC
ACCCGCACTTGGCGAAAAATCGGGCGTTCACCCCTTTTTAGTGTACAACGCGTAGATGTTACATCCGTTACTTTGTAAGGGTTTC
GTCCTCCTTTTTAAGGAGATCAAATGGATGTTTCATGTACCCTTACTTAGAACTCCCCCCATGCTCGGTTACTTACGTTATCTCATG
GATTCCTTGGTCCCTCCTGCGGATCCAATTTCCGTACCAACTAAAGGAATGATAGTCTGGT

2º Secuenciamento – 12 clones

>IGM2-MKLFOMP_818bases

ANNNTAANAATAAACGGNTGGCTCGGAGGGGTCAGCGGGCCTACTTCCGCCACCGGGGTTGCTCCCGATTTCCGGTCTGGCCCGACCAA
GAGTTGCCCAGAATTTTGTGGACGAGACCTCCAACCAGTCGGGGTACGCGGAGTCCAAGCCGCGCACTCACGGCTAGGACAGGGTGAT
TCCCGGTGCAATGGTCCCTGGGTCATTGAGAAGATGGGGACCCTTCCCGGAGTACTGGTCAACTTGATGTTACGAAGACCCGGG
AAAACCCCAAACGGACGGTCCCAAAATCAAGCCCTCGCGCGAAGTCGGGGGCGCTTAATACATAACTCGCACTGGTCAATGAAGGAGC
GGTGATGTCATTACCGAATGTTGTCCTTGTCTCCACCAGGCTTTTGACTCTAAAACCCACTTCTTTTACGAAGTCCAAAACCCGAA
TAGGCGCATGCTGTTCTTGGAGAATGGCAGCAATAGTTAATCTGGGGAGTGGGACTGGTGAAAGGGTGGCGAGAATATTGCTGGC
CTCAACCAAAACAAAAATCGCAAGCAACATTCAATTTGTTGTTTCAGTCATGTTCTCCCTTAAACGAGTGTTCCTCCATGATTTTGTCC
GTATACTGTACATCGAAGGTGTGCTTAATGGGACTCATGCTTTGTGCTGGATAGCTCCACCCTTTAAGACACCCATCTCATATATGGA
CCTTGAGAGTGGAGAGATGGATCAGACGATCTTCTTTTTTCTTCGCTACTGATTTCCGAACCTCTATCTCCCTATCCCTTGTTTTCT
TGATATCGCGTATCTCGCCATATATT

>IGM2-PC3X_696bases

CAGNGNANTGGGAAGGTTGCTCGGCGGGGTTAGCGGCGCCTTCCCCATGGCGGGTGTCTTGTAGTGGGTGAAGCCGTGTTACA
CTGGTCCAGGACTTTTCCGGGAGCCAGTCATTCGGTTCGCGGAACGCGCACCTTAGCTAGCAGAGTCCAGAGTAACATAGGGAAATTC
GCATTGCCATGAGTTCCTAGGTGACTGATGAAGTCGGAGGTGCACACTTGTCTTCGCAATCTGAAGAGTAATGTTTTTTTACACCG
CGGGCCGAAAACCAACAGAACCCCGTGCTAGCCATCCAGGTAAGTTGGTCTTCTATAAACTGGGATATGGGGTATTGGGCGCCG
GTGTTCAATTAACACACTCGAGTCTCTTCCACCCCGGCTTTGACGAAAAGATCCAAGTCTATTCTCTGAAGTCCACTGATTCGAAG
CGATGGCCCGCCTTGGAGAGCGCCGGAATATGTTTTCTGGAGAAGTGGGACTCGTGAAAAGGCCCTCAGATCTTTTGTCTTGTCTG
TTTTTCTTGGCAGGATGCTTCTTTAGCATATTAATTCAGGAGGCTCGCTCTTTTGTGAGTGTCTTTTTTGAAGATGTCTGTCTGCTGT
TGCATAAAAGTGGATATAATGAGTCTTATATTTTTGGTGGATTACAACCTCACCTTTTTTACCATCGCCATCCCACGATT

>IGM3-MKLFOMP_813bases

CTGANAAAATAGNGAGAAAAGAAGNAGGAGTAGACGGGGACACTCCCCATAGAGGGAGCTGATGAGTGGGTCAAGCGAGATCGAGA
GCGTGCAGGTTTGGAGACCGAGACCTCAATCCAACCGGTTACAGAAAAACCTTATATGGCAATCACGTAAACTGACGGAATTTCTC
GGAAACGATGTGGCGGGACCGGCTTAAATCGGGAGGTGAAACTGTCTTCGGCATCCCTGACAGTGTGGCCCGGAGATCCCGGG
AAACTGAAAACCGTCCGTCGCAAAAACCTCGCCCGGGGTAAGTCGGGTCCAGTTAATATCTTATCTGAGGGTCTGCTCGCCGGAAGAG
TTCAATTTGACCAAGCGGTGCAACCAACAGAGGCTTACAGTACGGAACGCCCTCACATTTGAGGCTCTCATCCACGAATATTCGAA
ATCTTTACGAGAGAAAAGTGCGGGAAATTCATCTGGCAGAAGTGGTGTGGAGAAAAGGGCGGTGAGAAATTTGGTACGGGATAATAGG
GGTTTAAACGGGATGCTTCGAGAAAACGGTGA AAAACATTTTTGTTTCTTTTATCGGTTACAGTCCCAGCTGTCTTGAAGTGTGAA
AAGTGCATGATTTAATGTGTCCACATCTTGGCTGGATGCATGCACCCGCTGTGCAACCCCATGCGACTAAGTACGGTTAGNGTAGT
GACCGTCTCTAACCCATCGTGTCTTTTTCCCGCAACAGAAATCCCAACCCCATCGCCTATACTCTTATTTCTTTGATAGCGGGTCA
ATCCCCCTGCGAATGAGTGGG

>IGM3-PC3X_859bases

AATANNAANAGCGANGGTTGGCAGGCGGGGTTAGCGGCCACTTCCCCCCCAGAGGGTGCCTCACGATCGTGTGAAAGTGGGCT
AGAAGCGTCCGAAATTTGGTGGGCGAGACCTCAATCTATCGGTTACAGCTAAACCCAGACCCGCGACCCCAAGAGCTGACAGGATAATTC
CCCATTGCACTGGGTTCCGAGGTAACAATGAAATTTGGAGGTGCAAACTCCCGGAAGTAATCAGAGATCAAGGACCCGAAGACCCGG
GGAAATTTGTAATCCGTCGTCGACAGCCGCGGCTGGCGGTACGCTGGGGAACTTAAAAAAGAGGAGGATAGGAAGTGCCTGACGG
TGGTCACTTAGAGATATCGAGTGCCTGTCAAAAAGCTGTTAAATCAAAAAACCAATTCACTAAAGAACGACGAAAAACGTTTGTAGTCGG
AAATTTTACTTTGGAGAAAGCAACGATTAAGTTAACCGAAAAAAGGAAACAGGAGAAAAGGTGATCACAATTAAGCCGCGGTGATGGAA
AAGCAGAAGTTCGCAACTATGAAAAGTAAATGGCTAGATCTTACCATTAATACGAGTACAGTTCCCGAGCTGTTCTTTGACTGGTCGAT
GCTGGAGAATCGGATGAGGCCACACACCTATGGCTGGAATCTACAACCCGCTCAACACCCCATCTCTTTATGGACGGATTAAGTCG
AGTTGAGGTGGGACGAAAGCGATCGGACATTTTCTTCTGCTCATTTGTAACCCGACCCCTTAGAGCCCTATACCGAGGATTTCTT
GGTAAGGCGCTAAATCCCCCTTGTAGTGTGCGACCCGCGCGAGTGCATCGTGCAGTTGGTACTATC

>IGM4-MKLFOMP_622bases

AGAACNNNAATAAAGAAAAGGAAGAACGGACATACAGTCCGCCATTGAGGTAGCTCATGACGCGTCCCATTCGTCCTC
GCAAGACCCGTCAGGATTTGTCCCGTGACCCCGAGGATTCGCGTACTGCGAAGGTGAAAAGCGCAATCCTGATTACCGCGATTC
GAGGGGGTTCGATGTCCTTCGGACGCGGTAATAGTTATGCGGATGCGGCTCTCGTAGGTATCCCTGACGAAAAATGCCATAATTTCCC
CCGGGATTTGGCAATTTGACACCATGAAAGCAATGCAGAAAACCTCTCTTCCCTTACCCTGGGCTATCTGGGGTCTTCCGGGCAC
TGTTCCAAAAGAAAACCTCGCGTGTCTAGCTAAGATTTCTTATATGTCAGGAACTGCTTCAGTTTGTGGAACCCATAAACTTTGCTCC
CATATGATTTCTGTTAGAAATGTACGAGAATCTCATTTGCGGAAGTGGTTTTGTAGAAGTCCGGATTAAGTTGGACGCGGATTAATA
ATAAACGCCAACCTTCTGTTTGTATTATTAGCAAAATGATTTCTTAGTTCTGGTACTGTGCGCAAGATATTCCTTGAACCCCTCCGA
AAGTAT

>IGM4-PC3X_950bases

NNNGNAAAAGNTAAAAAGGAAGAACGGACATACAGGAAATGTCCTAGCCGTTCCGACAGCTGAGGCGGTGGGGCTAAAGGACGACTT
GCTGCGTGGCGTATGGATACCGTTACCACAAACCCACTGCCGTTACGAAACGACTTATTGTGCCATTCACTCTGTCCTGACCTT
GTGGCGCAGGCGTCTTCCGGATCCGGCAAGACATCGGCCCTTTTGATTTGTCTTCTGCAAGGTATGCCGATCATCGCTGCGGGAAACGC
AAGGGCTTGTGCTTAGTCCCACGCGAGAAGTGGCGATGCAGACGCAAGATCTCAGCAACAACATTTGGCACACATGGGTCCTGCCCC
ATACGCCTCTATTGGAGGAAAGAGCGTGCAAGATGACATCACTCGTTTGGAGCGTGGTGTGCATATTTGTGCTGCGACCCCGAGGACGC
TTGTTGCAAAATGATCACCCGGCGGTCCCTGCGTGAGATTCATCTGAAGAAACTGATTTGGACGACCGGATGACATGTTGGCAAAGG
GTACATGGCCCTCATTCGAGCTTCACTGAGTATTCGCGAGTGTAAAGTATTCTTTGTCTCTCCACAGTTCGCGGTTGGTGTGCTT
GAACGTGACGGAACAAGATCAAACCGCCTGACATATTTCTGACAGAGGAAAAACCCCGTAAGATCCCTTTTCGCAATATTTGGTTT
GGGTGGAGGAGGAAAAAATCAATCTGAAATTTTTCCCACTCTATACCCCTAATCTTCCGCTATGCCCCATGCCCCCTTATTTTTTGTAC
ACCCCTAAAACAGTGGATAAACTCGAGGTAAGAGGATCAGATCTTGAACACGTTTTCTGATTTGCATGGCCGTGTACATGTAGTA
NATCTACCGTTATGACATTTTTCCGAAATTTCCGCGAGGAAAAATCCTAATGCTCATTCACATACTTAC

>IGM5-MKLFOMP_950bases

GNNNNNAAAAGGACAAAAGGCGGGCGGAGAACCCGGCGGAATGCCCCGAGCAGCGGGAGCTCATGCGGGCGCCATAACCCATGTTA
 GGGCCCTTGGGGCCATTGACCCCGTGCCTCAATGCGATGGCGGTACTGCTCACGTGAAAAGGGGAAATCGTTCTTCCGCAAGGCGTC
 GGGCGCCATCTCATTGGGACCTGACCAATAATTCTGGGGAAAGAGACTCGGCTTTTCCCTGACCGATGTGGGGGATAAATTCATC
 CCGGTTTGGCGGGCATGACGCCATGCCTGCAACGCACGAAAACTTATCTTTGCCATACTCTGCGTAAACTGTCCAACCTGCTTGC
 GGGTGTCCAAAAAAAACGGAGCGGGCTAGGGCTAGGGGTCTTATAGGTGGTGGACTGTAGTATTTGTGGTTACCATCATCAAAT
 GACCAATAAGTGAAGAGGCACCCCTGCAGAAGTTACATCATGCCGAGCAAGAAGAGGGGGGCTCAGGCAGGAACATTTCCGTGTTA
 CAGAAACATCAACAGGAAGCAACAAGAATCGAATTAACCTGTATGTCTGATCAGCTATAAAAAGTCCCGAAAAATAAATGAACCCCTT
 AGAAAAACCTAACCGCCGACTCAATAATTGATAAAAAAGAGTACACACGTCCACCCCGTTTCTATGTGCGGTTCGTGTGCAGGGC
 TGCAGAAGCATTTCTGAAAGACTTTCTCAAATAAATATGCCTTCTCATCTCTCATGTCCCTCATATATGTGGTATGCCGCTAAACGCCT
 TCGATGAGCGATAAGTTCACCTCTTCTGCGTCTGCCTTGACAGATTATATAAGTATGATAAGTACCAGTAGCTCGTATCGTAGTCAC
 ATATGAATCGCACTATACCNAAGACAAACTCTTATGGCCATACTAGCTCGANCCGTACTATGCTGCCTT

>IGM5-PC3X_950bases

GNGGATATTAGAAAAGAGGAAGAACGAGAATACAGGGATGTCTTAGCTATTCCATGTCTGAGGAGATGGGGCTTACGGAGGAGTAAGT
 TGTGGCGGTATGGATACCGTGCCACAAAACCGACGGCCGTTCTGAAACGACTTATAGGGCCATCCACTCTTCCCGGGACCCTGTGGC
 GTAGGCGTCTTCCGGATCCGGCAAGCATCGGCCTATTGGATCTGTGCGGTGTAGGTCTGCCAGACAACCGCGCGGAAACCAAGGG
 CTTGTGCTCAGCCCCACCCGAGAATGGCGATGACAGCGCAAGATCTCTGCAACAACATTTGGGCACCCATGGGTCTCGCCGCACACTG
 CTCATAGGAGGAGGAGCGGTGCAAGATGATACCCCGTTTTTGGCCCTGGGTCTGCTTATTGTGCTGGCAGCCCGACCTGTGTTT
 GAAATGTTCAAACGGGTGTAACCTGCGTGAGATTACCTGAAACACACTGATTTGGTCAAGCGCAGGAGACGCTTGGTAAAGGGTACA
 AGGCCCTGATCCCCGACATTCACCGAATGAATCCTTCCGTGTCAAGTAATCTTTGTCTCCTGGACAGTTCCGGTGTATGTCCTGAAC
 TGACGGACAAGTACACGACCGATCTGCGCATATACATGGTAAGAATGCTTCAACCCCGTCCATCCCCCCTCTCNATGTCCCGTTA
 GAGTGGAGGAGGGGAAGAAAAAATTTTAAATCTTTCCCAATATCATATATCCCTCCTCATCGCCGATGCCGTTTATATTTTTG
 ATAAACCCCTAAAACGGTGCAGAGACTCAGGGTAGAAGACCTCTTATCCTATGTTTTCGCGATATGGTTTGCATTGTTATTTGT
 AGTACGTTCTATCTTATTCACTTTTTTTTTTTCGAAGTTTCGCAAGGGCACAAAATCTAANGGCCATCTCA

>IGM6-MKLFOMP_950bases

GGNNCNTNNNNGGNTCGCTACGCTGGCCNGGCGGGCAGGTGCAGCTGCTCGAGATGAGCGATAAAAATTTACCTGACTGACGAC
 AGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGACAGAGTGGTGGGTCCGTGCAAAATGATCGCCC
 CGATTTCTGGATGAAATCGTGCAGAAATACAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAACCCCTGGCACTGCGCCGAA
 ATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAGTGGGTGACTGTCTAAAGGTGAG
 TTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCCTACTAGTGGCCAGGCCGCGCCAGCACCAT
 ACCATCACCATGGCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTAGGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGG
 CGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTGTTCCGGTGATTTGATTATGAAAAGATGGCAACGCTAATAAGGGGGCTATG
 ATCGAAAATGCCGATGAAAACGTGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTGCTATCGATG
 GTTTCATTGGTACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGTACTGGTATTTTGTGGCTCTCACTCCCCAATGGCTCAAGTCCG
 TGACGGTGATAATTACCTTTTAAATGAATAATTTCCGTACATATTTACCTTTCCCTCCCTCCATCGGTTGAATGTCGCCCTTTT
 GCCTTCTGGCGACTGGCACACCATAATGAATTTTCCAGTGTATCGGCACAAAACAACCTTATTCCGCTG

>IGM6-PC3X_950bases

NNNNNTTGGNANAAGACGCTATCGCGATTGCGAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCAGGCGGCGGAGGTGCAGCTGCTCGA
 GATGAGCGATAAAAATTTACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGG
 GCAGAGTGGTGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCGGATTTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAAC
 TGAACATCGATCAAACCCCTGGCACTGGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGC
 GGCACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGTTCAGTTGAAAGAGTTCTCTGACGCTAACCTGGCGTACCCGACTACGACTTCCGGACTAC
 GGTCTACTAGTGGCCAGGCCGCGCCAGCACCATCACCATCACCATGGCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTAGGAGG
 GTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTCCGGTGGTTTGGATTA
 TGAAGAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCCAAAATGCCGATGAAAACGCTGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTTGT
 TCTGTGCTACTGATTACCGGTGCTGCTATCGATGGTTTCAATTTGATGACGTTTCCGGCCCTGCTAATGGTAAATGGTGTACTGGTATT
 TTGCTGGCTCTAATTTCCCAAATGGNTCAGTCCGTGACGGTGATAATTTACCCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTTCC
 TCCTCTCACTCGGCTGATGCCGCTCTTTTTCTGTCTTTGGCGCTGGGTAAACTCACTATTGAATTT

>IGM25-MKLFOMP_605bases

CANANNGAAGGGTGGGTAGGCGGACGNAGTTACGCGGGAACCCCTCCCCATGGACGGAGCTCATGATCGTTGGAGGTTGAGGTTCTC
 CCGTCCGAGGATTGAGGCGTGAATTTACTGCCATCGTGTACTTCTAAAACGTTTAGGGCAACCATGCTACGACGAGGGTTCCCCATA
 ACCCTCAGTCCGGGGCCAAAAACGAAATAGGAGGCACAATCACCGCTGTATCTGACGAATGTTGCCCGGAAAAACCGCGGGTAT
 CTGAATGGTTTTGACCCGAAATTTGGACCCGATAGAAGCATGCCATGTATACTATGGGATTTCTGGGTTCTTGCACCGGTGTCTAT
 TTTTGCATGGTTGTGACGTCATCGTTTTTTTTTACTTAAAAATCTGCGTAACTTTACTGGTTCTAGATCGAAACTCAATAGGATTTT
 CTGTAGCACGACGCAAAATTTTCTTTACACACCTGAAACGAGAAGGACGGAATAAATTTACGAGGATTAATAAGTTTTAAAGGGTC
 TTTCAATAAAGTAAATGTGACAAAAAATGTACTTTTTTCTTTTACTGTCCCCATTTTGTCCCTTGAACGGTTGGAC

>IGM25-PC3X_684bases

TTGTGNANTTATGGGCGTAAGAAGGAGTGGCAAGCGGGAACCGCCCGCCAGGGGAGCTCATGCGGGCGGGGTTCCGTTACCGGGTC
 CTGTTCCCGCTATGGACCCCGTGACTTAATGCATTTGCGGTACTGAGAAAACCTATAGTGGAAATTCAGTCTACACATGACGTTCCGGGAC
 ACGTCTTCCCGAAACCGCCAGAAACGGGGGGCGGGATCTCTCTGATATCCCTGACGAATGTGGCAGCGAAAAACCGCGGGATT
 GAGGCGGCTGACCCGAGAACGAGCCCGGAGTAACTCCTCTTCCCTCACCTCTGCGCATTTCTGTTCAACTTGCACCCCAACCT
 TTCTATTAATAAATATAAGTGAATACACCACACCCCGGCTTTTTTACTCCGAGTCTGCTTTATTTTTCGTGAAACCCGATAAAA
 CACATATGTTCCGATTTATTTTCTTGATTGTATGTCACGCCCTACCAGATATCTAATTTAATCTTGGGAGCGAAATCTTGGGANATAT
 GAGATACTAAGCCGACAGCGCAACTTACTCTTTGTGTTACGTCGGCTATTATCAAGAAGAGTCAATATAATATCACGCCGCAA
 TCAACAATTACTCCCTTGACANNAGCTAAACAGTTATCAACAACATGATTTCCATAGGCGTCATCAT

ANEXO F – Especificações do anticorpo monoclonal anti-HTLV

<i>Antibodies and Antigens are in Our Blood.</i>		Fitzgerald Industries International, Inc. 34 Junction Square Drive Concord MA 01742-3049 USA Tel: 978.371.6446 Fax: 978.371.2266
		www.fitzgerald-fii.com E-mail: antibodies@fitzgerald-fii.com
<u>Monoclonal Antibody Data Sheet</u>		
<u>Product:</u>	<i>tax (HTLV-I)</i>	
<u>Catalog #:</u>	10-810001	
<u>New Catalog #:</u>	10-810001	<u>Host:</u> mouse
<u>Immunogen:</u>	purified, full length tax (HTLV-I)	
<u>Clone #:</u>	810001	
<u>Subclass:</u>	IgG1	
<u>Concentration:</u>	100µg per vial	<u>Affinity Constant:</u> N/A
<u>Cross Reactivity:</u>	Reacts with recombinant tax (HTLV-1) in Western Blot. Not epitope mapped	
<u>Form:</u>	Supplied lyophilized in PBS buffer, >90% pure by SDS-PAGE analysis, with no preservatives added, reconstitute in sterile distilled water. Not tested for sterility or endotoxin content.	
<u>Storage:</u>	4°C while lyophilized, once reconstituted, aliquot and store at -70°C	
<u>Additional Remarks:</u>	Applications: Western Blot If antibody concentration is 1mg/ml, suggested starting dilutions: Western Blot- 1:500 to 1:1000	
<u>FOR INVITRO USE ONLY</u>		
CAUTION, not for use in humans or clinical diagnosis: This product is intended for research or manufacturing use only. It is pharmaceutically unrefined, and verification of its suitability for use in humans or as clinical diagnostic reagents and the compliance with all Federal and State laws regulating such applications are the responsibility of the purchaser. There is no expressed or implied warranty. No liability is assumed for fitness of purpose and merchantability, or direct or consequential damages. The user assumes all responsibility for care, custody and control of the material, including its disposal, in accordance with all regulations.		
FM 4.15-5		

ANEXO G – Especificações do anticorpo monoclonal anti-*T. pallidum*

		<i>Antibodies and Antigens are in Our Blood.</i>		Fitzgerald Industries International, Inc. 34 Junction Square Drive Concord MA 01742-3049 USA Tel: 978.371.6446 Fax: 978.371.2266	
		www.fitzgerald-fii.com E-mail: antibodies@fitzgerald-fii.com			
<u>Monoclonal Antibody Data Sheet</u>					
<u>Product:</u>	<i>Treponema pallidum</i>				
<u>Catalog #:</u>	RDI-TRK3T11-TR33				
<u>New Catalog #:</u>	10R-T135A	<u>Host:</u>	mouse		
<u>Immunogen:</u>	Formalin inactivated <i>Treponema pallidum</i> Strain N8				
<u>Clone #:</u>	Tr33				
<u>Subclass:</u>	IgG ₁				
<u>Concentration:</u>	16.5 mg/ml	<u>Affinity Constant:</u>	~1.0 x 10 ⁹ L/M		
<u>Cross Reactivity:</u>	This monoclonal is specific to sonicated lysates of <i>treponema pallidum</i> and <i>Treponema reiter</i>				
<u>Form:</u>	Purified, supplied in PBS buffer containing 0.1% NaN ₃ as the preservative.				
<u>Storage:</u>	4°C or -20°C for longer storage.				
<u>Additional Remarks:</u>					
<u>FOR INVITRO USE ONLY</u> CAUTION, not for use in humans or clinical diagnosis. This product is intended for research or manufacturing use only. It is pharmaceutically unrefined, and verification of its suitability for use in humans or as clinical diagnostic reagents and the compliance with all Federal and State laws regulating such applications are the responsibility of the purchaser. There is no expressed or implied warranty. No liability is assumed for fitness of purpose and merchantability, or direct or consequential damages. The user assumes all responsibility for care, custody and control of the material, including its disposal, in accordance with all regulations.					
FM 4.15-5					

ANEXO H – PAINEL DE SOROS POSITIVOS PARA SÍFILIS

REATIVIDADE DE CADA SORO EM DIFERENTES IMUNOENSAIOS PARA DIAGNÓSTICO DE SÍFILIS

Painel e resultados fornecidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos / FIOCRUZ)

Amostra	VDRL ¹	FTA-ABS ²	Serodia TP-PA ³	Trepanostika ⁴
4c2	Reagente (1:16)	Positivo	Positivo	Positivo
4c3	Reagente (1:64)	Positivo	Positivo	Positivo
4c4	Reagente (1:08)	Positivo	Positivo	Positivo
4c6	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
5c1	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
5c2	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
5c5	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
5c6	Reagente (1:16)	Positivo	Positivo	Positivo
6c2	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
6c3	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
6c4	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
6c5	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
7c1	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
7c3	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
7c5	Reagente (1:16)	Positivo	Positivo	Positivo
7c6	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
8c1	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
8c2	Reagente (1:16)	Positivo	Positivo	Positivo
8c3	Reagente (1:32)	Positivo	Positivo	Positivo
8c6	Reagente (1:08)	Positivo	Positivo	Positivo

1: *Venereal disease research laboratory*: teste não treponêmico; titulação indicada entre parênteses;

2: *Fluorescent Treponema Antibody Absorbed*: teste treponêmico;

3: Teste treponêmico do tipo TPHA (*Treponema pallidum Hemagglutination Assay*);

4: Teste treponêmico do tipo ELISA *sandwich* fabricado pela BIOMÉRIEUX; emprega como antígeno uma combinação de proteínas recombinantes de *T. pallidum*.