

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA LUIZA PALMA GUIMARÃES ASSMANN

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL E MONOCLONAL
ANTI-3ABC DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA

CURITIBA

2015

ANA LUIZA PALMA GUIMARÃES ASSMANN

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL E MONOCLONAL
ANTI-3ABC DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, setor de Tecnológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2015

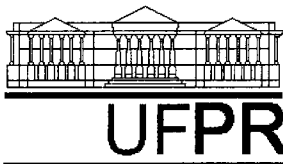
ANA LUIZA PALMA GUIMARÃES ASSMANN

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL E MONOCLONAL
ANTI-3ABC DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Processos Biotecnológicos, no Curso de Pós-graduação em Engenharia de Processos e Biotecnologia, Setor de Tecnológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof^a Dra Vanete Thomaz Soccol
Orientadora – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR/PR

Curitiba, 27 de fevereiro 2015



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e sete dias do mês de Fevereiro de 2015, na Sala de Aulas do prédio CENBAPAR, do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Nonagésima Sexta Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Profa. Dra. Aline Caroline Aleixo Silva (Ouro Fino Saúde Animal Ltda.), Dr. Ernesto Renato Krüger (SEAB – PR), e Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol (UFPR – orientadora da dissertação).

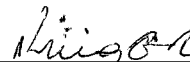
Às 09h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Ana Luíza Palma Guimarães Assmann** a fazer a apresentação da dissertação intitulada: “**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL E MONOCLONAL ANTI-3ABC.DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA**”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Profa. Dra. Aline Caroline Aleixo Silva (Ouro Fino Saúde Animal Ltda.), Dr. Ernesto Renato Krüger (SEAB – PR), e Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol (UFPR – orientadora da dissertação), declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

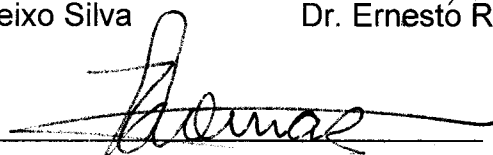
Curitiba, 27 de Fevereiro de 2015.



Profa. Dra. Aline Caroline Aleixo Silva



Dr. Ernesto Renato Krüger



Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol

Dedico este trabalho ao meu esposo Ricardo Assmann pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões, aos meus pais João e Lilian e minhas irmãs Lisa e Mariana por estarem sempre presentes e auxiliando sempre que necessário e a minha filha Alícia que enche de alegria os meus dias impulsionando-me em direção às vitórias dos meus desafios.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

À minha orientadora Dra Vanete Thomaz Soccol por acreditar no futuro deste projeto, me mostrar o caminho da ciência, por sua compreensão e enorme auxílio na elaboração deste trabalho e por ser exemplo de profissional e de mulher a qual sempre levarei para minha vida.

Ao Dr Carlos Ricardo Soccol por acreditar em mim e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao diretor de Biológicos Dr. Fausto Terra e a empresa Ourofino Saúde Animal Ltda, por me proporcionarem a execução deste mestrado e por todo apoio e incentivos.

Ao meu coordenador MSc. Pedro Motta pelo incentivo, apoio e disponibilização de tempo, equipamentos, reagentes, materiais utilizados nas diferentes etapas deste trabalho.

Às minhas queridas amigas e colegas de trabalho Dra. Aline Aleixo e Dra. Lívia Faim que participaram diretamente deste trabalho, me ajudando em todos os momentos contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal. Também agradeço suas constantes presenças apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis. Suas participações foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Dra. Ludmilla Dela Colleta Troiano pela disponibilidade e imensa contribuição para a realização deste trabalho, transmitindo seus conhecimentos e por toda sua ajuda que foi de extrema importância.

Aos Dr Celso Ramos e Dra. Myriam Quelopana pelo apoio técnico em diferentes etapas deste trabalho.

À toda equipe do PDI Biológicos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

À equipe do laboratório de Controle de Qualidade Biológico da Ourofino por me ajudarem com a disponibilização de materiais, equipamentos, reagentes e por me receberem sempre tão bem.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia e Bioenergia pelo apoio e colaboração na utilização de equipamentos e reagentes.

Ao Dr. João Carlos Minozzo, Dra. Ligia Barizon e toda equipe do biotério do CPPI pelo auxílio e apoio com as coletas de sangue, imunizações e manutenção dos coelhos utilizados neste trabalho.

Aos amigos Micheli Raymundo e José Eduardo Fiuza pela ajuda com as imunizações, manutenção e coleta de material biológico dos camundongos utilizados.

Ao curso de pós-graduação em bioprocessos e biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, coordenado pela Dra. Luciana Vandenberghe por me acolherem sempre muito bem.

À todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

À todos muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

A febre aftosa é uma doença altamente contagiosa que acomete animais biungulados. Tem distribuição cosmopolita, mas é endêmica na Ásia, África e em alguns países da América do Sul, sendo que o Brasil é considerado zona livre com vacinação. No Brasil o controle epidemiológico da doença é realizado mediante a vacinação e vigilância sanitária sendo necessário diagnóstico diferencial entre animais vacinados de portadores do vírus, para provar a ausência da doença. Desta forma é fundamental o desenvolvimento de testes para diferenciar animais vacinados de doentes e para o controle do processo de produção da vacina. A resposta a anticorpos, contra proteínas não estruturais do vírus, tem sido amplamente utilizada para este propósito, como é o caso do ensaio imuno-enzimático–ELISA/EITB. A proteína 3ABC é uma proteína não estrutural do vírus da febre aftosa e está presente em altos níveis no soro de animais infectados. Visando a diferenciação entre animais doentes e vacinados a proteína ABC deve ser removida durante o processo de produção da vacina, para que o animal imunizado não apresente anticorpos detectáveis contra ela. O objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar anticorpos policlonal e monoclonal contra a proteína 3ABC do vírus da febre aftosa, para serem utilizados no desenvolvimento de um teste imunoenzimático que permita monitorar os processos de purificação da vacina, para remover as proteínas não estruturais e controle de qualidade das partidas produzidas visando sua aprovação pelos órgãos fiscalizadores como o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para a produção dos anticorpos policlonal e monoclonal primeiramente foi produzida a proteína 3ABC recombinante a partir do plasmídeo contendo gene que codifica a proteína 3ABC, já com a mutagenese do gene 3ABC no sítio ativo da protease 3Cpro para sua inativação, produzido por Gonzales, 2013. A produção da proteína foi realizada por fermentação da *Escherichia coli* recombinante em erlenmeyer de um litro e realizada as etapas de semi purificação (anticorpo policlonal) e ou purificação (anticorpo monoclonal). O anticorpo policlonal, produzido em coelhos, apresentou altos títulos a partir de 75 dias pós-imunização. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade com proteína G, o que resultou em uma imunoglobulina altamente pura, tornando-a mais específica para a proteína de interesse. Para a produção do anticorpo monoclonal foram imunizados camundongos BALB/c por via intramuscular. A fusão realizada originou 217 colônias de hibridomas, sendo 10 deles positivos no teste ELISA indireto. Após clonagem e expansão dos clones positivos, foi realizado o teste de estabilidade permitindo a seleção de dois clones estáveis. Os anticorpos foram caracterizados pelas metodologias de ELISA e *Western Blotting* e mostraram alta reatividade contra a proteína 3ABC e podem ser utilizados no desenvolvimento do teste ELISA para o monitoramento dos processos de purificação da vacina contra a febre aftosa. Todos os experimentos foram realizados na empresa Ourofino Saúde Animal.

Palavras chave: febre aftosa; proteína 3ABC; anticorpo policlonal anti-3ABC; anticorpo monoclonal anti-3ABC.

ABSTRACT

FMD is a highly contagious disease that affects cloven-hoofed animals and is endemic in Asia, Africa and some countries in South America. In Brazil the epidemiological disease control is achieved by vaccination and health surveillance. For this control is necessary differential diagnosis between vaccinated animals and those carrying the virus, to prove the absence of the disease. Thus it is important to develop tests to differentiate vaccinated animals from sick animals. The antibody response against non-structural proteins of the virus, have been widely used for this purpose, such as the enzyme-immunoassay ELISA / EITB. The 3ABC is a nonstructural protein of FMD virus and it is present in high levels in infected animals serum. It is necessary to be removed during vaccine production, so the immunized animal does not produce detectable antibodies against them. The aim of this study was to produce and characterize polyclonal and monoclonal antibodies against the 3ABC protein of FMD virus, for their use to develop an enzymatic immunoassay experiments. Such experiments will allow the monitoring of the vaccine purification processes, which removes non-structural proteins and also the quality control process of the produced batches for approval by regulatory agencies such as the Ministry of Agriculture Livestock and Supply (MAPA). In this study, the plasmid to heterologous protein 3ABC production was produced by GONZALEZ, 2013. The expression has been optimized for subsequent production of polyclonal and monoclonal antibodies. For animal's immunization, either rabbit or mouse, the protein used was the semi purified protein. And for the monoclonal antibody screening tests, the protein used was the purified protein. The purification in this stage was due to the need of a specific test to select the monoclonal antibody which is also highly specific. The polyclonal antibody produced in rabbits, showed high titers from 75 days post-immunization. The large amount of polyclonal antibody obtained enabled the using of affinity chromatography using protein G, as a purification method, which resulted in a highly pure immunoglobulin, making it more specific to the protein of interest. For the production of monoclonal antibody (Mabs) BALB/c Mice were immunized intramuscularly. The fusion carried out originated 217 hybridomas colonies, 10 of them were positives for antibody production by ELISA test. After cloning and expansion of positive clones, stability tests were performed which allowed the selection of two stable clones. The antibodies were characterized by ELISA and Western Blotting approaches. The mabs obtained showed high reactivity against 3ABC protein and as a result they can be used in the development of an ELISA assay to monitor the purification processes of the vaccine against FMD. All experiments were performed in Ourofino Animal Health Company.

Key-words: FMD; 3ABC protein; polyclonal anti-3ABC; monoclonal anti-3ABC.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA.....	31
FIGURA 2 – ESTRUTURA DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA.....	36
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA FEBRE AFTOSA NO FINAL DO ANO DE 2013.	40
FIGURA 4 – ESTRUTURA DOS ANTICORPOS IgG, IgM E IgA.	54
FIGURA 5 – ESQUEMA DA PLACA DE ELISA PARA AS POSIÇÕES DOS SOROS HIPERIMUNES TESTADOS NOS DIFERENTES TEMPOS DE IMUNIZAÇÃO.....	68
FIGURA 6 – PROCEDIMENTO REALIZADO PARA A PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL UTILIZANDO O KIT <i>AMICON® PRO AFFINITY CONCENTRATION – PROTEIN G</i> DA MERCK MILLIPORE.	71
FIGURA 7 – IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS BALB/C POR VIA INTRAMUSCULAR.	72
FIGURA 8 – CULTIVO DE MIELOMAS DA LINHAGEM NS0 COM 24 HORAS DE ANTECEDENCIA A FUSÃO.	74
FIGURA 9 - PROTEÍNA 3ABC RECOMBINANTE EM SDS-PAGE 12% APÓS INDUÇÃO.....	82
FIGURA 10 - PROTEÍNA 3ABC RECOMBINANTE EM SDS-PAGE 12% APÓS PROCEDIMENTOS DE SEMI PURIFICAÇÃO (A) E PURIFICAÇÃO (B). 83	
FIGURA 11 - <i>WESTERN BLOTTING</i> PARA IDENTIDADE IMUNOLÓGICA DA PROTEÍNA 3ABC RECOMBINANTE.....	83
FIGURA 12 – <i>WESTERN BLOTTING</i> PARA A CONFERÊNCIA DA RESPOSTA HUMORAL DOS COELHOS IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA 3ABC SEMI PURIFICADA.....	86
FIGURA 13 – ELETROFORESE SDS-PAGE 12% PARA ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA G.	88
FIGURA 14 – <i>WESTERN BLOTTING</i> PARA CARACTERIZAÇÃO DA REAÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL PURIFICADO FRENTE A PROTEÍNA 3ABC.. ..	89
FIGURA 15 - <i>WESTERN BLOTTING</i> PARA CONFERÊNCIA DA RESPOSTA HUMORAL DOS CAMUNDONGOS APÓS IMUNIZAÇÃO.	90

FIGURA 16 – GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 12% CORADO COM PRATA PARA ANÁLISE DA PROTEÍNA 3ABC PURIFICADA.	90
FIGURA 17 – CULTIVO DE MIELOMAS PARA O CONTROLE DO PROCEDIMENTO DE FUSÃO - MIELOMAS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE LISE CELULAR.....	91
FIGURA 18 – DIFERENTES FASES DE FORMAÇÃO E CRESCIMENTO DOS HIBRIDOMAS	91
FIGURA 19 – DIAGRAMA DA PLACA DE ELISA COM A IDENTIFICAÇÃO DOS HIBRIDOMAS TESTADOS, CONTROLE POSITIVO (C+), CONTROLE NEGATIVO (-) E BRANCO (BCO)	92
FIGURA 20 – LEITURAS A 492NM DOS HIBRIDOMAS TESTADOS NO ELISA.	92
FIGURA 21 – TESTE DE <i>WESTERN BLOTTING</i> PARA CONFIRMAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-3ABC.	93
FIGURA 22 – TESTE DE <i>WESTERN BLOTTING</i> PARA CARACTERIZAÇÃO DA REAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL PURIFICADO FRENTE A DIFERENTES ORIGENS DA PROTEÍNA 3ABC.	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FATORES VIRAIS E DO HOSPEDEIRO QUE PODEM DETERMINAR A VIRULÊNCIA DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA.	45
TABELA 2 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA O ESQUEMA DE SANGRIA E IMUNIZAÇÕES DOS COELHOS PARA A PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE ANTI-3ABC	63
TABELA 3 – CURVA PADRÃO PARA A PROTEÍNA SEMI PURIFICADA COM OS VALORES DO VOLUME DE BSA APLICADO NO GEL SDS-PAGE E OS VALORES DE IOD DAS BANDAS CALCULADAS PELO PROGRAMA <i>GEL – PRO ANALYSER</i>	84
TABELA 4 – DADOS DA QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA 3ABC SEMI PURIFICADA BASEADOS NA CURVA PADRÃO DO GRÁFICO 1.	84
TABELA 5 - CURVA PADRÃO PARA A PROTEÍNA PURIFICADA COM OS VALORES DO VOLUME DE BSA APLICADO NO GEL SDS-PAGE E OS VALORES DE IOD DAS BANDAS CALCULADAS PELO PROGRAMA <i>GEL – PRO ANALYSER</i>	85
TABELA 6 - DADOS DA QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA 3ABC PURIFICADA BASEADOS NA CURVA PADRÃO DO GRÁFICO 2.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMc -	Anticorpos monoclonais
BSA -	Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CEVAN -	Centro de Virologia Animal
CO ₂ -	Dióxido de carbono
DNA -	Ácido Desoxirribonucléico
DO -	Densidade Ótica
EDTA -	Ácido Etilenodiamonotetracético
EITB -	Eletro imuno-transferência
ELISA -	Ensaio Imunoenzimático
Fab -	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc -	Fragmento cristalizável
G –	Grama
HAT -	Hipoxantina Aminopterina Timidina
HGPRT -	Hipoxantina-Guanina-Fosforribonosil-Transferase
HPRT -	Hipoxantina Fosforibosil Transferase
HT –	Hipoxantina Timidina
Ig -	Imunoglobulina
IgA-	Imunoglobulina A
IgD-	Imunoglobulina D
IgE-	Imunoglobulina E
IgG-	Imunoglobulina G
IgM-	Imunoglobulina M
IMAC -	Cromatografia de afinidade com metal imobilizado (<i>Immobilized Metal IonAffinity Chromatography</i>)
IN -	Instrução Normativa
IPTG -	Isopropil-β-D-Tiogalctopiranosídeo
kDa -	Kilodalton
Kg –	Kilograma
L -	Litros

LB -	Meio Luria Bertani
MAPA -	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
µg -	Micrograma
µL –	Microlitro
mA -	Milliampere
mg–	Miligrama
mg/mL -	Miligrama por mililitro
mL -	Mililitro
mM -	Milimolar
mV –	Milivolts
M –	Molar
nm -	Nanômetro
nM –	Nanomolar
OIE -	Organização Mundial da Saúde Animal
ORF -	Marco de Leitura (<i>Open Reading Frame</i>)
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PANAFTOSA -	Centro Panamericano de Febre Aftosa
PBS -	Tampão Salina Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR -	Reação em cadeia da polimerase
PEG -	Polietilenoglicol
pH -	Potencial Hidrogeniônico
PNEs (<i>NSPs</i>) -	Proteínas Não Estruturais
3ABC -	Polipeptídeo 3ABC
qsp -	Quantidade Suficiente Para
rpm -	Rotações por Minuto
RNA -	Ácido Ribonucleico
RNA _m -	Ácido Ribonucleico mensageiro
RPMI -	Roswell Park Memorial Institute
SDS -	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE -	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
6xHis–	Seis Resíduos Consecutivos de Histidina

SFB -	Soro Fetal Bovino
SPF -	Livre de agentes patogênicos (Specific Patogen Free)
TRIS -	Hidroximetilamônio Metanol
VFA (<i>FMDV</i>) -	Vírus da Febre Aftosa
VIAA -	Antígeno Associado à Infecção (Virus Infection-associated Antigen)
VLP -	Partícula Semelhante a Vírus (<i>Virus Like Particles</i>)
WB -	<i>Western Blotting</i>
xg -	gravidades

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	OBJETIVO	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3	REVISÃO DE LITERATURA	30
3.1	AGENTE ETIOLÓGICO	30
3.2	ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS	31
3.2.1	Tradução do RNA viral e modificações pós-traducionais	34
3.2.2	Replicação do genoma viral	35
3.2.3	Estrutura do vírus e sua montagem.....	36
3.2.4	Sorotipos, variação antigênica e distribuição geográfica	37
3.3	CICLO INFECCIOSO, SINTOMAS E TRANSMISSÃO.....	42
3.4	VIRULÊNCIA E RESPOSTA DA CÉLULA HOSPEDEIRA	44
3.5	DIAGNÓSTICO.....	45
3.6	CONTROLE E PREVENÇÃO	47
3.7	DIFERENCIAÇÃO ENTRE ANIMAIS INFECTADOS OU PORTADORES DE ANIMAIS VACINADOS	49
3.8	A PROTEÍNA 3ABC.....	51
3.9	ANTICORPOS	51
4	MATERIAL E MÉTODO	58
4.1	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA 3ABC RECOMBINANTE.	58
4.1.1	Expressão da proteína 3ABC.....	58
4.1.2	Semi purificação da proteína 3ABC recombinante.....	59
4.1.2.1	Eletroforese SDS-PAGE	60
4.1.2.2	<i>Western Blotting</i>	60
4.1.3	Purificação da proteína 3ABC recombinante.	61
4.1.4	Quantificação da proteína 3ABC.....	62
4.2	COMITÊ DE ETICA	63
4.3	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-3ABC.	63
4.3.1	Imunização de Coelhos	63
4.3.2	Obtenção dos Soros.....	64
4.3.3	Triagem da Produção de Anticorpo Policlonal.....	64
4.3.3.1	Avaliação da imunidade humoral dos coelhos para a proteína 3ABC por <i>Western Blotting</i>	64

4.3.4	Teste ELISA para Titulação da proteína 3ABC x Conjugado anti-IgG de coelho x diluição do soro.....	65
4.3.4.1	Adsorção do Antígeno.....	65
4.3.4.2	Lavagem.....	65
4.3.4.3	Bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos.....	66
4.3.4.4	Incubação do Soro Positivo e Negativo.....	66
4.3.4.5	Incubação do Conjugado.....	66
4.3.4.6	Solução reveladora.....	66
4.3.4.7	Parada da Reação.....	67
4.3.4.8	Leitura.....	67
4.3.5	Cinética de produção de anticorpo policlonal anti-3ABC.....	67
4.3.6	Purificação do Anticorpo Policlonal.....	68
4.3.6.1	Remoção de anticorpos antibacterianos do soro.....	68
4.3.6.2	Extração de Lipoproteína.....	69
4.3.6.3	Precipitação das Imunoglobulinas com Sulfato de Amônio.....	69
4.3.6.4	Precipitação das Imunoglobulinas G com Sulfato de Amônio.....	70
4.3.6.5	Diálise do soro.....	70
4.3.6.6	Purificação das Imunoglobulinas G com proteína G.....	70
4.4	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-3ABC.....	71
4.4.1	Imunização de Camundongos.....	71
4.4.2	Avaliação da imunidade humoral dos camundongos para a proteína 3ABC por <i>Western Blotting</i>	72
4.4.3	Cultivo dos Mielomas.....	73
4.4.4	Coleta de Macrófagos Intraperitoneais.....	74
4.4.5	Coleta de linfócitos dos animais imunizados com a proteína 3ABC.....	75
4.4.6	Fusão dos linfócitos e mielomas.....	76
4.4.7	Triagem da produção de anticorpos monoclonais anti-3ABC.....	77
4.4.8	Clonagem dos hibridomas positivos.....	78
4.4.9	Expansão dos Hibridomas.....	79
4.4.10	Teste de Estabilidade dos Hibridomas.....	79
4.4.11	Caracterização dos anticorpos monoclonais por <i>Western Blotting</i>	79
4.4.12	Produção de líquido ascítico e cultivo de hibridoma ascítico.....	80
4.4.13	Purificação dos anticorpos monoclonais.....	81
5	RESULTADOS.....	82
5.1	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	82
5.2	PRODUÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL.....	86
5.3	PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL.....	89
6	DISCUSSÃO.....	96
7	CONCLUSÃO.....	104
8	PERSPECTIVAS.....	105
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

A febre aftosa é uma doença contagiosa que causa grave perdas econômicas em animais biungulados como os bovinos, bubalinos e suínos. A doença é causada pelo vírus da febre aftosa (VFA), membro da família *Picornaviridae*, gênero *Aphthovirus*. Seu genoma é constituído por uma fita simples de RNA com 8500 nucleotídeos a qual codifica quatro proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4) que vão formar o capsídeo icosaédrico e nove proteínas não estruturais (L/L9, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D) que estão envolvidas com a replicação viral (GRUBMAN, 2004).

Testes sorológicos visando à detecção de anticorpos contra proteínas não estruturais são realizados para diferenciar animais infectados dos animais vacinados. O monitoramento dos soros para a presença de anticorpos contra as proteínas não estruturais (PNE), especialmente a poliproteína 3ABC que é um polipeptídeo altamente imunogênico, permite a detecção da infecção, pois animais vacinados somente respondem às proteínas estruturais (RUBIOLO, 2006). Portanto, as vacinas devem provar que não induzem a produção de anticorpos contra as PNE sob as condições usadas em campo que podem incluir repetidas vacinações. Desta forma, é importante o desenvolvimento de um teste que seja capaz de quantificar as PNE em amostras industriais para o controle da purificação das mesmas durante o processo de fabricação da vacina. Essa é uma exigência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pois, lotes de vacina com PNEs elevadas serão rejeitados, o que implicaria em grandes perdas econômicas para o fabricante.

Devido a necessidade de ter técnicas quantitativas para monitorar os processos industriais de purificação viral, o laboratório de controle de processo da vacina contra febre aftosa, da empresa Ouro Fino Saúde Animal, desenvolveu um teste de ELISA direto fazendo uso de reagentes obtidos de diferentes fontes. O teste é realizado em microplacas de 96 poços onde é adsorvido o anticorpo monoclonal 3H7, IgG1 dirigido ao epítipo do polipeptídeo 3A do VFA (RUBIOLO, 2006). Este anticorpo é obtido comercialmente. Uma curva padrão utilizando a proteína

recombinante 3ABC, com concentração de 7,5 $\mu\text{L/mL}$, é realizada para determinação da concentração das amostras que são diluídas em base 2. Esse teste utiliza como detector o Soro Bovino de animal convalescente comprovadamente positivo no teste de 3ABC/EITB. Depois o conjugado anti-bovino com peroxidase é adicionado a todos os poços. A cor é obtida pela adição da mistura cromógeno/substrato – ABTS (2,2-azino bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) e H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) parando a reação com NaF 0,2 % (fluoreto de sódio). A absorbância é lida em leitora para placas de ELISA com filtro a 415 nm. A partir das absorbâncias (A) da curva padrão é construído um gráfico onde as concentrações das amostras são calculadas por interpolação e expressas em ng/mL.

O soro hiperimune bovino utilizado é obtido a partir de animais convalescentes obtidos em focos de infecção no campo. Os animais infectados produzem anticorpos tanto contra as proteínas estruturais como contra as proteínas não estruturais. Eles estão expostos às PNE durante a citólise produzida pela estratégia de replicação do vírus (CLAVIJO, 2004). A vantagem do uso deste soro, no teste, é que os anticorpos de um animal infectado apresentam uma alta reatividade contra as PNE em testes *in vitro*. Porém, deverá ser utilizado um anticorpo monoclonal anti-3ABC para minimizar a inespecificidade do anticorpo policlonal. Um dos fatores limitantes do uso de soro hiperimune de animais convalescentes é que este tipo de material está cada vez mais escasso, devido as medidas de vigilância sanitária e aos planos de erradicação da Febre Aftosa nos países da América do Sul. Desta forma faz-se necessário a obtenção de anticorpos de outra forma, para controle do processo de fabricação da vacina.

Os anticorpos policlonais eram muito utilizados antes da década de 60, nos testes ELISA. Estes são anticorpos dirigidos para uma diversidade de antígenos ou para diferentes partes de um único antígeno. Sua obtenção é realizada a partir da coleta de soro de animais imunizados, não sendo viável seu cultivo *in vitro* (ABBAS *et al.*, 2008).

Anticorpos monoclonais (mAbs) são anticorpos produzidos, por um único clone de um linfócito B parental, sendo portanto, idênticos em relação às suas

propriedades físico-químicas e biológicas. Estes desempenham um papel importante na pesquisa de doenças infecciosas, diagnósticos e terapia. Eles são ferramentas utilizadas em diversas pesquisas e têm propiciado avanços na medicina, medicina veterinária especialmente no diagnóstico, tendo como aplicação a área de virologia. A utilização dos mAbs aumenta a precisão, especificidade e eficiência dos testes de diagnóstico em comparação com anticorpos policlonais, além de garantir a sua produção homogênea ilimitada (YANG, 2007).

A produção de mAbs requer a imunização de um animal, geralmente um camundongo, posteriormente a obtenção de células do sistema imunológico de seu baço as quais serão fundidas com células de proliferação ilimitada para torná-las imortais. A fusão destas células gera uma terceira denominada hibridoma. Os hibridomas possuem a capacidade de secretar os anticorpos monoclonais.

Diante do acima exposto, o presente trabalho tem como hipótese que anticorpos policlonais e monoclonais poderiam ser utilizados para o controle de qualidade no processo de produção de vacinas contra o vírus da FA. Esses anticorpos reconheceriam proteínas não estruturais do vírus e poderiam substituir os soros de animais convalescentes da FA.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir reagentes necessários para desenvolvimento do teste ELISA sanduíche, para quantificar proteínas não estruturais do vírus da febre aftosa em suspensões virais industriais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir e purificar a proteína 3ABC recombinante do VFA a partir da construção do plasmídeo contendo o gene mutado da proteína ABC, realizada por GONZALEZ, 2013;
- b) Produzir e caracterizar anticorpo policlonal anti-3ABC do VFA a partir da imunização de coelhos utilizando a proteína 3ABC recombinante;
- c) Produzir e caracterizar anticorpo monoclonal anti-3ABC do VFA a partir da imunização de camundongos BALB/c utilizando também a proteína 3ABC recombinante produzida.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A febre aftosa (do inglês, *Foot and Mouth Disease*, FMD) é uma doença viral altamente contagiosa, considerada como uma das principais doenças que acometem animais biungulados, incluindo bovinos, búfalos, porcos, ovelhas, cabras e mais de 70 espécies selvagens, como os búfalos africanos (THOMSON *et al.*, 2003; GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Apesar de animais adultos geralmente superarem esta doença, a taxa de mortalidade de populações jovens é alta e as sequelas incluem o decréscimo na produção de leite, danos nos cascos e mastite crônica, o que pode levar a uma grande perda econômica (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Nas áreas endêmicas, a Febre Aftosa é causa de restrições de comércio internacional de produtos de pecuária impostas pela Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organization for Animal Health, Office International de Epizooties – OIE*) (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013; SMITH *et al.*, 2014). Por isso o interesse na erradicação da doença não está presente somente nos países que sofrem de surtos de febre aftosa. Esse cuidado se expande a países que já registraram casos da doença e que possuem animais de importância para a pecuária, devido à sua facilidade de transmissão (SMITH *et al.*, 2014).

3.1 AGENTE ETIOLÓGICO

O primeiro registro da febre aftosa foi realizado pelo monge italiano Hieronymus Fracastorius em 1514, quem documentou que o gado infectado se recusava a se alimentar e sua mucosa oral apresentava vermelhidão. (FRACASTORIUS, 1514; GRUBMAN E BAXT, 2005). Em 1897, Loeffler e Frosch passaram o sangue de gado infectado por um filtro de Chamberland e demonstraram que um agente filtrável causava a doença animal, uma descoberta marcante na área da Virologia (LOEFFLER E FROSCH, 1897; GRUBMAN E BAXT, 2005).

Os vírus da família *Picornaviridae* são pequenos vírus de RNA (*pico RNA virus* ou *small RNA virus*), caracterizados por possuírem uma molécula de RNA de fita simples positiva encapsulada por capsídeo proteico icosaédrico (RUECKERT E WIMMER, 1994, GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013). O agente etiológico da febre aftosa pertence ao gênero *Aphthovirus*, juntamente com o vírus de rinite A equina, e se caracteriza por ser uma partícula viral praticamente esférica, com 25-30 nm de diâmetro (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

3.2 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS

O vírion da febre aftosa consiste de um genoma de RNA de fita simples de aproximadamente 8400 nucleotídeos de comprimento encapsulado por um capsídeo que contém 60 capsômeros formados por 4 proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4).

A figura 1 mostra a organização do genoma do vírus da Febre Aftosa, que é composto de uma região não traduzida (do inglês, *Un Translated Region* - UTR) na extremidade 5' (5'-UTR) contendo aproximadamente 1300 nucleotídeos, uma longa região codificadora (L) com aproximadamente 7000 nucleotídeos e uma região não codificadora na extremidade 3' (3'-UTR) contendo 90 nucleotídeos (BELSHAM, 2005; FRY, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

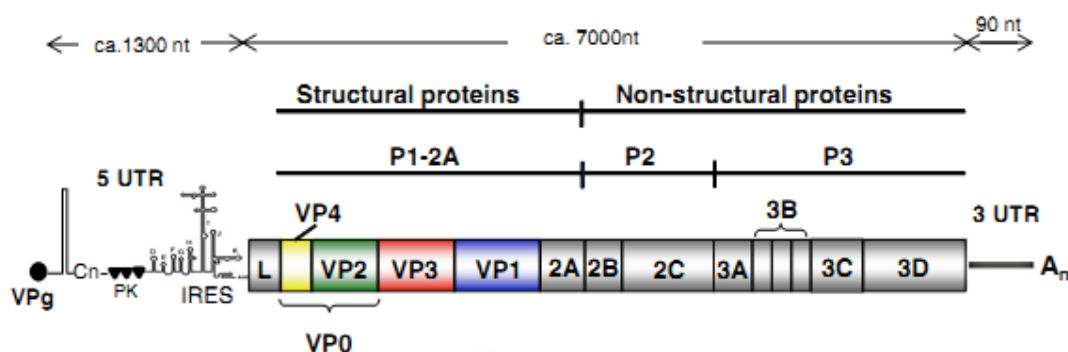


FIGURA 1 - ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA. AS REGIÕES DENTRO DO RETÂNGULO INDICAM REGIÕES CODIFICANTES PARA PROTEÍNAS INDIVIDUAIS.

FONTE: ADAPTADO DE JAMAL E BELSHAM (2013).

Como se observa na figura 1, a região 5'-UTR do genoma viral pode ser dividida em cinco elementos funcionais que atuam na transcrição e na replicação do RNA viral. Na sua extremidade 5', o fragmento S contém cerca de 360 nucleotídeos e forma uma estrutura secundária na forma *hairpin loop*. O *hairpin loop* é uma estrutura que ocorre quando duas regiões da mesma molécula, normalmente palindrômicas, formam pares de bases para constituírem uma dupla hélice que termina em um *loop* não emparelhado. Entretanto, sua função não está definida. Em outros vírus da família *Picornaviridae*, esta estrutura está relacionada à manutenção da estabilidade do genoma viral nas células infectadas (BELSHAM, 2005; FRY, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

É possível verificar uma sequência de poli-citosinas (poli-C) de aproximadamente 100 nucleotídeos de comprimento, podendo ser variável em sua extensão. A função exata desta região ainda não está definida, apesar de estudos recentes terem revelado a associação da proteína de ligação a poli-rC (PCBP) à extremidade 5' do genoma do poliovírus. Esta proteína poderia regular a tradução do RNA viral na célula do hospedeiro (BELSHAM, 2005; FRY, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Algumas estruturas na forma de pseudonós (do inglês, *pseudoknot* – PK) são observadas em seguida a este fragmento, mas também possuem função desconhecida (BELSHAM, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013). Uma pequena estrutura, *hairpin loop*, de aproximadamente 55 nucleotídeos, conhecida como elemento de *cis*-ativação de replicação (do inglês, *cis-acting replicative element - cre*), é observada após os pseudonós, dentro da região 5'-UTR, em contraste com outros picornavírus, onde *cre* é encontrado dentro da região codificante para proteínas. Na sequência da região da alça, observa-se a conservação do motivo de sequência de aminoácidos AAACA que atua como um molde para a uridilação da proteína VPg (3B₁₋₃) pela RNA polimerase viral (BELSHAM, 2005; FRY, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Entre *cre* e a pauta de leitura (do inglês, *Open Reading Frame* – ORF) para tradução do produto poliproteico, estruturas *hairp loop* altamente conservadas constituem, juntas, um sítio interno de entrada de ribossomo (do inglês, *Internal*

Ribosome Entry Site – IRES). Este sítio também é observado em outros picornavírus. Porém, apesar da sequência consenso de elementos IRES apresentar uma região rica em pirimidina na extremidade 3', imediatamente após o códon de iniciação de tradução AUG, o vírus da febre aftosa apresenta dois códons de iniciação AUG e regiões ricas em pirimidina são observadas imediatamente antes da IRES (BELSHAM E BRANGWYN, 1990; BELSHAM, 2005; FRY, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

A ORF do vírus da febre aftosa é traduzida em um produto poliprotéico que sofre uma modificação pós-traducional por proteólise. Esta ORF é dividida em quatro regiões de acordo com os produtos iniciais de proteólise (FIGURA 1). A extremidade 5' da região L codifica para o componente N-terminal do produto poliprotéico e contém dois códons de iniciação de tradução AUG em fase, o que resulta nas proteínas Lab e Lb, observadas *in vitro* e em células infectadas (BELSHAM, 2005; FRY, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013). Em 1995, CAO e colaboradores observaram que apenas a deleção do segundo códon de iniciação inibiu a replicação do RNA viral nas células infectadas. PICCONE e colaboradores (1995) mostraram que genomas virais sintéticos iniciados no segundo códon AUG produziram vírus ativos, sugerindo que Lb é a proteína funcional *in vivo*.

Em seguida à região L, a região P1 codifica as proteínas estruturais VP4, VP2, VP3 e VP1. A região P2, em seguida, codifica as proteínas não estruturais 2A, 2B e 2C. Adicionalmente, a região P3 codifica a proteína não estrutural 3A, para três cópias de VPg, além da protease 3C^{pro} e da RNA polimerase dependente de RNA 3D^{pol} (BELSHAM, 2005; FRY, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

A região 3'-UTR após o códon de terminação de tradução da ORF possui 90 nucleotídeos de comprimento e se enovela como o *hairp loop* seguida de uma cauda de poli-adeninas (poli-A) de tamanho variável. Esta região pode se ligar a proteínas de picornavírus envolvidas na replicação viral, porém sua função ainda não foi descrita (DORSCH-HASLER *et al.*, 1975; JAMAL E BELSHAM, 2013).

3.2.1 Tradução do RNA viral e modificações pós-traducionais

Após infecção da célula hospedeira, o conteúdo de RNA viral é liberado no citoplasma da mesma, diferentemente dos RNAs mensageiros (mRNAs) da célula hospedeira, o genoma viral possui a proteína VPg ligada covalentemente à extremidade 5', no lugar do *cap* de 7-metil-guanosina. Portanto, a síntese de proteínas virais se inicia na IRES independentemente de CAP (modificação presente no extremo 5' de todos os mRNA celulares). Enquanto isso, a tradução dependente de CAP é inibida nas células infectadas devido à clivagem do fator de iniciação de tradução celular conhecido como eIF4G pela protease L^{pro}. Neste caso, a região C-terminal de eIF4G clivada se liga à IRES do vírus da febre aftosa e interage com a subunidade 40S do ribossoma via fator eIF3 (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

A proteína nuclear ligadora da cauda de poli-pirimidina (do inglês, *nuclear polypirimidine tract binding protein*, PTBP) interage com duas regiões IRES (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013). Mason e colaboradores (2012) identificaram o fator de *trans*-ativação específico de IRES (do inglês, *IRES-specific trans-acting factor*, ITAF₄₅), que, juntamente com PTBP, é necessário para a formação do complexo de iniciação de tradução 48S.

A presença de umacauda de poli-C em região anterior a IRES sugere a necessidade de um fator de ligação a poli-C, porém este ainda não foi identificado. Duque e Palmenberg (2001) identificaram que a região 3'-UTR do vírus da febre aftosa também é necessária para a tradução, tendo observado diminuição na eficiência de tradução *in vitro* após deleção da cauda de poli-A e/ou da sequência da região de *hairpin loop*.

A tradução do genoma viral leva à produção de uma única molécula polipeptídica que sofre modificação pós-traducional por meio de proteólise em sítios específicos. Este processo resulta na liberação das proteínas estruturais e não estruturais do vírus. Primeiramente, a protease L^{pro} realiza sua autoclivagem. Em seguida, a proteína 2A sofre autoclivagem a partir da poli-proteína P2 e permanece ligada ao precursor da proteína P1 (98 kDa), formando o precursor P1-2A. A proteína

3C^{pro}, da família de serino-proteases, realiza os outros passos de proteólise para liberação das proteínas VP0 (36 kDa), VP1 (32 kDa) e VP3 (27 kDa), que interagem entre si para a formação do capsídeo. A autoproteólise de VP0 em VP2 (28 kDa) e VP4 (8 kDa) ocorre durante o processo de formação do capsídeo. A formação das proteínas não estruturais também ocorre a partir da proteólise catalisada pela proteína 3C^{pro} (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

3.2.2 Replicação do genoma viral

O início da síntese do genoma viral ocorre a partir do reconhecimento do RNA viral pela enzima RNA polimerase dependente de RNA (3D^{pol}) produzida dentro célula hospedeira, em detrimento dos mRNAs desta célula. Para a iniciação da tradução, a forma uridilada da proteína VPg é utilizada. A adição de duas moléculas de uridina monofosfato (UMP) no grupamento hidroxila do resíduo de tirosina 3 da proteína VPg é feita pela proteína 3D^{pol} na presença do fator 3CD, cujo precursor (3AB ou 3BCD) ainda é desconhecido, e a região AAACA de *cre* atua como molde para esta uridilação. Deve-se notar que o gene 3B, que codifica para VPg, possui três cópias em *tandem* no genoma, o que pode explicar a alta taxa de replicação do vírus (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

A replicação da maioria dos vírus de RNA de fita positiva acontece em locais que permitem sua compartimentalização e concentração, além da proteção dos componentes e produtos. No caso do vírus da febre aftosa, Polatnick e Wool (1983) mostraram que 3D^{pol} está concentrada em membranas de pequenos vacúolos na célula e, recentemente, Bentham e colaboradores (2011) mostraram que 3D^{pol} forma fibras *in vitro* ligadas à membrana apenas quando todos os componentes necessários para a tradução das proteínas virais estão presentes. Estudos *in vivo* são necessários para o melhor entendimento deste processo.

3.2.3 Estrutura do vírus e sua montagem

O capsídeo do vírus da febre aftosa íntegro possui 60 cópias das proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4 que encapsulam o genoma viral. O mesmo é formado a partir de um precursor monomérico de coeficiente de sedimentação igual a 5S (FIGURA 2), formado por VP0, VP2 e VP3, que se enovelam como um barril de oito fitas- β em forma de cunha. As fitas- β são conectadas por alças que formam a superfície externa da partícula viral (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Os precursores se associam para formar pentâmeros (figura 2) cujo coeficiente de sedimentação é igual a 12S (S = Svedberg; $1\text{ S} = 1 \times 10^{-13}\text{ cm/seg}$), em um processo dependente da N-miristilação de VP0. Em seguida, 12 pentâmeros se associam para a formação do capsídeo viral, cujo coeficiente de sedimentação é igual a 75 S (FIGURA 2). Os capsídeos formados são mantidos principalmente por interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre os pentâmeros (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

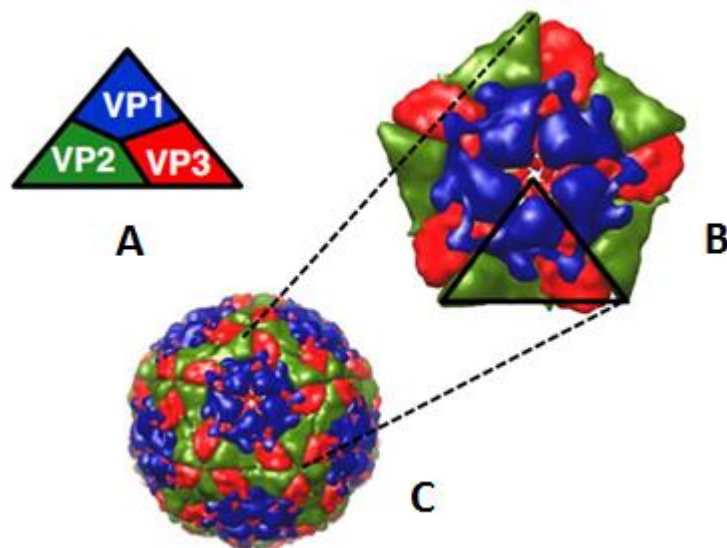


FIGURA 2 – ESTRUTURA DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA. A – Protômero (5S). B – Pentâmero (12 S). C – Capsídeo (vazio – 75S e vírion – 146S).
 FONTE: ADAPTADO DE JAMAL E BELSHAM (2013).

A etapa final de maturação do vírus consiste na autoclivagem do precursor VP0 em VP4 e VP2 e requer a presença do RNA viral ligado à proteína VPg. A

proteína VP4 apresenta um grupamento miristil (C_{14}) ligado covalentemente a sua extremidade N-terminal e está localizada dentro do capsídeo viral. O coeficiente de sedimentação da partícula viral resultante é igual a 146S (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

As proteínas estruturais formam um capsídeo icosaédrico pseudo T = 3, com a proteína VP1 localizada próxima ao eixo de simetria de ordem cinco e com as proteínas VP2 e VP3 alternando-se em torno do eixo de simetria de ordem três. Diferentemente de outros picornavírus, o vírus da febre aftosa não possui um canal na sua superfície, cuja função em outros picornavírus é de sítio receptor (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

O vírus da febre aftosa se dissocia em subunidades pentaméricas em pHs abaixo de 6,5 e, também, em altas temperaturas. Esta instabilidade, não observada para outros picornavírus, é devida à presença de um *cluster* de resíduos de histidina na interface entre VP2 e VP3, que fica protonado em baixo pH, levando à repulsão eletrostática. Esta instabilidade tem consequência na produção de vacinas, exigindo condições especiais para sua distribuição (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

3.2.4 Sorotipos, variação antigênica e distribuição geográfica

Vírus de RNA, em geral, apresentam alta taxa de mutação (10^3 a 10^5 por sítio de nucleotídeo por replicação) devido à falta de mecanismo de correção de erros durante a replicação viral (DRAKE E HOLLAND, 1999). Esta taxa de erro leva a variações nos genomas dos vírus, inclusive no vírus da febre aftosa. Essas são geradas a partir da replicação de um vírus original, que podem apresentar de 1 a 10 nucleotídeos diferentes (HAYDON *et al.*, 2001). Portanto, em uma população viral, os genomas não são idênticos e o fenótipo médio observado está adaptado ao ambiente. Pressão imunológica e condições físico-químicas como pH e temperatura influenciam neste fenômeno (GRUBMAN E BAXT, 2005).

A variabilidade das populações de vírus da febre aftosa é manifestada quando mutações levam a mudança de códon que resulta em fenótipo diferente. A

maioria destas variações é observada na região P1 do genoma viral e leva à variação antigênica. Mutações em regiões não codificadoras ou codificadoras para proteínas não estruturais são menos toleradas porque estas regiões controlam a replicação viral. Eventos de recombinação também foram observados e contribuem para a variabilidade do genoma da população viral (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Os sítios antigênicos são regiões capazes de promover uma resposta imune no hospedeiro. Quatro sítios antigênicos do vírus da febre aftosa foram identificados envolvendo VP1, VP2 e VP3. Três deles possuem elementos localizados na alça flexível que conecta as fitas- β das proteínas virais e dois sítios incluem a região C-terminal de VP1. O principal sítio antigênico, para o qual a maior parte da resposta imunológica é dirigida, está localizado dentro da alça G-H de VP1 e contém uma sequência RGD de ligação de receptor celular (BOLWEL *et al.*, 1989; BARANOWSKI *et al.*, 2001; GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Os vírus da febre aftosa são classificados em sete tipos imunologicamente distintos (sorotipos): O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 e Asia 1. Há pouca proteção cruzada entre os diferentes sorotipos (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013). Os sorotipos O e A foram descobertos inicialmente por Valee e Carre, em 1922. Eles observaram que o gado curado de febre aftosa na França era reinfectado quando misturado com animais infectados com vírus originário da Alemanha por isso, foi denominado sorotipo O (Oise, França) e sorotipo A (Alemanha) (VALLE E CARRE, 1922; JAMAL E BELSHAM, 2013). Em seguida, Waldmann e Trautwein (1926) descobriram um novo sorotipo, que nomearam tipo C. Três sorotipos adicionais foram descobertos na África do Sul denominados SAT1, SAT2 e SAT3 (do inglês, *South African Territories – SAT*) (BROOKSBY *et al.*, 1958; JAMAL E BELSHAM, 2013). Finalmente, o sorotipo Asia-1 foi identificado em Okara, no Paquistão, em 1954 (BROOKSBY *et al.*, 1958; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Atualmente, os sorotipos O e A estão amplamente distribuídos pelo mundo, sendo responsáveis por epidemias na Europa, nas Américas, Ásia e África desde sua descoberta (JAMAL E BELSHAM, 2013; VOSLOO, 2013). Já o sorotipo C é menos comum e seu último registro data de 2005 na Etiópia (JAMAL E BELSHAM,

2013). Os sorotipos SAT1, SAT2 e SAT3 são restritos à África subsaariana, apesar de alguns eventos controlados terem aparecido no Oriente Médio em 1962–1965, 1969–1970, 1990 e 2000, e na Grécia em 1962 (JAMAL E BELSHAM, 2013). Mais recentemente, o sorotipo SAT2 foi identificado no nordeste da África (Egito e Líbia), na Palestina e no Barein. O sorotipo Asia-1 está confinado à Ásia, apesar de dois eventos de incursão na Grécia, em 1984 e em 2000. Nos EUA, nove eventos foram registrados desde 1870, sendo que o último registro data de 1929 na Califórnia. Alguns casos foram documentados na Austrália no começo dos anos 1800 – 1870 e 1962 (FIGURA 3) (JAMAL E BELSHAM, 2013; VOSLOO, 2013).

Apesar da propensão de alastramento da doença em novas regiões, a comparação entre sequências de VP1 revela uma tendência de recorrência de sorotipos em algumas áreas geográficas, como mostra a figura 3. Esta tendência reflete, aparentemente, o grau de isolamento ecológico, o que provavelmente tem efeito nos padrões de deslocamento animal e de comércio ou de reservatórios animais selvagens. De acordo com análise antigênica e genética, os vírus da febre aftosa foram divididos em *pools* (FIGURA 3). Entretanto, alguns países como Egito e Líbia compartilham vírus que pertencem a diferentes *pools*. A circulação viral e sua evolução dentro das diferentes regiões resultam em mudança na necessidade de novas vacinas (JAMAL E BELSHAM, 2013; VOSLOO, 2013).

No Brasil, a febre aftosa foi descrita em 1895, concomitantemente com a importação sistemática de reprodutores bovinos europeus e surgimento da indústria frigorífica. Na década de 1960, a campanha de combate à febre aftosa foi institucionalizada pelo governo federal e houve a identificação de 55% de casos de tipo O, 26% de casos de tipo A e 19% de casos de tipo C, com taxa de mortalidade de 60% nos bovinos de até dois anos e de 40% nos animais mais velhos. Entre 1972 e 1974, foi observada uma epidemia de casos com vírus do subtipo C3 na região de criação de porcos do Rio Grande do Sul. Focos de vírus do tipo A foram identificados em bovinos entre 1975 e 1978, sendo que em 1976, observou-se a maior taxa de mortalidade. Em 1978, aumentou-se a incidência de vírus do tipo O (LYRA E SILVA, 2004).

O número de focos no Brasil decresceu de 10295 casos em 1976 para 1376 casos em 1989 devido ao maior aporte de recursos financeiros. No período, o maior número de casos da doença era por vírus do tipo A, inclusive com observação de casos nas regiões de fronteira com Argentina e Uruguai. A redução de casos foi significativa na década de 90, sendo que a maior ocorrência foi observada no ano de 94. O tipo A foi o mais frequente nos surtos epidêmicos do período e o tipo O predominou no surto epidêmico de 1997. O tipo C, por sua vez, só esteve presente no início da década de 1990. No início do ano de 2000, o *status* de área livre de febre aftosa no Brasil, devido as estratégias de vacinação, já representava grande parte do território nacional. Porém, o tipo O do vírus foi reintroduzido em 2005 no Mato Grosso do Sul e no Paraná, com suspensão da condição sanitária de zona livre de febre aftosa com vacinação para esses dois estados além da Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Sergipe e Tocantins (LYRA E SILVA, 2004). Atualmente, 99% do rebanho de bovinos e búfalos em 78% do território nacional estão livres da doença (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014).

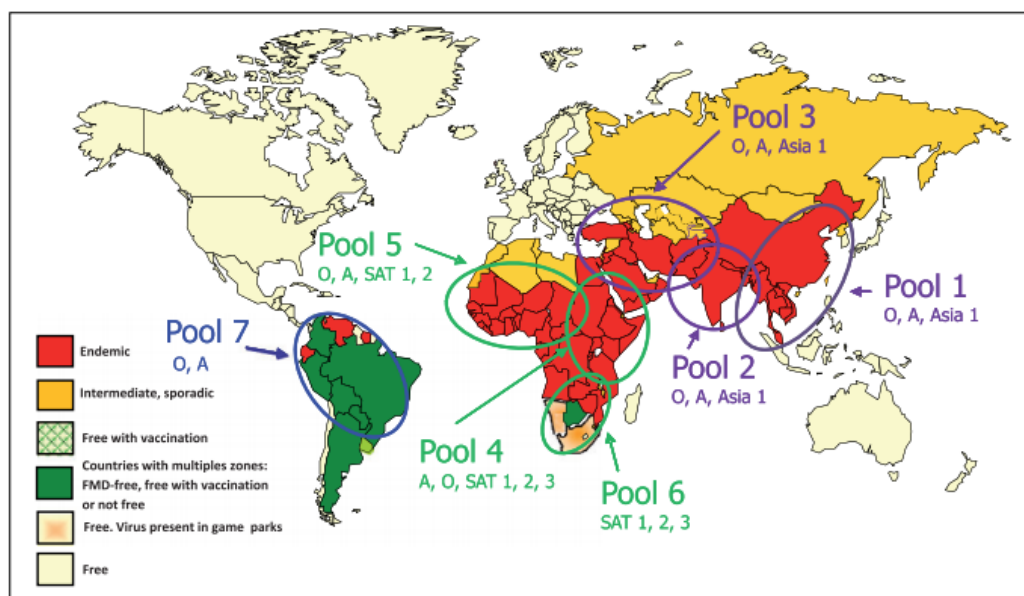


FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA FEBRE AFTOSA NO FINAL DO ANO DE 2013. SÃO MOSTRADAS 7 REGIÕES (POOLS) IDENTIFICADAS COM DIFERENTES SOROTIPOS (A,O,SAT1,SAT2,SAT3,Asia-1) CIRCULANTES. FONTE: VOSLOO (2013).

Dentro de cada sorotipo, há uma grande diversidade de variantes, com características antigênicas, biológicas e epidemiológicas próprias. Em alguns casos, há pouca proteção cruzada entre variantes dentro do mesmo sorotipo e, portanto, a caracterização de cepas se torna necessária para se garantir controle da doença (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Dopazo e colaboradores (1988) publicaram a primeira análise filogenética do vírus da febre aftosa. Desde então, vários estudos foram publicados para a análise dos sete sorotipos deste vírus (SAMUEL *et al.*, 2001; COTTAM *et al.*, 2008; AYELET *et al.*, 2008; JAMAL *et al.*, 2011; JAMAL E BELSHAM, 2013). Os sorotipos do vírus apresentam cerca de 86% de identidade de genoma entre si e a região codificadora para a proteína VP1 apresenta apenas 50-70% de identidade (JAMAL E BELSHAM, 2013).

Infelizmente não existe um critério uniforme para classificação das variantes dos sorotipos do vírus (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013). Os sorotipos O, A, C e Asia-1 foram classificados genotipicamente com base na diferença das sequências codificadoras de VP1, sendo que o sorotipo O foi classificado em oito grupos genéticos e geograficamente distintos, conhecidos como topotipos ME-SA (do inglês *Middle East South Asia*), SEA (do inglês, *South East Asia*), Cathay, Indonésia-1, Indonésia-2, África Ocidental, África Oriental e Euro-AS (do inglês, *Europe-South America*). Na Ásia, o topotipo dominante é ME-SA e quatro linhagens diferentes foram definidas para o topotipo ME-SA e a cepa pandêmica designada PanAsia se espalhou vigorosamente (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

O sorotipo A é o mais diverso dentre os sorotipos da Eurásia. Recentemente, foram classificados 26 genótipos baseados em diferença de mais de 15% na sequência de VP1 e estes formam os topotipos Ásia, Euro-AS e África. O topotipo Ásia predomina na Oriente Médio e no sul da Ásia e várias linhagens foram identificadas. A linhagem A-Iran05 é, atualmente, predominante na Eurásia Oriental (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

O sorotipo Asia-1 é o menos diverso. Entretanto, o motivo de ligação a receptor RGDLXXL deste sorotipo é mais variável que dos sorotipos O e A.

Diferentes classificações foram reportadas para o sorotipo Asia-1, sendo que Valarcher e colaboradores (2009) apresentaram, recentemente, uma divisão em seis grupos e um grupo adicional, Sindh-08, foi adicionado, sendo o grupo que circula atualmente na região da Eurásia Oriental.

3.3 CICLO INFECCIOSO, SINTOMAS E TRANSMISSÃO.

O vírus da febre aftosa tem um ciclo de vida relativamente curto em cultura de células, assim como outros membros da família *Picornaviridae*. Dependendo da multiplicidade da infecção, novas infecções virais começam a partir de 4 a 5 horas da primeira infecção (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Durante a infecção, o vírus rapidamente se liga a células em cultura através de alguns receptores celulares, cerca de uma centena de receptores por célula (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013). O motivo RGD altamente conservado na região de alça G-H, localizada na superfície da proteína VP1, foi identificado por Pierschbacher e Ruoslahti, em 1984, como sendo a região de ligação o receptor celular. Baxt e colaboradores (1990) identificaram que peptídeos contendo motivo RGD podem inibir a adesão do vírus a células em cultura (BAXT *et al.*, 1990).

Dentre os 24 receptores de membrana conhecidos como integrinas, que são glicoproteínas de membrana do tipo 1, envolvidos em adesão celular, migração celular, trombose e interação de linfócitos, oito deles usam o tripeptídeo RGD como sequência de reconhecimento (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013). A primeira identificação de um receptor de integrina para o vírus da febre aftosa foi feita por Roivainen e colaboradores (1994), que mostraram que células que não produziam a integrina $\alpha_v\beta_3$ não eram susceptíveis à infecção pelo vírus da febre aftosa. A integrina $\alpha_v\beta_3$ também é usada pelo coxsackievirus. Estudos posteriores mostraram que o vírus também pode utilizar os receptores $\alpha_v\beta_1$ e $\alpha_v\beta_6$. Em 1997, Jackson e colaboradores (1997) reportaram que o vírus do tipo O1 era capaz de utilizar o glicosaminoglicano sulfato de heparina (HS) como receptor, mediante interação com a proteína VP3.

Cavanagh e colaboradores (1979) e Baxt (1987) observaram que, após adsorção na célula, o vírion 146S quebra em subunidades pentaméricas 12S, liberando o RNA na célula. Entretanto, esta quebra não se dá na superfície da célula e provavelmente ocorre dentro de um endossomo ácido. Após liberação do RNA, o vírus usa a maquinaria da célula hospedeira para produzir suas proteínas estruturais e não estruturais, replicar seu conteúdo gênico e formar novas partículas virais encapsuladas (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

O vírus da febre aftosa é citocida e as células infectadas apresentam alterações morfológicas, conhecidas como efeitos citopáticos, que incluem o arredondamento das células e alteração e redistribuição de membranas celulares internas. Alterações bioquímicas, incluindo inibição de transcrição e tradução celular, também foram documentadas após infecção viral (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

O período de incubação do vírus da Febre Aftosa varia entre as espécies animais, com a dose do vírus, com a cepa e com a via de infecção, sendo de 1 a 12 dias em ovelhas, 2 a 14 dias em gado e, geralmente, dois dias em porcos. Os animais infectados apresentam uma febre alta durante 2 ou 3 dias e depois aparecem pequenas vesículas na mucosa da cavidade oral e na região dos cascos formadas pelas células afetadas pela multiplicação dos vírus que se coalesceram. As vesículas acabam se rompendo deixando à mostra o tecido conjuntivo na forma de ferimento e, assim, o conteúdo celular rico em vírus é liberado. Adicionalmente, o animal passa a salivar e claudicar. Desta forma, os animais se alimentam menos e não conseguem caminhar para se alimentar, diminuindo assim sua produção e desempenho, porém sua recuperação é provável. Animais novos podem morrer de forma aguda devido à miocardite derivada da infecção do músculo cardíaco pelo vírus (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

O vírus da febre aftosa pode ser encontrado em todas as secreções de animais que apresentam infecção aguda, incluindo saliva, leite, urina, fezes e sêmen, bem como fluidos de feridas associadas à infecção, além de fluido amniótico e fetos abortados. A maior produção de vírus ocorre usualmente no período em que as feridas se rompem e a maioria dos sinais clínicos aparece. O vírus pode entrar no

corpo do animal por meio de inalação, ingestão ou por meio de contato com mucosas e a susceptibilidade a cada via depende da espécie animal. O gado, em particular, é susceptível ao vírus na forma de aerossol, enquanto porcos requerem doses altas de vírus para infecção por esta via. Curiosamente, porcos produzem grande quantidade de vírus na forma de aerossóis e acabam sendo fonte de contaminação de gado.

Há pouca informação disponível acerca da sobrevivência do vírus no meio ambiente, porém sugere-se que o vírus seja viável por até três meses, podendo ser maior em baixas temperaturas. Humanos também podem atuar como vetores mecânicos ao carregar os vírus na roupa ou na pele. A transmissão sexual do vírus é uma via significativa para o tipo SAT em populações de búfalo africano. Em ovelhas, o vírus pode ultrapassar a placenta e infectar o feto (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

A febre aftosa não é considerada um problema de saúde pública, já que contaminação humana é bastante rara e não promove sérios danos, tendo sido reportada apenas algumas vezes, principalmente por contaminação de trabalhadores de fábricas de vacinas (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

3.4 VIRULÊNCIA E RESPOSTA DA CÉLULA HOSPEDEIRA

Virulência é a capacidade patogênica de um microrganismo, medida pela mortalidade que ele produz e/ou por seu poder de invadir tecidos do hospedeiro. No caso do vírus da febre aftosa, a virulência está associada às regiões descritas na tabela 1 (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013).

A proteção humoral contra o vírus da febre aftosa está associada à indução de altos níveis de anticorpos neutralizadores no soro sanguíneo, podendo ser encontrados até mesmo quatro dias após a infecção. Entretanto, esta resposta não garante proteção clínica e sua proteção depende dos níveis de anticorpos neutralizadores produzidos, o que indica que imunização mediada por célula deve atuar na eliminação do vírus. Porém, este mecanismo não está bem compreendido. Acredita-se que a exposição ao vírus resulta na produção de anticorpos neutralizadores IgG dependente de células-T e subsequente memória imunológica

dependente de células-T, com estimulação de células CD4+ (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013; SEGUNDO ET AL, 2014).

TABELA 1 - FATORES VIRAIS E DO HOSPEDEIRO QUE PODEM DETERMINAR A VIRULÊNCIA DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA.

Função	Fatores virais	Fatores da célula hospedeira
Adsorção e penetração	Proteínas do capsídeo (VP1, VP2 e VP3)	Integrinas, outros receptores (?), fatores de entrada (?)
Tradução	L ^{pro} e IRES	eIFs, PTBP, ITAF ₄₅
Replicação do RNA	Região S, poli-C, cre, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C ^{pro} , 3D ^{pol}	Membranas celulares, PCBP, PABP
Montagem e maturação	Proteínas do capsídeo (VP0, VP1 e VP3), 3C ^{pro} , 2A, RNA viral	Membranas celulares (?)

FONTE: ADAPTADO DE GRUBMAN E BAXT(2005).

3.5 DIAGNÓSTICO

Dada a importância econômica e a rápida disseminação do vírus da febre aftosa, métodos eficazes de diagnóstico e identificação de sorotipo são essenciais (GRUBMAN E BAXT, 2005; SMITH *et al.*, 2014) .

Inicialmente, a doença pode ser diagnosticada de acordo com sinais clínicos, como alta temperatura, excesso de salivação, formação de vesículas na mucosa oral e nos espaços interdigitais. Porém, estes sinais podem ser confundidos com outras doenças. Além disso, o sorotipo da doença não pode ser identificado por meio dos sinais clínicos. Portanto, vários métodos foram desenvolvidos para o diagnóstico da doença (GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013; SMITH ET AL, 2014).

Testes sorológicos podem ser usados para vigilância, certificação animal para importação/exportação, confirmação de casos suspeitos e monitoramento de

imunização por vacinação. Estes testes foram revisados por Jamal e Belsham em 2013 e alguns destes testes detectam proteínas virais estruturais e outros identificam anticorpos produzidos pelo animal contra proteínas não estruturais do vírus da febre aftosa.

Dentre os diferentes métodos desenvolvidos, pode-se citar o Teste de Neutralização do Vírus (do inglês, *Virus Neutralization Test* – VNT), que permite a detecção de anticorpos contra proteínas estruturais do vírus e é prescrito para certificação de produtos animais para importação/exportação. Porém, este método é lento, sujeito à contaminação, além de requerer condições de biocontenção para ser aplicado (JAMAL E BELSHAM, 2013).

Deste modo, o método de diagnóstico ELISA (sigla do inglês para *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) pode ser empregado para detecção de antígeno e determinação de sorotipo. Este ensaio apresenta 70-80% de resultados positivos para suspensões celulares de tecido epitelial que contém o vírus. Recentemente, uma combinação de integrina $\alpha_v\beta_6$ recombinante para captura do vírus com anticorpo monoclonal específico para cada sorotipo do vírus resultou em teste de mais alta especificidade, com a mesma sensibilidade dos testes ELISA com anticorpos policlonais (JAMAL E BELSHAM, 2013). Quando a quantidade de vírus é muito pequena para ser detectado por ELISA, os vírus precisam ser propagados em cultura de células primárias (células de tireóide bovinas ou células de fígado ovinas) ou linhagens como BHK e IBRS2. Porém, este processo é bastante caro, trabalhoso e consome muito tempo (até quatro dias) (JAMAL E BELSHAM, 2013).

A transcrição reversa por meio da reação em cadeia da DNA polimerase (do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction* – RT-PCR) tem se mostrado uma técnica bastante poderosa para o diagnóstico de febre aftosa, sendo rápida, sensível e confiável. *Primers* RT-PCR para detecção dos diferentes sorotipos têm sido reportados desde o trabalho de Rodriguez e colaboradores (1992). Recentemente, RT-PCR quantitativo também tem sido aplicado para tal diagnóstico, com a vantagem de se poder quantificar o conteúdo da amostra. Entretanto, ainda não é possível usar apenas uma técnica ou um conjunto de *primers* para obter resultados 100% precisos com relação ao diagnóstico. Além disso, os métodos

relacionados são dispendiosos e sua portabilidade ainda é um desafio. Devido a esta deficiência outros métodos têm sido desenvolvidos, como é o caso da técnica de amplificação mediada por alça (do inglês, *loop mediated amplification* – LAMP), que permite aplicação no campo com ferramentas baratas (Notomi *et al.*, 2000; Jamal e Belsham, 2013).

A região LAMP amplifica especificamente sequências de nucleotídeos a temperatura constante e usa dois *primers* internos e dois externos, além de DNA polimerase de alta taxa de extensão. Entretanto, este método ainda está em fase de avaliação e não há relato de sua capacidade de substituição pelos métodos tradicionais descritos anteriormente (NOTOMI *et al.*, 2000; JAMAL E BELSHAM, 2013). Outro método que pode ser aplicado no campo é um teste cromatográfico que se baseia em anticorpos monoclonais, que foi desenvolvido por Reid e colaboradores, em 2001. Porém, este método ainda está em fase inicial de aplicação (JAMAL E BELSHAM, 2013).

3.6 CONTROLE E PREVENÇÃO

Uma resposta rápida a um surto de febre aftosa é necessária para conter a doença, de modo a não se espalhar para regiões livres. Mecanismos de controle da doença foram revisados por Jamal e Belsham (2013).

No Brasil, veterinários que suspeitam de casos de aftosa devem seguir as recomendações do Ministério da Agricultura (MAPA), de acordo com os padrões constantes no Manual de Padronização – CTQA/DAS e no Manual de Vigilância Sanitária de Doenças Vesiculares – CFA/CGCD/DAS, disponíveis na sua página eletrônica (www.agricultura.gov.br).

A regulamentação de importação/exportação é crucial para que o vírus não seja introduzido em áreas livres da doença. Além de haver um controle da alimentação dos animais, de modo a evitar este meio de transmissão do vírus, que é preocupante principalmente para suínos. O tratamento por calor pode ser usado neste caso, sendo eficaz na destruição do vírus uma vez que diversos protocolos de

inativação do vírus da febre aftosa em produtos animais como leite e carne foram desenvolvidos pela OIE (JAMAL E BELSHAM, 2013; SMITH *et al.*, 2014).

Para a desinfecção de ambientes com excreções de animais contaminados, recomenda-se a utilização de desinfetante como hidróxido de sódio, carbonato de sódio, ácido cítrico e Virkon-S®. Compostos de iodo, de amônio, hipoclorito e fenóis são menos efetivos. A concentração e o tempo de exposição ao desinfetante dependem do tipo de superfície (JAMAL E BELSHAM, 2013).

Programas de controle global foram estabelecidos pela OIE para a redução da circulação do vírus e consequente redução na incidência da doença. O programa conhecido como *Progressive Control Pathway* (PCP-FMD) inclui uma série de critérios para assistir países endêmicos de modo a reduzir progressivamente a circulação e o impacto da doença. Este programa consiste em série de estágios, cada qual com resultados esperados definidos. Estes resultados podem ser atingidos a partir de várias atividades, que podem ser definidas pelos países. A determinação de fatores responsáveis pela manutenção e disseminação da doença e o conhecimento acerca dos subtipos do vírus que circula na região endêmica são essenciais para o controle efetivo da doença (JAMAL E BELSHAM, 2013; SMITH *et al.*, 2014).

Para o controle da doença, vários métodos são empregados, incluindo quarentena, eutanásia de animais afetados ou expostos, além da limpeza e desinfecção de locais e equipamentos contaminados. A vacinação é o método utilizado para a contenção da disseminação do vírus e para a proteção animal. Baseando-se neste método de controle, a Organização Mundial para a Saúde Animal classifica países como pertencentes a região que apresenta casos de febre aftosa com ou sem vacinação, região livre de febre aftosa com vacinação ou região livre da doença sem vacinação (JAMAL E BELSHAM, 2013; SMITH *et al.*, 2014).

As primeiras vacinas datam da década de 30 e usavam amostras de vírus inativados com formalina, na presença de hidróxido de alumínio, para inoculação em animais. Estas amostras eram adquiridas em pequenas quantidades e não era possível sua comercialização, além de surtos reportados após sua administração. Um método de produção viral a partir de epitélio de língua de boi em alta quantidade

foi desenvolvido. Em 1970, observou-se que a vacina contra febre aftosa poderia ser produzida a partir de uma única proteína viral, o que tornou sua comercialização viável. Em 1981, o governo dos EUA anunciou a criação de uma vacina como a primeira geneticamente modificada (KLEID *et al.*, 1981; GRUBMAN E BAXT, 2005; JAMAL E BELSHAM, 2013; SMITH *et al.*, 2014).

O método de vacinação protege somente animais com o mesmo sorotipo contido na vacina, sendo aplicável de acordo com a região endêmica. A transmissão por animais selvagens ainda é recorrente, como no caso do búfalo selvagem na África (JAMAL E BELSHAM, 2013).

O uso da vacinação depende de fatores sócios econômicos, políticos e científicos. Observa-se que o mau armazenamento e a falta de controle eficiente da administração da vacina podem levar à ineficácia do método. O controle do movimento de animais também tem levado à resultados eficientes no controle da doença. Entretanto, este método pode ser dificultado devido aos costumes da sociedade, festivais religiosos e comércio informal de animais (JAMAL E BELSHAM, 2013).

3.7 DIFERENCIAÇÃO ENTRE ANIMAIS INFECTADOS OU PORTADORES DE ANIMAIS VACINADOS

A detecção de animais que foram infectados pelo vírus da febre aftosa é de grande importância para o controle da doença, especialmente em países livre da doença ou que apresenta apenas surtos esporádicos. Entretanto, é importante para propostas comerciais que se diferenciem animais vacinados de animais infectados porque uma fração de até 50% dos animais infectados pode se tornar carreador, podendo apresentar o vírus na faringe mesmo após 28 dias da infecção. Os animais carreadores podem permanecer normais por 2 a 3 anos, e atuarem como fonte de infecção para outros animais (GRUBMAN E BAXT, 2005; MA *et al.*, 2011; JAMAL E BELSHAM, 2013).

A replicação viral resulta na produção de proteínas estruturais e não estruturais ambas com características imunogênicas. As vacinas consistem de

partículas virais inativadas, proteínas virais ou seus peptídeos e também induzem a produção de anticorpos neutralizantes, principalmente contra proteínas estruturais do vírus. Deste modo, é possível discriminar animais infectados de animais vacinados a partir da detecção de anticorpos contra proteínas não estruturais. Apesar de diferentes tipos de vacinas terem sido desenvolvidas, incluindo aquelas com proteínas estruturais, peptídeos de proteínas virais e em DNA, a vacina que contém o vírus em sua forma inativada continua sendo utilizada no controle da doença na maioria dos países endêmicos, devido à sua alta taxa de proteção (MA *et al.*, 2011; JAMAL E BELSHAM, 2013). No caso das primeiras vacinas desenvolvidas, proteínas não estruturais contaminantes em vacinas não filtradas adequadamente levavam à produção de anticorpos contra estas proteínas, dificultando a diferenciação (GRUBMAN E BAXT, 2005).

O primeiro relato do uso de proteínas não estruturais para detecção de animais vacinados foi citado por Cowan e Graves (1966) que identificaram um antígeno não estrutural (proteína 3D^{pol}) do vírus que reagia com soro sanguíneo de animais infectados, em detrimento do soro de animais vacinados (COWAN E GRAVES, 1966). Outras proteínas não estruturais foram utilizadas para a diferenciação dos animais e as proteínas 3AB, 2C, 3C e 2B ou peptídeos correspondentes são indicadas como antígenos em testes de diagnóstico como o teste ELISA. Bergmann e colaboradores (1993) propuseram que mais do que uma proteína não estrutural do vírus, ou peptídeos correspondentes, deveriam ser utilizados para a diferenciação não ambígua dos animais em imunoenaios.

Métodos de detecção baseados em ELISA foram revisados por Ma e colaboradores (2011). Várias proteínas recombinantes não estruturais usadas em vacinas são produzidas em *Escherichia coli* (DE DIEGO *et al.*, 1993), baculovírus (MEYER *et al.*, 1997; SORENSEN *et al.*, 1998) ou peptídeo sintéticos (SEHN *et al.*, 1999) e estas têm sido validadas. Entre as proteínas não estruturais, as mais estudadas e utilizadas são 3D^{pol}, 3B e 3ABC. Outras proteínas não estruturais e quimeras também têm sido analisadas, porém ainda em estágio de validação (MA *et al.*, 2011).

3.8 A PROTEÍNA 3ABC

O polipeptídeo 3ABC tem função no estágio de replicação do vírus da febre aftosa (O'DONNELL *et al.*, 2001; GRUBMAN E BAXT, 2005; MA *et al.*, 2011). Este polipeptídeo é resultado do produto P3 de tradução do genoma viral e é, provavelmente, um produto intermediário da protease 3C^{pro} em células infectadas. A sua função pode estar relacionada com a clivagem de histonas H3 e a inibição da transcrição do mRNA celular durante a infecção. Sendo assim, o polipeptídeo 3ABC é observado em relativamente baixa concentração em lisados celulares de células infectadas com o vírus da febre aftosa. Além disso, este polipeptídeo apresenta alta imunogenicidade (CAPPOZZO *et al.*, 2002; GRUBMAN E BAXT, 2005; MA *et al.*, 2011).

Inúmeros testes baseados em ELISA usando 3ABC recombinante produzida em *Escherichia coli* foram desenvolvidos para diferenciar suínos, bovinos e ovinos saudáveis, infectados ou vacinados. Nestes casos, foi possível detectar casos infecciosos subclínicos que eram silenciosos (MA *et al.*, 2011; JAMAL E BELSHAM, 2013).

Em 2003, Kweon e colaboradores estabeleceram um método de ELISA usando 3ABC recombinante expressa em baculovírus ligada a um anticorpo anti-3A. Sorensen e colaboradores (1998), a partir de filtração e inativação, conseguiram remover reações inespecíficas no soro sanguíneo de bovinos e ovinos. Clavijo e colaboradores (2004) estabeleceram um método de ELISA competitivo com a proteína 3ABC biotinizada. Outros métodos indiretos e competitivos envolvendo ELISA foram reportados (CLAVIJO *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2011; JAMAL E BELSHAM, 2013).

3.9 ANTICORPOS

Em 1890, von Behring e Kitasato Shibasaburo reportaram a existência de um agente no sangue que poderia neutralizar a toxina da difteria (BLACK, 1997). No ano seguinte, Paul Ehrlich fez referência a este agente, pela primeira vez, como anticorpo (do inglês, *antibody* - Ab), em estudos que descreviam a habilidade do agente em

discriminar duas substâncias imunes (BLACK, 1997). Subsequentemente, a substância que induz a produção de anticorpo foi referida como antígeno. Na década de 20, Michael Heidelberger e Oswald Avery observaram que antígenos poderiam ser precipitados por anticorpos proteicos (BLACK, 1997).

Anticorpos são glicoproteínas conhecidas como imunoglobulinas (Ig) e são produtos da resposta imune humoral, na qual o linfócito B, no plasma sanguíneo, reconhece substâncias exógenas como antígenos. Anticorpos solúveis são, então, produzidos por estas células e são secretados ou atuam como receptores de membrana. Estes receptores de membrana são importantes para a ativação destas células e sua posterior diferenciação em células que produzem anticorpos ou células de memória, que sobrevivem no corpo e podem levar à produção de anticorpos contra o mesmo antígeno (AL-LAZIKANIA *et al.*, 1997; TOLAR *et al.*, 2008; SCHROEDER *et al.*, 2010).

As técnicas de eletroforese e ultracentrifugação levaram às primeiras caracterizações das propriedades bioquímicas das imunoglobulinas de mamíferos. Em 1939, Tiselius e Kabat usaram eletroforese para separar soro sanguíneo humano imunizado com ovoalbumina em α -globulina, β -globulina e γ -globulina. A fração de γ -globulina continha a maior quantidade de imunoglobulina, que ficou conhecida posteriormente como IgG (BLACK, 1997).

Waldenstrom, Pedersen e Kunkel, em 1944, caracterizaram a imunoglobulina IgM (com "M" de macroglobulina) usando ultracentrifugação. Em 1959, Heremans e colaboradores identificaram a imunoglobulina IgA. Mais tarde, em 1965, Rowe e Fahey descobriram a imunoglobulina IgD em pacientes com mieloma. A imunoglobulina IgE, por sua vez, foi o último isotipo a ser descrito, um ano mais tarde, independentemente por Ishizaka e Hombrook e Johansson e Bennich (BLACK, 1997).

A descoberta de cadeias leves de imunoglobulinas é anterior à descoberta das imunoglobulinas. Porém, somente na década de 50, Korngold e Lipari separaram as proteínas descobertas por Bence Jones em 1845 nos tipos κ e λ (BLACK, 1997).

Duas cópias idênticas de um polipeptídeo de cadeia pesada (~55 kDa) e outras duas cópias de polipeptídeo de cadeia leve (~25kDa) interagem entre si por meio de ligações dissulfeto e não-covalentes para formar um heterotetrâmero na forma de Y, com aproximadamente 150 kDa (FIGURA 4). Cada polipeptídeo contém um domínio N-terminal variável (V) e uma região C-terminal constante, que pode ter 1 ou 3-4 domínios constantes (C), no caso da cadeia leve e da cadeia pesada, respectivamente. Cada um dos domínios consiste de dois motivos do tipo sanduíche de folhas pregueadas β de 110 a 130 resíduos de aminoácidos, mantidos por ligação dissulfeto. Adicionalmente, a cadeia pesada apresenta uma região espaçadora variável em extensão entre o primeiro e o segundo domínios constantes (FIGURA 4) (AL-LAZIKANIA *et al.*, 1997; SCHROEDER *et al.*, 2010).

Em mamíferos, as cadeias leves de anticorpos podem ser apenas do tipo κ ou do tipo λ . Já no caso das cadeias pesadas, a região constante difere entre os diferentes isotipos, sendo que as cadeias pesadas do tipo γ , α e δ apresentam uma região constante composta de três domínios de imunoglobulina em *tandem*, enquanto as cadeias pesadas do tipo μ e ϵ apresentam uma região constante composta por quatro domínios de imunoglobulina. A região variável das cadeias pesadas, por sua vez, difere em anticorpos produzidos por células B (AL-LAZIKANIA *et al.*, 1997; SCHROEDER *et al.*, 2010).

As regiões N-terminais variáveis das cadeias leve e pesada se associam para formar o domínio de ligação ao antígeno e as regiões C-terminais das duas cadeias pesadas se associam para formar o domínio Fc. As três regiões altamente variáveis em ambas as cadeias constituem as regiões que determinam complementaridade (do inglês, *complementarity determining regions* – CDR) e estão situadas entre quatro regiões estáveis. Os anticorpos, portanto, reconhecem seus antígenos usando algumas ou todas as suas CDRs (AL-LAZIKANIA *et al.*, 1997; SCHROEDER *et al.*, 2010).

Anticorpos se ligam reversivelmente a um epítopo de um antígeno por meio dos braços (Fab) da sua estrutura na forma de Y. Como cada braço contém um sítio de ligação, anticorpos são bivalentes. O domínio Fc corresponde à outra extremidade da estrutura na forma de Y e confere função de ligação a receptores

na superfície de células e a algumas proteínas do sistema complemento, possibilitando a ativação do sistema imune. Uma região articuladora rica em resíduos de prolina, treonina e serina confere movimentos rotacionais e laterais aos domínios de ligação a antígeno. Esta região é susceptível à proteólise por papaína ou pepsina antígeno (figura 4) (AL-LAZIKANIA *et al.*, 1997; SCHROEDER *et al.*, 2010).

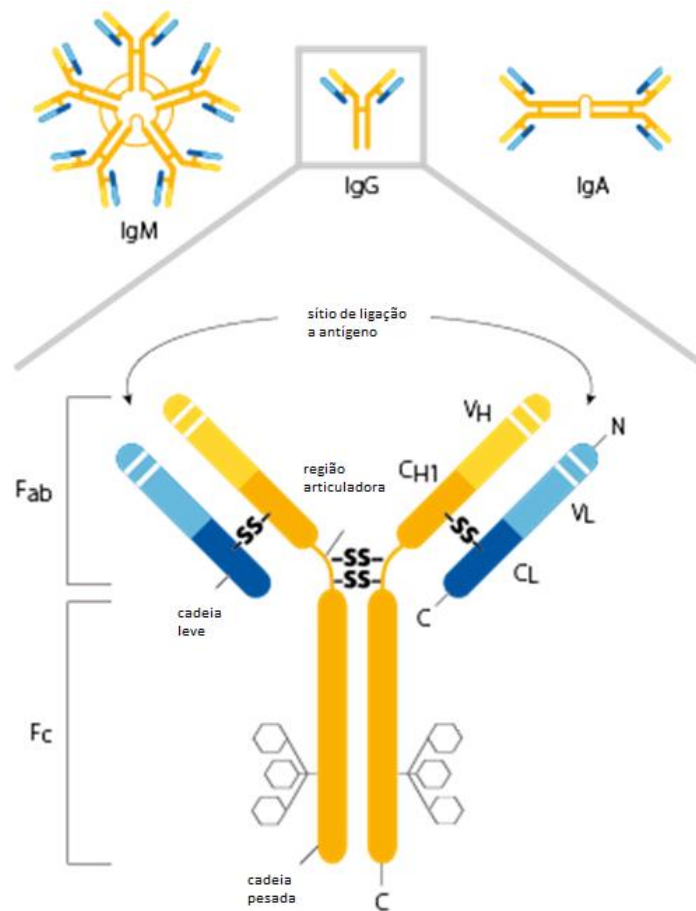


FIGURA 4 – ESTRUTURA DOS ANTICORPOS IgG, IgM E IgA.
FONTE: Adaptado de <http://www.ebioscience.com>.

Vários mecanismos são responsáveis pela geração da diversidade de sequência de aminoácidos necessária para a interação com os diferentes antígenos. Entre eles, pode-se citar a combinação de diferentes cadeias pesadas e leves para dar origem ao sítio de ligação, recombinação genética dentro das

regiões hipervariáveis e alta taxa de mutação somática (AL-LAZIKANIA *et al.*, 1997; SCHROEDER *et al.*, 2010).

Muitos dos antígenos são altamente complexos, podendo apresentar inúmeros epítomos que são reconhecidos por vários linfócitos-B. Cada linfócito-B é ativado, prolifera-se e se diferencia no plasma sanguíneo e a resposta imune é conhecida como policlonal, pois é devida a diferentes células do sistema imune. Anticorpos monoclonais, por sua vez, são produzidos por um único linfócito B ou sua população clonal em resposta a um único epítomo. Estes foram reconhecidos pela primeira vez no soro sanguíneo de pacientes que apresentavam quadro de mieloma no qual a expansão de células malignas levava à produção de altos níveis de anticorpos idênticos (AL-LAZIKANIA *et al.*, 1997; TOLAR *et al.*, 2008; SCHROEDER *et al.*, 2010).

A especificidade de anticorpos monoclonais é útil como ferramenta em pesquisas que avaliam mudanças conformacionais em proteínas, interações proteína-proteína, estados de fosforilação e outras modificações pós-traducionais, entre outros. Porém, sua alta especificidade também pode ser um fator limitante para sua aplicação, já que pequenas alterações estruturais podem afetar sua função. Por outro lado, anticorpos policlonais são heterogêneos e podem reconhecer diferentes epítomos e pequenas mudanças em um ou mais epítomos podem não ser tão importantes para sua função. Além disso, anticorpos policlonais tendem a ser mais estáveis em um largo espectro de pH e concentração de sal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON METHODS OF PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES, 1999; SCHROEDER *et al.*, 2010; YAMADA, 2011).

Anticorpos policlonais são produzidos a partir da inoculação de um antígeno em um animal como camundongo, coelho ou cabra. Animais maiores podem ser utilizados, já que a quantidade de soro sanguíneo é maior, o que implica em maior produção. A seleção do animal depende da quantidade de anticorpo necessária, a relação filogenética entre doador de antígeno e produtor de anticorpo (quanto menor, maior o potencial de produção de anticorpo de alto título) e características desejadas para os anticorpos (ex. isotipos). A injeção do antígeno induz linfócitos-B

a produzirem imunoglobulinas IgG específicas para o antígeno. Em seguida, estas imunoglobulinas policlonais são purificadas a partir do soro sanguíneo do animal, em geral, após alguns meses da imunização inicial. Políticas de segurança com pesquisa usando animais incluem limitação no volume de sangue a ser coletado por animal para a purificação dos anticorpos policlonais e precauções de segurança para a injeção de antígenos nos animais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON METHODS OF PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES, 1999; LIPMAN *et al.*, 2005; SCHROEDER *et al.*, 2010; YAMADA, 2011).

O tamanho, o envelhecimento e o grau de agregação dos antígenos podem afetar a qualidade e a quantidade de anticorpos produzidos. Proteínas carreadoras devem ser conjugadas a polipetídeos pequenos contra os quais se deseja produzir anticorpos. Além disso, adicionam-se adjuvantes às amostras de antígenos a serem injetadas nos animais objetivando-se aumentar e melhorar a resposta imune aos antígenos. Os adjuvantes mais utilizados são adjuvantes de *Freund*, de RIBI, Titermax e hidróxido de alumínio (LIPMAN *et al.*, 2005; SCHROEDER *et al.*, 2010; YAMADA, 2011).

A produção de anticorpos monoclonais é feita por meio da técnica desenvolvida por Köhler e Milstein a partir da fusão de linfócitos B esplênicos de um animal imunizado com células de mieloma, resultando em hibridomas imortais que produzem grande quantidade de anticorpos monoclonais (LIPMAN *et al.*, 2005; SCHROEDER *et al.*, 2010; YAMADA, 2011).

As células de mieloma não possuem capacidade de expressar a enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil transferase (HGPRT), necessária para a síntese de ácidos nucleicos. Ao expor estas células a aminopterina, análoga ao ácido fólico, que inibe a diidrofolato redutase (DHFR), estas células se tornam autotróficas para ácidos nucleicos, necessitando de suplementação para sua sobrevivência. Portanto, é possível selecionar as células de hibridoma. A seleção de clones de hibridomas se dá a partir de diluição da sua cultura. As populações clonais podem ser injetadas em camundongos, onde produzem tumores que secretam fluido rico em anticorpos, conhecidos como fluidos de ascites. Porém, este procedimento é doloroso ao animal (LIPMAN *et al.*, 2005; SCHROEDER *et al.*, 2010; YAMADA, 2011).

A purificação dos anticorpos se inicia com a remoção das células, fragmentos celulares e lipídeos por centrifugação seguida de filtração em filtro de corte de 0,45 μm . A amostra, então, é concentrada por ultrafiltração. Como muitas das impurezas associadas à amostra são ânions como ácidos nucleicos e endotoxinas, usualmente se emprega cromatografia de troca iônica. Para se alcançar maior pureza, uma etapa de cromatografia de afinidade ao antígeno pode ser empregada (LIPMAN *et al.*, 2005; SCHROEDER *et al.*, 2010; YAMADA, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a produção dos anticorpos policlonal e monoclonal anti-3ABC foram realizadas etapas de produção e purificação da proteína 3ABC, as quais foram realizadas de duas formas. A primeira, com um processo de semi purificação, teve como objetivo produzir altas quantidades de proteína para a imunização dos animais, tanto coelhos quanto camundongos. A segunda etapa foi realizada para obter uma proteína com elevado grau de pureza para a realização dos ensaios de seleção dos hibridomas positivos para a proteína 3ABC.

Após a produção da proteína foram realizadas imunizações em coelhos e camundongos para a obtenção dos anticorpos policlonal e monoclonal respectivamente. Esses anticorpos foram produzidos e caracterizados sendo descrito a seguir todo procedimento realizado.

4.1 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA 3ABC RECOMBINANTE.

4.1.1 Expressão da proteína 3ABC.

A proteína 3ABC do vírus da febre aftosa foi produzida utilizando o microrganismo geneticamente modificado e desenvolvido por GONZALEZ, 2013. O gene que codifica a proteína 3ABC clonada no vetor pET Sumo foi transformada em cepa de *E. coli* Rosetta (DE3).

Para a expressão foi preparado o pré inóculo em quatro frascos *Falcon* de 50 mL com 20 mL de meio Terrific® (SIGMA) e 200 µL da *E. coli* Rosetta (DE3) modificada. O pré inóculo foi incubado a 150 rpm, a 37°C e durante 16 horas.

O inóculo foi preparado em quatro elernmayer contendo 1 litro de meio Terrific®, 20 mL de pré inoculo e 30 µg/mL de solução de canamicina. Após aproximadamente cinco horas de cultivo, quando a densidade óptica (D_{600nm}) estava próxima de 0,6 nm fez-se a indução com 1 mM deisopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). A indução ocorreu durante três horas a 37° C e 150

rpm. Após a indução, as células foram centrifugadas a 6000 xg durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento formado foi armazenado a -20°C até o seu processamento para etapas de semi purificação e purificação. Foram tomadas amostras de 1 mL do cultivo antes da indução e após o término para confirmação da expressão da proteína. Essas amostras foram centrifugadas durante 1 minuto a 12000 xg, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendidos em 80 µL de água e 20 µL de tampão amostra cinco vezes concentrado para SDS-PAGE. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 95°C e aplicadas em gel de poliacrilamida 12%.

4.1.2 Semi purificação da proteína 3ABC recombinante.

Com o intuito de obter grandes quantidades e elevado teor de proteína 3ABC a mesma foi tratada de forma a conseguir boa solubilização seguida de processos de lavagens para eliminação de algumas proteínas contaminantes.

A ressuspensão do sedimento após a expressão da proteína foi realizada em 50 mL de PBS, seguida de centrifugação a 4000 xg durante 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 100 mL de PBS com 0,1% de Triton X-100. As células foram lisadas no homogenizador de alta pressão em três ciclos com 1000 Bar de pressão. Após a lise foi realizado a centrifugação a 13000 xg durante 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento o qual corresponde aos corpúsculos de inclusão, foi lavado duas vezes com água WFI, centrifugando a 15000 xg durante 30 minutos. O sedimento formado após a segunda lavagem foi ressuspendido com tampão Tris-HCl 0,1M pH 12. Fez-se outro ciclo de centrifugação a 15000 xg por 30 minutos. O sobrenadante foi recuperado, o qual apresentava a proteína de interesse semi purificada. O volume de proteína obtido foi de 60 mL os quais foram filtrados em membrana 0,22 µm, aliqüotados em microtubos de 2,0 mL e armazenados em ultrafreezer a -70°C.

Eletroforese em SDS-PAGE 12% foi realizada para a análise da proteína 3ABC após seu processamento. Para a identidade imunológica da proteína, foi realizado teste de *Western Blotting*, utilizando como anticorpo primário o monoclonal

3H7 CEVAN dirigido à proteína 3A. Como anticorpo secundário foi utilizado o anti IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com peroxidase. A reação foi revelada com o kit *ECL Western Blotting detection reagents (GE)*, a membrana foi incubada com os reagentes por 1 minuto para depois ser inserida no cassete para exposição à placa radiográfica. A placa foi revelada passando sequencialmente pelo revelador e fixador, observando a formação da banda correspondente a proteína 3ABC.

4.1.2.1 Eletroforese SDS-PAGE

As eletroforeses foram realizadas segundo protocolo proposto por Laemmli descrito em Sambrook e Russel (2001). Os géis utilizados foram de 12% de bisacrilamida/acrilamida (29:1) no gel de separação. As eletroforeses foram corridas a 100 mV utilizando a câmara vertical da BioRad. Como padrões de peso molecular foram utilizados LMW Marker (GE Healthcare). Os géis foram posteriormente corados com 0,25% de Coomassie – *Coomassie Blue Brilliant R250* em 50% metanol e descorados com 10% ácido acético. As amostras foram preparadas adicionando-se ¼ de volume do tampão amostra cinco vezes concentrado (5x TA SDS-PAGE: Tris-HCl 300 mM, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 25%, SDS 10% e azul de bromo fenol 0,05%).

4.1.2.2 *Western Blotting*

Para os testes de *Western Blotting* foram feitas corridas de eletroforese em SDS-PAGE 12% para a separação das proteínas e em seguida elas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose Hybond (GE) utilizando tampão de transferência (TRIS-Base 48mM, glicina 39mM, metanol 20%) na cuba para transferência da marca BioRad a 25V; 300 mA por 120 minutos. Após a transferência a membrana foi corada com vermelho de *Ponceau* 0,1% para a conferência da transferência das proteínas para a membrana e para a marcação na membrana das bandas correspondentes ao marcador de peso molecular. A seguir a membrana foi bloqueada em PBS com 0,1% de Tween 20 e 5% de BSA (do inglês

Bovine Serum Albumin), durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, a solução foi descartada e a membrana lavada duas vezes com solução de lavagem (PBS com 0,1% Tween 20) durante 5 minutos a 37°C. Foi preparada a diluição do anticorpo detector em solução PBS 0,1% Tween 20 e 0,5% de BSA e incubada por 1 hora a 37°C, sob agitação. Após três lavagens de 10 minutos foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a uma enzima específica, incubando por 1 hora a 37°C sob agitação. Após as lavagens, a revelação foi feita com um cromógeno e substrato específico dependendo do conjugado utilizado.

4.1.3 Purificação da proteína 3ABC recombinante.

A fim de obter uma proteína com elevado grau de pureza que pudesse ser utilizada nos procedimentos de seleção dos hibridomas produtores de anticorpo monoclonal anti-3ABC, foram realizados etapas de solubilização da proteína em presença de coquetel de inibidores de proteína seguida de purificação por cromatografia de afinidade.

O procedimento realizado para a purificação foi a ressuspensão do sedimento armazenado após a expressão da proteína em 136 mL de tampão PBS e 0,1% de Triton X-100, seguindo a proporção de 10 mL de tampão para cada 1 g de biomassa. As células foram lisadas no homogenizador de alta pressão em três ciclos de 1000 Bar de pressão. Após a lise foi realizada centrifugação a 13000 xg durante 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento o qual corresponde aos corpúsculos de inclusão, foi lavado duas vezes com 100 mL de PBS pH 8,5 centrifugando a 13000 xg durante 30 minutos.

A proteína foi solubilizada em 100 mL de tampão com 50 mM TRIS pH 8,5; 1 mM β mercaptoetanol; 0,5% de sarcosil; 5% de glicerol e uma pastilha do inibidor de protease SIGMAFAST *Protease Inhibitor Cocktail Tablets EDTA-Free*.

Após a solubilização a proteína foi purificada em coluna de afinidade com metal ionizado (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) utilizando a coluna HisTrapTM FF (GE Healthcare) e o equipamento AKTA fplc (GE Healthcare). Para a purificação foi adicionado à amostra 0,5 M de NaCl e foram preparados 500

mL de tampão de lavagem (500 mM de NaCl; 10 mM de Imidazol; 50 mM TRIS pH 8,5; 1 mM β mercaptoetanol; 0,5% de sarcosil; 5% de glicerol) e 500 mL de tampão de eluição (500mM de NaCl; 0,5 M de Imidazol; 50 mM TRIS pH 8,5; 1 mM β mercaptoetanol; 0,5% de sarcosil; 5% de glicerol). A coluna foi lavada com cinco volumes de água destilada e em seguida foi equilibrada com cinco volumes de tampão de lavagem com fluxo de 1 mL/minuto. Em seguida 50 mL de amostra foram aplicadas à coluna que logo foi lavada com tampão de lavagem. A eluição foi realizada em gradiente, obedecendo a seguinte ordem de concentração de Imidazol: 10, 25, 50, 100, 200 e 500 mM. A concentração de 500 mM foi a mais adequada para eluir a proteína 3ABC sem contaminantes. Após obtenção da proteína 3ABC com elevado grau de pureza, a mesma foi concentrada em ultrafiltros com membrana de 30kDa. As amostra foram centrifugadas a 3500 xg durante 20 minutos e após a centrifugação o sobrenadante (concentrado) foi coletado obtendo 1 mL de proteína concentrada e purificada a qual foi aliqotada em microtubos com 100 μ L cada um e armazenados a -20°C.

A proteína 3ABC após processo de purificação e concentração foi analisada em SDS-PAGE 12% conforme descrito no item 4.1.2.1; para a caracterização de sua identidade imunológica foi realizado teste de *Western Blotting* (item 4.1.2.2), utilizando como anticorpo primário o monoclonal 3H7 do CEVAN dirigido à proteína 3A e como anticorpo secundário foi utilizado o anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase produzido em cabra. A revelação foi realizada com o kit *ECL Western Blotting detection reagents (GE)*, a membrana foi incubada com os reagentes por 1 minuto para depois ser inserida no cassete para exposição à placa radiográfica. A placa foi revelada passando sequencialmente pelo revelador e fixador, observando a formação das bandas correspondentes às proteínas 3ABC.

4.1.4 Quantificação da proteína 3ABC.

A proteína 3ABC foi quantificada por densitometria através do programa *Gel - Pro Analyser*. Para a quantificação foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, no qual foram aplicadas diferentes quantidades do padrão com a

proteína BSA de concentração conhecida (1 mg/mL). A proteína obtida pelos dois métodos de purificação e semi purificação foram quantificadas.

Após a corrida eletroforética as proteínas separadas no gel de poliacrilamida foram coradas com corante *Comassie Blue* e após o uso da solução descorante para eliminação do excesso de corante o gel foi escaneado para a quantificação pelo programa. Através do programa *Gel - Pro Analyser* foi possível obter os valores de densidade ótica das bandas de interesse e através da integração da curva padrão, determinada através das diferentes quantidades de BSA (1mg/ml) aplicada no gel, foi possível obter as concentrações da amostra requerida.

4.2 COMITÊ DE ETICA

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Aniamis – CEUA-Ourofino, com o protocolo de número 039/14.

4.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-3ABC.

4.3.1 Imunização de Coelhos

Para as imunizações foram utilizados dois coelhos machos da raça Nova Zelândia com seis meses de idade. Cada coelho recebeu uma dose de 0,1 mg/mL da proteína 3ABC semi purificada a cada imunização. A primeira dose da proteína foi administrada com adjuvante completo de *Freund* (50% v/v). As doses seguintes foram administradas com o adjuvante incompleto de *Freund* (50% v/v). A tabela 2 apresenta o protocolo utilizado com o esquema das imunizações e sangrias dos animais.

TABELA 2 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA O ESQUEMA DE SANGRIA E IMUNIZAÇÕES DOS COELHOS PARA A PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE ANTI-3ABC

Procedimento	Dia	Descrição
Sangria	Dia 0	Antes da imunização, foi coletado aproximadamente 5 mL de sangue dos animais pela veia marginal da orelha.
Primeira inoculação	Dia 0	Inoculação de 1 ml por via intramuscular (dois pontos perna direita)
Primeiro <i>Booster</i>	Dia 15	Coleta de sangue (orelha-aproximadamente 5 ml) e Inoculação de 1 mL por via intramuscular (dois pontos perna esquerda)
Segundo <i>Booster</i>	Dia 30	Coleta de sangue (orelha-aproximadamente 5 ml) e 2º booster com 1 mL por via intramuscular.
Terceiro <i>Booster</i>	Dia 45	Coleta de sangue (orelha-aproximadamente 5 ml) e 3º booster com 1 mL por via intramuscular.
Quarto <i>Booster</i>	Dia 60	Coleta de sangue (orelha-aproximadamente 5 ml) e 4º booster com 1 mL por via intramuscular.
Sangria total	Dia 75	Sangria do animal para obtenção de grande volume de sangue através de punção cardíaca.

FONTE: O AUTOR

4.3.2 Obtenção dos Soros

Após as coletas de sangue dos coelhos, os tubos com sangue foram deixados em temperatura ambiente para a formação do coágulo. Os soros foram transferidos para novos tubos e centrifugados a 4000 xg durante 10 minutos. Em seguida o soro foi aliquoteado em microtubos de 1,0 mL com 500 µL cada e foram armazenados a -20°C até sua utilização.

4.3.3 Triagem da Produção de Anticorpo Policlonal

4.3.3.1 Avaliação da imunidade humoral dos coelhos para a proteína 3ABC por *Western Blotting*.

Após as cinco imunizações dos coelhos, foi realizado teste de *Western Blotting* com o soro dos animais positivo e negativo (coletado no dia zero) para a conferência da resposta humoral dos animais frente à proteína 3ABC.

Para o teste de *Western Blotting* foi corrida uma eletroforese em SDS-PAGE 12% para a separação das proteínas e em seguida elas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose Hybond (GE), conforme descrito no item 4.1.2.2.

O anticorpo primário utilizado neste teste foi soro do animal positivo e negativo diluídos 1:200. O anticorpo secundário foi o anti IgG de coelho produzido em cabra conjugado com fosfatase alcalina diluído em 1:5000. A revelação foi feita com 2 mL de solução BCIP/NTB por 3 minutos. Para o bloqueio da reação a membrana foi lavada com água destilada.

4.3.4 Teste ELISA para Titulação da proteína 3ABC x Conjugado anti-IgG de coelho x diluição do soro.

Com o objetivo de determinar as concentrações ótimas dos reagentes utilizados no teste ELISA para a verificação da produção de anticorpo policlonal anti-3ABC, foi realizada titulação da proteína 3ABC x conjugado anti-IgG de coelho x diluição do soro, como descrito a seguir.

4.3.4.1 Adsorção do Antígeno

A proteína utilizada nos testes ELISA para a triagem do anticorpo policlonal foi a proteína semi purificada. A mesma foi adsorvida em microplacas de 96 poços de fundo chato. A adsorção ocorreu em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e foram testadas as seguintes concentrações da proteína: 7,0; 3,5; 1,75; 0,875 µg/mL aplicadas em 50 µL/poço cada concentração. A placa foi incubada de 4 a 8°C por aproximadamente 16 horas.

4.3.4.2 Lavagem

A primeira lavagem teve como finalidade remover o excesso de antígeno que não se fixou na placa. Utilizou-se 200 µL/poço de solução de lavagem (salina fisiológica 0,05% Tween 20) por cinco vezes cada poço. A solução ainda restante nos orifícios da placa foi retirada, invertendo-se a placa sobre papel absorvente.

4.3.4.3 Bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos

Esta etapa foi realizada com o objetivo de bloquear os sítios de ligação não específicos. O bloqueio da placa foi feito utilizando-se 100 µL/poço de solução de bloqueio (tampão PBS a 1% de Ovoalbumina grau V). Incubou-se a mesma em estufa à 37°C por 60 minutos, em seguida a placa foi lavada como descrito no item 4.3.4.2.

4.3.4.4 Incubação do Soro Positivo e Negativo

Os soros positivos e negativos coletados dos coelhos foram diluídos em solução diluição (tampão PBS pH 7,4; 0,05% Tween 20; 1% Ovoalbumina grau II) desde de 1:100 até 1:25600. A diluição foi distribuída 50µL/poço e a placa incubada a 37°C durante 1 hora. Após a incubação a placa foi lavada como descrito no item 4.3.4.2, para retirada dos anticorpos que não se ligaram ao antígeno adsorvido.

4.3.4.5 Incubação do Conjugado

O segundo anticorpo a ser adicionado na placa foi a imunoglobulina anti-IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase. O conjugado foi diluído em solução diluição em 1:2000 e 1:4000. Foram aplicados 50µL/poço e a placa foi incubada a 37°C durante 1 hora. Após a incubação a placa foi lavada como descrito no item 4.3.4.2, para retirada dos anticorpos que não se ligaram.

4.3.4.6 Solução reveladora

A atividade enzimática foi revelada usando-se 50µL/poço da solução reveladora (5 mg de OPD; 10,5 mL de tampão citrato pH 5,0; 5 µL de H₂O₂). A placa foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos.

4.3.4.7 Parada da Reação

A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 3N.

4.3.4.8 Leitura

A leitura da densidade óptica (D.O) das placas foi realizada utilizando-se o filtro com comprimento de onda de 492 nm. A leitura foi realizada logo após a parada da reação.

4.3.5 Cinética de produção de anticorpo policlonal anti-3ABC.

Após a determinação das concentrações dos reagentes foi realizado o teste de cinética de produção de anticorpo policlonal anti-3ABC para os dois coelhos imunizados. O objetivo deste teste foi verificar o aumento dos níveis de anticorpos produzidos pelos coelhos após as diferentes imunizações com a proteína 3ABC semi purificada.

Foi realizado teste ELISA e os soros dos coelhos colhidos ao longo do experimento foram testados em quintuplicata seguindo o esquema da figura 5. O controle negativo da reação foi feito utilizando-se o soro do animal colhido no dia zero do experimento, antes da inoculação da proteína. O branco do teste corresponde aos poços que não contém o soro de coelho, utilizado para verificar o *background* do teste. Ao final do experimento foi feita a média das réplicas dos soros testados nos diferentes tempos e dos dois coelhos testados além dos controles negativo e positivo.

O protocolo deste teste ELISA foi o mesmo realizado nos testes de titulação dos reagentes (item 4.3.4) utilizando a concentração de 3,5µg/mL da proteína

minutos. Após tres lavagens com PBS, centrifugando a 5000 xg por 10 minutos, o sedimento foi armazenado a -20°C até o momento de seu uso.

Para o tratamento do anticorpo policlonal, o soro foi diluído 1:50 em PBS com 1% de BSA, afim de obter um volume de aproximadamente 20 mL. Em seguida o precipitado bacteriano foi ressuspenso no soro diluído. A suspensão foi incubada por duas horas a 4°C e depois centrifugada a 5000 xg durante 10 minutos. O sobrenadante obtido foi submetido quatro vezes ao mesmo processo. Após o último ciclo, o soro foi filtrado em membrana 0,22 µm e armazenado a -20°C até o seu uso.

4.3.6.2 Extração de Lipoproteína

Ao volume de soro obtido no ítem anterior - 25 mL - (4.3.6.1) foi adicionado 5% de Dextran Sulfato. Esta adição foi realizada gota a gota sob agitação e em seguida foi deixada em repouso por 30 minutos, agitando a cada 10 minutos. Após este tempo, foi adicionado solução de Cloreto de Cálcio a 11,1% na proporção de 2,25 mL de cloreto de cálcio para 25 mL de soro. O cloreto foi adicionado gota a gota sob agitação em banho de gelo. Deixou-se em repouso durante 30 minutos em banho de gelo. Em seguida foi realizada centrifugação a 13500 x g durante 30 minutos. O sobrenadante foi armazenado e o sedimento foi descartado.

4.3.6.3 Precipitação das Imunoglobulinas com Sulfato de Amônio

Foi adicionado igual volume de PBS ao soro pré-tratado no ítem 4.3.6.2. Para 5 mL de soro foram adicionados 2,18 g de sulfato de amônio para atingir a saturação de 70%. A suspensão ficou sob agitação por 30 minutos em banho de gelo. Logo após, foi centrifugada a 13500 xg durante 30 minutos a 4°C. O sedimento foi recuperado e ressuspenso em PBS com o mesmo volume original do soro. Foi tomada uma alíquota do soro após precipitação com sulfato de amônio para análise em eletroforese SDS-PAGE 12%.

4.3.6.4 Precipitação das Imunoglobulinas G com Sulfato de Amônio

Em 5 mL de soro tratado como descrito no item anterior (4.3.6.3) foi adicionado 0,97 g de sulfato de amônio para atingir a saturação de 30%, visando a precipitação apenas das IgG. A suspensão ficou sob agitação durante 30 minutos em banho de gelo. Logo após, foi centrifugada a 13500 xg durante 30 minutos a 4°C. O precipitado foi recuperado e ressuspendido em PBS com o mesmo volume original do soro. Foi tomada uma alíquota do soro após precipitação com sulfato de amônio a 30% para análise em eletroforese SDS-PAGE 12%.

4.3.6.5 Diálise do soro

Após as precipitações do soro com sulfato de amônio, o mesmo foi dialisado em ultrafiltros com membrana de 10 kDa. O soro foi dialisado com um volume de PBS cinco vezes maior que o volume original da amostra. Após a diálise o soro foi aliquotado para análise em eletroforese SDS-PAGE 12%.

4.3.6.6 Purificação das Imunoglobulinas G com proteína G

A purificação da imunoglobulina foi realizada com o kit *Amicon® Pro Affinity Concentration – Protein G* (MERCK MILLIPORE). O kit apresenta os seguintes componentes: resina de proteína G, tampão de ligação e lavagem (PBS), tampão de eluição (0,2 M de glicina pH 2,5), tampão de neutralização (1M Tris pH 8,5), dispositivo de troca, tubo de suporte, tubo de coleta de 50 mL, o Amicon-0,5 que é um dispositivo com membrana de 30kDa para concentração da amostra purificada e o microtubo de 2,0 mL para a coleta da amostra purificada.

A purificação com este kit foi realizada em três etapas básicas: ligação da imunoglobulina à proteína G; lavagem dos componentes que não se ligaram e eluição da imunoglobulina. A figura 6 ilustra o procedimento e material utilizado para a purificação, conforme o manual do fabricante.

Após a purificação a Imunoglobulina G foi analisada em eletroforese SDS-PAGE 12% para verificação do perfil de purificação e também foi realizado teste de *Western Blotting* para a verificação da resposta do anticorpo purificado frente a proteína semi purificada.

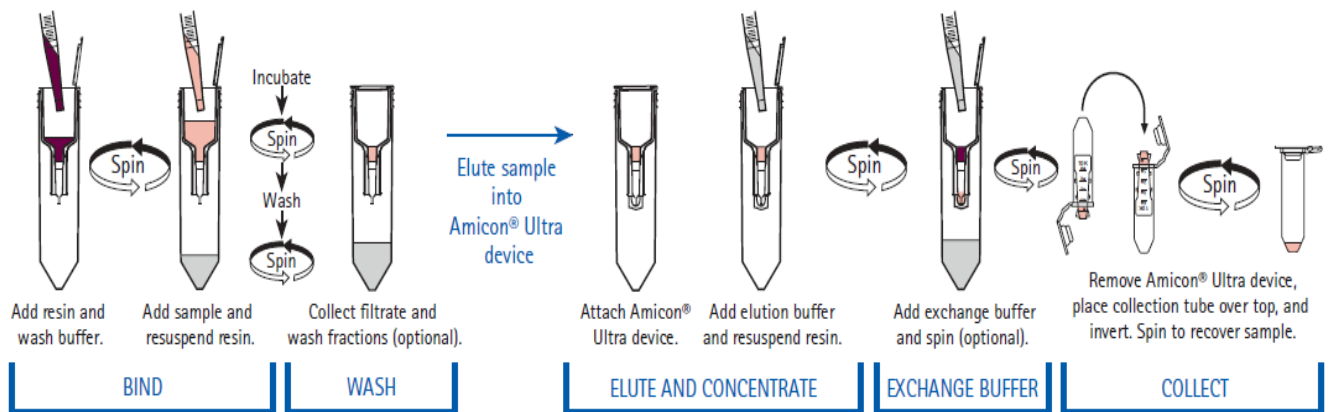


FIGURA 6 – PROCEDIMENTO REALIZADO PARA A PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL UTILIZANDO O KIT AMICON® PRO AFFINITY CONCENTRATION – PROTEIN G DA MERCK MILLIPORE.

FONTE: MANUAL DE INSTRUÇÕES DO FABRICANTE.

4.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-3ABC.

Para a produção do anticorpo monoclonal o trabalho de TROIANO (2009) foi utilizado como referência.

4.4.1 Imunização de Camundongos

Foram utilizadas 10 fêmeas de camundongo da linhagem BALB/c (SPF) com idade aproximada de 21 dias. Cada camundongo recebeu a dose de 35 µg da proteína 3ABC semi purificada a cada imunização. A primeira dose da proteína foi emulsionada com adjuvante completo de *Freund* (50% v/v). As doses seguintes foram emulsionadas com o adjuvante incompleto de *Freund* (50% v/v). As imunizações foram feitas por via intramuscular, inoculando 100 µL da emulsão por animal (FIGURA 7). Foram feitas cinco imunizações com intervalo de 15 dias cada

uma. Uma imunização adicional foi realizada três dias antes da fusão utilizando a mesma dose e volume das outras imunizações, com o adjuvante incompleto de *Freund* (50% v/v) por via intraperitoneal.



FIGURA 7 – IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS BALB/C POR VIA INTRAMUSCULAR.
FONTE: O AUTOR

4.4.2 Avaliação da imunidade humoral dos camundongos para a proteína 3ABC por *Western Blotting*

Após cinco imunizações dos camundongos, uma semana antes da fusão foi realizado o teste para avaliação da imunidade humoral dos animais frente a proteína 3ABC. Para este teste foi coletado sangue de dois camundongos imunizados, utilizados como controle positivo, e de dois não imunizados, como controle negativo. Foram coletados aproximadamente 0,5 mL de sangue de cada animal por punção cardíaca. O sangue foi coletado em microtubos de 1,5 mL os quais foram deixados em repouso após a coleta para a retração do coágulo. Em seguida o sangue foi centrifugado a 4000 xg durante 10 minutos e o soro foi separado e armazenado a -20°C.

Estes soros foram utilizados para o teste de *Western Blotting*. Para realização deste teste foi feita a eletroforese em SDS-PAGE 12% da proteína 3ABC purificada e em seguida a mesma foi transferida para uma membrana de nitrocelulose, seguindo o procedimento como descrito no item 4.1.2.2. Para a etapa de reação antígeno-anticorpo, os soros controle positivo e negativo foram diluídos 1:1200. O conjugado utilizado foi o anticorpo anti IgG de camundongo produzido em

cabra conjugado com peroxidase diluído 1:5000. Como cromógeno e substrato da reação foram utilizados respectivamente o 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride e peróxido de hidrogênio.

4.4.3 Cultivo dos Mielomas

Três semanas antes da fusão dos linfócitos com mielomas, foi iniciado o cultivo dos mielomas da linhagem NS0, utilizando técnicas padrão de cultura celular. O cultivo foi iniciado a partir de uma ampola contendo aproximadamente 1×10^7 células/mL que foi descongelada em frasco T de 25 cm² com 10 mL de meio RPM 1640 suplementado com 2% de Bicarbonato de Sódio e 10% de soro fetal bovino (Meio Completo) e mantido em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após aproximadamente 4 horas do descongelamento, quando as células já haviam aderido à parede do frasco, foi trocado todo meio de cultura por 10 mL de meio RPMI completo fresco para a eliminação do DMSO proveniente do congelamento das células e que é tóxico para as mesmas, principalmente com o aumento da temperatura. Após a troca do meio, o frasco T contendo os mielomas foram novamente incubados em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após atingirem 80 a 90% de confluência, as células foram desprendidas através de golpes com a palma das mãos nas laterais do frasco, uma alíquota foi retirada e a densidade celular foi estimada através de contagem em câmara *Neubauer*, utilizando o corante azul de *Tripán* para a diferenciação de células viáveis e inviáveis. As células foram subcultivadas para frascos T de 75 cm² e em seguida para 150 cm² com volume de 15 mL e 30 mL respectivamente e contagem inicial de $0,3 \times 10^6$ células/mL. O meio de cultura utilizado nos cultivos foi o RPMI 1640 suplementado com 2,0 g/litros de bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal bovino (Meio RPMI Completo)

Foram preparados oito frascos T de 150 cm² quando os mesmos passaram a ser cultivados em meio RPMI completo contendo 8-azaguanina. Os subcultivos em 8-azaguanina foram feitos por aproximadamente uma semana. Vinte e quatro horas antes da fusão o meio dos cultivos foi substituído por meio RPMI completo sem a 8-azaguanina. A figura 8 mostra o cultivo de mielomas 24 horas antes da fusão.

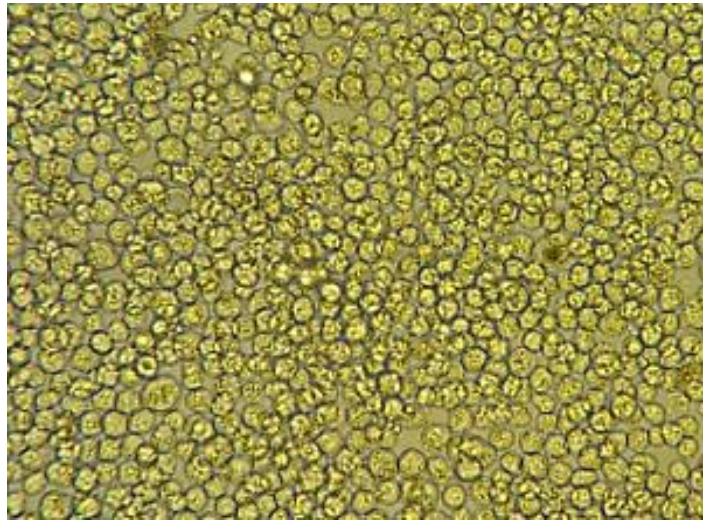


FIGURA 8 – CULTIVO DE MIELOMAS DA LINHAGEM NS0 COM 24 HORAS DE ANTECEDENCIA A FUSÃO.

FONTE: O AUTOR.

4.4.4 Coleta de Macrófagos Intraperitoneais

A coleta de macrófagos foi realizada 24 horas antes da fusão, utilizando-se cinco camundongos fêmeas da linhagem BALB/c (SPF) com dois meses de idade. Para o procedimento os camundongos foram eutanasiados com excesso de anestésico (Dopaser e Ketamina) pelo plexo retro orbital. Em seguida foram sanitizados com álcool 70% e colocados com o abdômen voltado para cima em um suporte de isopor com as quatro patas fixadas nas extremidades com alfinete.

Sob fluxo laminar foi realizada a retirada da pele do abdômen, com auxílio de pinça “dente de rato”, para a exposição da membrana peritoneal. Inoculou-se 5 mL da solução de sacarose a 11,6% estéril, com auxílio de uma seringa de 5 mL e agulha 25 x 8mm, dentro da cavidade abdominal e fez-se a massagem para a liberação dos macrófagos. A solução inoculada foi aspirada e aliqotada em tubos *Falcon* de 15 mL. Em seguida a suspensão de macrófagos foi centrifugada durante 15 minutos a 3500 xg. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado com o meio RPMI incompleto (sem adição de soro fetal bovino) e centrifugado a 3500 xg durante 15 minutos novamente. Após o descarte do sobrenadante, os macrófagos foram contados em câmara de *Neubauer* utilizando o corante azul de *Tripán* para a contagem de células viáveis. O sedimento foi ressuspendido em 30 mL de meio

RPMI completo ajustando a concentração celular para 5×10^5 células/mL. Foram distribuídos 50 μ L/poço da suspensão de macrófagos em seis microplacas de cultivo de 96 poços. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas.

4.4.5 Coleta de linfócitos dos animais imunizados com a proteína 3ABC.

Dois camundongos imunizados foram utilizados para a extração do baço e obtenção de linfócitos. Para a extração do órgão, os animais foram eutanasiados com excesso de anestésico (Dopaser e Ketamina) pelo plexo retro-orbital, e colocado com o abdômen voltado para cima, em um suporte de isopor e com as quatro patas fixadas com alfinete. Antes de colocá-los sob fluxo laminar, os camundongos foram sanitizados com álcool 70%. Utilizando uma pinça “dente de rato” a pele do abdômen dos animais foi retirada e com auxílio de uma tesoura de ponta fina a membrana peritoneal foi aberta. O baço foi extraído com uma pinça e colocado em tubo *Falcon* de 50 mL estéril contendo 5 mL de meio RPMI incompleto. Em uma placa de Petri de vidro foram colocados os dois baços juntamente com o meio. Foi feita a limpeza do órgão para a retirada de toda a camada de gordura aderida. Em seguida, com auxílio de duas lâminas de microscopia, o baço foi comprimido para o desprendimento dos esplenócitos da cápsula esplênica. Na sequência a cápsula esplênica foi cortada com o bisturi. Com auxílio de uma pinça e das lâminas do bisturi o baço foi macerado para liberação dos esplenócitos. Com uma pipeta volumétrica de 5 mL foi feita uma homogeneização dos esplenócitos e em seguida a suspensão foi filtrada em peneira de malha fina para um tubo *Falcon* de 50 mL. Foi realizada a centrifugação do filtrado a 3500 xg durante 10 minutos. O precipitado foi ressuscitado em meio residual e em seguida foi adicionado 5 mL de tampão de lise (150mM NH₄Cl; 10mM NaHCO₃; 0,1mM EDTA; pH 7,2) sob banho de gelo incubando por 5 minutos em repouso. Após este período foram realizadas duas lavagens com 25 mL de meio RPMI incompleto, centrifugando a 3500 xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi realizada uma estimativa

do número de linfócitos através de contagem em câmara de *Neubauer* com corante azul de *Tripan*.

4.4.6 Fusão dos linfócitos e mielomas

Para o procedimento de fusão as células de mielomas e linfócitos foram misturadas na proporção de 1:5 utilizando a quantidade total de linfócitos extraídos dos dois baços. Após a contagem dos linfócitos foi calculado a quantidade de mielomas a ser adicionada. O procedimento foi realizado em tubo *Falcon* de 50 mL misturandoos dois tipos celulares e completando o volume para 50 mL. A suspensão foi centrifugada a 3500 xg durante 15 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado. O tubo ficou vertido sob um pano estéril (*Wypall*) por 30 segundos para eliminação de todo o sobrenadante. O sedimento foi desprendido através de leves batidas no fundo do tubo, para que as células se desprendessem. Foi adicionado ao precipitado 1 mL de Solução de Polietilenoglicol (PEG) 1500 *HYBRI-MAX* (SIGMA) previamente aquecido a 37°C. Esta adição foi feita gota a gota, sob agitação durante 1 minuto. Na sequência foram adicionados 2 mL de meio RPMI incompleto em 2 minutos, 7 mL em 2 minutos e outros 15 mL em 2 minutos totalizando um volume final de 25 mL. Foi realizada a centrifugação a 3500 xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 25 mL de meio RPMI incompleto. Novamente foi realizada centrifugação a 3500 xg durante 10 minutos para retirada de possíveis resíduos de PEG. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuscitado em 50 mL de RPMI completo.

A suspensão de células fusionadas foi distribuída em placas de 96 poços, aplicando 100 µL/poço. Foram aplicadas em 5 microplacas preparadas anteriormente com a cultura de macrófagos. Uma placa adicional contendo os macrófagos foi preparada para o controle de mielomas. Este controle foi preparado ajustando a concentração de células para obter a mesma proporção de mielomas colocadas na fusão.

A cultura foi incubada a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 48 horas, quando foram retirados 100 µL de RPMI de cada poço e acrescentado 100 µL de

meio HAT. Novamente foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 10 dias, observando em microscópio invertido a formação das colônias de hibridomas e a morte das células de mielomas referentes ao controle. As trocas de meio de cultura durante os 10 dias de cultivo em meio HAT foram realizadas a cada dia trocando aproximadamente 50 µL do meio de cultura. Após os 10 dias os cultivos passaram para o meio HT trocando 50 µL do meio por 2 dias. Em seguida ao meio HT os cultivos passaram para RPMI completo com trocas a cada 48 horas ou conforme acidificação do cultivo. Nesta etapa também se iniciou a seleção de hibridomas por ELISA, conforme o crescimento das colônias. Os hibridomas testados por ELISA foram aqueles com crescimento de 80 a 90%, estimado pela confluência, e com tempo de cultivo de 48 horas.

4.4.7 Triagem da produção de anticorpos monoclonais anti-3ABC

Para a triagem da produção de anticorpos monoclonais anti-3ABC inicialmente foi realizada a titulação da proteína 3ABC purificada x conjugado x diluições do soro de camundongo positivo, confirmado no teste de *Western Blotting*. O teste de titulação anterior à triagem foi realizado com o objetivo de encontrar as diluições dos reagentes para o teste ELISA da triagem. O procedimento para a titulação foi o mesmo seguido para a titulação do anticorpo policlonal descrito no item 4.3.4.

Toda a triagem para a produção de anticorpo monoclonal foi realizada com a proteína 3ABC purificada. Na titulação foram testadas as seguintes concentrações da proteína 3ABC purificada: 70; 35; 17,5; 7; 3,5 e 1,75 µg/mL. Os soros de camundongo positivos e negativos foram diluídos em 1:50; 1:100; 1:200 e 1:400. O conjugado, anticorpo anti IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com peroxidase, foi utilizado na diluição de 1:5000.

Após a definição das concentrações dos reagentes em 1,75 µg/mL da proteína purificada, 1:400 do soro de camundongo positivo e negativo e 1:5000 do conjugado, foram feitos os testes ELISA para a triagem dos anticorpos monoclonais.

Com o intuito de confirmar a pureza da proteína 3ABC utilizada nos testes ELISA para seleção dos anticorpos monoclonais foi feita uma eletroforese da proteína purificada e em seguida o gel de poliacrilamida foi corado com prata. Na eletroforese foi colocada a mesma quantidade de proteína utilizada por poço da placa de ELISA, ou seja, 87,5 ng de proteína, correspondente a concentração de 1,75 µg/mL no ELISA.

Confirmando a pureza da proteína para teste ELISA, o procedimento para a triagem foi realizado como descrito no item 4.3.4., porém ao invés de utilizar o soro positivo de camundongo, utilizou-se o sobrenadante dos hibridomas diluídos 1:2 em solução diluição. Em três poços de cada placa teste foram adicionados o soro positivo de camundongo imunizado com a proteína 3ABC, em outros três poços o soro negativo e mais outros três poços nos quais nenhum soro foi adicionado, para utilizá-lo como branco.

4.4.8 Clonagem dos hibridomas positivos

Após obtenção de resultados positivos na triagem para a produção anticorpos monoclonais anti-3ABC, os hibridomas foram submetidos ao procedimento de clonagem. A clonagem é importante para reduzir o risco de superpopulação de células não produtoras de anticorpo e garantir a presença do anticorpo monoclonal.

O procedimento foi realizado utilizando a técnica da Diluição Limite em que os hibridomas positivos foram colocados em outra microplaca em uma série de diluições em base 2 em 100 µL de meio RPMI completo. Para isto 50 µL do poço original do hibridoma positivo foi passado para o poço 1A de outra placa que continha 50 µL de RPMI completo e as diluições base 2 foram realizadas no sentido da coluna, do poço 1A para o 1H, passando sempre 50 µL. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O poço com maior diluição pelo qual se observou crescimento foi considerado o que continha clone único. Estes poços com clone único foram testados por ELISA para a confirmação da produção de anticorpo monoclonal anti-3ABC.

4.4.9 Expansão dos Hibridomas

Foram realizados sucessivos subcultivos dos hibridomas positivos após a clonagem para microplacas de 24 poços e em seguida para frascos T de 25 cm², 75 cm² e 150 cm², com o objetivo de aumentar a quantidade dos hibridomas produtores de anticorpo. O sobrenadante do cultivo dos clones expandidos foi analisado por ELISA.

4.4.10 Teste de Estabilidade dos Hibridomas

Após expansão dos hibridomas positivos, os mesmos foram submetidos a um ciclo de congelamento e descongelamento e em seguida confirmação de crescimento e produção do anticorpo a fim de selecionar clones estáveis. Para o congelamento foi utilizado sistema *Mrs Frosty* o qual se utiliza álcool isopropílico e um congelamento inicial a -70°C por 16 horas e em seguida o congelamento em N₂ garantindo um decréscimo da temperatura em -1°C por minuto, ideal para a conservação das células. As células foram congeladas em criotubos de 2,0 mL com 1,8 mL de cultivo em 10% de DMSO e 90% de meio RPMI com 20% de soro fetal bovino. A concentração celular congelada foi de aproximadamente 2,5 x 10⁷ células/criotubo.

As células ficaram congeladas por 48 horas e após o descongelamento os hibridomas foram expandidos e avaliados por ELISA para a verificação da produção do anticorpo monoclonal anti-3ABC.

4.4.11 Caracterização dos anticorpos monoclonais por *Western Blotting*

Para a caracterização dos anticorpos monoclonais foi realizada corrida de eletroforese em SDS-PAGE 12% e em seguida a proteína foi transferida para a membrana de nitrocelulose e todo o procedimento para o *Western Blotting* foi realizado conforme o item 4.1.2.2.

O anticorpo primário utilizado foi o sobrenadante do cultivo dos hibridomas diluído 1:4, sendo aplicado 1 mL por membrana. O anticorpo secundário utilizado foi anticorpo anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com peroxidase diluído em 1:8000 sendo aplicado 1 mL por membrana.

A revelação do teste foi realizada com o cromógeno 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride e peróxido de hidrogênio como substrato. Para o bloqueio da reação foi utilizado tampão PBS.

4.4.12 Produção de líquido ascítico e cultivo de hibridoma ascítico

A produção do líquido ascítico foi realizada conforme os procedimentos descritos por Harlow & Lane (1998). Foram utilizadas 2 fêmeas de camundongo da linhagem BALB/c (SPF) para cada hibridoma selecionado. Inoculou-se 500 µL de Pristane (2,6,10,14 – *Tetramethylpentadecane* – SIGMA) por via intraperitoneal de cada camundongo. Após dez dias da aplicação do Pristane, cada hibridoma selecionado foi injetado nos camundongos, também por via intraperitoneal, na concentração de $2,5 \times 10^6$ células suspensas em 300 µL de tampão PBS. Após vinte dias desta inoculação coletou-se aproximadamente 5 mL do líquido ascítico de cada camundongo.

O líquido ascítico foi centrifugado a 3000 xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e testado por ELISA para a verificação da produção do anticorpo monoclonal anti-3ABC. O sedimento contendo os hibridomas foi ressuspenso com 5 mL de tampão de lise de hemácias e durante 5 minutos a suspensão ficou em repouso em banho de gelo. Foi realizada a centrifugação a 3000 xg durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 6 mL de meio RPMI completo. A suspensão de hibridomas ascítico foi distribuída em placas de cultivo de 24 poços, sendo aplicados 500 µL/poço. O cultivo foi mantido em estufa a 37°C com 5% de CO₂ com troca de 50% do volume de meio de cultura a cada 48 horas. Após os hibridomas preencherem 80% dos poços, foram homogeneizados levemente com micropipeta e transferidos para frascos T de 25 cm² e em seguida para frascos T de 75 cm² para expansão e

congelamento. O sobrenadante do cultivo dos hibridomas ascíticos foram testados por ELISA em difentes fases de crescimento para a confirmação da produção do anticorpo monoclonal anti-3ABC.

4.4.13 Purificação dos anticorpos monoclonais

Tanto o sobrenadante dos cultivos dos hibridomas ascíticos quanto o líquido ascítico coletado foram purificados utilizando o kit *Amicon® Pro Affinity Concentration – Protein G* (MERCK MILLIPORE) conforme os procedimentos descritos no ítem 4.3.6.6.

O sobrenadante dos cultivos foram coletados e centrifugados a 1500 xg durante 10 minutos para separação de eventual conteúdo celular. O sobrenadante foi em seguida purificado. O líquido ascítico foi tratado conforme o ítem 4.3.6.2 para a remoção de glicoproteínas para em seguida ser purificado.

Com o objetivo de caracterizar a reação imunológica dos anticorpos monoclonais purificados foi realizado teste de *Western Blotting*. Neste teste foi utilizada a proteína 3ABC de diferentes origens, como a produzida e comercializada pelo CEVAN e um cultivo do vírus da febre aftosa cepa O1 Campos não purificado produzido industrialmente pela Ourofino Saúde Animal.

O anticorpo derivado do líquido ascítico foi diluído 1:50. Como controles foram utilizados os soros positivo e negativo de camundongo utilizados nos testes ELISA para seleção dos hibridomas.

5 RESULTADOS

5.1 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A proteína 6xHis-SUMO-3ABC foi obtida com sucesso, comprovada no gel de SDS-PAGE onde uma banda proteica com 66 kDa (indicada pela seta) foi obtida após a indução com 1 mM de IPTG, (FIGURA 9).

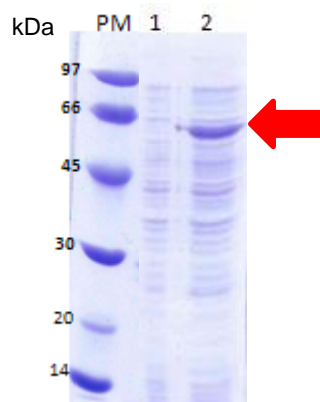


FIGURA 9 - PROTEÍNA 3ABC RECOMBINANTE EM SDS-PAGE 12% APÓS INDUÇÃO. PM: Marcador de Peso Molecular; 1) Expressão da proteína - 3ABC NÃO INDUZIDA – 2,5 µL; 2) Expressão da proteína - 3ABC INDUZIDA – 2,5 µL. A seta vermelha corresponde à banda da proteína 3ABC.

FONTE: O AUTOR

Na sequência a proteína foi purificada parcialmente e ou submetida a purificação total dependendo da etapa de produção e de utilização para a produção dos anticorpos. Com o intuito de obter maior quantidade e concentração mais elevada para a imunização dos animais, a 3ABC foi processada sem passar por procedimentos de purificação, sendo denominado purificação parcial. A proteína é expressa na forma de corpúsculos de inclusão que foram recuperados e lavados após centrifugação. Em seguida a solubilização dos corpúsculos com tampão em pH 12 apresentou boa recuperação da proteína como demonstrado no gel de poliacrilamida da figura 10 A.

Já a proteína produzida com elevado grau de pureza foi utilizada para os testes ELISA de seleção dos hibridomas positivos, e produzida em pequena quantidade e concentração. Para sua obtenção foi realizada cromatografia de afinidade (IMAC) já que a proteína recombinante contém a cauda de histidina

(6xHis). A figura 10 B mostra o gel de poliacrilamida onde se pode observar a banda de 66 kDa da proteína purificada e concentrada.

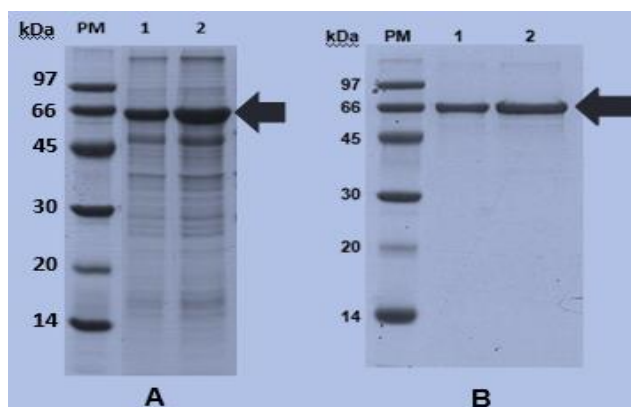


FIGURA 10 - PROTEÍNA 3ABC RECOMBINANTE EM SDS-PAGE 12% APÓS PROCEDIMENTOS DE SEMI PURIFICAÇÃO (A) E PURIFICAÇÃO (B).

A - Proteína 3ABC após processo de semi purificação. PM: Marcador de Peso Molecular; 1) Proteína 3ABC (66 kDa) semi purificada após filtração em membrana 0,22 μm - 5 μL ; 2) Proteína 3ABC semi purificada (66 kDa) após filtração em membrana 0,22 μm - 10 μL . A seta corresponde a banda da proteína 3ABC.

B - Proteína 3ABC após processo de purificação. PM: Marcador de Peso Molecular; 1) Proteína 3ABC (66 kDa) purificada após concentração em membrana de 30kDa - 5 μL ; 2) Proteína 3ABC purificada após concentração em membrana de 30 kDa (66 kDa) - 10 μL . A seta corresponde a banda da proteína 3ABC.

FONTE: O AUTOR

A identidade imunológica da proteína 3ABC expressa em *E. coli* após o procedimento de semi purificação e purificação foi verificada por *Western Blotting* utilizando o anticorpo monoclonal 3H7 anti-3A. Para ambas o anticorpo monoclonal reconheceu a proteína 3ABC recombinante (FIGURAS 11A e 11B).



FIGURA 11 - *WESTERN BLOT* PARA IDENTIDADE IMUNOLÓGICA DA PROTEÍNA 3ABC RECOMBINANTE.

A - Proteína 3ABC após processo de semi purificação e filtração em membrana 0,22 μm - 1 μL . A seta corresponde a banda da proteína 3ABC.

B - Proteína 3ABC após processo de purificação e concentração após concentração em membrana de 30kDa - 2 μL . A seta corresponde a banda da proteína 3ABC.

FONTE: O AUTOR

Após a confirmação da identidade imunológica da proteína a mesma foi quantificada por densitometria pelo programa *Gel - Pro Analyser*. Para a proteína semi purificada obteve-se 0,7 mg/mL. A tabela 3 apresenta os resultados de IOD obtidos a partir do programa para diferentes concentrações de BSA e o gráfico 1 representa o *plotting* desses dados. A tabela 4 apresenta os dados da quantificação da proteína 3ABC semi purificada os quais foram obtidos através da integração da curva padrão presentes no gráfico 1.

TABELA 3 – CURVA PADRÃO PARA A PROTEÍNA SEMI PURIFICADA COM OS VALORES DO VOLUME DE BSA APLICADO NO GEL SDS-PAGE E OS VALORES DE IOD DAS BANDAS CALCULADAS PELO PROGRAMA *GEL – PRO ANALYSER*.

Curva Padrão BSA	
Volume (µL)	IOD
0,5	269,38
1,0	482,62
2,0	835,16
4,0	1462,2

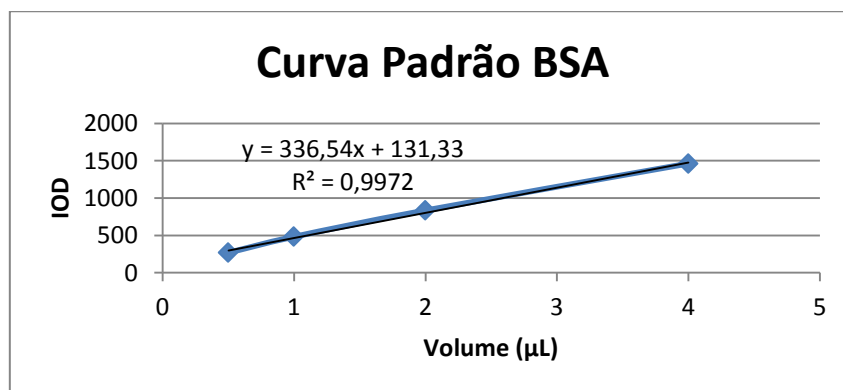


GRÁFICO 1 – CURVA PADRÃO PARA A PROTEÍNA SEMI PURIFICADA O QUAL APRESENTA NO EIXO X OS VALORES DE VOLUME APLICADOS NO GEL SDS-PAGE E NO EIXO Y OS VALORES DE IOD CALCULADOS PELO PROGRAMA.

TABELA 4 – DADOS DA QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA 3ABC SEMI PURIFICADA BASEADOS NA CURVA PADRÃO DO GRÁFICO 1.

3ABC (66kDa)	Volume (µL)	IDO	Quantidade (µg)	Concentração (mg/mL)	Média (mg/mL)
	5	1307	3,5	0,699	0,7
	10	2780,4	7,9	0,787	

Da proteína purificada obteve-se 0,4 mg/mL. A tabela 5 apresenta os resultados de IOD para as diferentes concentrações de BSA. O gráfico 2 representa o *plotting* dos dados da tabela 5. A tabela 6 apresenta os dados da quantificação da proteína 3ABC.

TABELA 5 - CURVA PADRÃO PARA A PROTEÍNA PURIFICADA COM OS VALORES DO VOLUME DE BSA APLICADO NO GEL SDS-PAGE E OS VALORES DE IOD DAS BANDAS CALCULADAS PELO PROGRAMA GEL – PRO ANALYSER.

Curva Padrão BSA	
Volume (µL)	IOD
0,5	269,72
1,0	304,75
2,0	552,46
4,0	1021,9
8,0	1962,2

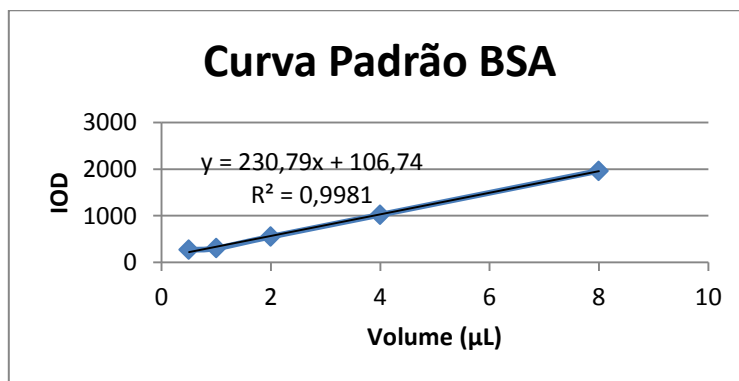


GRÁFICO 2 – CURVA PADRÃO PARA A PROTEÍNA PURIFICADA O QUAL APRESENTA NO EIXO X OS VALORES DE VOLUME APLICADOS NO GEL SDS-PAGE E NO EIXO Y OS VALORES DE IOD CALCULADOS PELO PROGRAMA.

TABELA 6 - DADOS DA QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA 3ABC PURIFICADA BASEADOS NA CURVA PADRÃO DO GRÁFICO 2.

3ABC (66kDa)	Volume (µL)	IDO	Quantidade (µg)	Concentração (mg/mL)	Média (mg/mL)
	5,0	520,1	1,8	0,4	0,4
	10,0	1022,9	4,0	0,4	

5.2 PRODUÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL

Anticorpos policlonais contra a proteína semi purificada foram obtidos nos dois coelhos imunizados sendo que o animal controle negativo não apresentou nenhum anticorpo específico para a proteína (FIGURAS 12 A e B).

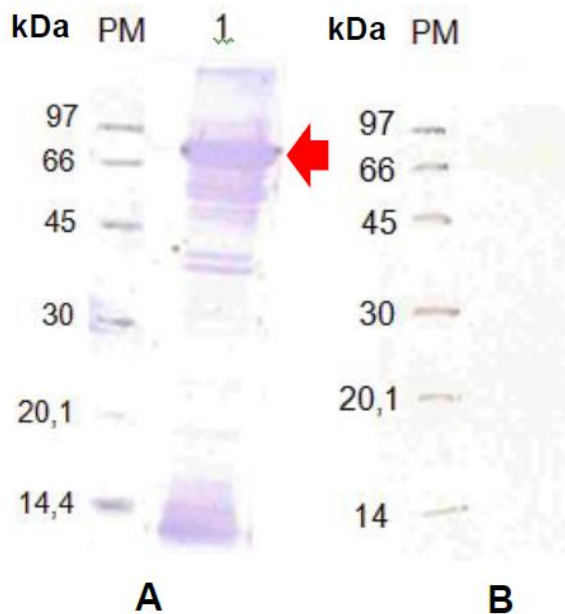


FIGURA 12 – *WESTERN BLOTTING* PARA A CONFERÊNCIA DA RESPOSTA HUMORAL DOS COELHOS IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA 3ABC SEMI PURIFICADA. A – Soro de coelho positivo. PM: Marcador de Peso Molecular; 1) Proteína 3ABC (66 kDa) semi purificada -10 μ L. A seta vermelha corresponde a banda da proteína 3ABC. B – Soro de coelho negativo. PM: Marcador de Peso Molecular; 1) Proteína 3ABC (66 kDa) semi purificada - 10 μ L.

FONTE: O AUTOR

5.2.1 Cinética de produção de anticorpo policlonal

A cinética de produção de anticorpos contra a proteína 3ABC foi acompanhada pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA). Este teste foi realizado com o objetivo de verificar o aumento dos níveis de anticorpos produzidos pelos coelhos após as imunizações com a proteína 3ABC.

Inicialmente, no teste de titulação dos reagentes para a padronização da técnica estabeleceu as seguintes condições ótimas da reação: concentração da proteína semi purificada em 3,5 μ g/mL, diluição do soro de 1:400 e diluição do

conjugado em 1:4000. Para o controle negativo da reação utilizou-se o soro de coelho colhido no dia zero do experimento. Para controle positivo foi usado o soro do coelho colhido após a última imunização. Os testes ELISA para a cinética de produção de anticorpo policlonal foram realizados em triplicata e os soros testados e cada controle foram realizados em quintuplicata. Para a validação dos resultados, os mesmos foram analisados pela curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (METZ, 1978; ZWEIG and CAMPBELL, 1993). Por esta curva pode-se definir o ponto de corte do teste, igual a 0,276 nm, com 92% de sensibilidade e 80% de especificidade, ou seja, amostras com absorbância maior que 0,276 nm foram consideradas positivas. Considerando este ponto de corte, 92% de todas as amostras consideradas positivas foram corretamente identificadas como tal e 80% de todas as amostras negativas também foram identificadas corretamente.

O gráfico 3 demonstra o aumento dos níveis de produção de anticorpos policlonais anti-3ABC nos dias zero a 60 para os animais imunizados considerando o ponto de corte da reação.

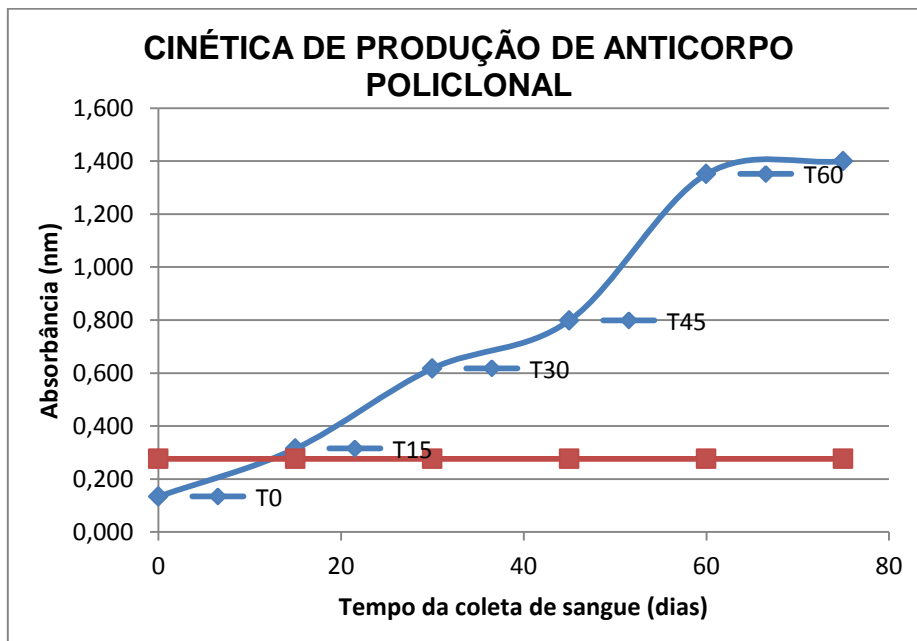


GRÁFICO 3 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-3ABC. A LINHA AZUL REPRESENTA O AUMENTO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS CONFORME AS IMUNIZAÇÕES REALIZADAS, IDENTIFICADAS COMO T0, T15, T30, T45 E T60. A LINHA VERMELHA REPRESENTA O PONTO DE CORTE.

Sabendo que os níveis de anticorpos anti-3ABC dos coelhos estavam altos, o soro policlonal foi purificado. Os resultados da purificação do anticorpo é dado no gel SDS-PAGE a 12% (FIGURA 13). Duas bandas foram obtidas, uma de 50 kDa e outra de 25 kDa que caracterizam a imunoglobulina G após purificação com proteína G. Estas duas bandas representam as cadeias pesada e leve da IgG, respectivamente.

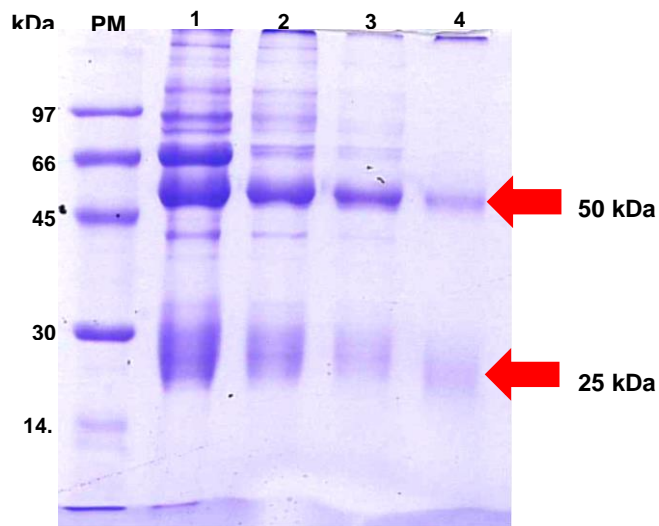


FIGURA 13 – ELETROFORESE SDS-PAGE 12% PARA ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA G. PM: Marcador de Peso Molecular; 1) Imunoglobulina após precipitação com 70% de Sulfato de Amônio – 2,5 μ L; 2) Imunoglobulina após precipitação com 33% de Sulfato de Amônio – 2,5 μ L; 3) Imunoglobulina após diálise com PBS 2,5 μ L; 4) Imunoglobulina após purificação com proteína G - 2,0 μ L. As setas vermelhas indicam as cadeias pesada (50 kDa) e leve (25 kDa).

FONTE: O AUTOR

Para a verificação da resposta do anticorpo purificado frente à proteína 3ABC foi realizado teste de *Western Blotting* (FIGURA 14). O anticorpo mostrou reatividade à proteína 3ABC purificada parcialmente sendo mais específico após a purificação com proteína G.

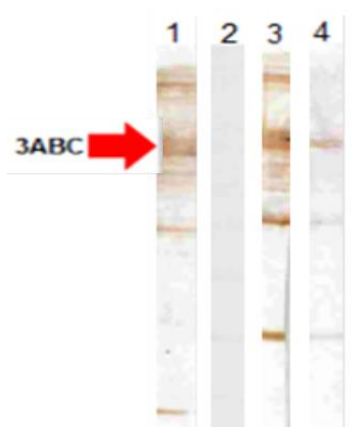


FIGURA 14 – *WESTERN BLOTTING* PARA CARACTERIZAÇÃO DA REAÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL PURIFICADO FRENTE A PROTEÍNA 3ABC. 1) Soro do coelho colhido após a última imunização; 2) Soro do coelho não imunizado (controle negativo); 3) Anticorpo após diálise 4) Anticorpo após purificação com proteína G. A seta vermelha indica a proteína 3ABC (66 kDa).

FONTE: O AUTOR

5.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL

Para a produção do anticorpo monoclonal 10 fêmeas de camundongo da linhagem BALB/c foram imunizadas com a proteína 3ABC e sua imunidade humoral foi conferida pelo teste de *Western Blotting*. O resultado foi positivo como demonstrado na figura 15. O soro do animal imunizado reconheceu a proteína 3ABC aderida à membrana de nitrocelulose diferente do soro do animal negativo que não reagiu com nenhuma proteína (não apresentou banda no gel).

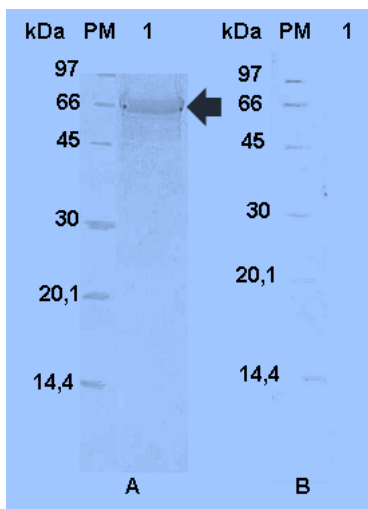


FIGURA 15 - WESTERN BLOTTING PARA CONFERÊNCIA DA RESPOSTA HUMORAL DOS CAMUNDONGOS APÓS IMUNIZAÇÃO.

A – Soro de camundongo positivo diluído 1:1200. PM: Marcador de Peso Molecular; 1) Proteína 3ABC (66 kDa) purificada - 10 μ L. A seta corresponde a banda da proteína 3ABC.

B – Soro de camundongo negativo 1:1200. PM: Marcador de Peso Molecular; 1) Proteína 3ABC (66 kDa) purificada - 10 μ L

FONTE: O AUTOR

Toda a triagem para a produção e caracterização do anticorpo monoclonal foi realizada com a proteína purificada (figura 16).

O gel corado com prata demonstra o grau de pureza da proteína 3ABC (FIGURA 16) que foi utilizada nos testes de seleção do anticorpo monoclonal.

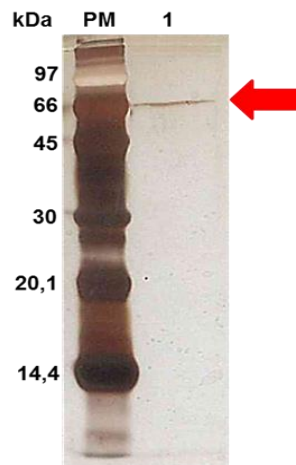


FIGURA 16 – GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 12% CORADO COM PRATA PARA ANÁLISE DA PROTEÍNA 3ABC PURIFICADA. PM: Marcador de Peso Molecular; 1) 3ABC purificada com a mesma quantidade utilizada no teste ELISA – 87,5 ng. A seta vermelha corresponde a banda da proteína 3ABC.

FONTE: O AUTOR.

Após a confirmação da imunidade humoral desenvolvida pelos camundongos foi realizada a fusão. Vinte e quatro horas antes da fusão foi feita a coleta de macrófagos de cinco camundongos, obtendo uma contagem de $3,62 \times 10^6$ células/mL. Os macrófagos foram cultivados em seis placas de 96 poços ajustando a concentração para $5,0 \times 10^5$ células/mL. A fusão foi realizada com $1,84 \times 10^7$ mieloma / $9,2 \times 10^7$ linfócitos a fim de obter a proporção de 1 mieloma para 5 linfócitos. As células fusionadas foram distribuídas nas cinco placas de cultivo que continha os macrófagos, totalizando 480 poços para crescimento de colônias de hibridomas. Na 6ª placa foi colocado $1,5 \times 10^5$ células de mieloma em 40 poços para

servir como controle de morte destes em meio HAT (Hipoxantina Aminopterina e Timidina). Após o décimo dia de cultivo em meio HAT foi possível verificar a morte de 100% dos mielomas (FIGURA 17 F) e o aparecimento das primeiras colônias de hibridomas (FIGURA 18 F).

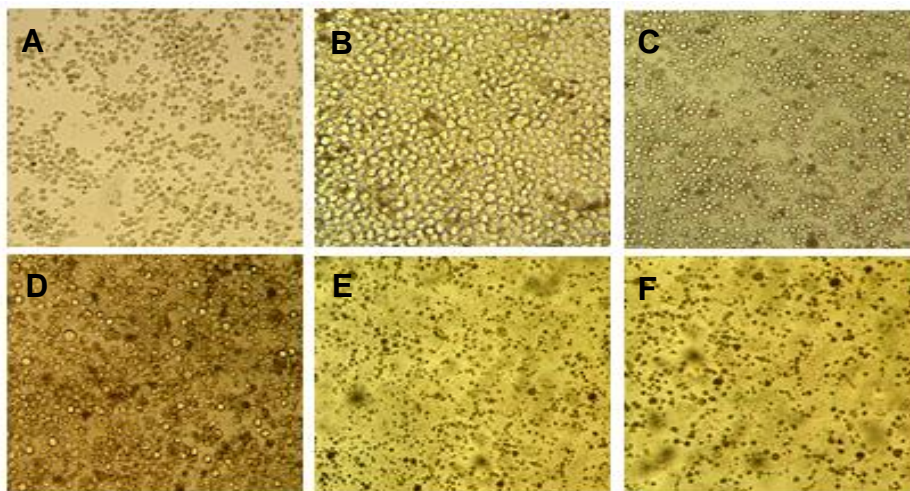


FIGURA 17 – CULTIVO DE MIELOMAS PARA O CONTROLE DO PROCEDIMENTO DE FUSÃO - MIELOMAS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE LISE CELULAR.

- A - Mielomas após 24 horas da fusão em meio RPMI completo.
- B - Mielomas após 48 horas da fusão em meio RPMI completo.
- C - Mielomas após 1 dia de cultivo em meio HAT.
- D - Mielomas após 2 dias de cultivo em meio HAT.
- E - Mielomas após 3 dias de cultivo em meio HAT.
- F - Mielomas após 10 dias de cultivo em meio HAT.

FONTE: O AUTOR

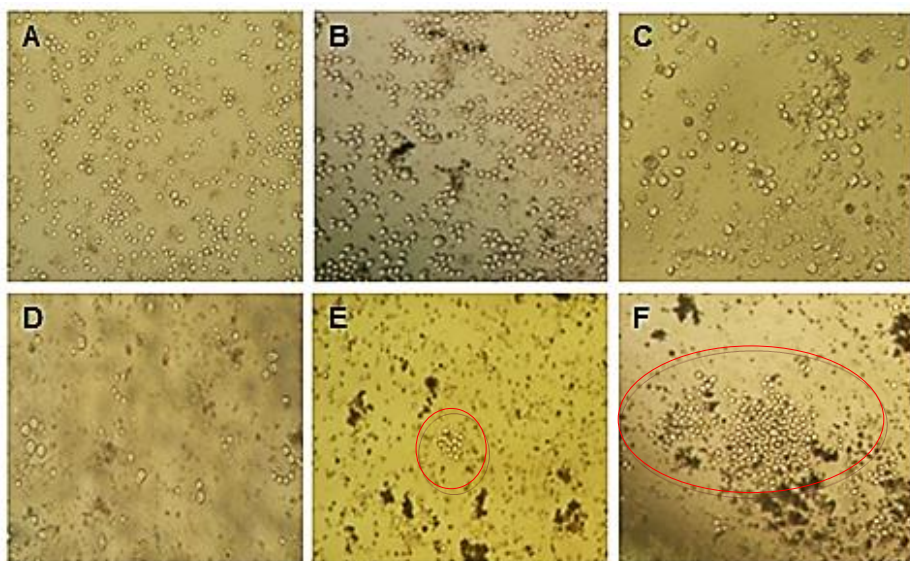


FIGURA 18 – DIFERENTES FASES DE FORMAÇÃO E CRESCIMENTO DOS HIBRIDOMAS

- A - Células fusionadas após 24 horas da fusão em meio RPMI.
- B - Células fusionadas após 48 horas da fusão em meio RPMI.
- C - Células fusionadas após 1 dia em meio HAT.
- D - Células fusionadas após 2 dia em meio HAT.
- E - Células fusionadas após 3 dia em meio HAT.
- F - Células fusionadas após 10 dia em meio HAT.

FORNE: O AUTOR.

Foram obtidos 217 poços com colônias de hibridomas os quais foram testados por ELISA quando 80% do poço se apresentava com crescimento e com 48 horas sem troca de meio. Foram considerados 10 hibridomas positivos, testados em diferentes fases de crescimento com absorbância superior ao controle negativo (FIGURAS 19 e 20). Destes 10 hibridomas positivos oito apresentaram absorbância acima de 0,1 nm, visível a olho nú e dois apresentaram leituras com absorbância abaixo de 0,1. Porém, ainda considerados positivos levando-se em conta a análise de sensibilidade e especificidade realizadas pela curva de ROC. Por esta curva foi obtido um ponto de corte de 0,072 nm, com 97,31% de sensibilidade e 31,58% de especificidade.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1A10	1B1	1B5	1C11	1D8	1D10	1D12	1E9	1E12	1F12	1H4	1H8
B	1H9	1H10	2A3	2A9	2B3	2B10	2C9	2D3	2D5	2D6	2D12	2E1
C	2E3	2F10	2F12	2H1	2H6	2H9	3A1	3A7	3A8	3A11	3B5	3B6
D	3B8	3B12	3D12	3E1	3E12	3F8	3G7	3G8	3G9	3H1	3H2	3H11
E	4B11	4D2	4D3	4E12	4G3	4H2	5C2	5C4	5C11	5F1	5F7	5F12
F	6B3	6B4	6D10	6H2	7A10	7B2	7B4	7B7	7C4	7C6	7D5	7D6
G	7D7	7D8	7D11	7E3	7E11	7E12	7F4	7F8	7F9	7F11	7F12	7G2
H	C+	C+	C+	C+	C-	C-	C-	C-	BCO	BCO	BCO	BCO

FIGURA 19 – DIAGRAMA DA PLACA DE ELISA COM A IDENTIFICAÇÃO DOS HIBRIDOMAS TESTADOS, CONTROLE POSITIVO (C+), CONTROLE NEGATIVO (-) E BRANCO (BCO)

FORNE: O AUTOR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,042	0,04	0,04	0,064	0,041	0,039	0,04	0,043	0,048	0,04	0,041	0,044
B	0,044	0,041	0,043	0,042	0,042	0,044	0,348	0,503	0,068	0,111	0,043	0,048
C	0,039	0,037	0,037	0,038	0,043	0,038	0,041	0,041	0,036	0,037	0,036	0,04
D	0,044	0,042	0,456	0,039	0,039	0,041	0,04	0,044	0,038	0,04	0,038	0,044
E	0,062	0,139	0,084	0,062	0,064	0,059	0,063	0,068	0,059	0,065	0,061	0,076
F	0,042	0,041	0,041	0,041	0,04	0,04	0,041	0,044	0,162	0,042	0,04	0,045
G	0,041	0,039	0,038	0,041	0,453	0,155	0,039	0,04	0,038	0,038	0,039	0,042
H	1,778	1,661	1,818	1,849	0,046	0,046	0,049	0,05	0,047	0,042	0,043	0,048

FIGURA 20 – LEITURAS A 492NM DOS HIBRIDOMAS TESTADOS NO ELISA.

FORNE: O AUTOR

Os oito hibridomas positivos, com absorbância superior a 0,1 nm, foram submetidos ao processo de clonagem com diluição limite, a fim de obter clone único secretor de anticorpo monoclonal anti-3ABC para posterior expansão. Após crescimento, o sobrenadante dos cultivos foi testado por ELISA e aquele com maior

diluição e com resultado positivo no teste foi selecionado para ser expandido. Após a seleção de clones únicos e expansão dos mesmos, os hibridomas foram submetidos ao processo de congelamento e descongelamento para seleção de clones estáveis. Novamente o sobrenadante dos cultivos dos hibridomas descongelados foi testado por ELISA e somente dois clones se mantiveram estáveis nomeados de 2D3 e 3D12.

Para a caracterização dos anticorpos monoclonais secretados pelos referidos clones estáveis foi realizado o teste de *Western Blotting* verificando para quais proteínas os anticorpos secretados responderiam. Dois clones testados, reagiram contra uma proteína de peso molecular a 66 kDa referente a 3ABC (FIGURA 21).

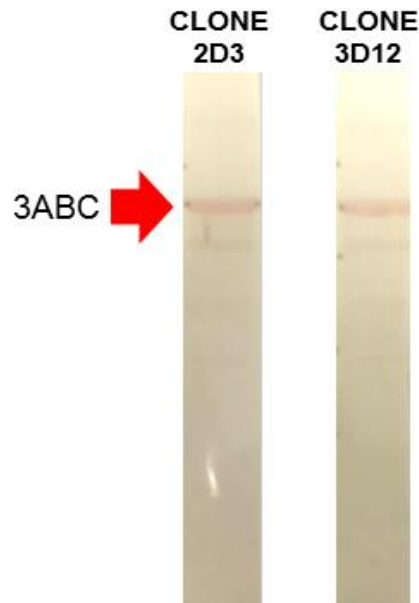


FIGURA 21 – TESTE DE *WESTERN BLOTTING* PARA CONFIRMAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-3ABC. A seta vermelha indica a banda da proteína 3ABC.

FONTE: O AUTOR

A produção do líquido ascítico em camundongos foi realizada inoculando-se os dois clones estáveis e caracterizados por *Western Blotting* (2D3 e 3D12). Cada clone foi inoculado em dois animais. Somente os camundongos inoculados com o clone 2D3 produziram o líquido ascítico.

O cultivo dos hibridomas retirados do líquido ascítico apresentou superioridade em morfologia, ausência de debris celulares, e melhor desempenho

de crescimento. O hibridoma 2D3, proveniente do líquido ascítico apresentou um aumento na secreção de anticorpo anti-3ABC, em três vezes, a absorvância quando comparado ao seu respectivo hibridoma derivado da fusão. Enquanto que o líquido ascítico foi superior em quatro vezes em relação a este mesmo hibridoma (GRÁFICO 4).

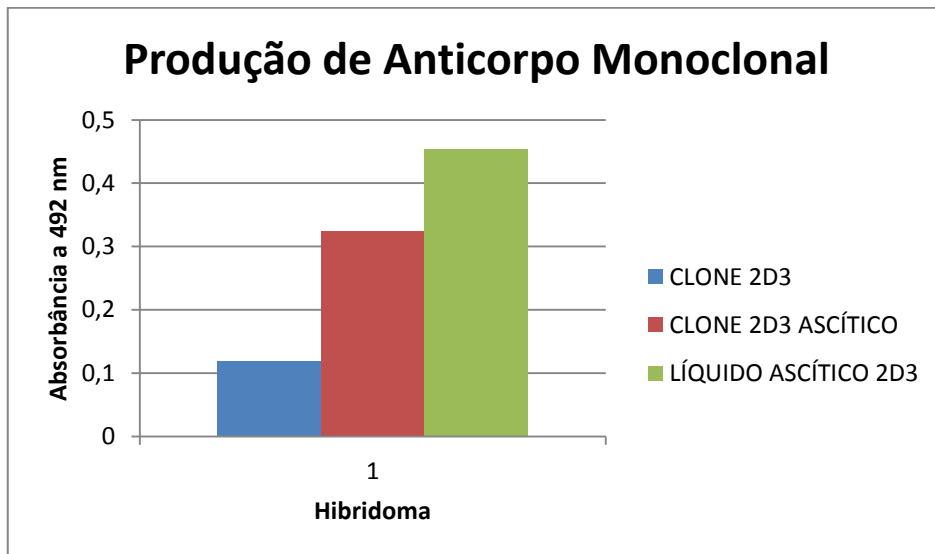


GRÁFICO 4 – REPRESENTAÇÃO DA ABSORBÂNCIA ENTRE HIBRIDOMA, HIBRIDOMA ASCÍTICO E LÍQUIDO ASCÍTICO.

FONTE: O AUTOR.

A caracterização da reação do anticorpo monoclonal após o procedimento de purificação foi realizado por *Western Blotting* e os resultados mostraram que o anticorpo foi capaz de reconhecer a proteína 3ABC comercial e também a proteína do cultivo do vírus O1 Campos produzido industrialmente (FIGURA 22).

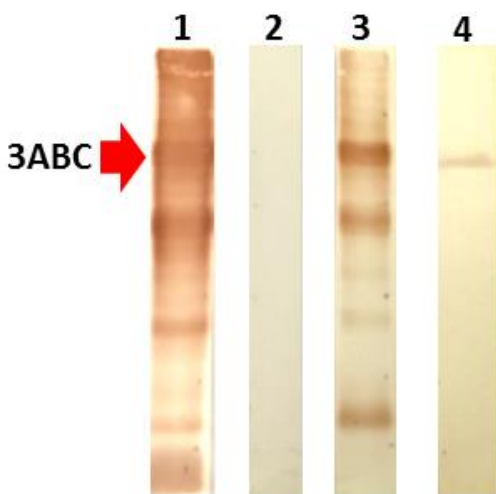


FIGURA 22 – TESTE DE *WESTERN BLOTTING* PARA CARACTERIZAÇÃO DA REAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL PURIFICADO FRENTE A DIFERENTES ORIGENS DA PROTEÍNA 3ABC. 1) Proteína 3ABC comercial e Soro Controle Positivo; 2) Proteína 3ABC do CEVAN e Soro Controle Negativo; 3) Proteína 3ABC do CEVAN e anticorpo monoclonal purificado; 4) Cultivo do vírus O1 Campos e anticorpo monoclonal purificado. A seta vermelha indica a proteína 3ABC (66 kDa).

FONTE: O AUTOR

6 DISCUSSÃO

Para a produção de anticorpos tanto policlonal quanto monoclonal anti-3ABC, inicialmente os esforços, deste trabalho, foram direcionados a produção da proteína recombinante 3ABC e posterior produção dos anticorpos. A modificação genética do microrganismo utilizado para a expressão da proteína foi realizado por GONZALEZ (2013). Para o presente trabalho havia a necessidade de produzir a proteína em quantidade suficiente para imunizar os animais para a produção dos anticorpos poli e monoclonal. Foi então realizada a produção obtendo-se proteína de massa molecular de 66 kDa que teve maior concentração após a adição do indutor (IPTG) ao meio de cultura. Essa massa corresponde à determinada pela sequência de aminoácidos da proteína 6xHis-3ABC (49,7 kDa) e do vetor pET-SUMO (16 kDa) totalizando os 65,7 kDa. Portanto, a proteína produzida, no presente trabalho, não teve degradação por proteases. Este foi um passo fundamental para as etapas posteriores.

A estratégia de purificação da proteína 3ABC escolhida foi dependente de seu uso. Para a produção de anticorpos é possível utilizar proteínas purificadas, parcialmente purificadas, peptídeos ou ainda amostras de tecidos não purificadas, com características solúveis ou insolúveis (STAHL *et al.*, 1983; CIANFRIGLIA *et al.*, 1987). Para a imunização dos animais, tanto coelho quanto camundongos, foi realizada a etapa purificação parcial da proteína 3ABC, para obter elevada concentração. Segundo Coffino *et al.* (1972), Harlow *et al.* (1988) e Bazin *et al.* (1989) por mais que para a produção de anticorpos monoclonais seja desejável imunizar os animais com um antígeno purificado, para aumentar a frequência de crescimento de hibridomas, que secretam os anticorpos específicos, este não é o requisito primordial. É importante notar que o anticorpo monoclonal é bastante específico sendo então possível imunizar animais com um antígeno impuro ou até mesmo com diferentes antígenos desde que se tenha um teste de seleção altamente específico para o monoclonal, que irá identificar um antígeno específico (BAZIN *et al.*, 1989).

A proteína 6xHis-SUMO-3ABC foi produzida na forma de corpúsculos de inclusão. A proteína 6xHis-SUMO-3ABC que poderia ser facilmente purificada por cromatografia de afinidade em condições desnaturantes com 8M de uréia, apresentou baixa solubilidade e interações fracas entre a proteína e a resina da coluna IMAC. Este problema foi devido à formação de agregados que poderiam ocultar a fusão 6xHis dificultando a purificação por IMAC (GONZALEZ, 2013). A principal causa da formação de agregados pode estar relacionada com a proteína 3A que possui sequências hidrofóbicas que dirigem sua ancoragem às membranas celulares (Teterina *et al.*, 2003). Para solucionar este problema e obter a proteína em grande quantidade e concentração, a proteína purificada parcialmente foi solubilizada em tampão TRIS pH 12 o qual permitiu a recuperação da proteína íntegra. A etapa anterior a solubilização foi a lavagem dos corpúsculos de inclusão com água, a qual permitiu a eliminação de algumas proteínas contaminantes.

Neste trabalho a obtenção da proteína com elevado grau de pureza para os testes de seleção dos hibridomas foi obtida por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC). Os resíduos de histidina (6Hix) presentes na proteína tem afinidade pelo íon imobilizado, nesse caso o níquel, e a eluição foi realizada com Imidazol que compete com a histidina por afinidade pelos íons níquel devido ao seu anel imidazólico. O sucesso do processo de purificação deveu-se ao tampão utilizado no presente trabalho para a solubilização dos corpúsculos, permitindo solubilizar a proteína e desfazer agregados que atrapalham a ligação dos resíduos de histidina ao níquel imobilizado à coluna. O tampão contém o detergente aniônico (sarcosil) que estabiliza as interações hidrofóbicas. O sarcosil é bastante utilizado para estabilização e desagregação de proteínas de membranas como o caso da 3ABC (BILOZORV, 1998). Outro aditivo utilizado foi o 2-mercaptoetanol que reduz as possíveis pontes de dissulfeto que podem ocorrer entre cisteínas exteriorizadas formando agregados (BORNHORST *et al.*, 2000). Esses aditivos foram importantes para manter a proteína íntegra e livre de agregados e expor a cauda de Histidina para a purificação.

A identidade imunológica da proteína 3ABC nas etapas de purificação foi confirmada por *Western Blotting*. Neste teste foi utilizado como detector o anticorpo

monoclonal 3H7 produzido comercialmente e dirigido ao epítopo 3A que reconheceu a proteína. Neste ensaio foi possível observar que a proteína semi purificada apresentou rastros de degradação. O processo de purificação pela presença do coquetel de inibidores de proteases foi fundamental para manter a estabilidade da proteína, livre de degradação.

Para a obtenção do anticorpo policlonal o animal escolhido, para a sensibilização com a proteína 3ABC, foi o coelho por apresentar tamanho maior em relação aos outros animais de laboratório. E, conseqüentemente, produzir quantidade maior volume de soro sem efeitos prejudiciais significativos ao animal. A imunização dos coelhos foi feita com Adjuvante de *Freund*. Este adjuvante é amplamente utilizado por mais de 50 anos (FREUND *et al.*, 1937) e é um adjuvante eficaz com uma ampla gama de antígenos (HAROLD e STILS, 2005).

A avaliação da produção de anticorpo policlonal anti-3ABC foi realizada pelos testes de *Western Blotting* e ELISA para verificação da cinética de produção de anticorpo. No teste de *Western Blotting* foi possível conferir a resposta humoral em coelhos com a presença de uma banda a 66 kDa correspondente a proteína 3ABC. Este resultado mostrou que a imunoglobulina anti-3ABC foi facilmente produzida em coelhos da raça Nova Zelândia. No teste de cinética para produção de anticorpo policlonal foi possível conferir o aumento dos títulos de anticorpos ao longo das imunizações realizadas. O esquema de imunização realizado foi suficientemente eficaz para uma boa produção de anticorpos. Conforme Klinman e Press (1975) após a imunização primária, células B virgens são estimuladas a diferenciarem-se em células do plasma secretoras de anticorpos. Para a maioria dos antígenos proteicos solúveis, um anticorpo específico começa a aparecer, no soro, de cinco a sete dias após o animal ser imunizado. Os títulos de anticorpos continuaram a subir até o 15º dia e depois diminuíram. Além de se diferenciar em células formadoras de anticorpos, as células B estimuladas por antígenos proliferam para formar uma grande população de células B de memória, que rapidamente se tornam ativadas após a administração do reforço (booster) (PRESS, 1975). O pico de produção de anticorpos ocorre de 7 a 14 dias após o reforço, e isto foi possível

observar neste trabalho, onde o pico de anticorpos ocorreu em 60 dias e após o *booster* os animais apresentaram aumento dos títulos.

A validação do teste ELISA para avaliar a cinética de produção de anticorpo policlonal foi realizada com base na curva ROC (METZ, 1978; ZWEIG and CAMPBELL, 1993). Esta metodologia é uma forma eficiente de demonstrar a relação normalmente antagônica entre a sensibilidade e a especificidade dos testes que apresentam resultados contínuos. É uma ferramenta para medir e especificar problemas no desempenho do teste por permitir estudar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte (KESTLER, 2001). A curva ROC foi desenvolvida no campo das comunicações como uma forma de demonstrar as relações entre sinal-ruído. Interpretando o sinal como os verdadeiros positivos (sensibilidade) e o ruído, os falsos positivos (especificidade) (KESTLER, 2001). Através desta ferramenta foi possível demonstrar o aumento da produção do anticorpo policlonal contra a proteína 3ABC de forma confiável.

A purificação do anticorpo policlonal foi realizada com resina de proteína G. A porção Fc de uma variedade de imunoglobulinas (Ig) é conhecida por se ligar a várias proteínas, incluindo a proteína A e G. Matrizes destas proteínas imobilizadas em resina de agarose têm sido amplamente utilizadas em pesquisa, onde a purificação de anticorpos é requerida (HUSE *et al.*, 2002). A purificação foi precedida de processos de pré-purificação com solução de sulfato de amônio saturado com concentração final de 33% possibilitou concentrar a imunoglobulina G (EL-KAK E VIJAYALAKSHMI, 1991). Também foi realizado o procedimento para a remoção de anticorpos que reconhecem antígenos bacterianos (LPS). Este procedimento foi importante para tornar o anticorpo policlonal mais específico à proteína 3ABC, visto que para a imunização dos animais foi utilizada a proteína semi purificada que continha proteínas de *E. coli*. Amostras obtidas em diferentes fases do processo de purificação do anticorpo policlonal foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% com redutor, para que as cadeias leves e pesadas fossem separadas e gerassem bandas com massas moleculares específicas a cada molécula. Constatou-se a presença de bandas com massas moleculares equivalentes a 25 e 50 kDa, condizentes com as cadeias leves e pesadas

respectivamente. A confirmação da resposta imunológica do anticorpo frente à proteína 3ABC, após todos os procedimentos de purificação, foi realizado por *Western Blotting*. Este resultado mostrou que os procedimentos realizados para a purificação foram eficientes deixando-o mais específico para a proteína de interesse.

Após a produção e purificação do anticorpo policlonal e com a finalidade de se obter um anticorpo altamente específico e que pudesse ser utilizado em testes ELISA do tipo sanduiche, juntamente com o policlonal, foi produzido o anticorpo monoclonal anti - 3ABC. Para a produção de anticorpo monoclonal foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, pois são animais de fácil manuseio, reagentes anti-Ig específicos para cada isotipo de Ig de camundongo são mais comumente disponíveis e geralmente os monoclonais produzidos a partir da imunização de camundongos são mais fáceis de purificar. Além disso, as células do baço isoladas dos camundongos devem ser da mesma linhagem de origem dos mielomas (HARLOW & LANE, 1988). Deste modo a linhagem NS0 e linfócitos B derivados de camundongos de mesma linhagem (BALB/c) foram escolhidos. A imunização dos camundongos foi feita com adjuvante de *Freund*. A primeira dose da proteína foi administrada junto com o adjuvante completo de *Freund* que contém *Mycobacterium tuberculosis* inativo, a fim de estimular o sistema imune do animal (FREUND *et al.*, 1937). Geralmente os anticorpos produzidos logo após esta aplicação possuem alta concentração e inespecificidade. Nas inoculações seguintes o adjuvante foi substituído por adjuvante incompleto de *Freund*, o qual não possui o *M. tuberculosis*, aumentando a especificidade do anticorpo (JOHNSTON *et al.*, 1991; DEEB *et al.*, 1992; SMITH *et al.*, 1992). A imunização dos camundongos foi realizada por via intramuscular por apresentar uma absorção rápida e por poder ser usada na primo e reinoculações. Uma sexta imunização foi realizada três dias antes da fusão, para a sincronização das células B (HARLOW & LANE, 1988).

Ao término do protocolo de imunizações, os soros dos camundongos foram analisados por *Western Blotting* para avaliar a resposta humoral. Amostras de soro sanguíneo, obtidas por punção cardíaca dos camundongos, foram avaliadas frente à proteína 3ABC purificada impregnada na membrana de nitrocelulose. O resultado mostrou reatividade do soro positivo para a proteína 3ABC e ausência de reação do

soro negativo. Entendeu-se que este resultado seria uma evidência convincente de que o baço dos camundongos conteriam quantidades suficientes de clones de linfócitos B sensibilizados podendo, desta forma, realizar a fusão. Os soros dos animais positivos e negativos também foram utilizados nos testes ELISA como controle positivo e negativo, respectivamente, para discriminar os clones secretores.

O princípio da técnica de produção de anticorpo monoclonal não sofreu alterações desde 1976, muitos artigos publicados descrevem apenas adaptações e algumas modificações (LLAMES *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2012; CHO *et al.*, 2012). Neste trabalho as condições de produção dos anticorpos monoclonais foram realizadas com algumas adaptações no protocolo descrito por HARLOW & LANE (1988) e LLAMES *et al.* (2000). A fusão foi realizada após três dias da última imunização dos animais. Este tempo para a retirada do baço tem sido associado como fator importante no resultado da fusão e produção de anticorpo (STHAL *et al.*, 1983; CIANFRIGLIA *et al.*, 1987). Para a fusão foi utilizado a proporção de 1:5, mielomas e linfócitos respectivamente, os quais foram distribuídos em 5 placas de 96 poços. A escolha desta proporção foi com o objetivo de diminuir a fusão de mielomas entre si, aumentando a probabilidade de fusão linfócito/mieloma (TROIANO, 2009). Uma placa controle contendo somente mielomas foi utilizada. Após o décimo dia de cultivo, em meio HAT, todos os mielomas estavam mortos, confirmando que os mielomas eram realmente hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase negativas, sendo incapazes de sobreviver no meio HAT. A proporção de células, escolhida neste trabalho, obteve sucesso pois 45,2% dos 480 poços apresentaram colônias de hibridomas com uma frequência de fusão de $2,5 \times 10^6$ células hibridizadas. Dos 217 poços com crescimento de hibridomas, apenas oito foram considerados positivos no teste ELISA com coloração visível (absorbância acima de 0,1 nm). A presença de colônias não secretoras pode ser explicada quando os dois tipos celulares são fundidos (linfócito B e mieloma), na mitose ou interfase, o DNA sofre segregação para as células filhas, formando assim diversos híbridos ou clones (HARLOW & LANE, 1988). Durante a segregação o número de cromossomos é maior que o normal, nem sempre a divisão é igual para as células filhas e muitos cromossomos podem ser perdidos. A perda de cromossomos pode

resultar na incapacidade dos hibridomas em produzir anticorpos específicos ou de fazer rearranjos das frações variáveis das cadeias leves e pesadas (HARLOW & LANE, 1988). Cerca de 50% dos hibridomas gerados que inicialmente expressam anticorpos contra um antígeno desejado perdem a habilidade de expressão devido à perda cromossomal (TROIANO, 2009; TROIANO et al., 2013). Outra questão é que os hibridomas formados poderiam estar secretando anticorpos para outras proteínas não presentes no teste ELISA, já que os camundongos foram imunizados com a proteína purificada parcialmente.

Os anticorpos monoclonais são secretados pela descendência de uma única célula que pode produzir apenas um único anticorpo. A clonagem, por diluição limite é necessária para assegurar que os problemas de múltipla especificidade sejam evitados e o risco de crescimento excessivo de células não produtoras, minimizados (COFFINO et al., 1972). Após a clonagem as células foram expandidas.

Para os anticorpos monoclonais serem utilizados como insumo para o teste ELISA, a estabilidade dos clones foi testada. O teste permitiu selecionar dois clones, dos oito iniciais, que perderam sua capacidade de secreção de anticorpos. Este dado está de acordo com os resultados observados por Clark (1981), em que vários clones submetidos ao processo de congelamento e descongelamento perdem a capacidade de expressão de anticorpo. O congelamento e descongelamento dos clones 2D3 e 3D12 foi utilizado com sucesso para a seleção e determinação de células viáveis e estáveis para a produção do anticorpo monoclonal (PRAVTCHEVA et al., 1983).

Quanto à caracterização dos anticorpos monoclonais produzidos pode-se salientar que são específicos para a proteína 3ABC como demonstrado no teste *Western Blotting*.

Com a finalidade de recuperar os hibridomas ascíticos e produzir maior concentração de anticorpos foi realizada a produção de líquido ascítico em camundongos BALB/c (HARLOW & LANE, 1988). A produção de líquido ascítico é recomendada, pois normalmente a linhagem de hibridomas não se adaptam bem as condições de cultivo *in vitro* e aquelas que se adaptam tornam-se incapazes de manter a produção adequada de anticorpo (NATIONAL HEALTH AND MEDICAL

RESEARCH COUNCIL GUIDELINES FOR MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION, 2008). Os métodos de cultura também produzem populações de IgG que estão glicosiladas em posições diferentes daquelas colhidas a partir do fluido ascítico, influenciando assim na capacidade de ligação ao antígeno e nas funções biológicas importantes (MORIOKA *et al.*, 2009).

A inoculação das células na cavidade peritoneal causa um processo inflamatório, aumentando o fluxo de macrófagos que propiciam um ambiente com todos os fatores para um melhor crescimento dos hibridomas e, portanto, uma maior produção de anticorpo monoclonal (ALVES, 2006).

O procedimento de purificação do anticorpo monoclonal foi realizado com sucesso e pode-se observar no teste de *Western Blotting* para a caracterização da reação do anticorpo que o mesmo reconheceu a proteína 3ABC de diferentes origens. Este teste foi fundamental para demonstrar que o anticorpo monoclonal produzido neste trabalho é capaz de identificar a proteína 3ABC de antígenos produzidos no processo de fabricação da vacina contra a febre aftosa da empresa Ourofino Saúde Animal.

7 CONCLUSÃO

Foi comprovada a capacidade imunogênica da proteína recombinante obtida usando a técnica de *Western Blotting* com o anticorpo monoclonal anti-3A disponível comercialmente.

As imunizações dos coelhos com a proteína semi purificada produzida foram suficientes para obter o anticorpo policlonal. Este anticorpo foi purificado e caracterizado, tornando-o mais específico para proteína 3ABC.

Foi possível obter oito clones que secretam o anticorpo monoclonal anti-3ABC, os quais foram expandidos e testados sua estabilidade. Dois clones mostraram-se estáveis e foram caracterizados pelo teste de *Western Blotting*, comprovando que o anticorpo monoclonal reage contra a proteína 3ABC especificamente.

O anticorpo monoclonal assim como a anticorpo policlonal produzidos neste trabalho permitem o monitoramento da presença de proteínas não estruturais do vírus da febre aftosa durante as etapas de produção e purificação da vacina.

8 PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho são estabelecer e validar o teste ELISA com alta especificidade, homogeneidade e reprodutibilidade, para a quantificação das proteínas não estruturais do vírus da febre aftosa e para o monitoramento destas durante o processo de produção da vacina.

Após estabelecimento e validação do teste, deve-se correlacionar com o teste oficial ELISA 3ABC/EITB. A finalidade deste teste é de verificar se as partidas de vacina contra a febre aftosa antes da comercialização apresentam capacidade de induzir a formação de anticorpos contra proteínas não estruturais nos animais vacinados. A correlação entre os testes permitirá conhecer os níveis de anticorpos presentes nas vacinas que poderão induzir a formação de anticorpos nos animais, que serão identificados pelo teste oficial ELISA 3ABC/EITB. Esta será uma forma de evitar a reprovação de vacinas, que geram grandes perdas econômicas ao fabricante.

Os resultados promissores obtidos neste trabalho abrem as portas para o desenvolvimento de outras plataformas tecnológicas na empresa Ourofino Saúde Animal, como a produção de anticorpos monoclonais, que permitirão sua independência tecnológica quanto a obtenção de reagentes biológicos para o controle de seus processos produtivos e produtos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 6^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- AL-LAZIKANIA, B.; LESKA, A. M.; CHOTHIAA, C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. **Journal of molecular biology**, v. 273, n. 4, p. 927-948, 1997.
- ALONSO, A.; GOMES, M.P.D.; MARTINS, M.A.; SONDHAL, M.S. Detection of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immune sorbent assay and agar gel immune diffusion tests. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 9, p. 234-240, 1990.
- ALVES, T. M. Produção e Caracterização de anticorpos monoclonais contra *Campylobacter fetus subsp. venerealis*. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2006.
- AYELET, G.; MAHAPATRA, M.; GELAYE, E.; EGZIABHER, B. G.; RUFÉAL, T.; SAHLE, M.; FERRIS, N. P.; WADSWORTH, J.; HUTCHINGS, G. H.; KNOWLES, N. J. Genetic characterization of foot-and-mouth disease viruses, Ethiopia, 1981–2007. **Emerging infectious diseases journal**, v. 15, n. 9, p. 1409-1417, 2009.
- BARANOWSKI, E.; RUIZ-JARABO, C. M.; LIM, F.; DOMINGO, E. Foot-and-mouth disease virus lacking the VP1 G-H loop: the mutant spectrum uncovers interactions among antigenic sites for fitness gain. **Virology**, v.288, n.2, p.192-202, 2001.
- BAXT, B. Effect of lysosomotropic compounds on early events in foot-and-mouth disease virus replication. **Virus research**, v. 7, n. 3, p. 257–271, 1987.
- BAXT, B.; BECKER, Y. The effect of peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells. **Virus genes**, v. 4, n. 1, p. 73-83, 1990.
- BAZIN, R.; LEMIEUX, R. Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6). **Journal Immunology Methods**, v. 116, p. 245-249, 1989.
- BELSHAM, G. J. Translation and replication of FMDV RNA. **Current topics on microbiological and immunology**, v. 288, n. 1, p. 43-70, 2005.
- BELSHAM, G. J.; BRANGWYN, J. K.. A region of the 5 noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within

cells: involvement with the role of Lprotease in translational control. **Journal of virology**, v. 64, n. 11, p. 5389-5395, 1990.

BENTHAM, M.; HOLMES, K.; FORREST, S.; ROWLANDS, D. J.; NICOLA, J. Formation of higher-order foot-and-mouth disease virus 3Dpol complexes is dependent on elongation activity stonehouse. **Journal of virology**, v. 86, n. 4, p. 2371-2374, 2012.

BERGER, H.G.; STRAUB, O.C.; AHL, R.; TESAR, M.; MARQUARDT, O. Identification of foot-and-mouth disease virus replication in vaccinated cattle by antibodies to non-structuralvirus proteins. **Vaccine**, v. 8, p. 213-216, 1990.

BERGMANN, I. E.; DE MELLO, P. A.; NEITZERT, E.; BECK, E.; GOMES, I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. **American journal of veterinary research**, v. 54, n. 6, p. 825-831, 1993.

BERGMANN, I.E.;NEITZERT, E.; MALIRAT, V.; CAMPOS, R.M.; PULGA, M.; MURATOVIC, R.; QUINTINO, D.; MORGADO, J.C.; OLIVEIRA, M.; NETO, D.L. Development of an Inhibition ELISA Test for the Detection of Non-Capsid Polyprotein 3ABC in Viral Suspensions Destined for Inactivated Foot-and- Mouth Disease Vaccine. **Developmental Biology (Basel)**, v.126, p. 241-250, 2006.

BILOZORV, O.P. A method of isolating the main outer membrane protein of *Chlamydia*. **Mikrobiol. Z**, v. 60, n. 3, p. 85-90, 1998

BLACK, C. A. A brief history of the discovery of the immunoglobulins and the origin of the modern immunoglobulin nomenclature. **Immunology and cell biology**, v. 75, n. 1, p. 65-68, 1997.

BOLWELL, C.; CLARKE, B. E.; PARRY, N. R.; OULDRIDGE, E. J.; BROWN, F.; ROWLANDS, D. J. Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus with neutralizing monoclonal antibodies. **Journal of general virology**, v. 70, n. 1, p. 59-68, 1989.

BORNHORST, J.A.; FALKE, J.J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. **Methods in enzymology**, v. 326, p. 245-254, 2000.

CAO, X.; BERGMANN, I. E.; FULLKRUG, R.; BECK, E. Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. **Journal of virology**, v. 69, n. 1, p. 560-563, 1995.

CAPOZZO, A.V.; MARTÍNEZ, M.R.; SCHELEN, W.J. Development of an in process control filtration- assisted chemiluminometric immunoassay to quantify foot and mouth disease virus (FMDV) non-capsid proteins in vaccine-antigen batches. **Vaccine**, v. 10. p. 1016, 2010.

CAPOZZO, A.V.E.; BURKE, D.J.; FOX, J.W.; BERGMANN, I. E.; LA TORRE, B. J. L.; GRIGERA, P.R. Expression of foot and mouth disease virus non-structural polypeptide 3ABC induces histone H3 cleavage in BHK21 cells. **Virus research**, v. 90, n. 1-2, p. 91-99, 2002.

CARRILLO, C., TULMAN, E.R., DELHON, G., LU, Z., CARRENO, A., VAGNOZZI, A. KUTISH, G.F., ROCK, D.L. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. **Journal of virology**, v. 79, p. 6487-6504, 2005.

CAVANAGH, D.; ROWLANDS, D. J.; BROWN, F. Early events in the interaction between foot-and mouth disease virus and primary pig kidney cells. **Journal of general virology**, v. 41, n. 2, p. 255-264, 1978.

CIANFRIGLIA, M.; NUTI, M.; TURCHI, V.; BARCA, S.; TOMBESI, M.; MORRONE, S.; CENCIARELLI, C; NATALI, P.G. High frequency production of hybridomas secreting antibodies to cell antigens. **Hybridoma**, v.6, n.6, p.673-677, 1987.

CHEN, H.; PENG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, X. Detection of Foot-and-mouth Disease Serotype O by ELISA Using a Monoclonal Antibody. **Hybridoma**, v.31, n.6, 2012.

CHO, J. G.; JO, Y. J.; SUNG, J. H.; HONG, J. K.; HWANG, J. H.; PARK, J. H.; LEE, K. N.; PARK, S. G. Monoclonal and Polyclonal Antibodies Specific for Foot and Mouth Disease Virus Type A and Type O VP1. **Hybridoma**, v.31, n.5, 2012.

CLARCK, M.R & MILSTEIN, C. Expression of spleen cell immunoglobulin phenotype in hybrids with myeloma cell lines. **Somatic cell genetic**, v.7, n.6, p.657-666, 1981.

CLAVIJO, A.; WRIGHT, P.; KITCHING, P. Development in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. **The Veterinary journal**, v. 167, p. 9-22, 2004.

CLAVIJO, A.; ZHOU, E. M.; HOLE, K.; GALIC, B.; KITCHING, P. Development and use of a biotinylated 3ABC recombinant protein in a solid-phase competitive ELISA for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. **Journal of virology methods**, v. 120, n. 2, p. 217-227, 2007.

COFFINO, P.; BAUMAL, R.; LASKOV, R.; SCHARFF, M.D. Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare variants. **Journal of Cellular Physiology**, v. 79, p. 429-440, 1972.

COTTAM, E. M.; WADSWORTH, J.; SHAW, A. E.; ROWLANDS, R. J.; GOATLEY, L.; MAAN, S.; MAAN, N. S.; MERTENS, P. P. C.; EBERT, K.; LI, Y.; RYAN, E.D.; JULEFF, N.; FERRIS, N. P.; KNOWLES, N. Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007. **PLoS Pathogens**, v.4, n. 4, 2008.

COWAN, K. M.; GRAVES, J. H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. **Virology**, v. 30, n. 3, p. 528-540, 1966.

DE DIEGO, M.; BROCCHI, E.; MACKAY, D.; DE SIMONE, F. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. **Archives on virology**, v. 142, n. 10, p. 2021-2033, 1997.

DEEB, B.J., DI GIACOMO, R.F., KUNZ, L.L., AND STEWART, J.L. Comparison of Freund's and Ribi adjuvants for inducing antibodies to the synthetic antigen (TG)-AL in rabbits. **Journal of Immunology Methods**, v.152, p.105-113, 1992.

DOMINGO, E.; ESCARMIS, C.; BARANOWSKI, E.; RUIZ-JARABO, C.M.; CARRILLO, E.; NUNEZ, J.I.; SOBRINO, F. Evolution of foot-and-mouth disease virus. **Virus Research**, v.91, p.47-63, 2003.

DOPAZO, J.; SOBRINO, F.; PALMA, E. L.; DOMINGO, E.; MOYA, A. Gene encoding capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus: a quasispecies model of molecular evolution. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 85, n. 18, p. 6811-6815, 1988.

DORSCH-HASLER, K., YOGO, Y., WIMMER, E. Replication of picornaviruses. I. Evidence from in vitro RNA synthesis that poly (A) of the poliovirus genome is genetically coded. **Journal of virology**, v. 16, n. 6, p. 1512-1517, 1976.

DRAKE, J. W.; HOLLAND, J. J. Mutation rates among RNA viruses. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 96, n. 24, p. 13910–13913, 1999.

DUQUE, H.; PALMENBERG, A. C. Phenotypic characterization of three phylogenetically conserved stem-loop motifs in the mengovirus 3' untranslated region. **Journal of virology**, v. 75, n. 7, p. 3111-3120, 2001.

EL-KAK, A.E.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Study of mouse monoclonal antibodies by pseudobioaffinity chromatography using matrix-linked histidine and histamine. **Journal of chromatography**, v. 570, p. 29-41, 1991.

FOORD, A.J.; MULLER, J.D.; YU, M.; WANG, L.F.; HEINE, H.G. Production and application of recombinant antibodies to foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3ABC. **Journal of immunological Methods**, v.321, p.142-151, 2007.

FREUND, J.; CASALS, J.; HOSMER, E.P. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. **The Journal of Immunology**, v.37, p.509, 1937.

FRY, E. E.; STUART, D. I.; ROWLANDS, J. D. The structure of foot-and-mouth disease virus. **Current Topics on microbiological immunology**, v. 288, n. 1, p. 71–101, 2005.

GONZALEZ, A. S. Produção e Avaliação Sorológica da Proteína 3ABC recombinante do vírus da febre aftosa. **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial da Universidade Positivo, 2013.

GRUBER, A.; ZINGALES, B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques*, v. 19, p. 28-30, 1995.

GRUBMAN, M. J.; BAXT, B. Foot-and-mouth disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 2, p. 465-493, 2004.

GRUBMAN, M.J. Foot and Mouth Disease. **Clinical microbiology reviews**, p.465-493, 2004.

HARLOW, E.D.; LANE, D. **Antibody a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

HAROLD, F.; STILLS JR. Adjuvants and antibody production: Dispelling the Myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **ILAR**, v. 46, p. 280-293, 2005.

HAYDON, D. T.; SAMUEL, A. R.; KNOWLES, N. J. The generation and persistence of genetic variation in foot-and-mouth disease virus. **Preventive veterinary medicine**, v. 51, n. 1-2, p. 111-124, 2001.

HUSE, K.; BOHME, H. J.; SCHOLZ, G.H. Purification of antibodies by affinity chromatography. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 51, p. 217-231, 2002.

JACKSON, T.; SHARMA, A., GHAZALEH; R. A.; BLAKEMORE, W. E.; ELLARD, F. M.; SIMMONS, D. L.; NEWMAN, J. W. I.; STUART, D. I.; KING, A. M. Q. Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin $\alpha\beta 3$ in vitro. **Journal of virology**, v. 71, n. 3, p. 8357-8361, 1991.

JAMAL, S. M.; BELSHAM, G. J. Foot-and-mouth disease: past, present and future. **Veterinary research**, v. 44, n. 116, 2013.

JAMAL, S. M.; FERRARI, G.; AHMED, S., NORMANN, P.; CURRY, S.; BELSHAM, G. J. Evolutionary analysis of serotype A foot-and-mouth disease viruses circulating in Pakistan and Afghanistan during 2002-2009. **Journal of general virology**, v. 92, n. 12, p. 2849-2864, 2011.

JAMAL, S. M.; FERRARI, G.; AHMED, S.; NORMANN, P.; BELSHAM, G. J. Molecular characterization of serotype Asia-1 foot-and-mouth disease viruses in Pakistan and Afghanistan; emergence of a new genetic Group and evidence for a novel recombinant virus. **Infection, genetics and evolution journal**, v. 11, n. 8, p. 2049-2062, 2011.

JOHNSTON, B.A.; EISEN, H.; FRY, D. An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. **Laboratory Animal Science**, v. 41, p. 15-21, 1991.

KESTLER, H.A. ROC with confidence – a Perl program for receiver operator characteristic curves. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 64, n. 2, p.133-136, 2001.

KLEID, D. G.; YANSURA, D.; SMALL, B.; DOWBENKO, D.; MOORE, D. M.; GRUBMAN, M. J.; MCKERCHER, P. D.; MORGAN, D. O.; ROBERTSON, B. H.; BACHRACH, H. L. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. **Science**, v. 214, n. 4525, p. 1125-1129, 1981.

KLINMAN, N.R.; PRESS, J. The B cell specificity repertoire: Its relationship to definable subpopulations. **Transplant Review**, v. 24, p. 41-83, 1975.

KNOWLES, N.J.; SAMUELA, A.R.; DAVIES, P.R.; KITCHING, R.P.; DONALDSON, A.I. Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the U.K caused by a pandemic strain. **Veterinary Record**, p.148-258, 2001.

KWEON, Y. H.; KO, Y. J.; KIM, W.; LEE, S. Y.; NAHA, J. J.; LEE, K. N.; SOHNA, H. J.; CHOI, K. S.; HYUNA, B. H.; KANGA, S. W.; JOO, Y. S.; LUBROTH, J. Development of a foot-and-mouth disease NSP ELISA and its comparison with differential diagnostic methods. **Vaccine**, v. 21, n. 13-14, p. 1409-1414, 2003.

LIPMAN, N. S., JACKSON, L. R., TRUDEL, L. J., WEIS-GARCIA, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. **Institute for laboratory animal research journal**, v. 46, n. 3, 2005.

LLAMES, L.; GOYACHE, J.; DOMÉNECH, A.; AVILA, A.; SUAREZ, G.; GOMEZLUCIA, G. Production and characterization of monoclonal antibodies against bovine leukaemia virus using various crude antigen preparations: a comparative study. **Journal veterinary medicine**, v.47, p.387–397, 2000.

LU, Z.; CAO, Y.; GUO, J.; QI, S.; LI, D.; ZHANG, Q.; MA, J.; CHANG, H.; LIU, Z.; LIU, X.; XIE, Q. Development and validation of a 3ABC indirect ELISA for differentiation of foot-and-mouth disease virus infected from vaccinated animals. **Veterinary microbiology**, v. 125, n. 1-2, p. 157-169, 2007.

LU, Z.J.; ZHANG, X.L.; FU, Y.F. Expression of the major epitope regions of 2C integrated with the 3AB non-structural protein of foot-and-mouth disease virus and its potential for differentiating infected from vaccinated animals. **Journal of virology Methods**, v.170, p.128-133, 2010.

LYRA, M. P.; SILVA, J. A. A febre aftosa no Brasil. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 565-576, 2004.

MA, L.; ZHANG, J.; CHEN, H.; ZHOU, J.; DING, Y.; LIU, Y. An overview on ELISA techniques for FMD. **Journal of virology**, v. 8, n. 419, p. 419, 2011.

MASON, P. W.; BEZBORODOVA, S. V.; HENRY, T. M. Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. **Journal of virology**, v. 76, n. 19, p. 9686-9694, 2002.

MC WILLIAM, A.; NIEMI, S.M. Freund's adjuvant. **Canadian council on animal care resource**, v.12, p.1, 1988.

METZ, C.E. Basic principles of ROC analysis. **Semin Nucl Med**, v.8, p. 283-289, 1978.

MEYER, R. F.; BABCOCK, G. D.; NEWMAN, J. F.; BURRAGE, T. G.; TOOHEY, K.; LUBROTH, J.; BROWN, F. Baculovirus expressed 2C of foot-and-mouth disease virus has the potential for differentiating convalescent from vaccinated animals. **Journal of virology methods**, v. 65, n. 1, p. 33-43, 1997.

MORIOKA, K.; FUKAI, K.; YOSHIDA, K.; YAMAZOE, R.; HIROYUKI, O.; OHASHI, S.; TSUDA, T.; SAKAMOTO, K. Immunosorbent Assay Using Multiserotype-Reactive Monoclonal Antibodies. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3663-3668, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON METHODS OF PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES. **Monoclonal antibody production**: 1-10. Washington (DC), 1999.

NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL GUIDELINES FOR MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION. <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/monosys.htm>, 2008.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.. Amino N, Hase T: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acid research**, v. 28, n. 12, e26, 2000.

O'DONNELL, V. K.; PACHECO, J. M.; HENRY, T. M.; MASON, P. W. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. **Virology**, v. 287, n. 1, p. 151-162, 2001.

Organización Panamericana de la Salud (OPS): Plan de acción: Programa Hemisférico de Erradicación da la Fiebre Aftosa em América del Sur. Reunión del Comité Hemisférico de Erradicación de la Fiebre Aftosa, Washington DC, p.32, 1988.

PENHA, T. R. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti-fragmento Fc de IgG de bovino. **Tese de doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação

em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil,p.98, 2007.

PEREDA, A.J., KONIG, G.A., CHIMENO ZOTH, S.A., BORCA, M., PALMA, E.T., PICCONE, M.E. Full length nucleotide sequence of foot-and-mouth disease vírus strain O1 Campos/Bra/58. **Archives of virology**, v.147, p.2225-2230, 2002.

PICCONE, M. E.; RIEDER, E.; MASON, P. W.; GRUBMAN, M. J. The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. **Journal of virology**, v. 69, n. 9, p. 5376-5382, 1995.

PIERSCHBACHER, M. D.; RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature**, v. 309, n. 5963, p. 30-33, 1984.

POLATNICK, J.; WOOL, S. H. Correlation of surface and internal ultrastructural changes in cells infected with foot-and mouth disease virus. **Canadian journal of computational medicine**, v. 47, n. 4, p. 440-444, 1983.

PRAVTCHEVA, D.D.; RUDDLE, F.H. X chromosome-induced reversion of chromosome segregation in mouse/Chinese hamster somatic cell hybrids.Cellular recognition of native and foreign X chromosomes. **Experimental cell research**, v.146, n.2, p.401-416, 1983.

PRIYADHARSHINI, M.L.; BALAMURUGAN, V.; PRABHUDAS, K. Expression of 3AB protein of foot and mouth disease virus in *Pichia pastoris*. **Indian Journal of biotechnology**, v.6, p.329-335, 2007.

REID, S. M.; FERRIS, N. P.; BRÜNING, A.; HUTCHINGS, G. H.; KOWALSKA, Z.; AKERBLUM, L. Development of a rapid chromatographic strip test for the pen-sidedetection of foot-and-mouth disease virus antigen. **Journal of virology methods**, v. 96, n. 2, p. 189-202, 2001.

RODRIGUEZ, A.; MARTÍNEZ-SALAS, E.; DOPAZO, J.; DÁVILA, M.; SÁIZ, J. C.; SOBRINO, F. Primer design for specific diagnosis by PCR of highly variable RNA viruses: typing of foot-and-mouth disease virus. **Virology**, v. 189, n. 1, p. 363-367, 1992.

ROIVAINEN, M. ; PIIRAINEN, L.; HOVI, T. ; VIRTANEN, I. ; RIIKONEN, T. ; HEINO, J. ; HYYPIA, T. Entry of coxsackievirus A9 into host cells: specific inter-actions with alpha v beta 3 integrin, the vitronectin receptor. **Virology**, v. 203, n. 2, p. 357-365, 1994.

ROSAS, M.F.; VIEIRA, Y.A.; POSTIGO, R. Susceptibility to viral infection is enhanced by stable expression of 3A or 3AB proteins from foot-and-mouth disease virus. **Virology**, v.380, p.34-45, 2008.

RUBIOLO, B.;SEKI, C.; FONDEVILLA, N.; GRIGERA, P.; SCODELLER, E.; PERIOLO, O.; LA TORRE, J.; MATTION, N. Analysis of the immune response to FMDV structural

and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of liquid phase and 3ABC-ELISA tests. **Vaccine**, v. 24, p. 997-1008, 2006.

RUECKERT, R. R.; WIMMER, E. Systematic nomenclature of picornavirus proteins. **Journal of virology**, v. 50, n. 3, p. 957-959, 1984.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third Edition, Cold.

SAMUEL, A. R.; KNOWLES, N. J. Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). **Journal of general virology**, v. 82, n. 3, p. 609-621, 2001.

SCHROEDER, H. W., CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Allergy and clinical immunology**, n. 202, p. S41-S52, 2010

SEGUNDO, F. D.; CALVO, T. R.; AVILA, A.; SEVILLA, N. Immunosuppression during acute infection with foot-and-mouth disease virus in swine is mediated by IL-10. **Plos one**, v. 4, n. 5, e5659, 2009.

SHEN, F.; CHEN, P. D.; WALFIELD, A. M.; YE, J.; HOUSE, J.; BROWN, F.; WANG, C. Y. Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot-and-mouth disease by a peptide ELISA. **Vaccine**, v. 17, n. 23-24, p. 3039-3049, 1999.

SMITH, D.E., O'BRIEN, M.E., PALMER, V.J., AND SADOWSKI, J.A. The selection of an adjuvante emulsion for polyclonal antibody production using a low-molecular-weight antigen in rabbits. **Laboratory Animal Science**, v. 42, p. 599-601, 1992.

SMITHA, M. T.; BENNETA, A. M.; GRUBMANB, M. J.; BUNDY, B. C. Foot-and-mouth disease: technical and political challenges to eradication. **Vaccine**, v. 32, n. 31, p. 3902-3908, 2014.

SORENSEN, K. J.; MADSEN, K. G.; MADSEN, E. S.; SALT, J. S.; NQINDI, J.; MACKAY, K. D.. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. **Archives on virology**, v. 143, n. 8, p. 1461-1476, 1998.

SORENSEN, K.J.; DE STRICKER, K.; DYRTING, K.C.; GRAZIOLI, S.; HAAS, B. Differentiation of foot-and-mouth disease virus infected animals from vaccinated animals using a blocking ELISA based on baculovirus expressed FMDV 3ABC antigen and a 3ABC monoclonal antibody. **Archives of Virology**, v.805, p.14, 2005.

Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2001 SARAIVA, V.E.V. Foot and mouth disease and control strategies in South America – current situation. **Proceedings – First OIE/FAO Global Conference on Foot and Mouth Disease: The Way towards Global Control**, 2009.

STAHL, C; STAEHELIN, T; MIGGIANO, V. Spleen cell analysis and optimal immunization for high-frequency production of specific hybridomas. **Methods in enzymology**, v. 92, p.26-36,1983.

SUTMOLLER, P.; BARTELING, S.S.; OLASCOAGA, R.C.; SUMPTION, K.J. Control and eradication of foot-and-mouth disease. **Virus research**, v.91, p.101-144, 2003

SUTMOLLER, P.; McVICAR, J.W.; COTTRAL, G.E. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. **Archives gesamte virusforsch**, v. 23, p. 227-235, 1968.

TETERINA, N.L., RINAUDO, N.S., EHRENFELD, E. Strand-specific RNA synthesis defects in a poliovirus with a mutation in protein 3A. **Journal of virology**, v. 77, p. 12679-12691, 2003.

THOMSON, D.; MURIEL, P.; RUSSELL, D.; OSBOURNE, P.; BROMELEY, A.; ROWLAND, M.; CREIGH-TYTE, S.; BROWN, C. Economic costs of the foot-and-mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. **Revue Scientifique et Technique**, v.3, p.675, 2002.

THOMSON, G. R.; VOSLOO, W.; BASTOS, A. D. Foot and mouth disease in wildlife. **Virus research**, v. 91, n. 1, p. 145-161, 2003.

TOLAR, P; WON, H.; ANDSUSAN, S.; PIERCE, K. Viewing the antigen-induced initiation of B-cell activation in living cells. **Immunological reviews**, v. 221, n. 1, p. 64-76, 2008.

TROIANO, L. D. C. Produção e Caracterização de anticorpos monoclonais anti-gp51 do vírus Leucose Bovina (VLB). **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnológicas, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2009.

TROIANO LDC, THOMAZ-SOCCOL V, AGOTTANI JVB, BRODZINSKI J, PENHA TR, OZAKI SC. Production, Characterization, and Use of Monoclonal Antibodies Against gp51 Protein to Diagnose Bovine Leukemia Virus Infection. **BioResearch Open Access**, v.2, n.1, p.55-60. 2013,

VAHIDEH, A.; MAJIDI, J.; CHAPARZADEH, N.; ABDOLALIZADEH, J.; ALIPARASTI, M.R. Production and purification of polyclonal anti-hamster immunoglobulins in rabbits. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 3, p.363-637, 2011.

VALARCHER J. F. et al. Multiple origins of foot-and-mouth disease virus serotype Asia 1 outbreaks, 2003–2007. **Emerging infectious diseases journal**, v. 15, n. 7, p. 1046-1051, 2009.

VOSLOO, W. Foot-and-mouth disease: a persistent threat. **Microbiology Australia**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2013.

YAMADA, T. Therapeutic monoclonal antibodies. **Journal of medicine**, v. 60, n. 2, p. 37-46, 2011.

YANG, M.; CLAVIJO, A.; BANMANN, R.S.; AVALO, R. Production and characterization of two serotype independent monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.115,p.126-134, 2007.

ZWEIG, M.H; CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clinical Chemistry**, v.39, p.561-577, 1993.