

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLA YOKO TANIKAWA DE ANDRADE

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS MIMÉTICOS DE
AFLATOXINA OBTIDOS POR *PHAGE DISPLAY* COM VALIDAÇÃO DO
POTENCIAL IMUNOGÊNICO

CURITIBA

2017

CARLA YOKO TANIKAWA DE ANDRADE

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS MIMÉTICOS DE AFLATOXINA
OBTIDOS POR *PHAGE DISPLAY* COM VALIDAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Área de concentração: Patologia

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Larissa Magalhães Alvarenga

Co-orientadores: Prof. Dr. Luiz Felipe Caron

Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira de Moura

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Marcia Andreiko –CRB/9-1582)

Andrade, Carla Yoko Tanikawa de
Prospecção e caracterização de antígenos miméticos de aflatoxina
obtidos por Phage Display com validação do potencial imunogênico. / Carla
Yoko Tanikawa de Andrade. – Curitiba, 2017.
125 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga
Co-orientadores: Luiz Felipe Caron e Juliana Ferreira de Moura

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

1. Aflatoxinas. 2. Peptídeo. 3. Imunogenicidade da vacina. 4. Vacinas.
I. Título. II. Alvarenga, Larissa Magalhães. III. Caron, Luiz Felipe. IV. Moura,
Juliana Ferreira de. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

CDD (20. ed.) 547.592



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO


“Prospecção e caracterização de antígenos miméticos de aflatoxina obtidos por phage display com validação do potencial imunogênico”

por

Carla Yoko Tanikawa de Andrade


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Profa. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga (Presidente)


Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin


Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol


Profa. Dra. Lucimara Mach Côrtes Cordeiro


Profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich


Profa. Dra. Lucy Ono

Curitiba, 11 de dezembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Aos que conheci durante esta minha odisseia e àqueles que participaram de minha vida pessoal durante este período *sui generis* de doutoramento meus agradecimentos, sem extensas citações escritas, mas com a eterna recordação na memória.

RESUMO

A aflatoxina é um metabólito fúngico que compromete a saúde pública e a produção animal, causando doença hepática severa, neoplasias e perdas econômicas. Por ser um hapteno, é incapaz de induzir resposta imune efetiva e produção de anticorpos anti-aflatoxina, exceto se conjugada a proteínas carreadoras. Buscando a substituição desses conjugados de toxinas como imunógenos, esse trabalho prospectou antígenos que mimetizam a aflatoxina, por meio da técnica de *phage display*. Nessa técnica, um anticorpo pode ser empregado como molécula alvo para a biosseleção *in vitro*, visando à obtenção de peptídeos que se ligam especificamente à região variável do anticorpo e que mimetizam o antígeno nativo. Dessa forma, bacteriófagos que se ligam *in vitro* ao anticorpo anti-aflatoxina podem ser selecionados para a obtenção de versões sintéticas de vacinas capazes de induzir resposta imune contra a aflatoxina. Assim, os objetivos do presente trabalho foram selecionar clones de fagos altamente reativos miméticos de aflatoxina B1, buscando o desenvolvimento de imunógenos capazes de induzir a produção de anticorpos anti-aflatoxina. As adequações da técnica de *phage display* previamente estabelecida permitiram a prospecção dos clones miméticos de aflatoxina 3P8, 3P13, 3P16, 3P20, 3P23 e 3P30 que foram ligantes de anticorpo comercial monoclonal anti-AFB1. Os resultados dos imunoenaios executados indicaram a alta especificidade de peptídeos expressos por esses fagos em mimetizar *in vitro* as características imunológicas correspondentes à AFB1 em anticorpo específico anti-AFB1. Desta forma, foi observado que a reatividade do fago com o anticorpo foi dependente das concentrações de fago estabelecidas, assim como não houve reatividade frente a moléculas irrelevantes. Fagos expressando mimotopos de baixa reatividade (como o fago 3P25 e o fago silvestre) não foram capazes de estabelecer esta condição, indicando que os mimotopos selecionados corresponderam complementarmente ao sítio de ligação ao antígeno em anticorpo anti-AFB1. A partir da sequência aminoacídica obtida dos mimotopos selecionados, QTDLDYLHPLINSWN, o peptídeo mimético de aflatoxina foi sintetizado e conjugado à molécula carreadora para validação do potencial imunogênico. O resultado das estratégias de imunização com mimotopos e peptídeo sintético indicou que os imunógenos foram eficientes na indução de anticorpo anti-peptídeo que também foi capaz de reconhecer o antígeno original. Portanto, o mimetismo molecular do peptídeo selecionado por *phage display* foi confirmado, permitindo o emprego do fago como imunógeno para o desenvolvimento de uma vacina de subunidades, por meio do encapsulamento em nanopartículas de quitosana. As nanopartículas de quitosana-bacteriófago proporcionaram melhoria na resposta imune específica e local quando comparada a fagos não recobertos. Portanto, o biopolímero permitiu a administração intranasal do imunógeno e o reconhecimento do antígeno pelo sistema imune de mucosa, configurando uma plataforma eficiente na indução de anticorpos específicos anti-aflatoxina. A proposta desse modelo vacinal para o controle de micotoxinas constitui uma nova linha de pesquisa na medicina veterinária e uma alternativa para o desenvolvimento da produção animal. Posteriormente, esta abordagem racional poderá ser aplicada a outras micotoxinas que afetam as populações humana e animal.

Palavras-chave: AFB1. Aflatoxicose. Peptídeo. Mimotopo. Imunógeno. Vacinação.

ABSTRACT

Aflatoxin is a fungal metabolite that compromises public health and animal production, causing severe liver disease, cancer and economic losses. Because it is a hapten, it is incapable of inducing effective immune response and production of anti-aflatoxin antibodies, unless conjugated to carrier proteins. Seeking the replacement of these conjugates of toxins as immunogens, this work prospected for antigens that mimic aflatoxin, using the phage display technique. In this technique, an antibody can be employed as a target molecule for in vitro bioselection, in order to obtain peptides that bind specifically to the variable region of the antibody and mimic the native antigen. Thus, bacteriophages that bind in vitro to the anti-aflatoxin antibody can be selected to obtain synthetic versions of vaccines capable of inducing an immune response against aflatoxin. Thus, the objectives of the present work were to select highly reactive mimetic phages of aflatoxin B1, seeking the development of immunogens capable of inducing the production of anti-aflatoxin antibodies. The adequacy of the previously established phage display technique allowed the prospection of aflatoxin 3P8, 3P13, 3P16, 3P20, 3P23, and 3P30 mimetic clones that were binder of commercial anti-AFB1 monoclonal antibody. The results of the immunoassays performed indicated the high specificity of peptides expressed by these phages in mimicking in vitro the immunological characteristics corresponding to AFB1 in specific anti-AFB1 antibody. Thus, it was observed that the reactivity of the phage against the antibody was dependent on the established phage concentrations, just as there was no reactivity to irrelevant molecules. Phages expressing low reactivity mimotopes (such as 3P25 phage and wild-type phage) were unable to establish this condition, indicating that the selected mimotopes corresponded complementary to the antigen-binding site in anti-AFB1 antibody. From the amino acid sequence obtained from the selected mimotopes, QTDLDYHLPLINSWN, the aflatoxin mimetic peptide was synthesized and conjugated to the carrier molecule to validate the immunogenic potential. The results of mimotope and synthetic peptide immunization strategies indicated that the immunogens were efficient in inducing anti-peptide antibody that was also able to recognize the original antigen. Therefore, the molecular mimicry of the peptide selected by phage display was confirmed, allowing the use of the phage as an immunogen for the development of a subunit vaccine, through the encapsulation in chitosan nanoparticles. Chitosan-bacteriophage nanoparticles provided improved local and specific immune response when compared to uncoated phages. Therefore, the biopolymer allowed the intranasal administration of the immunogen and the recognition of the antigen by the mucosal immune system, configuring an efficient platform in the induction of specific anti-aflatoxin antibodies. The proposal of this vaccine model for the control of mycotoxins constitutes a new line of research in veterinary medicine and an alternative for the development of animal production. Subsequently, this rational approach could be applied to other mycotoxins that affect human and animal populations.

Keywords: AFB1. Aflatoxicosis. Peptide. Mimotope. Immunogen. Vaccination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA E ALGUMAS REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO E EXCREÇÃO DE AFLATOXINA B1 EM HUMANOS E ANIMAIS.....	19
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE FAGO <i>f88.4</i>	23
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DE DIFERENTES BIOPOLÍMEROS.....	27
FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO.....	32
FIGURA 5 – ESQUEMA DE CONJUGAÇÃO DE AFLATOXINAS COM PROTEÍNAS CARREADORAS.....	34
FIGURA 6 – <i>PHAGE DISPLAY</i>	41
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ELISA ESTABELECIDO PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS FAGOS SELCIONADOS.....	46
FIGURA 8 – CONJUGAÇÃO DE AFB1 A KLH E BSA DEMONSTRADA POR <i>DOT BLOT</i>	63
FIGURA 9 – ESPECTROMETRIA DE MASSAS AFB1-BSA.....	64
FIGURA 10 – ESPECTROMETRIA DE MASSAS AFB1-BSA, BAIXA MASSA MOLECULAR E AFM1-BSA.....	64
FIGURA 11 – PERFIL IMUNOLÓGICO CELULAR DE AVES IMUNIZADAS COM AFB1-BSA.....	66
FIGURA 12 – ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE AVES IMUNIZADAS COM AFB1-BSA.....	66
FIGURA 13 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS NATIVAS E DOS CONJUGADOS DE PEPTÍDEO SINTÉTICO.....	79
FIGURA 14 – MACRÓFAGOS CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE AVES IMUNIZADAS COM AFB1-BSA.....	82
FIGURA 15 – MACRÓFAGOS PERITONEAIS CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE CÉLULAS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS E DESAFIADOS COM AFB1 <i>IN VITRO</i>	83

FIGURA 16 – MACRÓFAGOS PERITONEAIS CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE CÉLULAS DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS E DESAFIADOS COM AFB1 <i>IN VIVO</i>	84
FIGURA 17 – CURVA DE TITULAÇÃO DE QUITOSANA.....	87
FIGURA 18 – RMN ¹ H DE QUITOSANA EM ÁCIDO ACÉTICO DEUTERADO....	88
FIGURA 19 – RMN ¹³ C DE QUITOSANA EM ÁCIDO ACÉTICO DEUTERADO...	88
FIGURA 20 – PERFIL DE ELUIÇÃO SEC DE QUITOSANA.....	89
FIGURA 21 – ANÁLISE DE FAGO DILUÍDO 1:100 v/v, por DLS.....	89
FIGURA 22 – ANÁLISE DE QUITOSANA COM 20.000 MOLÉCULAS POR MOLÉCULA DE FAGO.....	90
FIGURA 23 – ENCAPSULAMENTO DE BACTERIÓFAGOS EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	91
FIGURA 24 – ANÁLISE DE NANOPARTÍCULAS DE FAGO DILUÍDO 1:10 v/v COM 20.000 MOLÉCULAS DE QUITOSANA POR MOLÉCULA DE FAGO, POR DLS.....	92
FIGURA 25 – IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-BACTERIÓFAGO.....	93
FIGURA 26 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE FAGO E NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-BACTERIÓFAGO.....	94

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM AFM1-KLH, POR ELISA...	68
GRÁFICO 2 – REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS EM AVES IMUNIZADAS COM AFB1-BSA, POR ELISA.....	69
GRÁFICO 3 – ENRIQUECIMENTO DA REATIVIDADE DOS FAGOS OBTIDOS NOS <i>PANNINGS</i> COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFB1 APÓS TRÊS CICLOS DE SELEÇÃO.....	72
GRÁFICO 4 – <i>SCREENING</i> DOS CLONES DE FAGOS RECUPERADOS.....	73
GRÁFICO 5 – ESPECIFICIDADE DE FAGOS SELECIONADOS (3P4 A 3P30), IRRELEVANTE (3P25) E SILVESTRE (FS) NA CONCENTRAÇÃO DE 10^{12} TU/mL CONTRA ANTICORPOS ANTI-AFB1, POR ELISA.....	73
GRÁFICO 6 – ESPECIFICIDADE DE FAGOS SELECIONADOS (3P4 A 3P30), IRRELEVANTE (3P25) E SILVESTRE (FS) NA CONCENTRAÇÃO DE 10^{11} TU/mL CONTRA BSA E ANTICORPOS IRRELEVANTES, POR ELISA.....	74
GRÁFICO 7 – ESPECIFICIDADE DE FAGOS SELECIONADOS (3P4 A 3P30), IRRELEVANTE (3P25) E SILVESTRE (FS) NAS CONCENTRAÇÕES DE 10^{11} , 10^{10} , 10^9 E 10^8 TU/mL CONTRA ANTICORPOS ANTI-AFB1, POR ELISA.....	75
GRÁFICO 8 – REATIVIDADE DE FAGOS SELECIONADOS (3P4 A 3P30), IRRELEVANTE (3P25) E SILVESTRE (FS) POR ELISA DE COMPETIÇÃO COM ANTICORPO ANTI-AFB1 ADSORVIDO À PLACA.....	75
GRÁFICO 9 – REATIVIDADE DE FAGOS SELECIONADOS (3P4 A 3P30), IRRELEVANTE (3P25) E SILVESTRE (FS) POR ELISA DE COMPETIÇÃO COM ANTICORPO ANTI-AFB1 ADSORVIDO À PLACA, DE ACORDO CO A CONCENTRAÇÃO MOLAR DE AFB1.....	76
GRÁFICO 10 – REATIVIDADE DE FAGOS SELECIONADOS (3P4 A 3P30), IRRELEVANTE (3P25) E SILVESTRE (FS) POR ELISA DE COMPETIÇÃO COM FAGOS ADSORVIDOS À PLACA.....	77

GRÁFICO 11 – REATIVIDADE DE FAGOS SELECIONADOS (3P4 A 3P30), IRRELEVANTE (3P25) E SILVESTRE (FS) POR ELISA DE COMPETIÇÃO COM AFLATOXINA ADSORVIDA À PLACA.....	77
GRÁFICO 12 – REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM FAGOTOPOS MIMÉTICOS DE AFB1, POR ELISA.....	80
GRÁFICO 13 – REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM FAGO E PEPTÍDEO SINTÉTICO, AVALIADA POR ELISA.....	81
GRÁFICO 14 – POTENCIAL ZETA DE NANOPARTÍCULAS DE FAGO DILUÍDO 1:100 v/v COM 20.000 MOLÉCULAS DE QUITOSANA POR MOLÉCULA DE FAGO EM pH 4,6 e pH 7,3.....	92
GRÁFICO 15 – REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS VIA INTRANASAL COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-FAGO, POR ELISA.....	95
GRÁFICO 16 – REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS EM LAVADO BRONCOALVEOLAR DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS VIA INTRANASAL COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-FAGO, AVALIADA POR ELISA.....	95

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADRO 1 – MARCADORES MOLECULARES E POPULAÇÕES CELULARES.....	39
QUADRO 2 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE IMUNIZAÇÃO COM BACTERIÓFAGOS.....	50
QUADRO 3 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE IMUNIZAÇÃO COM BACTERIÓFAGOS E PEPTÍDEO SINTÉTICO.....	52
QUADRO 4 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE IMUNIZAÇÃO COM BACTERIÓFAGOS E PEPTÍDEO SINTÉTICO, VISANDO O DESAFIO COM AFLATOXINA.....	53
QUADRO 5 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE IMUNIZAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E FAGO.....	61
QUADRO 6 – COMPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE AFLATOXINA OBTIDOS ANTERIORMENTE DE DIFERENTES ANTICORPOS ANTI-AFB1.....	78
TABELA 1 – VALORES HEMATOLÓGICOS OBTIDOS DE AVES IMUNIZADAS COM AFB1-BSA PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-AFLATOXINA.....	62 65
TABELA 2 – TITULAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE 8 A 17-MER APÓS AMPLIFICAÇÃO.....	70
TABELA 3 – RESULTADOS DOS CICLOS DE SELEÇÃO REALIZADOS.....	70
TABELA 4 – VALORES HEMATOLÓGICOS OBTIDOS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM PEPTÍDEO, FAGO RELEVANTE 3P30, FAGO SILVESTRE OU NÃO IMUNIZADOS E DESAFIADOS COM AFB1 <i>IN VITRO</i>	85
TABELA 5 – VALORES HEMATOLÓGICOS OBTIDOS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM PEPTÍDEO, FAGO RELEVANTE 3P30, FAGO SILVESTRE OU NÃO IMUNIZADOS E DESAFIADOS COM AFB1 <i>IN VIVO</i>	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB1	Aflatoxina B1
AFC	Adjuvante de Freund completo
AFI	Adjuvante de Freund incompleto
AFM1	Aflatoxina M1
BSA	Albumina sérica bovina
CYP450	Enzimas citocromo p450
DAB	Diaminobenzidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DL50	Dose letal mediana
EDC	1-etil1-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida hidrocloreto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FS	Fago silvestre
HCCA	α -4-hidroxicinâmico
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> (Hemocianina de molusco)
mAb	Anticorpo monoclonal
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight</i>
MES	2-[N-morphilo] etano ácido sulfônico
NALT	Tecido linfoide associado à mucosa nasal
NHS	N-hidroxisulfo-succinamida
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato salino
PBS – T	Tampão fosfato salino com Tween 20
PMSF	Fluoreto de fenilmetanossulfonilo
RPMI	meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TBS	Tampão Tris salino
TBS – T	Tampão Tris salino com Tween 20
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TU	<i>Transduction unit</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 AFLATOXICOSE: ETIOPATOGENIA E CONTROLE.....	17
2.2 <i>PHAGE DISPLAY</i>	22
2.3 VACINA DE ANTÍGENOS MIMÉTICOS.....	24
2.4 QUITOSANA COMO ADJUVANTE PARA VACINAÇÃO.....	26
3 OBJETIVOS	30
3.1 GERAL.....	30
3.2 ESPECÍFICOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 ETAPA 1: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-AFLATOXINA.....	34
4.1.1 Conjugação das toxinas.....	34
4.1.2 Ensaios para confirmação do acoplamento de toxinas às proteínas carreadoras.....	35
4.1.3 Produção de anticorpos anti-AFM1 em camundongos e anti-AFB1 em poedeiras comerciais.....	36
4.1.4 ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos.....	37
4.1.5 Caracterização da resposta imune por citometria de fluxo.....	38
4.1.6 Caracterização celular da resposta imune.....	40
4.2 ETAPA 2: <i>PHAGE DISPLAY</i>	41
4.2.1 Amplificação das bibliotecas randômicas de peptídeos apresentados em fagos.....	42
4.2.2 Seleção de peptídeos miméticos de aflatoxina B1 expressos na superfície de bacteriófagos (<i>panning</i>).....	43
4.2.3 <i>Screening</i> dos clones por ELISA.....	45
4.2.4 Processamento do DNA viral.....	47
4.2.5 Síntese do peptídeo e conjugação à proteína carreadora.....	49
4.3 ETAPA 3: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS INDUZIDOS POR ANTÍGENOS MIMÉTICOS DE AFLATOXINA.....	50
4.3.1 Imunização com bacteriófagos em camundongos.....	50

4.3.2	Imunização com bacteriófagos e peptídeo sintético em camundongos.....	52
4.3.3	Caracterização celular da resposta imune.....	53
4.4	ETAPA 4: VACINA DE MUCOSA COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-BACTERIÓFAGO.....	56
4.4.1	Purificação e caracterização do biopolímero quitosana.....	56
4.4.2	Encapsulamento de bacteriófagos em nanopartículas de quitosana...	58
4.4.3	Imunização com nanopartículas de quitosana-bacteriófagos em camundongos.....	60
5	RESULTADOS	63
5.1	ETAPA 1: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-AFLATOXINA.....	63
5.2	ETAPA 2: <i>PHAGE DISPLAY</i>	70
5.3	ETAPA 3: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS INDUZIDOS POR ANTÍGENOS MIMÉTICOS DE AFLATOXINA.....	80
5.4	ETAPA 4: VACINA DE MUCOSA COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-BACTERIÓFAGO.....	87
6	DISCUSSÃO	97
7	CONCLUSÕES	108
8	PERSPECTIVAS	110
	REFERÊNCIAS	112
	ANEXO I ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO	123
	ANEXO II PATENTE REGISTRADA	124

1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus* (WHO, 2002). Essa toxina não-proteica provoca a aflatoxicose, uma doença que afeta humanos e animais, causando intoxicação hepática severa por necrose hemorrágica do órgão, proliferação de ductos biliares e edema (WILD, 2015). A importância das aflatoxinas se torna ainda maior pelo significado da carcinogênese em humanos e animais por meio da ingestão direta de aflatoxinas em grãos e cereais, assim como pela transferência de metabólitos pelo consumo de leite e derivados (SCUSSEL, 1998; WANG *et al.*, 2013). A contaminação por aflatoxinas também traz significativas implicações econômicas para a indústria agrícola mundial pela restrição do comércio de grãos contaminados (YU & EHRLICH, 2011).

Assim, desde a descoberta das aflatoxinas, esforços extensivos têm sido feitos e gastos incorridos por todo mundo para monitorar a ocorrência dessas toxinas e desenvolver estratégias de controle (YU & EHRLICH, 2011). Contudo, os processos tecnológicos atuais de produção de alimentos falham em eliminar completamente as aflatoxinas, que se tornam parte da alimentação de humanos e animais (PARK, 2002; THEUMER & RUBINSTEIN, 2011). Considerando essa demanda por novas estratégias de controle da aflatoxicose tem sido proposto o emprego de imunógenos capazes de induzir a produção de anticorpos contra as aflatoxinas. Com este objetivo, a vacinação contra aflatoxicose foi âmbito de estudo em aves comerciais (WILKINSON *et al.*, 2003) e vacas leiteiras (POLONELLI *et al.*, 2011; GIOVATI *et al.*, 2014), utilizando conjugados de aflatoxina como imunógeno vacinal. Entretanto, devido à baixa imunogenicidade da toxina e ao risco de reversão de toxicidade, a aflatoxina pode não representar um modelo ideal de imunógeno para vacinação.

Buscando a substituição de conjugados de toxinas como imunógenos, esse trabalho visou à obtenção de antígenos miméticos de aflatoxina, por meio da técnica de *phage display* (GÁLAN *et al.*, 2016). Esta estratégia reflete o refinamento da tecnologia, em que peptídeos expressos por fagos, ligantes de anticorpo específico, são gerados para o propósito de imunização, com o objetivo de induzir anticorpo anti-peptídeo que também pode reconhecer o antígeno nativo (HENRY *et al.*, 2015). Dessa forma, bacteriófagos que expressam peptídeos miméticos de AFB1 podem ser empregados como imunógenos e serem capazes de induzir a produção de anticorpos específicos contra a toxina. Este modelo vacinal representa o prospecto para a obtenção de versões sintéticas de vacinas capazes de induzir resposta imune contra as aflatoxinas, antígenos que normalmente não são reconhecidos em infecções naturais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AFLATOXICOSE: ETIOPATOGENIA E CONTROLE

A aflatoxicose é a doença provocada principalmente pela ingestão de aflatoxinas contidas nos alimentos, podendo causar intoxicação hepática severa com necrose hemorrágica do órgão, proliferação de ductos biliares e edema (WILD, 2015). A enfermidade foi inicialmente chamada de Doença “X” de perus em 1960, quando fungos do gênero *Aspergillus* foram identificados como responsáveis pela elaboração das toxinas (BLOUNT, 1961). Apesar de ser agente etiológico de aspergilose sistêmica e de reações alérgicas, esses fungos toxigênicos receberam especial atenção devido à sua habilidade de produzir aflatoxinas carcinogênicas (RAZZAGHI-ABYANEH *et al.*, 2011).

Atualmente, os principais fungos aflatoxigênicos são *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, associados à contaminação de cereais como milho, amendoim, oleaginosas e semente de algodão. Grãos como soja, trigo, aveia, cevada, milheto e sorgo são moderadamente suscetíveis, entretanto qualquer produto vegetal estocado em condições ideais de umidade e temperatura pode favorecer a invasão fúngica e a produção de aflatoxinas (TAJKARIMI *et al.*, 2011). A síntese de toxinas aumenta em temperaturas acima de 27°C e umidade maior que 62%, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, ainda que grãos contaminados sejam encontrados em todo o mundo devido à importação de grãos e rações (ROYES & YANONG, 2002; DHANASEKARAN *et al.*, 2011).

Conceitualmente, aflatoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundários de fungos filamentosos, com mais de 20 substâncias relatadas, classificadas de acordo com a emissão de fluorescência sob luz ultravioleta: B1 e B2 emitem fluorescência azul, enquanto G1 e G2 emitem fluorescência verde (YU & EHRLICH, 2011). A aflatoxina B1 (AFB1, C₁₇H₁₂O₆, 312 g/mol, FIGURA 1) é considerada a mais frequente em substratos vegetais – 60 a 80% do conteúdo total de aflatoxinas – e a mais tóxica, sendo que B2, G1 e G2 conservam 50, 20 e 10% do poder toxigênico de AFB1, respectivamente (LESSON *et al.*, 1995; JAGER *et al.*, 2011). As aflatoxinas são consideradas haptenos, ou seja, compostos de baixa massa molecular pouco imunogênicos, com um anel bifurano fusionado ao núcleo cumarínico, que confere à toxina a ação hemorrágica semelhante aos compostos cumarínicos (DHANASEKARAN *et al.*, 2011).

Devido à alta estabilidade, as aflatoxinas podem persistir em produtos agrícolas mesmo que o fungo tenha sido removido por processos comuns de fabricação e embalagem (CHU, 1991; JAGER *et al.*, 2011), resistindo a altas temperaturas durante o processamento e peletização de rações (BACK, 2010). O crescimento do fungo e a contaminação por aflatoxinas são consequências das interações entre fungo, hospedeiro e ambiente, determinando a infestação e colonização do substrato, assim como o tipo e quantidade de aflatoxina produzida (DHANASEKARAN *et al.*, 2011).

Com relação ao hospedeiro, a toxicidade das aflatoxinas pode ser observada em várias espécies de animais vertebrados, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas, com diferenças na suscetibilidade e na metabolização da toxina (DIAZ & MURCIA, 2011). Estudos em animais demonstraram que, em condições normais, 50% da dose oral de AFB1 é rapidamente absorvida no duodeno e atinge o fígado pelo sistema portal (WILSON *et al.*, 1985; JAGER *et al.*, 2011). A AFB1 é concentrada primeiramente no fígado e, em menor quantia, nos rins, sendo também encontrada em vasos sanguíneos mesentéricos como AFB1 livre ou metabólitos solúveis em água (WOGAN *et al.*, 1967; JAGER *et al.*, 2011).

Em geral, a biotransformação de xenobióticos envolve a conversão da molécula original em compostos mais hidrofílicos prontamente excretados pelos rins ou fígado. Entretanto, AFB1 pode ser hidroxilada pelo sistema oxidase microssomal hepático em aflatoxina M1 (AFM1, $C_{17}H_{14}O_6$, 328 g/mol, FIGURA 1) que, apesar da biotransformação, ainda conserva características tóxicas e carcinogênicas (DIAZ & MURCIA, 2011). Portanto, AFM1 não pode ser considerada um produto de detoxificação, como AFB2a e AFQ1 (FIGURA 1), ingressando na cadeia alimentar humana por meio do consumo de leite e derivados, ovos ou carnes de animais contaminados por aflatoxinas (YU & EHRLICH, 2011).

A AFB1 pode ainda ser transformada em AFB1-exo-8,9-epóxido, intermediário epóxido reativo que forma adutos irreversíveis com DNA e proteínas (FIGURA 1). A ligação desse metabólito de aflatoxina com resíduos de guanina forma adutos guanil-N7 e induz alterações genéticas envolvidas no mecanismo de indução de hepatocarcinomas, como a mutação na terceira base do códon 249 do gene supressor de tumor p53 (YU & EHRLICH, 2011). Devido ao risco mutagênico, carcinogênico e teratogênico, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classifica a AFB1 como agente carcinogênico humano do grupo I e a AFM1 como potencial carcinógeno humano do grupo 2B (WHO, 1993).

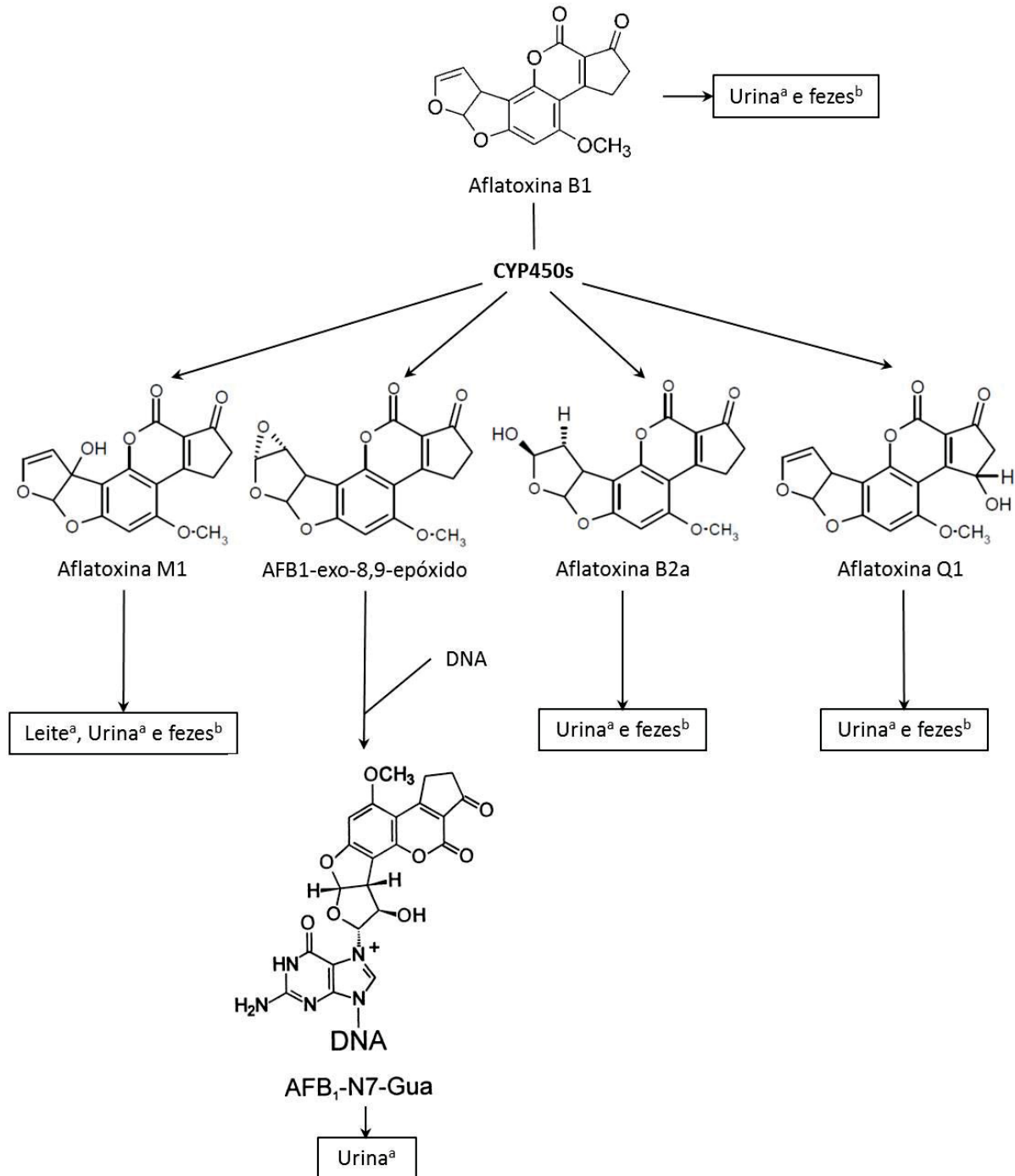


FIGURA 1: Estrutura química e algumas reações de biotransformação e excreção de aflatoxina B1 em humanos e animais. A fase I envolve principalmente reações de oxidação, catalisadas por enzimas citocromo p450s (CYP450s), como CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6. (a) Evidências experimentais e humanas de excreção deste metabólito; (b) Pouca ou ausência de evidências disponíveis. Adaptado de JAGER *et al.*, 2011 e DIAZ & MURCIA, 2011.

Após a aflatoxina ser ingerida, os danos teciduais induzidos por este hapteno invariavelmente resultarão em doença aguda ou crônica. As síndromes toxicológicas agudas causadas pela ingestão de aflatoxinas em quantidades moderadas a altas têm sido bem caracterizadas (OSWALD, 2013). Em espécies altamente suscetíveis ($DL_{50} < 1\text{mg/kg}$), como suínos, cães, gatos, coelhos, patos e perus, a intoxicação aguda manifesta-se como uma doença hepatotóxica severa, com mortalidade, anorexia, icterícia e hemorragias (DIAZ & MURCIA, 2011). Por outro lado, 90% dos casos são de intoxicações crônicas, quando a concentração de aflatoxinas é insuficiente para desencadear um quadro clínico perceptível, mas induz a perdas significativas de produtividade, com redução de ganho de peso, redução do consumo de ração, aumento da conversão alimentar, toxicidade embrionária, redução da produção de leite em vacas leiteiras, assim como imunossupressão com diminuição de títulos vacinais em suínos e aves (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2012). Diante da inespecificidade de sinais clínicos, a aflatoxicose crônica pode ser confundida com manejo ineficiente, problemas nutricionais e sanitários, entretanto a imunossupressão é marcante mesmo em animais que ingeriram aflatoxinas em concentrações abaixo daquelas que causam intoxicação premeditada (HALADI, 2013; OSWALD, 2013).

A importância das aflatoxinas se torna ainda maior pelo significado da carcinogênese em humanos e animais (WANG *et al.*, 2013). Notavelmente, cerca de 4,5 bilhões de pessoas de países em desenvolvimento são cronicamente expostas a altas quantidades de aflatoxinas, sendo que o consumo destas toxinas por longo período de tempo, mesmo em baixas concentrações, aumenta significativamente o risco de carcinoma hepatocelular e tumores extra-hepáticos (WHO, 2005). A importância para a saúde pública se deve tanto pela ingestão direta de aflatoxinas pelo homem como também pela transferência de metabólitos principalmente por meio do consumo de leite e derivados (SCUSSEL, 1998). Mesmo que a concentração de metabólitos de aflatoxina seja menor nos produtos de origem animal que em grãos e rações, a ponto de ser improvável de causar intoxicação aguda em humanos, os resíduos carcinogênicos como AFM1 continuam sendo uma ameaça à saúde humana e devem ser monitorados (MANAFI, 2011).

A contaminação por aflatoxinas também traz significativas implicações econômicas para a indústria agrícola mundial pela restrição do comércio de grãos contaminados (YU & EHRLICH, 2011). O maior impacto econômico da contaminação de aflatoxinas está relacionado aos produtores de milho – 46% de positividade em 68.123 amostras de milho avaliadas pelo Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, com concentração média de aflatoxinas de 21,17 $\mu\text{g/kg}$ (MALLMANN & DILKIN, 2012). De acordo com estimativa da FAO, mais de 25% do suprimento mundial de grãos está contaminado com aflatoxinas ou outras toxinas fúngicas (i.e. micotoxinas), destacando-se a importância da aflatoxina em todo o mundo (BOUTRIF & CANET, 1998).

Devido às propriedades tóxicas e carcinogênicas das aflatoxinas, não existe nível de segurança para a exposição a aflatoxinas, mas vários países, incluindo o Brasil, regulamentam níveis abaixo de 20 ppb de aflatoxinas em produtos alimentícios (BRASIL, 2002). Nos Estados Unidos, diretrizes regulamentares da *Food and Drug Administration* (FDA) especificamente previnem o comércio de matérias-primas contaminadas por aflatoxinas acima de 20 ppb para trânsito interestadual de grãos e alimentos para animais e de 0,5 ppb para aflatoxina no leite (FDA, 2000). A perda anual estimada devido à contaminação por aflatoxinas é atribuída a aproximadamente US\$ 270 milhões somente nos Estados Unidos (RICHARD & PAYNE, 2003; YU & EHRLICH, 2011). No mundo, a FAO estima ainda que muitos alimentos básicos podem estar contaminados com micotoxinas, contribuindo para perdas globais de alimentos em cerca de um bilhão de toneladas a cada ano (TAJKARIMI *et al.*, 2011).

Desde a descoberta das aflatoxinas, esforços extensivos têm sido feitos e gastos incorridos por todo mundo para monitorar a ocorrência destas toxinas e desenvolver estratégias de controle (YU & EHRLICH, 2011). Atualmente os processos tecnológicos de produção de alimentos falham em eliminar completamente aflatoxinas, que se tornam parte da alimentação de humanos e animais (PARK, 2002; THEUMER & RUBINSTEIN, 2011). As estratégias de investigação para prevenir a presença de aflatoxinas em alimentos, assim como para eliminar, inativar ou reduzir a biodisponibilidade destas micotoxinas em produtos contaminados incluem métodos físicos, químicos e biológicos. Limitações como perdas nutricionais e de qualidade sensorial, alto custo de equipamentos necessários para essas técnicas e a impossibilidade de garantir a detecção de baixos níveis de toxina sugerem a hipótese de que grãos e rações devem sempre ser considerados como potencialmente contaminados por aflatoxinas (DALCERO *et al.*, 1997; PIZZOLITTO *et al.*, 2011).

Na produção animal a melhor estratégia para impedir a aflatoxicose está no controle do crescimento fúngico nas matérias-primas das rações (FAO, 2007). A prevenção do crescimento do fungo pode ser feita durante o plantio, colheita e estocagem de grãos e cereais (VANDERBORGHT, 2010). Por outro lado, se a matéria-prima for contaminada, o método de tratamento mais utilizado é o uso de adsorventes, substâncias inorgânicas como carvão ativado e aluminossilicatos que possuem a habilidade de aderir à aflatoxina, impedindo a absorção do composto tóxico pelo trato gastrointestinal (MURUGESAN *et al.*, 2015). Apesar da aparente aplicabilidade dos adsorventes, sua inclusão nas rações é limitada devido à adsorção de nutrientes, eficácia variável entre as toxinas fúngicas, como também pela baixa eficiência quando altos níveis de aflatoxinas ou combinações de micotoxinas são encontrados nas rações (KOLOSSOVA *et al.*, 2009). Os adsorventes não tem uso aprovado em humanos devido à necessidade de estudos sobre a eficácia e segurança na alimentação humana (WILD, 2015).

Uma alternativa ao tratamento das matérias-primas das rações seria o estabelecimento de um controle imunológico, tornando o animal insensível à toxina por interceptação da aflatoxina pelo anticorpo específico. Com este objetivo, a vacinação para proteção contra aflatoxicose foi âmbito de estudo em aves comerciais (WILKINSON *et al.*, 2003) e vacas leiteiras (POLONELLI *et al.*, 2011; GIOVATI *et al.*, 2014), utilizando conjugados de aflatoxina como imunógeno vacinal. Entretanto, devido à baixa imunogenicidade da toxina e ao risco de reversão de toxicidade, a aflatoxina conjugada pode não representar o modelo ideal de imunógeno para vacinação.

A substituição da toxina por um antígeno mimético constitui uma das estratégias propostas pela técnica de *phage display* (GÁLAN *et al.*, 2016). Nesta estratégia, peptídeos expressos por fagos, ligantes de anticorpo específico, são gerados com o propósito de imunização, visando induzir anticorpo anti-peptídeo que também seja capaz de reconhecer o antígeno nativo (HENRY *et al.*, 2015). Desta forma, a partir da sequência peptídica mimética de aflatoxina pode ser produzido um imunógeno vacinal capaz de induzir a produção de anticorpos específicos sem exposição à toxina, evitando efeitos tóxicos indesejáveis.

2.2 PHAGE DISPLAY

Phage display é uma técnica de seleção *in vitro* em que peptídeos com propriedades desejadas são selecionados a partir de uma coleção de variantes chamada biblioteca de fagos (RUSSEL *et al.*, 2004). A técnica foi inicialmente desenvolvida por George Smith em 1985 ao verificar que pequenos fragmentos aleatórios de DNA poderiam ser inseridos no material genético de vírus filamentosos, resultando na expressão de mimotopos, i.e. proteínas recombinantes expressas na superfície viral em configuração imunologicamente acessível (SMITH, 1985).

O bacteriófago, ou simplesmente fago, atua como bioferramenta na técnica de *phage display* e caracteriza-se por ser um vírus do gênero *Inovírus*, como fd, f1 e M13, que possui DNA circular de fita simples com cerca de 6.400 pares de bases. Esses fagos infectam cepas de bactérias Gram negativas com plasmídeo conjugativo F (F+), que permite a inserção do DNA viral, induzindo a bactéria, por meio de ciclos lisogênicos, a produzir e secretar partículas de fago no meio de cultura (SCOTT & SMITH, 1990).

Os fagos filamentosos são flexíveis, longos e delgados, com cerca de 10 nm de diâmetro e comprimento variável – 900 a 2000 nm –, dependendo do tamanho da molécula de DNA a ser empacotada. Isto torna os fagos excelentes vetores de clonagem, pois a inserção de DNA exógeno em regiões não essenciais meramente resulta em partículas mais longas (RUSSEL *et al.*, 2004).

O capsídeo viral é composto por cinco proteínas – p3, p5, p7, p8 e p9 –, dentre as quais p3 e p8 são as mais empregadas para expressão de peptídeos recombinantes (HASSAPIS *et al.*, 2014). A principal proteína do capsídeo é a p8, com cerca de 2.700 cópias por partícula viral, compondo 87% da massa total do virion (HUANG *et al.*, 2012). Assim, apesar de permitir maior repetição de peptídeos por fago, a proteína p8 não permite a expressão de peptídeos maiores do que 6 a 8 resíduos, que poderiam desestabilizar a partícula viral. Por outro lado, a proteína p3, presente em três a cinco cópias na extremidade proximal do fago, suporta a inserção de peptídeos maiores, incluindo fragmentos de anticorpos (RUSSEL *et al.*, 2004). Além disso, a p3 é necessária para o reconhecimento e infecção da célula hospedeira (FUMAGALLI, 2008).

A metodologia envolvendo a inserção de genes que codificam milhões de peptídeos no genoma de bacteriófagos originou as bibliotecas de fagos, permitindo a expressão de um grande número ($\geq 10^{10}$) de peptídeos randômicos na superfície de fagos, levando a seleção de peptídeos com alta afinidade e especificidade por praticamente qualquer alvo (ARAP, 2005). Quanto maior a variedade representada na biblioteca, maior é a probabilidade de se encontrar fagos expondo proteínas que interajam com o alvo (RUSSEL *et al.*, 2004).

No presente estudo foram utilizadas bibliotecas de vetor f88.4, que são fagos filamentosos fd expressando peptídeos recombinantes na terminação amino das proteínas p8 do capsídeo viral, em sistema híbrido “8+8”, devido devido à expressão concomitante de proteína selvagem e recombinante na mesma partícula viral. Neste caso são toleradas inserções de peptídeos maiores, de 8 a 17-mer, conforme ilustrado na FIGURA 2, utilizando a mutagênese oligonucleotídica dirigida, em que o DNA sintético codifica oligonucleotídeos degenerados (BONNYCASTLE *et al.*, 1996).

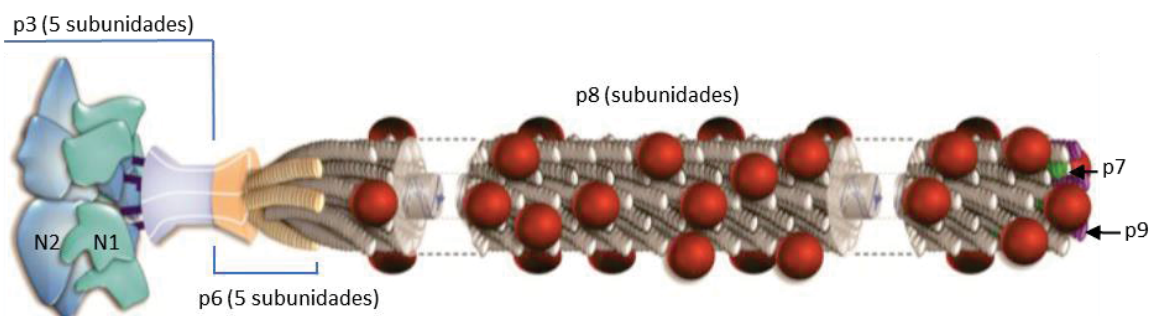


FIGURA 2: Representação esquemática de fago f88.4 com inserção de mimotopos (esferas vermelhas) na proteína p8 do capsídeo. Adaptado de HASSAPIS *et al.*, 2014.

Quando comparada a outras tecnologias de expressão, *phage display* apresenta algumas vantagens, como a seleção de epítomos descontínuos, possibilitando selecionar peptídeos miméticos correspondentes à estrutura conformacional de proteínas (IRVING *et al.*, 2010). Outro benefício é que os vírus filamentosos não lisam as células infectadas, permitindo uma melhor separação das partículas virais e eliminando a reatividade cruzada com proteínas bacterianas (FUMAGALLI, 2008). Os ligantes podem ser testados *in vitro* e *in vivo*, utilizando anticorpos para seleção dos peptídeos, estratégia que pode ser aplicada em imunodiagnóstico ou no desenvolvimento de vacinas contra diversos antígenos, pelo fato de selecionar ligantes de anticorpos específicos (PEIXOTO *et al.*, 2011).

Caso a molécula empregada para a biosseleção frente à biblioteca de fagos seja um anticorpo anti-aflatoxina podem ser adquiridos peptídeos com afinidade pelo sítio de ligação da aflatoxina ao anticorpo, ou seja, os peptídeos mimetizam a afinidade específica da aflatoxina com a região variável do anticorpo. Desta forma, esses peptídeos podem ser utilizados em imunizações e induzir a produção de anticorpos anti-aflatoxina, semelhantes ao anticorpo utilizado como alvo na técnica de *phage display*, mas sendo produzido sem o contato com a própria toxina.

Estudos anteriores com peptídeos miméticos de aflatoxina tiveram como objetivo a substituição da toxina em imunodiagnósticos. Thirumala-Devi *et al.* (2001), Li *et al.* (2012) e Wang *et al.* (2013) obtiveram peptídeos miméticos de aflatoxina, mas não buscaram demonstrar o desempenho destes peptídeos em imunizações. Apesar da importância destes estudos anteriores, buscando a retirada da toxina como reagente de imunoenaios, a técnica de *phage display* pode permitir que peptídeos miméticos selecionados possam induzir a produção de anticorpos anti-peptídeo que reconhecem a aflatoxina. Esta estratégia representa a comprovação do mimetismo molecular entre o peptídeo e a toxina, permitindo a aplicação do peptídeo mimético de aflatoxina para o desenvolvimento de vacinas.

2.3 VACINAS DE ANTÍGENOS MIMÉTICOS

Desde a década de 90, a técnica de *phage display* tem demonstrado grande potencial na descoberta de novas terapias (ARAP, 2005), sendo que alguns peptídeos e anticorpos monoclonais obtidos por *phage display* se encontram em fases de estudos pré-clínicos ou clínicos (HUANG *et al.*, 2012). Isto porque peptídeos selecionados por *phage display* podem servir como instrumento alternativo de imunização, gerando versões sintéticas de vacinas capazes de induzir resposta imune contra haptens (WHO, 1999).

Desta forma, a partir da tecnologia do *phage display*, diferentes abordagens de vacinação podem ser estabelecidas. Em uma primeira estratégia, os bacteriófagos podem ser utilizados como vetores de peptídeos imunogênicos de interesse. Pelo rastreamento de bibliotecas de fagos, cujo alvo é um anticorpo monoclonal, podem ser selecionados fagos que expressam peptídeos miméticos ligantes do anticorpo. A vacinação de animais com estes fagos pode induzir a produção de anticorpos semelhantes pelo indivíduo vacinado, oferecendo proteção contra a intoxicação (HASSAPIS *et al.*, 2014). Em outra estratégia, os próprios peptídeos podem ser utilizados como imunógenos, na forma solúvel ou conjugados com proteínas carreadoras. Neste contexto, a partir do bacteriófago, o DNA viral pode ter a sequência nucleotídica conhecida e a sequência proteica identificada. Assim, o peptídeo pode ser sintetizado quimicamente e empregado como instrumento em imunizações (HAMBY *et al.*, 2005).

Bacteriófagos são vetores eficazes para vacinas, tendo sido utilizados com êxito em numerosos estudos para o desenvolvimento de vacinas contra uma ampla variedade de vírus (ULIVIERI *et al.*, 2008; BUCZKOWSKI *et al.*, 2012; GAZARIAN *et al.*, 2013), protozoários (GREENWOOD *et al.*, 1991; STOUTE *et al.*, 1995), fungos (YANG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006a), parasitas (WANG *et al.*, 2006b; VILLA-MANCERA *et al.*, 2008), toxinas (DE MOURA, 2011) assim como vacinas para doença de Alzheimer (FRENKEL *et al.*, 2004; SOLOMON *et al.*, 2007) e câncer (WU *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2005).

Peptídeos fundidos a partículas virais são mais estáveis e mantêm a estrutura tridimensional do epítipo desejável, enquanto peptídeos solúveis apresentam estrutura tridimensional flexível. Como resultado, peptídeos expressos por bacteriófagos podem ser bons modelos indutores da produção de anticorpos desejados. Além disso, os vetores virais exibindo peptídeos são altamente imunogênicos, apresentam múltiplas cópias de peptídeos por capsídeo e a estrutura simplificada permite que o sistema imunológico possa concentrar uma resposta efetiva. Ainda como prerrogativa da biologia do fago, uma vez que podem se replicar em culturas de *Escherichia coli*, o custo de produção de vacinas é baixo. Em resumo, os inovírus constituem uma plataforma eficaz para o desenvolvimento de vacinas de subunidades (HENRY *et al.*, 2011; HASSAPIS *et al.*, 2014).

Como desvantagens, imunização com fagotopos, i.e. fagos como vetores de mimotopos de interesse, inevitavelmente induzem uma forte resposta aos antígenos proteicos do capsídeo viral, sendo difícil acessar se parte dessa resposta está sendo direcionada ao mimotopo exposto (HENRY *et al.*, 2015). A indução de anticorpos específicos para o mimotopo é complexa e varia consideravelmente de acordo com a imunogenicidade do mimotopo. Além disto, soros de animais imunizados com fagos apresentam reatividade a proteínas recombinantes purificadas do extrato de bactérias (GALFRÉ *et al.*, 1996).

Outra estratégia implica no emprego de peptídeos sintéticos, obtidos de sequências aminoacídicas expressas em bacteriófagos, empregados eficientemente contra vírus (WILKINSON *et al.*, 2007; ZHONG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015), protozoários (SILVA JR *et al.*, 2002; TOLEDO-MACHADO *et al.*, 2015), parasitos (WEI *et al.*, 2011), toxinas (THOMAS *et al.*, 2003) e câncer (HARDY *et al.*, 2005; HARTMANN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2013). Com os peptídeos sintéticos, as estratégias vacinais são ampliadas, permitindo uma resposta imune dominante para o peptídeo com diminuição da reatividade cruzada aos carreadores ou adjuvantes. Estas estratégias incluem: peptídeos não conjugados (HARDY *et al.*, 2005; ZHONG *et al.*, 2011), conjugação com estruturas poliméricas não-imunogênicas como poliacrilamida (MOUREZ *et al.*, 2001) ou nanotubos de carbono (SILVESTRE *et al.*, 2014) e síntese de peptídeos com grupos funcionais lipofílicos ou glicosídicos (GENTILUCCI *et al.*, 2006). Esta complexidade adicional aumenta a entrega para células apresentadoras de antígenos, aumenta o tempo de biodisponibilidade fisiológica do peptídeo e melhora a incorporação em veículos e adjuvantes vacinais (WHO, 1999).

O uso de peptídeos sintéticos contendo sequência do mimotopo pode ser uma alternativa útil, principalmente pela identificação da alta pureza do imunógeno, estabilidade e conservação superiores quando comparado aos vetores virais (WHO, 1999; HAMZEH-MIVEHROUD *et al.*, 2013). Apesar destas vantagens, devido à baixa massa molecular e baixa imunogenicidade, vacinas baseadas em epítopos usualmente requerem o uso de carreadores e adjuvantes para aumentar a eficácia das respostas imunes (HENRY *et al.*, 2015). Esses adjuvantes, como proteínas, lipossomas ou polissacarídeos, são ubíquos em permitir que fagos ou peptídeos possam transpassar barreiras biológicas, aumentar o tempo de residência na corrente sanguínea e melhorar o reconhecimento específico (SUN & XIA, 2016). Para este propósito, a quitosana é um polímero natural, não tóxico, não alérgico, biocompatível e biodegradável que tem sido usado na forma de nanopartículas para entrega de antígenos através de diferentes superfícies mucosas (YOO *et al.*, 2010).

2.4 QUITOSANA COMO ADJUVANTE PARA VACINAÇÃO

O biopolímero quitosana é um polissacarídeo linear composto de D-glucosamina com algumas unidades de N-acetil-D-glucosamina, extensivamente utilizado como excipiente farmacêutico e veículo de entrega intranasal de drogas (SILVA *et al.*, 2006). Esse carboidrato natural é resultante da deacetilação da quitina, que está presente no exoesqueleto de crustáceos e outros animais marinhos (FIGURA 3) (SARI, 2010). Desta forma, as propriedades químicas da quitosana são determinadas por seu grau de deacetilação, assim como pela massa molecular e pela viscosidade (VAN DER LUBBEN, 2001).

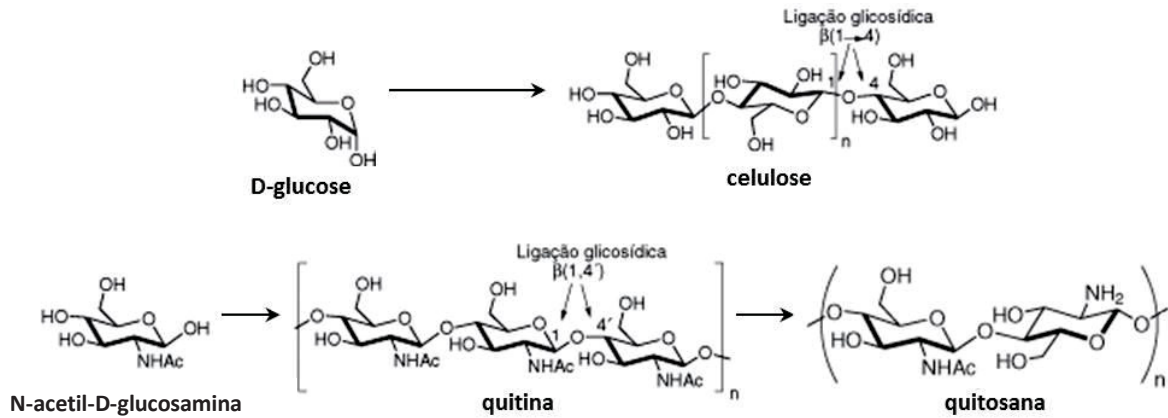


FIGURA 3: Representação esquemática da estrutura química de diferentes biopolímeros. A quitosana é obtida da deacetilação da quitina, composta de N-acetil-D-glucosamina e semelhante à celulose, composta de D-glucose, onde n representa o grau de polimerização.

A natureza catiônica da quitosana confere ao polímero a capacidade de bioadesão e o aumento da permeabilidade de membrana, permitindo a passagem de macromoléculas através da superfície mucosa e aumentando a absorção da substância administrada (AMIDI *et al.*, 2010; SOARES, 2016). A interação de grupamentos aminos carregados positivamente na posição C-2 da quitosana com sítios carregados negativamente na superfície celular e nas junções de oclusão permitem o transporte paracelular de grandes compostos hidrofílicos. O mecanismo envolvido na abertura de junções de oclusão tem sido demonstrado pela diminuição de proteínas ZO-1 e por mudanças na estrutura filamentosa da proteína de citoesqueleto F-actina (VAN DER LUBBEN, 2001).

De fato, muitos estudos destacam a habilidade do polímero de aderir fortemente ao epitélio e facilitar a abertura transitória e reversível de junções intracelulares, melhorando o transporte de antígenos através das vias aéreas nasais (JIANG *et al.*, 2004). A mucosa nasal é o primeiro local de contato com o antígeno inalado e também a primeira linha de defesa imunológica do trato aero-digestório (BRODSKY, 2011). Subjacentes ao epitélio nasal há vasos sanguíneos, nodos linfáticos cervicais e células linfoides, aos quais o antígeno tem acesso direto se adequadamente transportado através do epitélio (VILA *et al.*, 2004).

Desta forma, em humanos, o sítio alvo de formulações vacinais administradas via intranasal é o tecido linfoide associado à mucosa nasal (NALT), situado principalmente na faringe como um anel de tecido linfoide: anel de Waldeyer. Em roedores, como ratos e camundongos, um NALT bem definido pode ser identificado como agregados bilaterais não-encapsulados de tecido linfoide subjacente ao epitélio no aspecto ventral da cavidade nasal posterior (ILIUM *et al.*, 2001).

Vacinas contra doenças como influenza, pertússis e difteria administradas por via nasal obtiveram similares títulos de IgG e superiores títulos de IgA quando comparadas a vacinas administradas por via parenteral (ILLUM *et al.*, 2001). Assim, comparada às vacinas parenterais, a vacinação intranasal apresenta vantagens óbvias como processo não invasivo, sem uso de agulhas, eliminando infecções e efeitos colaterais relacionados à injeção, além de defesa humoral largamente provida por anticorpos nos sítios de mucosa, uma vez que a presença de anticorpos na circulação sistêmica por administração parenteral não necessariamente previne infecções em diferentes sítios de mucosa (SHARMA *et al.*, 2009).

Por outro lado, apesar das características atrativas, muitas vacinas não são bem absorvidas pela cavidade nasal quando administradas como soluções simples. A dificuldade de transpassar barreiras mucosas e a remoção de antígenos solúveis pelo mecanismo de depuração mucociliar são os principais fatores que limitam a absorção de vacinas administradas via nasal (AMIDI, 2007). Para este propósito, a estrutura policatiónica da quitosana tem sido explorada para o desenvolvimento de sistemas particulados de liberação de medicamentos e antígenos. Macromoléculas com cargas negativas, como peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos podem ser eficientemente encapsuladas às nanopartículas de quitosana, estabelecendo uma forte interação eletrostática com essas moléculas (SOARES, 2016).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos e/ou biomoléculas apresentam algumas vantagens atribuídas ao desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, entre elas, o tamanho reduzido e conseqüente maior área de superfície, que resulta em aumento da taxa de dissolução e biodisponibilidade. Outras vantagens incluem a diminuição da dose administrada, redução de toxicidade, proteção das macromoléculas da degradação em meios biológicos, aumento da permeabilidade da substância encapsulada e possibilidade de alterar a carga e a constituição da quitosana por meio de modificações químicas no grupamento amino, gerando derivados de quitosana com diferentes funcionalidades, como N-trimetil-quitosana, N-succinil-quitosana ou N-carboximetil-quitosana (SOARES, 2016).

Em vacinologia, estudos realizados com nano e micropartículas de quitosana apresentaram significativa resposta imune baseada no efeito sinérgico do polímero na interface biológica (HAGENAARS *et al.*, 2009). Nanopartículas de quitosana demonstraram eficiência de encapsulação satisfatória para o antígeno do vírus da Hepatite B e posteriormente foram utilizadas para imunização intranasal e subcutânea (KIM & KANG, 2008; BORGES *et al.*, 2008). Também foram estudadas para o desenvolvimento de vacinas contra os vírus da gripe suína (ZHAO *et al.*, 2011; SOARES, 2016) e da doença de NewCastle (RAUW *et al.*, 2010).

Assim, a aplicação de nanopartículas de bacteriófagos obtidos por *phage display* pode representar um modelo de imunização viável para administração intranasal. As partículas que apresentam um tempo reduzido de voo quando comparadas com nanoestruturas – como o fago sozinho – demonstram um grande potencial em carregar os fagos através das vias aéreas. Como objetos nanométricos são caracterizados por baixa inércia e, conseqüentemente, por rápida exalação pulmonar, o encapsulamento em nanopartículas de quitosana pode ser útil em promover altos conteúdos de fagos na corrente sanguínea, pela habilidade do polímero em ancorar ao epitélio e dissociar lentamente, liberando os fagos ao NALT (TSAPIS *et al.*, 2002).

Por fim, tecnologias que permitam a vacinação via mucosa são particularmente atrativas na medicina veterinária, viabilizando a aplicação em massa, via água de beber, nebulização e aerossol. Estas vias são priorizadas em relação à vacinação individual, pois eliminam o manejo individual e estressante dos animais, assim como facilitam o processo, permitindo a aplicação de grandes volumes vacinais em menos tempo e com um número reduzido de funcionários (BORNE & COMTE, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Selecionar, a partir de bibliotecas randômicas de peptídeos apresentados em fagos, epítomos que mimetizam a aflatoxina B1 e empregá-los como imunógenos para o desenvolvimento de um modelo vacinal capaz de induzir a produção de anticorpos específicos.

3.2 ESPECÍFICOS

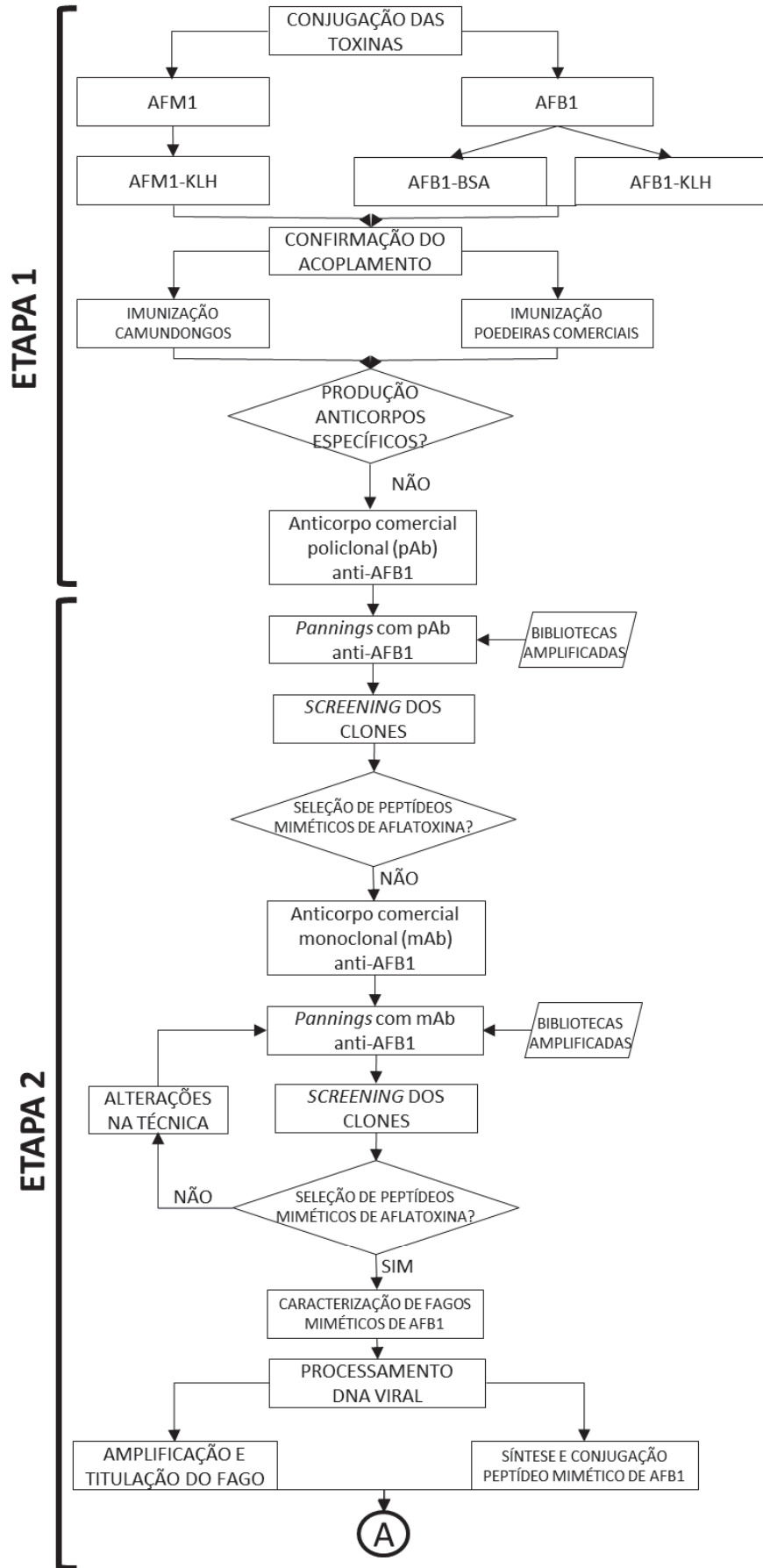
- 1) Produzir e caracterizar anticorpos anti-AFB1 para serem empregados na técnica de *phage display* (etapa 1);
- 2) Selecionar, por meio da técnica de *phage display*, mimotopos expressos em fagos que são reconhecidos por anticorpos anti-AFB1 (etapa 2);
- 3) Identificar as sequências peptídicas selecionadas pela técnica de *phage display* que são específicas (etapa 2);
- 4) Induzir a produção de anticorpos específicos em camundongos, tendo como imunógenos os bacteriófagos que expressam peptídeos miméticos de aflatoxina (etapa 3);
- 5) Sequenciar regiões codificantes dos mimotopos e sintetizar quimicamente tais peptídeos específicos (etapa 2);
- 6) Avaliar as sequências peptídicas sintéticas quanto à capacidade de induzir anticorpos específicos, por meio de diferentes esquemas de imunização em camundongos (etapa 3);
- 7) Desenvolver um modelo vacinal a partir do melhor imunógeno (bacteriófago ou peptídeo sintético) associado com adjuvante de mucosa (etapa 4);
- 8) Induzir a produção de anticorpos específicos em camundongos, a partir de nanopartículas de quitosana encapsulando bacteriófagos (etapa 4).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em quatro etapas de execução, envolvendo a prospecção e caracterização de antígenos miméticos de aflatoxina obtidos por *phage display* (etapas 1 e 2), com validação do potencial imunogênico (etapas 3 e 4) (FIGURA 4). Desta forma, na etapa 1 buscou-se a produção e caracterização de anticorpos anti-aflatoxina para serem utilizados como moléculas alvo na técnica de *phage display*. Inicialmente as aflatoxinas foram conjugadas a moléculas carreadoras para a imunização de camundongos após a confirmação do protocolo de acoplamento.

A etapa 2 consistiu na execução da técnica de phage display, utilizando diferentes estratégias para a seleção dos antígenos miméticos de aflatoxina, sejam eles bacteriófagos selecionados por ELISA ou peptídeo conjugado à proteína carreadora. Esses imunógenos foram testados na etapa 3, visando a produção e caracterização de anticorpos específicos, induzidos por antígenos miméticos de aflatoxina. Finalmente na etapa 4, buscando aperfeiçoar o bacteriófago como imunógeno para inoculação via mucosa, foi realizado o encapsulamento em nanopartículas de quitosana, após a purificação e caracterização do biopolímero.

O projeto de pesquisa e todos os procedimentos realizados com animais (processo nº 887) foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas (CEUA-BIO) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foi certificado que os procedimentos utilizando animais estavam de acordo com a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para experimentação animal.



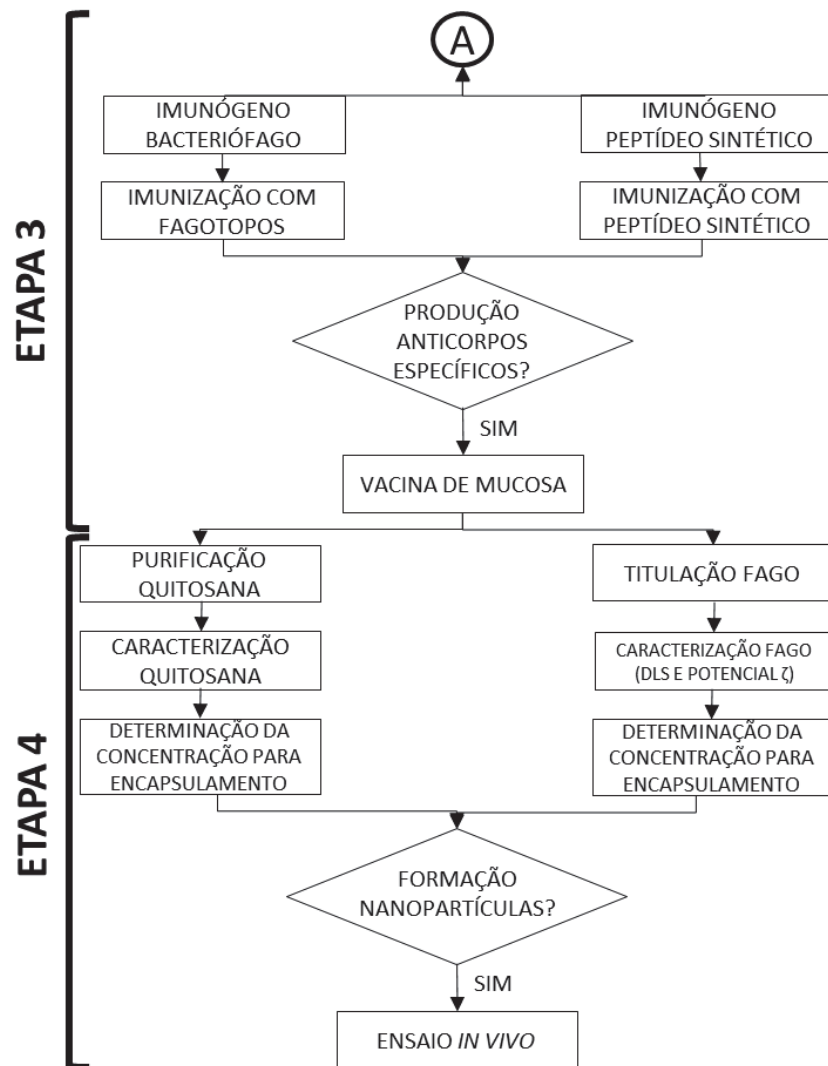


FIGURA 4: Fluxograma do experimento. FONTE: a autora.

4.1 ETAPA 1: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-AFLATOXINA

4.1.1 Conjugação das toxinas

Inicialmente foram produzidos e caracterizados os imunógenos constituídos de toxinas (AFB1 ou AFM1) conjugadas a proteínas carreadoras, visando tornar a toxina imunogênica. O metabólito tóxico AFM1 (A6428, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) foi concentrado em *Speed vac*® (ThermoScientific, Estados Unidos) por 2 horas e AFB1 (Fermentek, Israel) foi solubilizada em água ultrapura. A conjugação das aflatoxinas às proteínas carreadoras, albumina sérica bovina (BSA) (A4378, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e hemocianina de molusco (KLH) (H7017, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) foi realizada na proporção 1:1 v/v. Para conjugação de aflatoxina B1, utilizou-se 0,5 mg de BSA ou KLH e 0,5 mg AFB1. Para conjugação de AFM1, 20 µg da toxina foram conjugadas a mesma quantidade de KLH (FIGURA 5).

Foi utilizado um protocolo de acoplamento em duas etapas, utilizando como espaçadores moleculares o EDC (1-etil1-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida hidrocloreto) (22980, Thermo Scientific, Estados Unidos) e o NHS (N-hidroxisulfo-succinamida) (A8060, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante (Thermo Scientific, 2011). O tampão de conjugação MES (2-[N-morphilo] etano ácido sulfônico) foi utilizado para conjugação, segundo recomendações do fabricante (28390, Thermo Scientific, Estados Unidos). O EDC conjuga o NHS a grupamento carboxil, formando éster-NHS, intermediário estável que permite conjugação eficiente a aminas primárias em pH fisiológico.

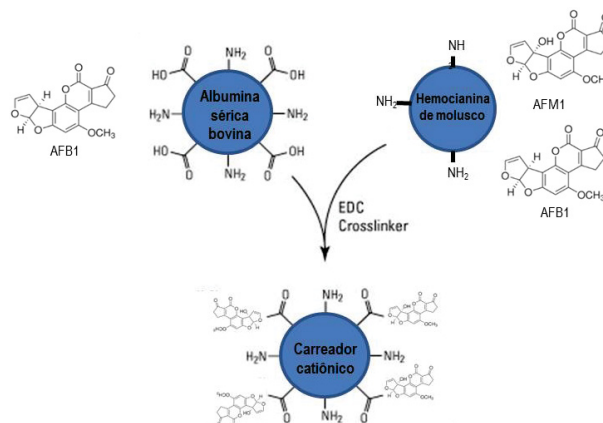


FIGURA 5: Esquema de conjugação de aflatoxinas com proteínas carreadoras. AFB1 foi carregado com BSA e KLH, enquanto AFM1 foi carregada com KLH, por meio de ligação covalente entre os grupamentos éster-NHS com aminas primárias. FONTE: a autora.

4.1.2 Ensaio para confirmação do acoplamento de toxinas às proteínas carreadoras

A confirmação do acoplamento foi realizada por ensaio de *dot blot*, adsorvendo à membrana de nitrocelulose 2,5 $\mu\text{L}/\text{spot}$ de AFB1-BSA, AFB1-KLH ou somente proteínas carreadoras, todas a 1 mg/mL. A presença das proteínas carreadoras foi constatada por meio de coloração de Ponceau (0,1% Ponceau S; 5% ácido acético), sendo a descoloração realizada por tripla lavagem com água destilada.

Após etapa de saturação por 12 horas com tampão fosfato salino com surfactante polissorbato 0,2% (PBS 50 mM, pH 7,4; 0,2% Tween 20), as membranas foram lavadas (PBS-T 0,05%) por três vezes e incubadas por uma hora a temperatura ambiente com anticorpos policlonais anti-AFB1 (A8679, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), na diluição 1:8.000, anticorpos anti-KLH ou anti-BSA. Os anticorpos policlonais murinos anti-KLH e anti-BSA foram obtidos do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas (Departamento de Patologia Básica, UFPR) e utilizados na diluição 1:500.

Após lavagem, as membranas tratadas com anti-AFB1 foram incubadas com anticorpos, produzidos em cabra, anti-imunoglobulina G (IgG) de coelho conjugados à peroxidase (1:5.000, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). As membranas tratadas com anti-BSA e anti-KLH foram incubadas com anticorpos, produzidos em cabra, anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase (1:4.000, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), por uma hora a temperatura ambiente. Para visualização da interação antígeno-anticorpo, após as devidas lavagens, foi realizada a revelação por solução de diaminobenzidina (DAB) e cloronaftol, adicionado o substrato (peróxido de hidrogênio 30%), durante 15 minutos sob agitação e a reação foi interrompida com adição de água destilada.

As toxinas carreadas foram ainda submetidas à análise de espectrometria de massas no equipamento MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*), Bruker Corporation (Billerica, MA, Estados Unidos), no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. A amostra de conjugado AFB1-BSA, obtida em 4.1.1, foi comparada ao padrão de BSA (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). A matriz α -4-hidroxicinâmico (HCCA) foi aplicada em placa polimérica (Bruker Scout 384TM MALDI, Bruker Corporation, Estados Unidos) e homogeneizada com 2 μL da amostra de BSA e AFB1-BSA, sendo permitida a secagem em temperatura ambiente para posterior análise.

4.1.3 Produção de anticorpos anti-AFB1 em camundongos e anti-AFM1 em poedeiras comerciais

Com os resultados de acoplamento parcialmente confirmados por *dot blot* e espectrometria de massa, as toxinas foram utilizadas em imunizações de camundongos com AFM1-KLH e de aves com AFB1-BSA. Para a produção de anticorpos policlonais, visando posteriormente obtenção de anticorpos monoclonais (mAb), três camundongos fêmeas linhagem BALB/c com 28 dias de idade foram imunizados com AFM1-KLH. Os animais foram mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com alimentação e água *ad libitum*, sendo a maravalha trocada a cada 2 ou 3 dias durante todo o período de experimentação e imunização. Os animais foram avaliados a cada 2 ou 3 dias quanto à presença de sinais clínicos e mortalidade.

Para imunização, os camundongos receberam uma injeção inicial subcutânea de imunógeno na concentração de 0,5 mg/mL, diluído em adjuvante de Freund completo (AFC) (F5881, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), totalizando 100 µL de volume final. O esquema de imunização foi seguido de injeções subcutâneas em intervalos de três, duas e uma semanas com imunógeno diluído em adjuvante de Freund incompleto (AFI) (F5506, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), conforme descrito por Alvarenga (2005). A coleta de sangue foi realizada via plexo infraorbital após terceira e quarta inoculações, com o auxílio de anestésico tópico (cloridrato de lidocaína 4%). As amostras obtidas foram mantidas a -20°C até a avaliação da produção de anticorpos específicos por meio de ensaio imunoenzimático.

Em aves, duas poedeiras comerciais (linhagem *Isa brown*) receberam o imunógeno AFB1 carreado à BSA, via intramuscular, para obtenção de anticorpos policlonais (pAb), isotipo IgY (imunoglobulina Y), obtidos a partir da gema do ovo. Os animais foram mantidos no aviário experimental do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com alimentação e água *ad libitum*, sendo mantidos em gaiolas individuais providas de bandejas para recolhimento das excretas. Os ovos foram coletados para a obtenção de IgY, por meio da precipitação da gema do ovo pelo processo de *salting-out*, com solução saturada de sulfato de amônio, sendo posteriormente dialisados e purificados (BIRD *et al.*, 2002). Resumidamente, a gema foi separada da clara e diluída nove vezes em água destilada. O pH foi ajustado para 4,0 e o material foi centrifugado a 1.680 g por 40 minutos, sendo o sobrenadante coletado e filtrado (5 µm). A purificação do filtrado consistiu na buretagem de 50 mL de solução saturada de sulfato de amônio, permitindo assim a precipitação de IgY. O material permaneceu a 4°C por 12 horas, sob leve agitação, sendo posteriormente centrifugado a 4°C e 1.680 g por 40 minutos. Ao precipitado foi adicionado 5 mL de tampão fosfato salino (50 mM, pH 7,4) e dialisado por 12 horas em mesmo tampão. O rendimento foi estimado na unidade de miligrama de anticorpos totais produzidos por mililitro de gema utilizada.

As poedeiras comerciais receberam quatro doses de imunógeno AFB1-BSA seguindo o mesmo esquema de imunização descrito anteriormente para camundongos, exceto pela concentração (1 mg/mL), pelo volume final da solução imunógeno-adjuvante (500 µL) e pela via de inoculação empregada (intramuscular). A coleta de amostras de sangue foi realizada via veia ulnar antes das imunizações, para obtenção de soro pré-imune, assim como após terceira e quarta inoculações, com o auxílio de seringas heparinizadas e tubos com anticoagulante (EDTA). As amostras de sangue total foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, do Hospital Veterinário, Setor de Ciências Agrárias, UFPR, sob a orientação da Professora Rosangela Locatelli Dittrich, para avaliação hematológica. As amostras de soro obtidas foram mantidas a -20°C até a avaliação da produção de anticorpos específicos por meio de ensaio imunoenzimático. Finalizado o esquema de imunização e a coleta de sangue, as aves imunizadas com AFB1-BSA foram submetidas à eutanásia com sobredose de anestésico, ou seja, três vezes a dose anestésica de quetamina e xilazina, 150 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente. Na necropsia foram coletados fragmentos de órgãos – fígado e baço – e encaminhados para o Laboratório de Patologia Veterinária, do Hospital Veterinário, Setor de Ciências Agrárias, UFPR, sob a orientação do Professor Renato de Souza, para avaliação histopatológica.

4.1.4 ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos

Para caracterização dos anticorpos produzidos pelos camundongos imunizados com AFM1-KLH foi padronizado o ensaio indireto nas seguintes condições: à placa foi adicionado 20 µg/mL de solução de BSA (A7030, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) ou AFM1-BSA (A6412, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), diluída em tampão carbonato (NaHCO₃, pH 9,6), totalizando 100 µL por poço e mantida a 4°C por 12 horas. O controle positivo da imunização foi obtido com KLH adsorvido à placa, testado com os soros dos camundongos. Os controles BSA e BSA-AFM1 adsorvidos individualmente à placa foram realizados com soro anti-BSA, produzido pelo Laboratório de Imunoquímica de proteínas, na diluição 1:800 v/v em tampão de incubação. Após etapa de lavagem (quatro repetições com PBS-T 0,05%), a saturação da placa foi realizada com solução caseína 2% em tampão fosfato salino, totalizando 120 µL/poço e incubação a 37°C por uma hora. Após quatro lavagens com PBS-T 0,05%, foram incubados 100 µL dos soros de camundongos imunizados, diluídos 1:800 em tampão de incubação (PBS com 0,25% de caseína e 0,05% Tween 20) por uma hora a 37°C, seguida por nova etapa de lavagem para retirada dos anticorpos inespecíficos.

Para verificação da interação AFM1-anticorpo foi adicionado o anticorpo secundário de imunoglobulinas heterólogas produzidas em cabra anti-IgG murina conjugado à enzima peroxidase (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), na diluição 1:4.000 em tampão de incubação e a placa foi incubada por mais 1 hora em estufa a 37°C. Após etapa de lavagem constituída de seis repetições com PBS-T 0,05%, foi adicionado solução de revelação – 2 mg de cromógeno orto-fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato (Na₂HPO₄ 0,05M, Ácido cítrico 0,027M, pH 5,0) – e 2 µL do substrato, peróxido de hidrogênio 30%, 100 µL por poço. A placa foi incubada em câmara escura a temperatura ambiente por 15 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1M).

A reatividade foi determinada em função da intensidade da coloração, cuja absorbância foi lida em comprimento de onda de 490 nm com o auxílio de espectrofotômetro de placa *Bio-Rad* 550 (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos). O controle positivo da imunização foi obtido com KLH adsorvido à placa, testado com os soros dos camundongos e revelado conforme descrito acima. O controle de BSA adsorvido à placa foi realizado com soro anti-BSA na diluição 1:800 em tampão de incubação.

Para a caracterização de anticorpos policlonais nas aves de postura, o mesmo procedimento foi realizado, exceto por KLH ou AFB1-KLH adsorvido à placa, soro de aves na diluição 1:400 e utilizando anticorpo secundário, produzido em coelho, anti-IgY de galinha conjugado à peroxidase.

4.1.5 Caracterização da resposta imune por citometria de fluxo

Para caracterização da resposta imune de aves imunizadas com AFB1-BSA foi realizada a citometria de fluxo, de acordo com protocolo já estabelecido (FAIR *et al.*, 2008). As amostras de sangue total foram coletadas ao final do esquema de imunização, com auxílio de seringas heparinizadas e transferidas para tubos com anticoagulante (EDTA). Células mononucleares foram separadas do sangue total por gradiente de densidade utilizando Ficoll 400, ajustado para densidade de 1,077 g/mL (Histopaque®-1077 - Sigma-Aldrich, Estados Unidos). O sangue foi diluído 1:1 v/v em tampão fosfato salino (50 mM, pH 7,4) para um volume final de 2 mL. Essa diluição foi colocada gentilmente sobre 1 mL de Histopaque-1077 em tubo de 15 mL. As amostras foram centrifugadas a 420 g, por 30 minutos, sendo o sedimento de leucócitos (*buffy coat*) acima dos eritrócitos coletado e transferido para outro tubo de 15 mL. As células foram lavadas duas vezes com 4 mL de PBS e centrifugadas a 420 g por sete minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 mL de tampão fosfato salino. As células foram contadas utilizando câmara de contagem de Neubauer.

Os anticorpos primários comerciais foram diluídos na proporção 1:10 v/v em tampão fosfato salino na concentração de 0,5 mg/mL de cada anticorpo adicionados em 10^6 células, incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Esses anticorpos produzidos em camundongos (*Southern Biotechnology Associates*, Estados Unidos) identificaram as seguintes moléculas em superfície de leucócitos: CD4 (conjugado com isotiocianato de fluoresceína - FITC); CD8 α (conjugado com ficoeritrina - PE); MHC classe II (FITC); TCR $\alpha\beta$ /V β 1 (PE); CD28 (FITC); Kul-01 (PE) e Bu-1a (PE). Para determinar diferentes subpopulações leucocitárias e suas funções foi utilizada a duplas marcações: CD4/TCR $\nu\beta$ 1, CD8 α /CD28, Kul-01/MHC II, assim como a marcação única Bu-1 (QUADRO 1).

TIPO CELULAR	MARCAÇÃO	TCR $\nu\beta$ 1	TCR $\nu\beta$ 1 ⁻
Linfócitos T	CD4 ⁺	Linfócitos T CD4 de mucosa	Linfócitos T CD4 gerais
	CD4 ⁻	Linfócitos T CD8 de mucosa	-
	MARCAÇÃO	CD28 ⁺	CD28 ⁻
	CD8 ⁺	Linfócitos T CD8 não ativados	Linfócitos T CD8 ativados
	CD8 ⁻	Linfócitos T CD4 não ativados	-
TIPO CELULAR	MARCAÇÃO	Bu-1 ⁺	
Linfócitos B	Bu-1 ⁺	Linfócitos B	
TIPO CELULAR	MARCAÇÃO	MHCII ⁺	MHCII ⁻
Monócitos e APC	Kul-01 ⁺	Monócitos fagocíticos	Monócitos supressores
	Kul-01 ⁻	APC não monócitos	-

QUADRO 1: MARCADORES MOLECULARES E POPULAÇÕES CELULARES. Os anticorpos monoclonais utilizados neste trabalho com especificidade para os diferentes antígenos de superfície permitem o reconhecimento dos diferentes subtipos celulares apresentados.

Após marcação, foi realizada a fixação com 1 mL de paraformaldeído 1% em PBS por 30 minutos. As células foram centrifugadas por sete minutos a 420 g, o sobrenadante descartado e ao precipitado foi adicionado PBS para análise em citômetro de fluxo FACSalibur® (Becton Dickinson, Estados Unidos), no Laboratório de Microbiologia Yasuyoshi Hayashi, do Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

4.1.6 Caracterização celular da resposta imune

Com o objetivo de caracterizar a resposta imune *in vitro* de células expostas às aflatoxinas, preliminarmente foram coletadas amostras de sangue periférico com EDTA das aves de experimentação para avaliação da atividade fagocítica de macrófagos em cultivo celular. Posteriormente, este conhecimento auxiliará a caracterização da resposta imune de produção de anticorpos específicos em camundongos imunizados com antígenos miméticos e desafiados com aflatoxina.

De acordo com FAIR *et al.* (2008), as amostras de sangue total das duas poedeiras comerciais, aproximadamente 3 mL, foram diluídas na proporção 1:1 v/v em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), sendo posteriormente adicionado 4 mL de Histopaque-1077 para centrifugação a 600 g por 20 minutos a temperatura ambiente. A camada de leucócitos central foi diluída em 3 mL de meio RPMI com antibiótico (penicilina 10.000 UI e estreptomicina 10 mg/mL, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para centrifugação a 600 g por 20 minutos a temperatura ambiente. Ao precipitado foram adicionados 3 mL de meio RPMI com antibiótico para contagem em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para $7,2 \times 10^6$ células para 3 mL de solução em garrafa de cultivo celular com área de cultivo de 60 cm² que foi incubada por uma hora a 37°C com 5% de CO₂.

As células não aderidas foram descartadas por três lavagens sucessivas com PBS, substituindo por meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% soro de galinha e antibiótico. Após quatro dias, o meio de cultivo foi substituído para proceder a estimulação dos macrófagos com 10 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella* Enteritidis, produzido pela IMUNOVA, empresa incubada na UFPR, localizada no Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da UFPR. As células antes e após a estimulação foram analisadas por microscópio invertido IX51 (Olympus, Japão) em aumento de 40x.

4.2 ETAPA 2: PHAGE DISPLAY

Após a amplificação inicial das bibliotecas de fagos, a técnica de *phage display* propriamente dita consistiu na realização de ciclos de seleção (*pannings*) com bibliotecas randômicas de peptídeos apresentados em bacteriófagos. Estas foram expostas ao alvo (anticorpo monoclonal anti-AFB1) adsorvido em uma superfície sólida, com o objetivo de identificar possíveis ligantes de interesse que mimetizassem a referida toxina (FIGURA 6).

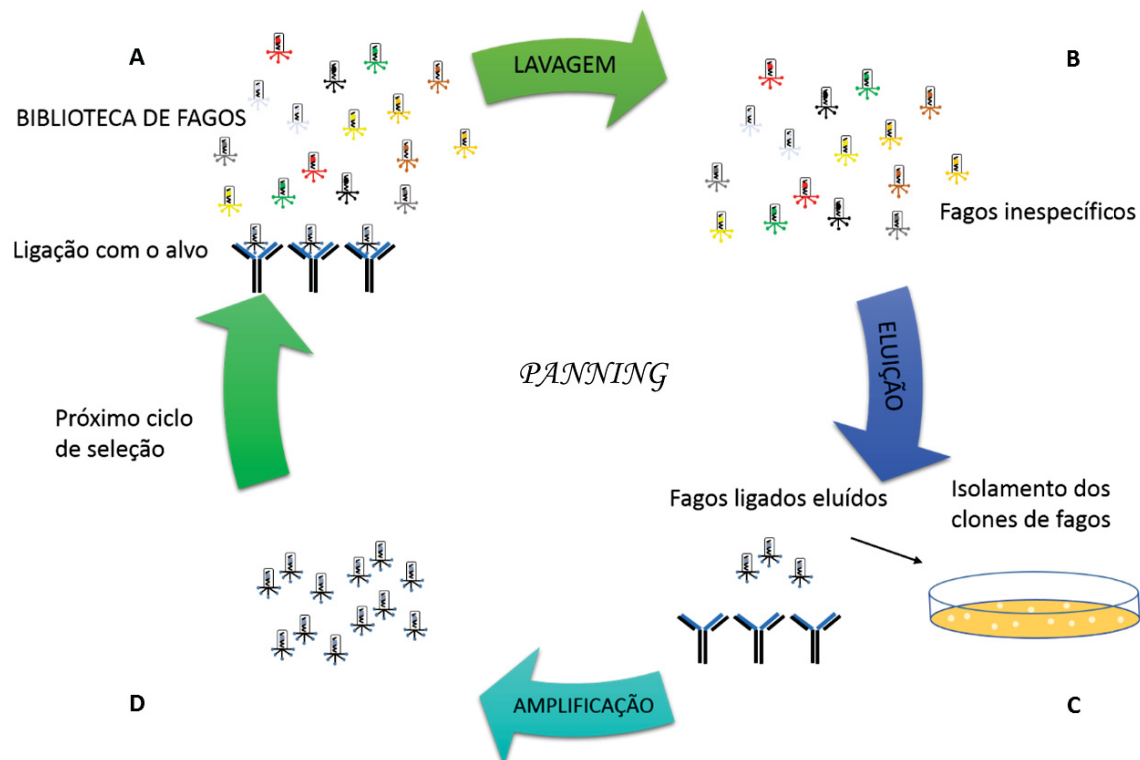


FIGURA 6: *PHAGE DISPLAY*. (A) Bacteriófagos selecionados a partir de anticorpos anti-AFB1. (B) Após sucessivas lavagens para remoção de fagos inespecíficos, (C) os fagos ligantes foram eluídos, permitindo o isolamento dos clones de fagos específicos e finalmente (D) amplificados para serem submetidos ao próximo ciclo de seleção e/ou testados quanto à imunorreatividade e especificidade. FONTE: a autora.

Após diversos ciclos de seleção, bacteriófagos de alta afinidade pelo alvo foram testados por ELISA quanto à imunorreatividade e especificidade. A partir dos fagos específicos selecionados foi obtido o DNA viral para posterior sequenciamento. Ao se obter a sequência nucleotídica, consequentemente a sequência peptídica pôde ser proposta e os peptídeos sintetizados quimicamente.

4.2.1 Amplificação das bibliotecas randômicas de peptídeos apresentados em fagos

Primeiramente, bibliotecas previamente cedidas por J. Scott, Universidade Simon Fraser, Canadá (BONNYCASLITE *et al.*, 1996) foram individualmente amplificadas para posterior utilização nos ciclos de seleção. Em síntese, culturas de bactéria *Escherichia coli*, que expressam o antígeno capsular K91 (*E. coli* K91), foram infectadas com alíquotas de cada biblioteca de fagos (LX4, LX8, X₁₅ e X₈CX₈, sendo que X representa aminoácidos aleatórios e C representa o resíduo de cisteína) em meio com tetraciclina. Bactérias infectadas adquirem resistência ao antibiótico e desenvolvem ciclos lisogênicos (não líticos), liberando as partículas virais no meio de cultura. Após a remoção das bactérias, os fagos são precipitados com o polímero hidrofílico polietilenoglicol, massa molecular 8.000 Da (PEG 8.000) e recuperados em solução tampão TRIS salino (TBS) para titulação.

Assim, a partir de uma colônia isolada de bactéria *E. coli* K91 em placa de Petri com meio ágar Luria-Bertani (LB), foi incubado um pré-inóculo com 10 mL de meio líquido LB a 37°C e 250 rpm por 12 horas. O inóculo foi obtido por meio do pré-inóculo acrescido de 100 mL de meio LB líquido, incubado a 37°C e 250 rpm até atingir a densidade ótica de 1,8 em espectrofotômetro, filtro de 550 nm, indicativo da fase exponencial da bactéria. Após 30 minutos a 50 rpm para formação de *pili*, foi realizada a indução da infecção pelos fagos, com 10¹¹ *transduction units* (TU) por mL de cada biblioteca em *E. coli* K91, fase exponencial, incubando por 10 minutos à temperatura ambiente com agitação a cada dois minutos.

Para a amplificação foram divididos 100 mL da cultura de bactérias *E. coli* K91 infectadas em dois frascos do tipo erlenmeyer, cada um contendo 200 mL de meio LB líquido e 0,4 µg/mL de antibiótico tetraciclina e incubou-se por 30 minutos a 37°C e 250 rpm. Após este período, a concentração de antibiótico foi ajustada para 20 µg/mL, com incubação a 37°C e 250 rpm por 12 horas.

Após a amplificação, as culturas de bactérias *E. coli* K91 infectadas foram repassadas para tubos estéreis (com capacidade para 250 mL) e submetidas à centrifugação a 4°C e 1.680 g por 20 minutos. Para precipitação dos fagos, o sobrenadante foi recuperado e transferido para tubos estéreis com 15% de solução de polietilenoglicol 8.000 (PEG 20%, NaCl 2,5 M), incubados em gelo e a 4°C por 12 horas. Após centrifugação a 4°C e 6.720 g por 40 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 7,5 mL de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) a 37°C e 150 rpm por 30 minutos. A solução foi transferida para microtubos para posterior centrifugação a 4°C e 23.640 g por 10 minutos, eliminando possíveis debris e células remanescentes.

O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril, ao qual foi adicionado novamente 15% de solução PEG 8.000/NaCl e incubado a 4°C em gelo por 12 horas. Os fagos foram transferidos para microtubos e centrifugados por 40 minutos a 4°C a 10.510 g. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1,5 mL de TBS. Após nova centrifugação a 4°C e 23.640 g por 10 minutos, a solução foi filtrada em filtro com membrana polietersulfônica com tamanho de poro de 0,22 µm, previamente umedecido com TBS, recolhida em microtubos e congelada para posterior titulação.

A titulação dos fagos foi realizada em diluição seriada com meio LB líquido, a partir de 10 µL da solução de fagos em 100 µL de meio LB líquido. Posteriormente, 10 µL das diluições 10^6 , 10^8 e 10^{10} foram separadas para infectar individualmente 200 µL da cultura de *E. coli* K91 em fase exponencial, conforme descrito anteriormente com a preparação de pré-inóculo, inóculo e densidade ótica de 1,8 em espectrofotômetro, filtro 550 nm. Após a formação do *pili*, as bactérias infectadas foram incubadas com as diluições de fago por 15 minutos a 37°C sem agitação e 15 minutos a 37°C a 250 rpm. De cada diluição, foram plaqueados 200 µL em meio LB sólido contendo 20 µg/mL de tetraciclina, incubando a 37°C por 12 horas, estabelecendo o título de fagos por mL (TU/mL) de acordo com o número de colônias multiplicado pelo fator de diluição e por 100.

4.2.2 Seleção de peptídeos miméticos de aflatoxina B1 expressos na superfície de bacteriófagos (*panning*)

A partir da amplificação das bibliotecas, diferentes estratégias para padronização dos ciclos de seleção (*pannings*) foram executadas para obtenção de peptídeos miméticos de aflatoxina. Foram executadas as seguintes estratégias de seleção com os respectivos alvos adsorvidos à placa na concentração de 10 µg/mL: I) anticorpo comercial policlonal anti-AFB1, sem prévia amplificação das bibliotecas; II) anticorpo comercial policlonal anti-AFB1, após reamplificação das bibliotecas; III) anticorpo policlonal anti-AFB1, após seleção negativa das bibliotecas com *pool* de anticorpos anti-IgG de coelho; IV) anticorpo comercial monoclonal anti-AFB1; V) anticorpo comercial monoclonal anti-AFB1 com eluição ácida e sonicação. Para a estratégia III foi empregada uma seleção negativa com imunoglobulina de coelho não imunizado, visando à eliminação de fagos inespecíficos. Os fagos ligantes à imunoglobulina de coelho reconhecem regiões irrelevantes e somente fagos não ligantes foram recuperados para exposição a anticorpos anti-AFB1. A precipitação de IgG de soro de coelho foi realizada por meio do processo de *salting-out*, com solução saturada de sulfato de amônio. Assim, após incubação por 12 horas com imunoglobulina de coelho, os fagos não ligantes foram submetidos aos *pannings* com anticorpos policlonais anti-AFB1.

A técnica de *phage display* foi realizada de acordo com SCOTT & SMITH (1990) com modificações propostas por PEIXOTO (2011). Em todos os formatos foram adicionadas alíquotas de cada biblioteca a 1×10^{11} TU/mL, exceto na estratégia V, em que foi reduzido o *input* de fagos das bibliotecas, obtendo a concentração final de 1×10^{11} TU/mL entre todas as bibliotecas juntas. Na estratégia V também foi testada a metodologia de recuperação de fagos associando a eluição ácida e a sonicação, conforme descrito por LUNDER *et al.* (2008), com algumas modificações.

Assim, de acordo com a estratégia V, anticorpos comerciais monoclonais anti-AFB1 foram diluídos em tampão carbonato (NaHCO_3 100 mM, pH 8,6) e adsorvidos em placas de 96 poços (Nunc-Immuno, MaxiSorp F96, NUNC Brand Products, Roskilde, Dinamarca) que foram incubadas a 4°C por 12 horas. Para o primeiro ciclo de seleção, a concentração de anticorpo anti-AFB1 foi de 10 µg/mL, sendo reduzida nos dois ciclos seguintes, 5 e 1 µg/mL, para maior afinidade e especificidade de seleção.

Após remoção do tampão de cobertura, foram realizadas cinco lavagens por dois minutos cada, com tampão Tris salino com Tween 0,05% - TBS-T 0,05% (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0,05% Tween 20, pH 7,5). A saturação com solução de bloqueio (TBS-T 0,05%, suplementada com 3% BSA) por uma hora a 37°C e 25 rpm foi seguida de cinco lavagens por dois minutos cada com solução TBS-T 0,05%. Alíquotas das bibliotecas amplificadas, totalizando uma concentração final de 1×10^{11} TU/mL em 10 mL de solução, foram distribuídas em 96 poços da placa, com incubação a 4°C e 25 rpm por 12 horas.

Fagos inespecíficos foram removidos por sucessivas lavagens (25 vezes de dois minutos cada) com 200 µL por poço de solução TBS-T 0,2% e, posteriormente, quatro lavagens – duração de cinco minutos cada – com solução tamponada de glicina (Glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2). Os fagos específicos foram recuperados com solução tamponada de glicina, ao qual foi adicionada no volume de 100 µL por poço, associada à sonicação com frequência de 50 Hz em banho-maria por 10 minutos (UltraSonic Cleaner, Unique Group, Brasil).

A solução eluída foi recuperada em tubo estéril de 50 mL e imediatamente neutralizada para pH 7,0, com auxílio de tiras de medição de pH e adicionando gradativamente solução Tris-HCl, 1 M, pH 9,0. Duas alíquotas de 50 µL foram mantidas a -20°C para posterior titulação (titulação parcial). Em seguida, fagos eluídos foram purificados por precipitação em polietilenoglicol (PEG 8.000), amplificados (10^{11} - 10^{12} TU/mL) e titulados em *E. coli* K91, fase exponencial, conforme descrito anteriormente (item 4.2.1). As colônias isoladas obtidas das placas de titulação parcial foram selecionadas, permitindo a enumeração de clones individualizados para amplificação individual e *screening* por ELISA (item 4.2.3).

Por outro lado, para a amplificação do *pool* de fagos selecionados, um pré-inóculo foi incubado a 37°C e 250 rpm por 12 horas contendo 10 mL de meio LB líquido e uma colônia isolada de *E.coli* K91 sem resistência à tetraciclina. A partir deste pré-inóculo foi feito o inóculo, acrescentando 100 mL de meio LB líquido, incubado a 37°C e 250 rpm, até atingir a densidade ótica de 1,8 em espectrofotômetro, filtro 550 nm. A indução da infecção pelos fagos foi realizada em dois tubos estéreis de 15 mL, contendo 5 mL de solução de fagos recuperados após neutralização do pH e 8,5 mL de cultura de bactérias, fase exponencial. Estas soluções foram incubadas por 10 minutos a 37°C e 250 rpm para posterior amplificação em 100 mL de meio LB, contendo 0,02 µg/mL de tetraciclina. A concentração de tetraciclina foi ajustada para 20 µg/mL após nova indução a 37°C, 250 rpm por 30 minutos. Após a amplificação, as culturas de bactérias *E. coli* K91 infectadas foram processadas conforme descrito anteriormente para amplificação e titulação das bibliotecas (item 4.2.1), exceto pela etapa única de precipitação dos fagos com polietilenoglicol. Ao final deste processo, clones amplificados e titulados apresentaram concentrações mínima de 1×10^{11} TU/mL para serem testados por ELISA.

4.2.3 *Screening* dos clones por ELISA

Para a determinação da reatividade específica de fagos selecionados (*screening*) foram testados alguns formatos de ELISA, visando à padronização da técnica. Inicialmente, os ensaios foram realizados com a adsorção de anticorpos diretamente nos poços, seguido de *pools* de fagos recuperados, a fim de avaliar a reatividade de um conjunto de fagos simultaneamente. Posteriormente foram testados também os clones individualizados das diferentes estratégias de seleção.

Outro formato de imunoensaio foi realizado com fagos previamente selecionados adsorvidos à placa. Posteriormente foi adicionado anticorpo policlonal anti-AFB1 e finalmente anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. Ao final deste trabalho, foram estabelecidas as melhores condições do ensaio imunoenzimático indireto para seleção dos clones, conforme ilustrado na Figura 7. As amostras foram testadas em duplicata e como controles negativos em cada imunoensaio foram utilizados o anticorpo anti-BSA e o fago silvestre (FS). Este não expressa peptídeos recombinantes na porção amino terminal da proteína p8 do capsídeo do bacteriófago, permitindo seu emprego como controle da reação.

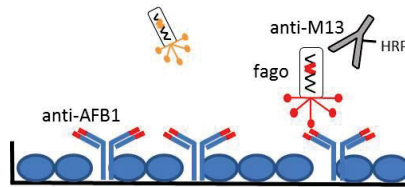


FIGURA 7: Representação esquemática de ELISA estabelecido para avaliação da reatividade dos fagos selecionados. Anticorpo anti-AFB1 (1µg/poço) foi adsorvido à placa, adicionando-se clones de fagos amplificados e posteriormente anticorpo produzido em camundongo anti-M13 conjugado à peroxidase e substrato específico. A leitura das absorbâncias das amostras foi determinada em 490 nm. FONTE: a autora.

Resumidamente, solução de 10 µg/mL do anticorpo anti-AFB1 diluído em solução de tampão carbonato (NaHCO₃, 100 mM, pH 9,6) foi adicionada à placa e mantida a 4°C por 12 horas. Após etapa de lavagem (quatro repetições com PBS-T 0,05%), a saturação da placa foi realizada com solução caseína 2% em PBS e incubada a 37°C por uma hora. Após quatro lavagens, foram incubados 100 µL de fagos na concentração de 10¹¹ TU/mL, por uma hora a 37°C, seguida por outra etapa de lavagem para retirada dos fagos não ligados. Para verificação da interação anticorpo-fago, o conjugado anti-proteína p8 de fago M13 marcado com peroxidase, produzido em camundongo (27942101, GE, Inglaterra) na diluição 1:5.000, foi adicionado e a placa foi incubada por mais uma hora em estufa a 37°C. A revelação foi realizada conforme descrito anteriormente para ensaio imunoenzimático indireto. A reatividade final foi determinada por meio da subtração do controle negativo, que foi obtido com a absorbância em duplicata do fago silvestre.

A otimização da concentração de fagos para caracterizar a reatividade ao anticorpo anti-AFB1 foi observada em ensaio com diluições crescentes de fagos, de 1 x 10¹¹ TU/mL a 1 x 10⁸ TU/mL. Este ensaio imunoenzimático foi realizado conforme descrito acima com as diluições de 1 x 10¹¹, 1 x 10¹⁰, 1 x 10⁹ e 1 x 10⁸ em duplicata de cada diluição e tendo como controles o fago irrelevante 3P25 e o fago silvestre nas mesmas concentrações.

A mesma estratégia foi utilizada para determinar a interação específica do fago frente às moléculas irrelevantes. Foram testadas concentrações fixas de 10 µg/mL dos seguintes compostos aderidos à placa: anticorpos monoclonais irrelevantes anti-veneno loxoscélico (mAb 7; ALVARENGA *et al.*, 2005); anticorpos policlonais irrelevantes, obtidos de soro de camundongo não imunizado; anticorpos policlonais irrelevantes, obtido de soro de coelho não imunizado; assim como a proteína BSA. Os fagos selecionados, amplificados e titulados foram testados na concentração de 1 x 10¹¹ TU/mL.

Com o objetivo de verificar a especificidade do fago pelo anticorpo, os imunoenaios de competição foram realizados por diferentes estratégias. O anticorpo anti-AFB1 foi adsorvido à placa e concentrações decrescentes de AFB1 (30 - 15 - 7,5 - 3,7 - 1,8 - 0,9 - 0,5 - 0 ng/mL) foram adicionadas com concentrações constantes (10^{11} TU/mL) de fagos específicos, fago irrelevante e fago silvestre. A interação anticorpo-fago foi determinada com conjugado anti-fago M13 peroxidase, conforme descrito anteriormente. Além disto, buscando adequar equitativamente as concentrações molares de antígeno e anticorpo, a mesma estratégia de competição foi utilizada, mas estabelecendo as seguintes concentrações de aflatoxina: 400 – 200 – 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 0 pg/mL.

Uma segunda estratégia foi utilizada, adsorvendo à placa fagos específicos, fago irrelevante e fago silvestre em concentração fixa (10^{11} TU/mL). Anticorpos anti-AFB1 foram incubados com diferentes quantidades de AFB1 (500 – 250 – 125 – 0 pg/mL), sendo verificada a interação por anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. Por fim, na terceira estratégia de ensaio de competição foi adsorvido o conjugado AFB1-BSA à placa, para que fago e anticorpo anti-AFB1 pudessem formar complexos antígeno-anticorpo durante a incubação, sendo posteriormente removidos por lavagem. O anticorpo restante poderia se ligar à aflatoxina, permitindo a reatividade expressa em absorbância. Desta forma, os fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25), aleatoriamente escolhido como fago de baixa reatividade do terceiro *panning*, e silvestre (FS) foram testados nas concentrações de 10^{11} a 10^8 TU (*transduction units*)/mL e incubados com anticorpo policlonal anti-AFB1, tendo a aflatoxina (AFB1-BSA) adsorvida à placa na concentração de 10 µg/mL. A reação foi detectada após a adição de conjugado anti-imunoglobulina de coelho-peroxidase e substrato específico, como absorbância a 490 nm.

4.2.4 Processamento do DNA viral

Finalizada a caracterização dos clones específicos, foram processadas as amostras de fagos individualizados e amplificados para obtenção do DNA viral, sequenciamento e comparação de sequências biológicas (análise de bioinformática). Na estratégia inicial o DNA dos fagos amplificados foi extraído conforme protocolo descrito para kit Qiagen® 27704 – QIAprep spin M13 (Qiagen, Alemanha). Bactérias infectadas com fagos individualizados foram cultivadas em 10 mL de meio LB, a 37°C, sob agitação constante a 250 rpm por 5 horas. Após centrifugação a 4°C e 2.630 g por 20 minutos, os sobrenadantes contendo fagos foram transferidos para microtubos esterilizados e centrifugados novamente nas mesmas condições, seguindo a partir desta etapa o protocolo do fabricante. A concentração final dos ácidos nucleicos foi dosada pelo espectrofotômetro *Nanodrop* (Thermo Scientific, Estados Unidos) e as amostras foram congeladas a -20° C.

Entretanto, para obter material genético adequado para a reação de sequenciamento foi necessário estabelecer um protocolo de PCR de colônia, obtendo DNA dos fagos a partir de uma colônia de *E. coli* individualizada contendo inserto do respectivo fago. Assim, o DNA foi amplificado utilizando como iniciadores: *FOR 88.4 1* 5'-CCT TTA ATC GGC CTC CTG TT-3'; *REV CLAUDE* 5'- TCG GCA AGC TCT TTT AGG -3', obtendo produtos de amplificação de 710 pares de base. As condições da reação de amplificação foram: 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial do DNA, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, com extensão final a 72°C por 7 minutos.

A purificação e a concentração de fragmentos de DNA obtidos na reação de PCR de colônia foram realizadas com o auxílio de coluna de gel sílica, que permite a separação de produtos de PCR de 80 pb a 30 kb, com taxa de recuperação de 80-95% (MSB® Spin PCRapace and Invisorb® Fragment CleanUp, Stratec Molecular, Alemanha). Os fragmentos de DNA foram ligados diretamente na superfície da coluna filtro, após incubação em tampão de ligação 1:5 v/v. As impurezas indesejadas, como *primers*, sais, enzimas e nucleotídeos não incorporados, não ligam à membrana sílica, sendo removidas da coluna pela força centrífuga junto ao tampão de ligação. Os fragmentos de DNA foram eluídos com 30 µL de água ultrapura esterilizada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC, Thermo Scientific, Estados Unidos), sendo a solução armazenada a -20°C para execução da reação de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Estados Unidos) com 100 ng de DNA amplificado, contendo 1 µL de tampão *Big Dye* e 0,5 µL de primer reverso 10 pmol (5' AGT AGC AGA AGC CTG AAG A 3'), completando para 10 µL de reação em água DEPC. As condições do sequenciamento foram: 1 minuto a 96°C para desnaturação inicial do DNA, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e extensão final a 60°C por 4 minutos.

Para purificação do DNA foram testados dois protocolos (GREEN & SAMBROOK, 2012). No protocolo 1 foram adicionados 10 µL de água ultrapura, 2 µL de acetato de amônio (7,5 M) e 66 µL de etanol absoluto, que foram incubados por 10 minutos a -20°C. No protocolo 2 foram adicionados 40 µL de isopropanol 75% ao microtubo, o qual foi homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Para o prosseguimento, independente do protocolo testado, os tubos foram centrifugados a 17.760 g por 25 minutos, sendo o conteúdo removido por inversão em papel absorvente. Foram adicionados 100 µL de etanol 70%, centrifugado a 17.760 g por 5 minutos. O etanol foi removido e o tubo mantido em estufa a 37°C por 30 minutos para permitir a secagem. Todas as amostras testadas foram armazenadas a -20°C.

As sequências de DNA submetidas à eletroforese capilar em sequenciador automático *Applied Biosystems* 3130 (Thermo Sientific, Estados Unidos) foram processadas em *software* do próprio equipamento. Logo após esta pré-análise, os cromatogramas foram traduzidos e as sequências geradas foram analisadas, utilizando programas de bioinformática. As sequências peptídicas dos clones de fagos válidos – com absorbância ao menos duas vezes superior à do fago silvestre – assim como do fago irrelevante 3P25 e fago silvestre foram deduzidas usando o servidor Expasy (www.expasy.org) e analisadas com os seguintes programas para caracterização do peptídeo: HHPred, Pepdraw, PepSearch, PeptideMass e ProtParam.

4.2.5 Síntese do peptídeo e conjugação à proteína carreadora

O peptídeo foi sintetizado por Aminotech (São Paulo, Brasil) com pureza $\geq 95\%$ e covalentemente conjugada via extensão C-terminal de cisteína à albumina sérica bovina ou ovalbumina (77120, Thermo Scientific, Estados Unidos), como descrito por Capelli-Peixoto *et al.* (2011). Em síntese, a proteína carreadora, previamente diluída em PBS, foi ativada pelo *crosslinker* sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato) (22322B, Thermo Sientific, Estados Unidos). Após uma hora sob agitação constante em temperatura ambiente, o excesso de reagente foi removido por eluição através de coluna Pd-10. A proteína ativada foi colocada sob reação por 2 hs com o peptídeo em temperatura ambiente, sob agitação constante e protegido da luz. O tampão contendo cisteína foi adicionado para interromper a reação e os peptídeos conjugados foram separados em alíquotas estocadas a -20°C .

Para caracterização do acoplamento de peptídeo às proteínas carreadoras, 10 μg de cada conjugado foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em presença de 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS). As amostras foram adicionadas ao tampão de amostra em condições não redutora (Tris-HCl 0,5 M, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10% e azul de bromofenol 0,1%) ou redutora (com agente redutor β -mercaptoetanol 5% em banho-maria a 100°C por 3 minutos). O gel obtido após migração em tampão de migração (Tris 0,025 M, glicina 0,2 M e SDS 0,5%, pH 8.3) sob voltagem de 150 V foi posteriormente corado por prata e fixado (ácido acético 10%, etanol 40%).

4.3 ETAPA 3: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS INDUZIDOS POR ANTÍGENOS MIMÉTICOS DE AFLATOXINA

4.3.1 Imunização com bacteriófagos em camundongos

Com o objetivo de avaliar a imunogenicidade específica de fagotopos, ou seja, a capacidade de induzir a produção de anticorpos que reconhecem o epítipo nativo, assim como as melhores condições de imunização, foram testados imunógenos compostos por *pools* de fagos específicos e fago silvestre. Paralelamente foi escolhido aleatoriamente o fago 3P30 entre os fagos específicos para constituir o imunógeno de um grupo experimental. Os fagos selecionados foram amplificados e titulados para imunização de camundongos *Swiss* fêmeas de 28 dias de idade. Foram constituídos cinco grupos de quatro animais para cada grupo, na presença ou não de adjuvante De Freund, em delineamento inteiramente casualizado (QUADRO 2).

GRUPOS	IMUNÓGENO	ADJUVANTE
1	POOL DE FAGOS (3P19, 3P20, 3P23 e 3P30)	NÃO
2	FAGO SILVESTRE	NÃO
3	POOL DE FAGOS (3P19, 3P20, 3P23 e 3P30)	SIM
4	FAGO SILVESTRE	SIM
5	FAGO 3P30	SIM

QUADRO 2: Delineamento experimental de imunização com bacteriófagos. Cinco grupos de quatro unidades experimentais foram imunizados com fagos expressando peptídeos miméticos de AFB1 (3P19, 3P20, 3P23 e 3P30) e fago silvestre.

Cada grupo foi mantido em caixas individualizadas em condições controladas de temperatura e luminosidade no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Alimentação e água foram oferecidas *ad libitum* e a maravalha foi trocada a cada 2 ou 3 dias durante todo o período do experimento. Os animais foram avaliados quanto à presença de sinais clínicos e mortalidade a cada 2 ou 3 dias. Ao início do esquema de imunização foram coletadas amostras de sangue via plexo infraorbital em tubo sem anticoagulante, com o auxílio de anestésico tópico (cloridrato de lidocaína 4%, pomada) e pipetas de Pasteur para obtenção de soro pré-imune.

Após uma semana, os animais receberam uma injeção inicial subcutânea de imunógeno (10^{11} TU/mL), em emulsão com ou sem adjuvante de Freund completo (AFC) nos grupos 3, 4 e 5, totalizando 500 μ L de volume final por animal. As imunizações subsequentes foram realizadas via subcutânea, com ou sem adjuvante de Freund incompleto (AFI), de acordo com o QUADRO 1. Esse procedimento foi realizado conforme esquema de imunização a cada três, duas e uma semanas, totalizando cinco imunizações. Na quarta imunização foi realizada a irradiação ultrassônica (Sonoplus HD 2070, Bandelin, Alemanha) da solução de fagos, visando modificar a apresentação proteica do imunógeno. As amostras foram mantidas em gelo para evitar a elevação da temperatura durante as pulsações, com aplicação de três ciclos de dez pulsos de 40 Hz por um minuto com intervalo de 30 segundos entre ciclos.

Sete dias após a terceira e quarta imunizações, assim como ao final do esquema de imunização foram coletadas amostras de sangue sem anticoagulante via plexo infraorbital, com o auxílio de anestésico tópico (cloridrato de lidocaína 4%, pomada). Finalizado o esquema de imunização e obtenção dos soros, foi realizada a eutanásia dos animais por overdose de anestésico, ou seja, três vezes a dose anestésica de quetamina e xilazina, 150 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente, sendo posteriormente realizado o deslocamento cervical.

Como o interesse estava na produção de anticorpos específicos anti-aflatoxina induzidos pelo peptídeo mimético de AFB1 exposto no capsídeo do bacteriófago, os soros foram testados por ELISA frente aos conjugados comerciais AFB1-BSA e AFM1-BSA. O ensaio imunoenzimático foi realizado conforme descrito no item 4.1.4, exceto pelos compostos adsorvidos à placa: fagos na concentração de 10^{11} TU/mL, AFB1-BSA, AFM1-BSA e BSA na concentração de 10 μ g/mL. Os soros dos camundongos foram diluídos 1:100 em tampão de incubação. O controle positivo da imunização foi obtido com *pool* de fagos relevantes (P19, P20, P23 e P30) e fago silvestre adsorvidos individualmente à placa, testado com os soros dos camundongos. A reatividade final foi obtida por subtração do controle negativo, que foi obtido da absorbância da proteína carreadora BSA, testada com os soros dos camundongos.

4.3.2 Imunização com bacteriófagos e peptídeo sintético em camundongos

Em um segundo esquema de imunização foi realizada a avaliação dos antígenos miméticos obtidos, em que peptídeo sintético e peptídeo expresso em fagos são comparados frente à indução da produção de anticorpos específicos anti-AFB1. Os grupos de camundongos foram inoculados com BSA conjugada à AFB1 ou ao peptídeo sintético, assim como fago relevante 3P30, fago silvestre ou fago irrelevante 3P25 (QUADRO 3).

GRUPOS	IMUNÓGENO	CONCENTRAÇÃO	VOLUME
1	AFB1-BSA	1 mg/mL	25 µL
2	PEPTÍDEO-BSA	1 mg/mL	25 µL
3	FAGO 3P30	1×10^{10} TU/mL	100 µL
4	FAGO SILVESTRE	1×10^{10} TU/mL	100 µL
5	FAGO IRRELEVANTE 3P25	1×10^{10} TU/mL	100 µL

QUADRO 3: Delineamento experimental de imunização com bacteriófagos e peptídeo sintético. Cinco grupos de quatro unidades experimentais foram imunizados com conjugados de aflatoxina ou peptídeo, assim como com fagos expressando peptídeos miméticos de AFB1 (3P30), fago silvestre ou fago irrelevante (3P25).

A imunização de camundongos com fagos foi realizada conforme descrito por Galfré *et al.* (1996). Resumidamente, solução de 1×10^{11} TU de clones de fagos 3P30 em 100 µL TBS foi injetada via subcutânea em camundongos Swiss, fêmeas de 3-4 semanas de idade. Os camundongos pertencentes aos grupos controles foram injetados com fago silvestre ou fago irrelevante 3P25. Grupos de camundongos também foram injetados com BSA conjugada à AFB1 (A6655, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) ou ao peptídeo sintético, 1mg/mL, totalizando 25 µL de imunógeno por animal. Todos os cinco grupos foram compostos por quatro camundongos e receberam AFC na primeira imunização e AFI nas imunizações subsequentes com suspensão 1:1 v/v de adjuvante:fago ou conjugado (peptídeo-BSA ou AFB1-BSA). Dois reforços adicionais foram realizados em intervalo de 2-3 semanas, seguido de injeção final após uma semana. Os animais foram sangrados via plexo infraorbital após a quarta imunização para obtenção de soro, que foi mantido a -20°C até análise da resposta imune induzida pela imunização.

O ELISA indireto para determinação de anticorpos anti-peptídeo e anti-AFB1 foi realizado conforme descrito no item 4.1.4, exceto pelas soluções de peptídeo-BSA, AFB1-BSA ou BSA adsorvidas à placa. O título de anticorpos específico foi derivado como diluição recíproca da amostra correspondente à densidade ótica 490 nm $\geq 0,05$ após correção dos valores de reatividade da proteína carreadora.

4.3.3 Caracterização celular da resposta imune

No esquema de imunização seguinte, camundongos imunizados ou ainda aqueles que não receberam nenhum imunógeno, foram avaliados quanto à atividade fagocítica de macrófagos e viabilidade de esplenócitos após imunização com peptídeo sintético ou peptídeo expresso em fago (QUADRO 4). O mesmo esquema de imunização descrito anteriormente foi repetido, exceto por conter oito unidades experimentais por grupo, visando o desafio com aflatoxina *in vivo* e *in vitro*. Assim, os grupos imunizados com peptídeo, fago relevante 3P30, fago silvestre e não imunizados foram divididos após as imunizações para receberem aflatoxina antes (desafio *in vivo*) ou após a eutanásia (desafio *in vitro*).

GRUPOS	IMUNÓGENO	CONCENTRAÇÃO	VOLUME
1	PEPTÍDEO-BSA	1 mg/mL	25 μ L
2	FAGO 3P30	1×10^{10} TU/mL	100 μ L
3	FAGO SILVESTRE	1×10^{10} TU/mL	100 μ L
4	FAGO IRRELEVANTE 3P25	1×10^{10} TU/mL	100 μ L

QUADRO 4: Delineamento experimental de imunização com bacteriófagos e peptídeo sintético, visando o desafio com aflatoxina. Quatro grupos de oito unidades experimentais foram imunizados com conjugados de peptídeo ou com fagos expressando peptídeos miméticos de AFB1 (3P30), fago silvestre ou fago irrelevante (3P25).

Desta forma, no desafio *in vivo*, foram administradas via oral, sete doses de 400 μ g de AFB1 por kg de peso vivo em aproximadamente 0,05 mL de veículo (água) durante 14 dias, ou seja, uma dose a cada dois dias (MOON *et al.*, 1999). Após eutanásia com sobredose de anestésico, foram coletados macrófagos peritoneais e esplenócitos, sendo as células mantidas por 24 ou 48 horas, com ou sem estímulo por LPS, 10 μ g/mL, ou seja, quatro condições de manutenção do cultivo celular.

No desafio *in vitro*, o mesmo esquema de imunização foi realizado, mas o desafio com administração de aflatoxina foi realizado somente no meio de cultivo celular. Assim, após a obtenção das células, os meios de cultivo foram complementados com 20 ng/mL (20 ppb) de aflatoxina, estabelecendo quatro condições de manutenção celular: controle (meio sem adição de aflatoxina); AFB1 (meio com adição de AFB1), LPS (meio com adição de LPS) e AFB1+LPS (meio com adição de AFB1 e posteriormente LPS).

Para o isolamento e ativação de macrófagos peritoneais de camundongos, inicialmente 1-3 mL de caldo tioglicolato foi injetado via intraperitoneal 3 dias antes do procedimento de obtenção das células (MOON *et al.*, 1999). Após coleta de sangue sem anticoagulante via plexo infraorbital, foi realizada a eutanásia dos animais com sobredose de anestésico, ou seja, três vezes a dose anestésica de quetamina e xilazina, 150 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente, procedendo também o deslocamento cervical. Ao fixar as patas do animal em placa de isopor, foi realizada a assepsia da pele abdominal com álcool etílico 70%.

Em câmara de fluxo laminar, a pele do abdome foi incisada com auxílio de tesoura e pinça cirúrgicas esterilizadas. O meio RPMI suplementado com heparina (2 UI/mL) foi injetado na cavidade peritoneal, com auxílio de seringa estéril de 10 mL. Ao perfundir 5 mL de meio, o abdome foi massageado, com o objetivo de desprender os macrófagos, recomendando suspender a musculatura da parede abdominal com auxílio de pinça estéril para promover espaço adequado para inserção da agulha e evitar a perfuração de órgãos da cavidade.

O líquido recuperado, que apresenta coloração amarelada, foi armazenado em tubo estéril de 15 mL e mantido em gelo até a obtenção das demais amostras para centrifugação a 150 g por 8 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas lentamente em meio RPMI com suplementação (10% soro fetal bovino, 100 µmol/mL L-glutamina, 100 UI penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) para contagem em hemocítmetro. Após ajuste da concentração celular para 10⁴ células/mL em meio RPMI com suplementação, a suspensão celular foi mantida em garrafa de cultivo celular de 24 poços, ou seja, em área de crescimento de 1,93 cm². Para ativação das células, foi adicionado LPS, 10 µg/mL, mantendo o cultivo pelo tempo determinado para o experimento (24 ou 48 horas).

Para o isolamento de esplenócitos, após a recuperação do meio da cavidade abdominal, o baço foi retirado com auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas estéreis. A gordura excedente do órgão foi removida em placa de Petri estéril, separando uma parte do baço para exame histopatológico, em formol 10%. Em outra placa de Petri, com meio RPMI sem suplementação, o baço foi transferido por meio de filtro estéril de malha 100 μm , com auxílio do êmbolo de uma seringa estéril. O macerado foi repassado para tubo plástico estéril de 50 mL, através de novo filtro estéril, de malha 40 μm , completando para 10 mL de meio RPMI em gelo. Após centrifugação a 150 g por 8 minutos a 4°C, as células foram lentamente ressuspendidas em meio RPMI com suplementação (10% soro fetal bovino, 100 $\mu\text{mol/mL}$ L-glutamina, 100 UI penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomicina). Após contagem em hemocítmetro, ajustando a concentração celular para 10^6 células/mL em meio RPMI com suplementação, a suspensão celular foi mantida em garrafa de cultivo celular de 24 poços, ou seja, em área de crescimento de 1,93 cm^2 , por 24 horas após a última inclusão (AFB1 ou LPS).

4.4 ETAPA 4: VACINA DE MUCOSA COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-BACTERIÓFAGO

Com o objetivo de desenvolver um imunógeno de mucosa baseado em peptídeos expressos em fago, assim como promover uma via de inoculação eficiente para utilização em animais de produção, foi executada a estratégia de encapsulamento de bacteriófagos em nanopartículas de quitosana. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Biopolímeros, Departamento de Química, Centro Politécnico, UFPR, sob direção do Professor Rilton Alves de Freitas. Desta forma, o biopolímero quitosana foi purificado e caracterizado, determinando o grau de deacetilação por titulação potenciométrica e ressonância magnética nuclear ^1H , com caracterização dos deslocamentos químicos por ^{13}C . A massa molar e a viscosidade intrínseca do biopolímero foram determinadas por cromatografia de gel permeação (SEC). Após o encapsulamento de fagos em nanopartículas de quitosana foi avaliada a imunogenicidade do antígeno por meio de imunização intranasal, sendo caracterizados anticorpos específicos anti-peptídeo e anti-AFB1.

4.4.1 Purificação e caracterização do biopolímero quitosana

Inicialmente 20,0 g de quitosana (lote K051218282, Purifarma, São Paulo, Brasil) foram purificadas por meio de ciclos de dispersão e precipitação, conforme descrito por Recillas *et al.* (2009). No primeiro ciclo, a dispersão da quitosana foi realizada em solução de ácido acético 0,1 M por 24 horas para centrifugação a 10.000 g por 30 minutos a 25°C. O particulado foi descartado e o sobrenadante precipitado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, gota a gota, até atingir pH 8,0. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 99% por 10 minutos sob agitação e centrifugação nas mesmas condições. O processo de lavagem com etanol 99% foi repetido por mais duas vezes, substituído por acetona após a última centrifugação. Ao final deste processo, a quitosana foi triturada com auxílio de pistão e secagem em estufa à vácuo a 40°C para obtenção do rendimento final de massa seca de quitosana purificada.

O grau de deacetilação (DDA) da quitosana foi determinado usando o método descrito por Broussignac (1968). Resumidamente, quitosana (0,2 g) foi dissolvida em ácido clorídrico 0,3 M, sob agitação por 24 horas, sendo titulada com NaOH 0,2 M, padronizado até pH 12,0. Foram plotados dois pontos de inflexão, calculando a primeira derivativa em relação ao pH e determinando picos V1 e V2 em relação ao volume de HCl, de acordo com a equação 1:

$$DDA (\%) = \frac{16.1 \times (V_2 - V_1) \times [\text{NaOH}]}{m}$$

onde a constante **16,1** está relacionada com a massa molar do grupo amino (NH_2); V_1 e V_2 representam o volume de HCl em excesso e a quantidade de NH_2^+ , respectivamente; **[NaOH]** representa a concentração de NaOH em mol/L e **m** representa a massa da amostra em grama.

A quitosana foi também analisada por espectrometria de ressonância magnética nuclear monodimensional ^{13}C e ^1H em espectrômetro (Bruker AVANCE III HD 400 MHz), usando sonda inversa de 5 mm. Como solvente foi utilizado ácido acético deuterado 0,1 M (Cambridge Isotope Laboratories) em óxido de deutério (D_2O) (Cambridge Isotope Laboratories, Estados Unidos) para dispersão da quitosana e TMS-p (sal de propionato de sódio 2,2,3,3-tetra-deutério-3-trimetilsililo) como referência para o espectro de calibração ($\delta = 0$). Todas as análises foram realizadas a 70°C , frequência de 400 MHz para ^1H NMR e 100 MHz para ^{13}C NMR. O grau de deacetilação por espectrometria RMN ^1H foi determinado de acordo com a equação 2 (HIRAI *et al.*, 1991):

$$DDA\% = \left(\frac{H_1}{H_1 + H_{AC}/3} \right) * 100$$

onde **DDA%** representa o grau de deacetilação (%); **H1** o deslocamento químico de ^1H em ppm; **H_{AC}** o desvio químico de ácido acético em ppm.

Para determinação da massa molar viscosimétrica, o incremento do índice de refração ($\partial n/\partial c$) foi determinado como 0,185 mL/g com a partir da análise de concentrações de quitosana de 0,1 a 1 mg/mL em 0,3 M ácido acético com 0,2 M acetato de sódio, pH 4,6. As análises foram realizadas em sistema SEC VISCOTEK (Malvern, Estados Unidos), sem coluna de exclusão por tamanho, com taxa de fluxo de 0,4 mL/minuto. A fase móvel foi a solução tampão de ácido acético 0,3 M com 0,2 M acetato de sódio, pH 4,6. O padrão utilizado foi PEO 24k, de massa ponderal média (M_w) igual a 24.200 Da.

Para a determinação de outros parâmetros físico-químicos, como massa molar média (M_w), dispersão (Đ), raio de giro ($\langle S^2 \rangle^{1/2}$) e viscosidade intrínseca ($[\eta]$), 100 μL das amostras foram injetadas em sistema anexo à coluna SB-806M-HQ (Shodex, Japan). Foi utilizado o sistema SEC VISCOTEK composto por bomba VE1122, refratômetro diferencial VE3580 e detector duplo de dispersão de luz 270 com fotodetector de ângulo reto a 90° e um viscosímetro diferencial.

4.4.2 Encapsulamento de bacteriófagos em nanopartículas de quitosana

Para determinação a concentração ideal de fago para encapsulamento, inicialmente foi utilizada uma amostra de fago silvestre na concentração de $1,78 \times 10^{13}$ TU/mL, a qual foi diluída em água ultrapura, a fim de obter soluções 1:10, 1:100 e 1:1000 v/v para avaliação em equipamento de espalhamento dinâmico de luz NanoDLS (Brookhaven, New York, Estados Unidos). A terminologia “aparente” foi definida devido à anisotropia dos fagos, sendo os valores obtidos determinados somente para o propósito comparativo.

As mesmas soluções foram também avaliadas em analisador Stabino® (*Rapid Particle Charge Titrations and Size Distribution*, Particle Metrix GmbH, Meerbusch, Germany) para determinação do potencial zeta (ζ). Para quitosana foram avaliadas soluções com 10, 100, 1.000, 10.000 e 20.000 moléculas de quitosana superior em relação à quantidade de fagos. As soluções de bacteriófago, quitosana e nanopartículas foram analisadas em pH 4,6 e 7,0.

Desta forma, o fago 3P30 foi empregado como substrato para formação de nanopartículas de quitosana, após amplificação e titulação do fago recombinante a 5×10^{12} TU/mL. A solução final de fagos para o encapsulamento foi determinada pela diluição em água ultrapura para a obtenção de solução na concentração de 1×10^{11} TU/mL. Assim, a dispersão dos bacteriófagos foi obtida após a adição de 10 mL de solução final de fagos em 10 mL de solução de quitosana (2mL de quitosana 1 mg/mL em solução de ácido acético 0,3 M com 0,2 M acetato de sódio, pH 4,6, diluída em 7 mL de água ultrapura). Após neutralização da solução em pH 7,3 com solução de NaOH 0,2 M, as nanopartículas de quitosana-bacteriófago foram centrifugadas a 10.000 g por 30 minutos a 25°C e ressuspendidas em 1 mL de PBS estéril. A titulação de bacteriófagos que se mantém no sobrenadante após centrifugação, ou seja, que não foi recoberto por quitosana, foi determinada por titulação em *E.coli* K91, fase exponencial, conforme descrito anteriormente (item 4.2.1). O controle negativo foi realizado por titulação da água ultrapura e da solução de quitosana, assim como o controle do processo foi obtido por titulação da solução inicial e final de fagos, dispersão de fago em quitosana pH 4,6 e pH 7,3. O encapsulamento efetivo ocorreu quando a solução final apresentou a titulação desejada (1×10^{11} TU/mL) e o sobrenadante da centrifugação após ajuste para pH 7,3 não apresentou titulação significativa.

Para caracterização das nanopartículas de quitosana-bacteriófago por microscopia foram testadas diferentes estratégias de marcação dos fagos. Inicialmente utilizando DAPI, diluído 1:5000 v/v em água ultrapura, uma alíquota de fago silvestre (4×10^{14} TU/mL) foi incubada por uma hora em temperatura ambiente, com proteção à luz, sob leve agitação. Os fagos foram precipitados com PEG 8000, por 16 horas a 4°C, em gelo e centrifugados a 6.720 g a 4°C por 40 minutos. O precipitado foi ressuscitado em 200 µL de TBS para o processamento da nanopartícula conforme descrito acima.

Em uma segunda estratégia de marcação de fago, utilizando Alexa flúor 633, o qual emite fluorescência vermelha, foram incubadas por 1 h nanopartículas de quitosana-bacteriófago com anticorpo anti-bacteriófago produzido pelo Laboratório de Imunoquímica, diluído 1:500 v/v em água ultrapura. Após ajustar o pH para 7,3 e centrifugar a 10.000 g por 30 minutos a 25°C, o precipitado foi lavado com PBS por 5 minutos, sob leve agitação. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o precipitado foi incubado com anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo marcado com Alexa flúor 633.

Finalmente, na terceira estratégia, a interação de nanopartículas de quitosana-bacteriófago foi caracterizada por microscopia utilizando quitosana-fluoresceína (FITC), conforme descrito por Quemeneur *et al.* (2007) e fagos marcados com Alexa-flúor 633, conforme descrito pelo fabricante (Thermo Scientific, Estados Unidos). Em síntese, 500 mg de quitosana purificada foram dissolvidos em 50 mL de HCl 0,1 M. Em seguida, 12,5 mL de solução de isotiocianato de fluoresceína 1 mg/mL em metanol foram adicionados e mantidos sob agitação por 3 hs em temperatura ambiente. A solução foi neutralizada com NaOH 1 M, centrifugada a 10.000 g por 10 minutos e lavada com etanol 70% v/v em água ultrapura. O produto foi submetido à secagem em estufa a vácuo a 40°C, protegido da luz, por 48 hs e mantido a -20°C até a utilização para marcação de nanopartículas de quitosana-fago.

Para marcação dos fagos, o fago 3P30 foi incubado com anticorpo monoclonal anti-M13 (27942101, GE Health Care, Inglaterra) por uma hora e marcado com anticorpo produzido em cabra anti-IgG de camundongo conjugado ao Alexa-flúor 633 (A21050, Thermo Scientific, Estados Unidos) por uma hora em temperatura ambiente, sob leve agitação (JAYE *et al.*, 2004). A quitosana 1 mg/mL, contendo 10% de quitosana fluorescente foi dispersa em ácido acético 0,3 M com acetato de sódio 0,2 M para o processo de encapsulamento, conforme descrito anteriormente.

Em seguida, as nanopartículas foram fotografadas em microscópio confocal de varredura a laser, modelo A1 MP+ (NIKON Instruments Inc., Japão), utilizando objetiva de 40 x (NA 1.40, imersão a óleo). Para as imagens fluorescentes, as moléculas de Alexa-flúor 633 foram excitadas a 621-639 nm e a emissão foi capturada a 645-655 nm. Para FITC, a excitação esteve em torno de 475 a 495 nm e a emissão 520 a 560 nm.

Todas as imagens foram capturadas com o software Nis Elements 4.20 (NIKON, Japão) e as mensurações processadas utilizando o software ImageJ v1.51 em plano equatorial para minimizar o erro devido ao posicionamento da porção escaneada.

Para microscopia eletrônica de transmissão (TEM), nanopartículas de quitosana-fago foram preparadas na diluição 1:5 v/v em água ultrapura. Aproximadamente 10 µL da amostra foram depositados no *grid* de cobre revestido com filme de carbono. A gota formada foi absorvida por papel filtro após 30 segundos de contato com o *grid*, sendo permitida a secagem em temperatura ambiente. Para a coloração negativa do fago não revestido foi utilizado o contraste acetato de uranila 2%. O exame morfológico das nanopartículas de quitosana-fago foi realizado em microscópio JEOL (JEM 1200 EX II, Japão), com voltagem de aceleração de 100 kV. As imagens foram gravadas com o auxílio de câmera CCD (Orius BioScan modelo 792) e software *Gatan digital micrograph* com resolução mínima de 2004 x 1335 pixels.

4.4.3 Imunização com nanopartículas de quitosana-bacteriófago em camundongos

A imunogenicidade de formulações de quitosana foi avaliada em camundongos Swiss por um esquema de imunização intranasal constituído de três aplicações com intervalo de 14 dias entre as imunizações. Em síntese, 30 µg de antígeno (10^{11} fagos por mL associado ou não com quitosana 1 mg/mL) em 10 µL de PBS foram administrados no plano nasal com o auxílio de micropipeta. Cada grupo foi constituído de quatro animais, estabelecendo seis tratamentos (QUADRO 5).

Nanopartículas com fago 3P30 ou fago silvestre foram administradas aos grupos 1 e 4, respectivamente. O grupo 2 e 5 foram tratados com antígenos livres 3P30 ou fago silvestre, respectivamente. No grupo 3, um estudo *pulse-chase* foi estabelecido para avaliar se a atividade adjuvante pode ser observada quando a quitosana for co-administrada com o fago, sem a formação de nanopartículas. Nesse estudo o intervalo entre a administração das soluções de quitosana e de bacteriófago foi de 2 hs para prevenir que o fago e a quitosana interagissem após a administração, antecipando que a quitosana catiônica seria prontamente neutralizada pela mucina carregada negativamente e/ou depurada pela atividade mucociliar (ILLUM, 2001). Por último, no grupo 6 os animais foram tratados somente com solução de quitosana, como grupo controle.

GRUPOS	IMUNÓGENO	CONCENTRAÇÃO	VOLUME
1	NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA+FAGO 3P30	1×10^{11} TU/mL em quitosana 1 mg/mL	10 μ L
2	FAGO 3P30	1×10^{11} TU/mL	10 μ L
3	QUITOSANA + 2 hs + FAGO 3P30	quitosana 1 mg/mL; fago 1×10^{11} TU/mL	10 μ L
4	NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA + FAGO SILVESTRE	1×10^{11} TU/mL em quitosana 1 mg/mL	10 μ L
5	FAGO SILVESTRE	1×10^{10} TU/mL	10 μ L
6	QUITOSANA	1 mg/mL	10 μ L

QUADRO 5: Delineamento experimental de imunização com nanopartículas de quitosana e bacteriófagos. Seis grupos de quatro unidades experimentais foram imunizados com nanopartículas de fago 3P30 que expressa peptídeos miméticos de AFB1 (grupo 1) ou fago silvestre (grupo 4), assim como com antígenos livre fagos 3P30 (grupo 2) ou fago silvestre (grupo 5). O grupo 6 (controle) foi imunizado somente com solução de quitosana.

Os animais foram mantidos em caixas individualizadas em condições controladas de temperatura e luminosidade no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Alimentação e água foram oferecidas *ad libitum* e a maravalha foi trocada a cada 2 ou 3 dias durante todo o período do experimento. A inocuidade das preparações vacinais foi avaliada em relação à possível toxicidade residual do polímero e purificados de bacteriófagos, sendo os animais avaliados a cada 2 ou 3 dias quanto à presença de sinais clínicos e mortalidade.

As amostras de sangue foram obtidas via plexo infraorbital 35 dias após o início do esquema de imunização e as amostras de soro foram mantidas a -20°C até a análise por ELISA, conforme descrito anteriormente (item 4.3.2). Para avaliação da produção de anticorpos na mucosa foram coletadas amostras de lavados intestinal e broncoalveolar 38 dias após a última imunização, utilizando procedimento descrito por Vila *et al.* (2004).

A eutanásia dos camundongos foi realizada com sobredose de anestésico, quetamina 150 mg/mL e xilazina 15 mg/mL, seguida de deslocamento cervical. Em fluxo laminar, após fixação das patas em placa de isopor, foi realizada a assepsia da pele abdominal e incisão com auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas esterilizadas. O intestino foi coletado por meio de incisões na junção pilórica e no ânus, assim como traqueia e pulmões foram removidos conjuntamente.

Os lavados intestinais foram obtidos por secção de segmentos de 15 cm de intestino a partir do piloro, perfundindo 1 mL de solução de lavagem gelada (0,9% NaCl, 1mM PMSF – fluoreto fenilmetanosulfonila; 10 mM EDTA). O segmento intestinal foi seccionado longitudinalmente e a superfície luminal foi levemente raspada para lavagem com 3 mL de solução de lavagem. Em seguida, as amostras foram sonicadas em gelo por 30 s e 20 W para extração de imunoglobulinas da mucina. As condições de centrifugação foram 19.000 g por 90 minutos a 4°C e o sobrenadante foi imediatamente congelado para posterior liofilização por 24 hs. As amostras liofilizadas foram reconstituídas em 200 µL de PBS estéril e diluídas 1:10 para ensaio imunoenzimático, conforme descrito anteriormente (item 4.3.2), exceto pelo anticorpo secundário, produzido em cabra, anti-IgA de camundongo conjugado à peroxidase (A4789, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), diluído 1:2.500 em tampão de incubação.

Para obtenção de lavados broncoalveolares foram injetados 4 mL de meio de lavagem gelado (0,9% NaCl, 0,05% v/v Tween 20 e 1 mM de PMSF) pela traqueia para inflar os pulmões com o auxílio de cateter intravenoso periférico estéril (24 GA x 0,75"; 0,7 x 19 mm; 17 mL/min; BD). Após recuperar a solução, comprimindo os pulmões e aspirando a solução injetada, as amostras foram mantidas em tubo plástico estéril em gelo até o processamento de todas as amostras. As condições de centrifugação foram 19.000 g por 90 minutos a 4°C e o sobrenadante foi imediatamente congelado para posterior liofilização por 24 hs. As amostras liofilizadas foram reconstituídas em 200 µL de PBS estéril e diluídas 1:10 para ensaio imunoenzimático, conforme descrito anteriormente (item 4.3.2), exceto pelo anticorpo secundário anti-IgA de camundongo conjugado à peroxidase, diluído 1:2500 em tampão de incubação.

5 RESULTADOS

5.1 ETAPA 1: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-AFLATOXINA

Os imunógenos conjugados às proteínas carreadoras foram caracterizados pelo ensaio de *dot blot* e espectrometria de massas. Para realização do *dot blot* (item 4.1.2) foi adsorvido à membrana de nitrocelulose AFB1-BSA, AFB1-KLH ou somente proteínas carreadoras. A presença das proteínas carreadoras foi constatada por meio de coloração de Ponceau (FIGURA 8, A e B). A reatividade frente ao anticorpo policlonal comercial anti-AFB1 foi indicativa da presença de toxina nas amostras conjugadas (FIGURA 8, C e D).

Não foi possível diferenciar a reatividade entre KLH e composto carregado AFB1-KLH, pois o anticorpo comercial policlonal anti-AFB1 foi produzido com imunógeno AFB1-KLH (FIGURA 8, C). A diferença na reatividade foi evidenciada somente para BSA e AFB1-BSA (FIGURA 8, D). No *spot* somente com BSA, não houve evidência de reatividade com anti-AFB1 (FIGURA 8, D1), enquanto que no *spot* BSA-AFB1 foi observada reação positiva (FIGURA 8, D2), indicando a presença da toxina acoplada à proteína carreadora. A presença de BSA e KLH também foi confirmada em todos os *spots* por incubação com anticorpos específicos anti-BSA e anti-KLH, respectivamente.

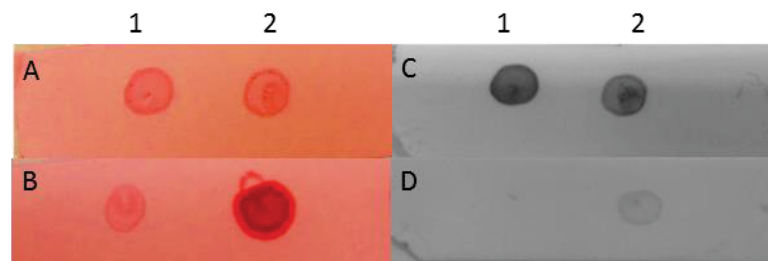


FIGURA 8: Conjugação de AFB1 a KLH e BSA demonstrada por *dot blot*. Coloração de Ponceau em (A) KLH (1) e KLH-AFB1 (2); e (B) BSA (1) e BSA-AFB1 (2). Após incubação com anti-AFB1, não foi possível diferenciar KLH (C1) e AFB1-KLH (C2). Por outro lado, a incubação com anti-AFB1 foi verificada com adsorção de AFB1-BSA (D2) à membrana de nitrocelulose, mas não com BSA (D1). Anticorpo conjugado, produzido em cabra, anti-imunoglobulina de coelho-peroxidase adicionado ao substrato foi revelado por DAB/cloronaftol.

A análise por espectrometria de massas permitiu a identificação de um padrão da composição elementar da amostra de BSA (FIGURA 9, A). Foi observado aumento da massa do composto AFB1-BSA, por deslocamento dos picos de relação massa e carga (m/z), podendo estimar aproximadamente uma molécula de AFB1 por molécula de BSA (FIGURA 9, B). Para AFB1-KLH e AFM1-KLH não foi possível verificar a conjugação devido à elevada massa molecular da proteína carreadora.

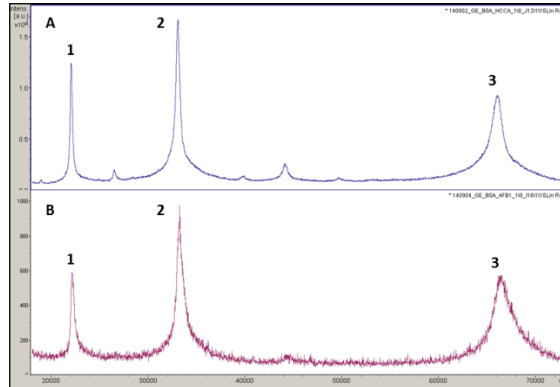


FIGURA 9: Espectrometria de massas AFB1-BSA. (A) Padrão amostra BSA (1) 22,030 kDa, (2) 33,075 kDa e (3) 66,127 kDa. (B) AFB1-BSA, (1) 22,126 kDa, (2) 33,227 kDa, (3) 66,501 kDa.

Com os resultados de acoplamento parcialmente confirmados por *dot blot* e espectrometria de massas, as toxinas foram utilizadas em imunizações nos camundongos com AFM1-KLH e nas aves com AFB1-BSA (item 4.1.3). Entretanto, os camundongos vieram a óbito após a quarta imunização, impedindo uma investigação mais profunda. Não foi possível realizar a necropsia dos camundongos imunizados, os quais também não apresentaram sinais clínicos ou alterações de comportamento durante as observações a cada dois a três dias.

Desta forma, amostras de toxinas carregadas foram reanalisadas por espectrometria de massas. Devido à possibilidade de encontrar toxina residual livre, foi analisado o padrão de baixa massa molecular (FIGURA 10A). Vários padrões de polímeros foram encontrados, podendo ser indicativo da presença de AFB1 livre na amostra, assim como de resíduos de conjugação. Com a aquisição do produto comercial AFM1-BSA foi possível observar o padrão de toxina carregada estabelecido pelo fabricante de aproximadamente sete moléculas de AFM1 acopladas a cada molécula de BSA. (FIGURA 10B).

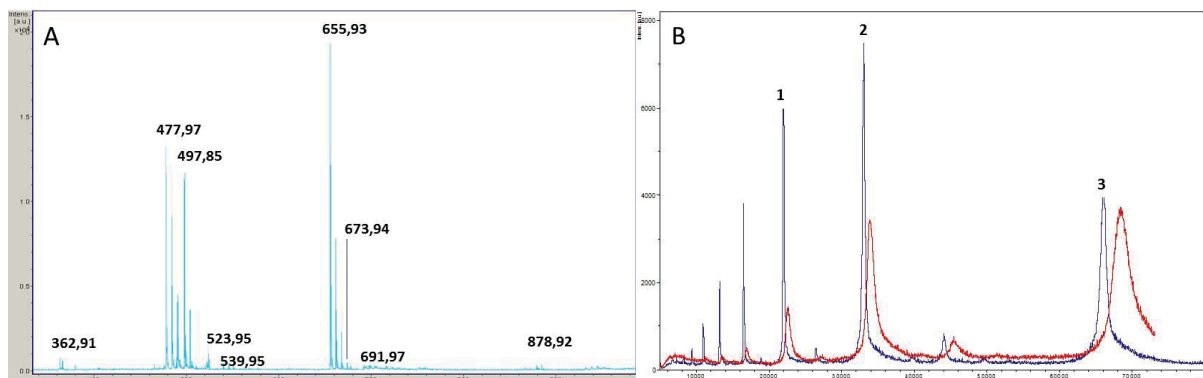


FIGURA 10: Espectrometria de massas (A) AFB1-BSA, baixa massa molecular. AFB1 (312 Da) e dímeros. (B) BSA (azul), (1) três cargas positivas 22,012 kDa, (2) duas cargas positivas 33,028 kDa e (3) uma carga positiva 66,050 kDa. Em vermelho AFM1-BSA comercial (1) 22,577 kDa, (2) 33,900 kDa e (3) 68,433 kDa.

De posse da evidência de intoxicação dos camundongos, foi investigada a intoxicação das aves inoculadas. Assim, finalizado o esquema de imunização das aves imunizadas com AFB1-BSA, amostras de sangue total foram coletadas para análise por hemograma e citometria de fluxo e os animais foram submetidos à eutanásia. As amostras de sangue total com anticoagulante foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, do Hospital Veterinário, Setor de Ciências Agrárias, UFPR.

Pela avaliação clínica, a galinha 1 apresentava peso corporal normal, entretanto à necropsia foi observado fígado amarelado, indicativo de lesão hepática. Na galinha 2 foi observada caquexia, principalmente por atrofia da massa muscular peitoral, mas à necropsia não foram observadas alterações macroscópicas. Em relação à análise hematológica, foram observadas anemia e leucopenia na galinha 1, indicando possivelmente a ação mielotóxica da aflatoxina (TABELA 1).

TABELA 1: Valores hematológicos obtidos de duas aves imunizadas com AFB1-BSA para produção de anticorpos anti-aflatoxina. Valores numéricos de hemácias, hematócrito, hemoglobina, leucócitos totais, heterófilos e linfócitos.

Parâmetros	Valor de referência	GALINHA 1		GALINHA 2	
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	2,5-3,5	1,36		2,28	
Hematócrito (%)	22-35	25		36	
Hemoglobina (g/dL)		13,2		13,4	
Leucócitos totais ($/\mu\text{L}$)	12000-30000	3000		1.000	
	$/\mu\text{L}$	%	$/\mu\text{L}$	%	$/\mu\text{L}$
Heterófilos	3000-6000	90	2900	96	11520
Linfócitos	7000-17500	10	100	4	480

FONTE: QUINTEIRO FILHO (2008) e a AUTORA.

Verificou-se também que o perfil imunológico celular foi semelhante entre as aves, exceto por redução do percentual de monócitos supressores da resposta de linfócitos T (MHCII-, Kul1A+) na galinha 1 (0,5%) em relação à galinha 2 (7,7%) (FIGURA 11, E e F). Os valores apresentados de leucócitos totais (CD45+), linfócitos T auxiliares (LTCD4+, TCRv β 1+/-), linfócitos T citotóxicos (LTCD8+, CD28+/-), linfócitos B (Bu1+) e monócitos (MHCII+/-, Kul1A+) são listados na FIGURA 11.

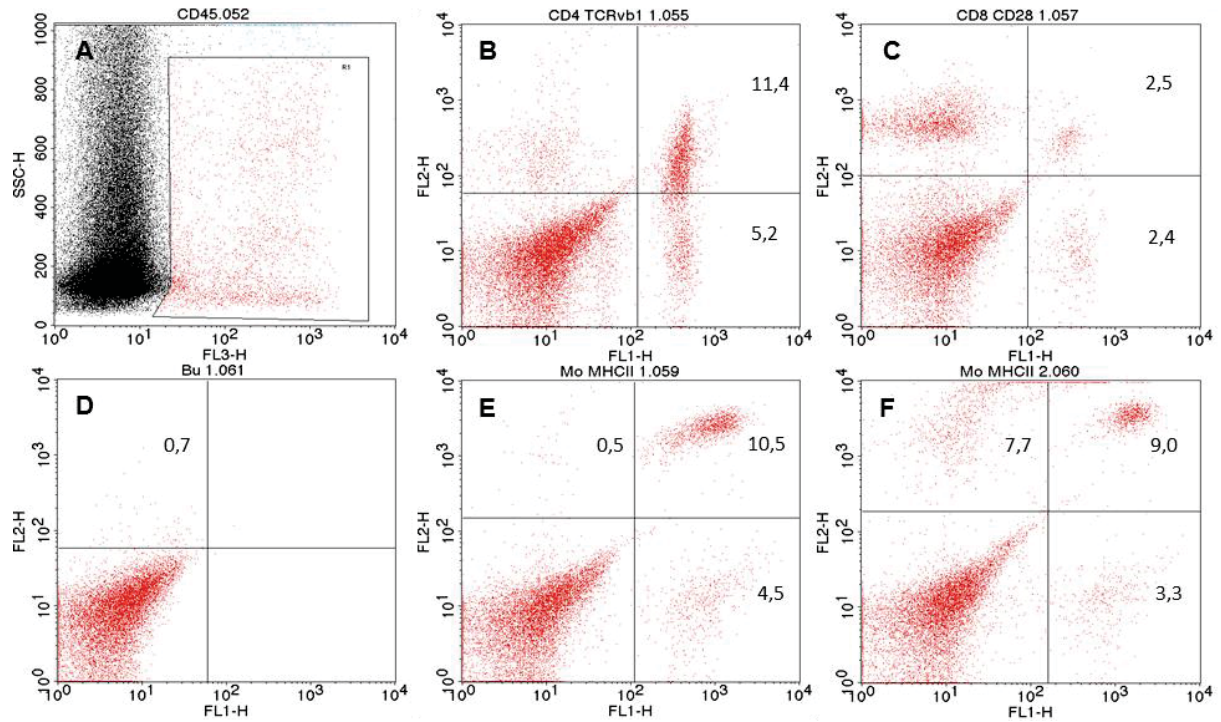


FIGURA 11: Perfil imunológico celular de aves imunizadas com AFB1-BSA demonstrando redução da população de monócitos supressores da resposta de linfócitos T na galinha 1. (A) leucócitos totais; (B) linfócitos T auxiliares; (C) linfócitos T citotóxicos; (D) linfócitos B; (E) monócitos galinha 1, (F) monócitos galinha 2.

Após a eutanásia dos animais, fragmentos de baço e fígado foram coletados para exame histopatológico, sendo possível observar degeneração gordurosa no fígado, com vacuolização de hepatócitos, principalmente na galinha 1. No baço houve redução do tamanho de folículos linfóides (FIGURA 12).

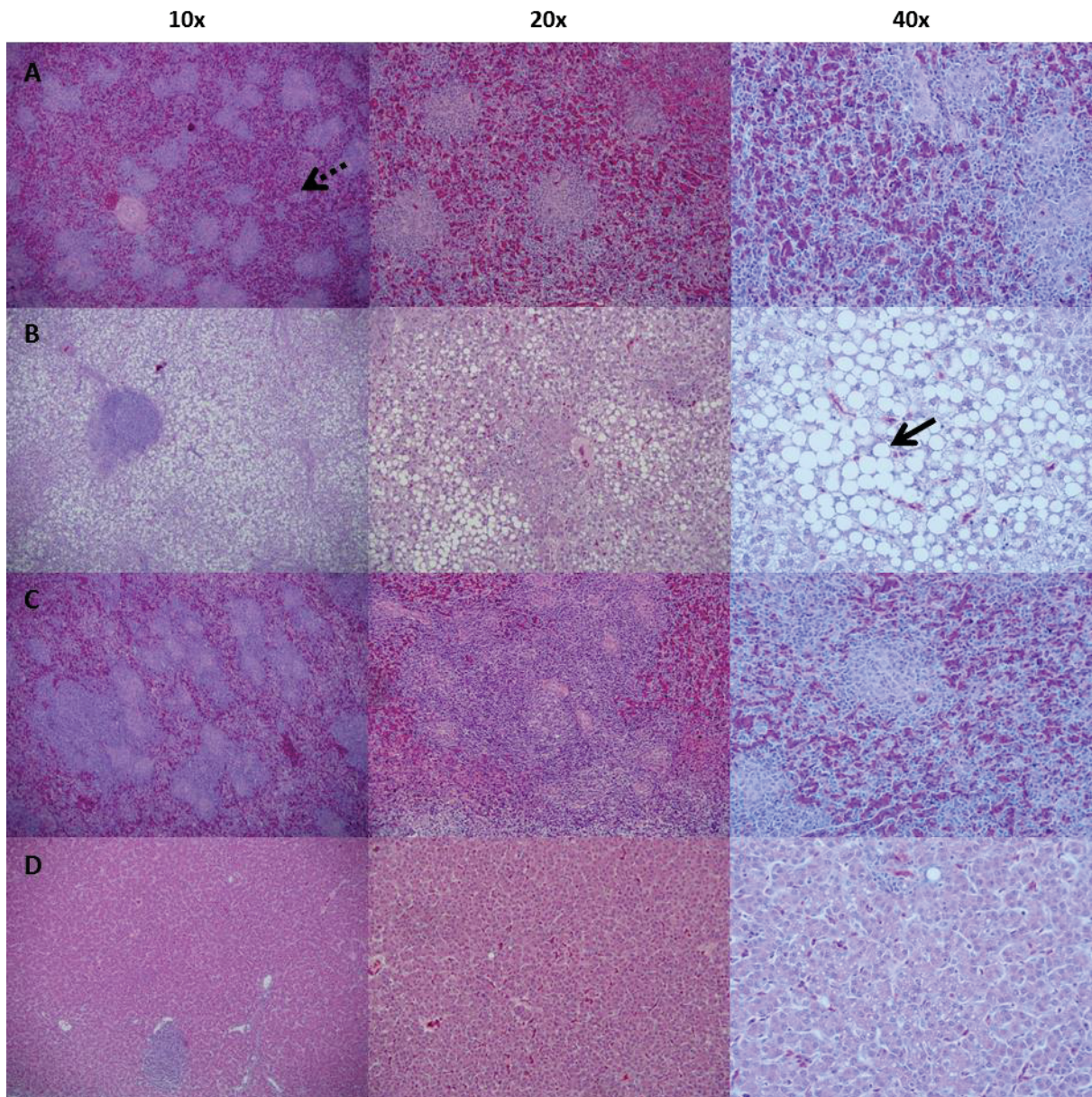


FIGURA 12: Alterações histológicas de aves imunizadas com AFB1-BSA, apresentando folículos linfóides reduzidos (SETAS PONTILHADAS) e vacuolização de hepatócitos (SETAS LARGAS). Baço (A) e fígado (B) da galinha 1; e baço (C) e fígado (D) da galinha 2, em aumento 10x, 20x e 40x.

Em resumo, as alterações mielotóxicas, citológicas e histopatológicas sugerem uma doença hepática severa compatível com intoxicação por aflatoxina B1 nas poedeiras comerciais imunizadas com AFB1-BSA, possivelmente pela presença de aflatoxina livre na solução imunógeno adjuvante. O mesmo pode ter ocorrido com os camundongos imunizados com AFM1-KLH, entretanto os animais vieram a óbito antes da coleta de amostras biológicas para comprovação da aflatoxicose.

Apesar da comprovação da intoxicação dos animais, foi possível coletar amostras de sangue e caracterizar a produção de anticorpos nos camundongos imunizados com AFM1-KLH e nas aves imunizadas com AFB1-BSA, tendo sido padronizado o ensaio indireto conforme descrito no item 4.1.4. No ensaio com soro de camundongos, à placa foi adsorvida outra proteína (BSA ou AFM1-BSA) para verificar a reatividade de anticorpos produzidos contra a aflatoxina após as imunizações. O controle positivo do ensaio foi obtido com KLH adsorvido à placa, testado com os soros dos camundongos. Os controles BSA e BSA-AFM1 adsorvidos individualmente à placa foram realizados com soro anti-BSA, produzido pelo Laboratório de Imunoquímica de proteínas, na diluição 1:800 v/v em tampão de incubação.

Desta forma, foi possível observar que os camundongos imunizados com AFM1-KLH produziram anticorpos, porém não foi possível evidenciar a produção de anticorpos específicos contra a toxina (GRÁFICO 1, coluna AFM1-BSA). A produção de anticorpos foi direcionada para a proteína carreadora KLH, assim como houve reatividade cruzada com BSA, que não foi utilizada na imunização. Isso ocorre devido à alta massa molecular da proteína KLH (390 kDa), expondo muito epítomos que podem causar reação cruzada com sítios semelhantes da proteína BSA. Para evitar essa resposta inespecífica seria conveniente utilizar a toxina diretamente à placa, entretanto a aflatoxina livre não adsorve ao poliestireno.

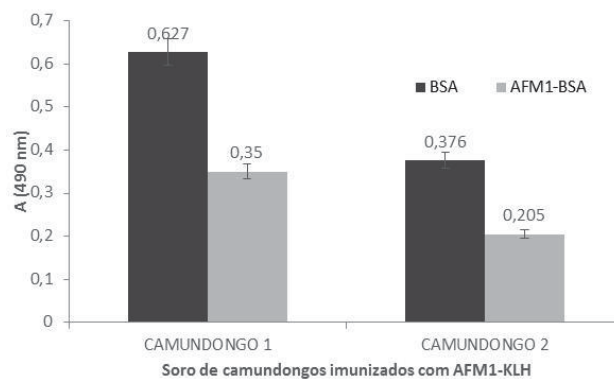


GRÁFICO 1: Reatividade dos anticorpos produzidos em camundongos imunizados com AFM1-KLH, por ELISA. Foram adsorvidas à placa as soluções de BSA e AFM1-BSA 20 µg/mL, adicionando-se soros de camundongos diluídos 1:800 em tampão de incubação e posteriormente anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo produzido em cabra, marcado com peroxidase e substrato específico. A reatividade do soro pré-imune foi subtraída da absorbância (490 nm) de cada soro.

Com relação à produção de anticorpos em aves, inesperadamente, os soros pré-ímmunes apresentaram reatividade contra BSA, indicando possível contato prévio destas aves com imunógenos vacinais que continham ou que reagem com BSA. No GRÁFICO 2, observa-se a reatividade dos soros das aves imunizadas com AFB1-BSA, após subtração da absorbância dos soros pré-ímmunes.

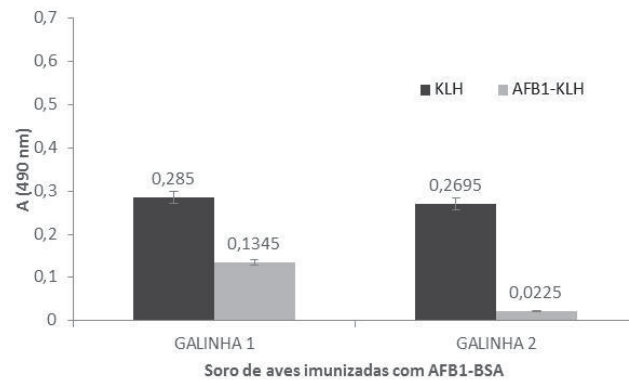


GRÁFICO 2: Reatividade dos anticorpos produzidos em aves imunizadas com AFB1-BSA, por ELISA. Foram adsorvidas à placa as soluções de KLH e AFM1-KLH 20µg/mL, adicionando-se soros de aves diluídos 1:400 em tampão de incubação e posteriormente anticorpo produzido em coelho anti-IgY de galinha conjugado à peroxidase e substrato específico. A reatividade do soro pré-imune foi subtraída da absorbância (490 nm) de cada soro.

Apesar de não ter sido comprovada a produção de anticorpos específicos anti-AFB1, foi possível precipitar anticorpos do isotipo IgY da gema do ovo das aves em experimentação. O rendimento obtido na precipitação de IgY foi de aproximadamente 2,5 mg/mL.

A estratégia de produção de anticorpos anti-AFM1 em camundongos e anti-AFB1 em aves não gerou os resultados esperados pelo baixo rendimento de conjugação das toxinas às moléculas carreadoras. Os animais produziram anticorpos contra o imunógeno, mas a resposta foi direcionada para as proteínas carreadoras. Desta forma, para a seleção de bacteriófagos que mimetizam a estrutura química da AFB1, foram adquiridos comercialmente anticorpos monoclonais e policlonais anti-AFB1 (A9555 e A8679, respectivamente, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e utilizados para realização da técnica de *phage display*.

5.2 ETAPA 2: PHAGE DISPLAY

Após amplificação das bibliotecas, observou-se a manutenção da titulação de fagos na biblioteca de 12-mer, cuja representação dos peptídeos apresenta a configuração XCX_8CX . Por outro lado, observou-se que as demais bibliotecas apresentaram aumento da titulação, indicando uma maior repetição de fagos representando os referidos peptídeos (TABELA 2).

TABELA 2: Titulações das bibliotecas de 8 a 17-mer após amplificação. As bibliotecas denominadas LX-4, LX-8, X15 e X8CX8, onde X representa resíduo aleatório de aminoácido e C representa cisteína, apresentaram as seguintes alterações nas titulações após o protocolo de amplificação.

BIBLIOTECA	REPRESENTAÇÃO DOS PEPTÍDEOS		Titulação antes da amplificação (TU/mL)	Titulação após a amplificação (TU/mL)
LX-4	XCX_4CX	8-mer	$6,29 \times 10^{12}$	$1,86 \times 10^{13}$
LX-8	XCX_8CX	12-mer	$1,1 \times 10^{11}$	1×10^{11}
X ₁₅	X ₁₅	15-mer	$5,7 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^{12}$
X ₈ CX ₈	X ₈ CX ₈	17-mer	4×10^8	8×10^{11}

A partir dos clones recuperados nas titulações parciais de cada ciclo de seleção foram realizados os *screenings*, conforme descrito no item 4.2.3, permitindo a comparação da especificidade dos clones das diferentes estratégias de seleção. Em relação às titulações finais, valores mais altos eram esperados, pois indicam que as amplificações durante os ciclos de seleção foram eficientes para aumentar o número de fagos recuperados (TABELA 3).

TABELA 3: Resultados dos ciclos de seleção realizados. Titulações parcial e final em TU/mL e clones recuperados em cinco estratégias de seleção (I a V), utilizando diferentes anticorpos adsorvidos à placa.

	Estratégias de seleção com os seguintes anticorpos adsorvidos à placa (10 μ g/mL)	Titulação parcial	Titulação final	Clones recuperados
I	Anticorpo policlonal anti-AFB1	$1,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{10}$	12
II	Anticorpo policlonal anti-AFB1, após reamplificação das bibliotecas	1×10^5	8×10^{13}	33
III	Anticorpo policlonal anti-AFB1, após seleção negativa com IgG de coelho	1×10^3	$3,4 \times 10^8$	20
IV	Anticorpo monoclonal anti-AFB1	$6,6 \times 10^8$	$3,4 \times 10^{12}$	20
V	Anticorpo monoclonal anti-AFB1 com redução do <i>input</i> de fagos das bibliotecas e alteração da eluição e recuperação de fagos ligantes	6×10^2	1×10^{11}	80

Não houve diferença entre as titulações parciais encontradas nas estratégias de seleção I e II, podendo indicar uma mesma recuperação de fagos. Entretanto, não é possível afirmar que houve uma mesma expressão de sequência aminoacídica de peptídeos recuperados nas duas estratégias. Desta forma foram testados os 45 clones, mas não foi observada reatividade contra o anticorpo comercial policlonal anti-AFB1.

Para a estratégia III, em que foram eliminados os fagos selecionados por imunoglobulina de coelho não imunizado, houve redução da quantidade de fagos recuperados na titulação parcial na proporção de 100 TU/mL. A partir desta estratégia foram selecionados 20 clones para serem testados por ELISA, mas não foi verificada reatividade frente ao anticorpo anti-AFB1 adsorvido à placa.

Por outro lado, na estratégia de seleção com anticorpo monoclonal comercial (IV) foi obtida a maior quantidade de fagos recuperados em relação aos ciclos de seleção realizados anteriormente. A redução de fagos recuperados seria desejável, pois indica sucesso na biosseleção de fagos específicos ao anticorpo. A fim de se obter tal resultado, os ciclos de seleção subsequentes com anticorpos monoclonais anti-AFB1 foram realizados com redução na concentração de anticorpos (5 e 1 $\mu\text{g/mL}$) para reduzir a recuperação de fagos inespecíficos. Foram selecionados 20 clones para serem testados por ELISA, mas não foi obtido sucesso na seleção.

Frente à dificuldade de obter fagos ligantes de anticorpos anti-AFB1 foi pesquisada a especificidade dos clones selecionados em ELISA com fagos adsorvidos à placa, sendo o restante do procedimento conforme descrito no item 4.2.3. Os ensaios realizados com *pool* de fagos e com os clones individualizados infelizmente não evidenciaram a presença de nenhum fago reativo ao anticorpo anti-AFB1. Inespecificamente, o *pool* de fagos apresentou reatividade frente ao anticorpo anti-BSA, controle negativo da reação.

Somente na estratégia V foi obtido sucesso na seleção de fagos ligantes de anticorpo monoclonal anti-AFB1, sendo realizada a metodologia de recuperação de fagos ligantes por eluição ácida e a sonicação, conforme descrito por LUNDER *et al.* (2008), com algumas modificações (item 4.2.2). Em síntese, a seleção de fagos foi realizada com anticorpo monoclonal anti-AFB1 adsorvido à placa em concentrações decrescentes entre os *pannings* (10 $\mu\text{g/mL}$, no primeiro ciclo; 5 $\mu\text{g/mL}$ no segundo ciclo e 1 $\mu\text{g/mL}$ no terceiro e último ciclo), com o objetivo de obter maior afinidade e especificidade de seleção. O input de fagos foi representado por uma concentração final de todas as bibliotecas juntas de 1×10^{11} TU/mL, sendo que nas estratégias anteriores cada biblioteca foi adicionada na concentração de 1×10^{11} TU/mL. Diferentemente das outras estratégias, um procedimento repetitivo de remoção de fagos inespecíficos, envolvendo 29 lavagens, foi realizado tanto com TBS-T 0,2% quanto com solução de eluição ácida. Somente após este processo, os fagos específicos foram recuperados em solução tamponada de glicina, associada à sonicação.

A seleção de peptídeos miméticos de aflatoxina B1 expressos na superfície de bacteriófagos foi possível somente no terceiro ciclo de seleção com anticorpos monoclonais anti-AFB1 e recuperação dos fagos específicos por eluição ácida com sonicação, detectando sequências aminoacídicas altamente reativas ao anticorpo anti-AFB1. O GRÁFICO 3 ilustra o enriquecimento de seleção de fagos específicos anti-AFB1 por três ciclos de seleção (PI, PII e PIII) e a reatividade média dos fagos recuperados ao final dos *pannings*, subtraído o controle negativo (fago silvestre). Após três ciclos de seleção, um significativo enriquecimento da afinidade dos fagos foi obtido, indicado por redução de 10^2 TU/mL na recuperação de fagos entre o primeiro e segundo *pannings*. Por outro lado, a reatividade dos fagos eluídos aumentou após o terceiro ciclo de seleção, sendo ao menos oito vezes maior que o segundo *panning*.

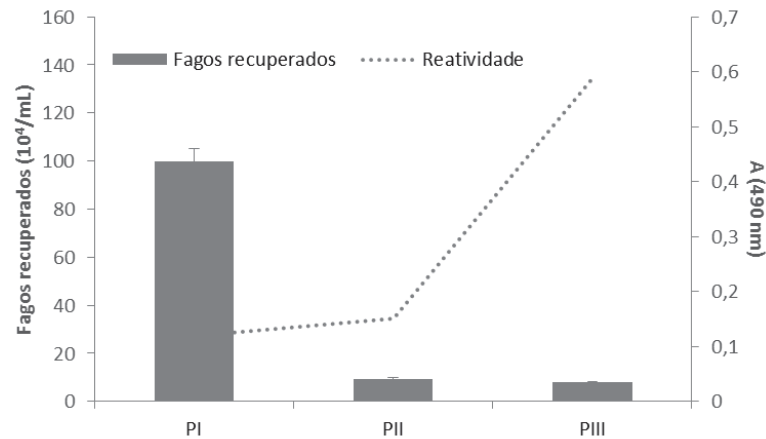


GRÁFICO 3: Enriquecimento da reatividade dos fagos obtidos nos *pannings* com anticorpo monoclonal anti-AFB1 após três ciclos de seleção. O número de partículas virais recuperadas após cada *panning* (PI, PII e PIII) e a reatividade contra anti-AFB1 são demonstradas como TU (*transduction units*)/mL e absorvância (490 nm), respectivamente. A média de absorvância do fago silvestre (duplicata) foi subtraída da absorvância de cada *panning*.

Clones individuais foram obtidos após screening baseado na habilidade de se ligar ao anticorpo monoclonal anti-AFB1 (GRÁFICO 4). Considerando 80 clones randomicamente selecionados dos *pannings*, nove clones foram reconhecidos por anticorpo contra aflatoxina, exibindo reatividade ao menos 20 vezes maior que a reatividade do fago silvestre. Estes resultados indicam que a reatividade dos clones de fagos selecionados ocorre entre anticorpos e peptídeos fusionados na proteína maior do capsídeo viral.

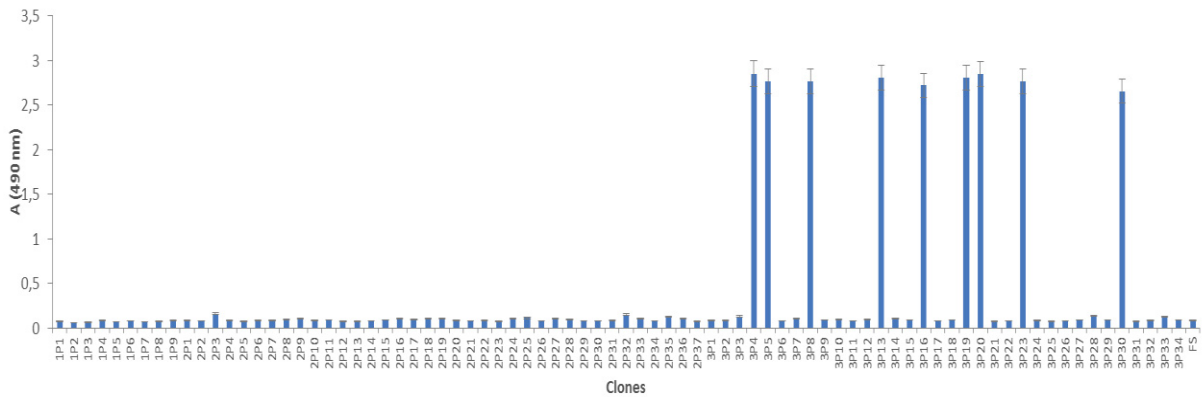


GRÁFICO 4: *Screening* dos clones de fagos recuperados. Colônias individualizadas contendo fagos de cada panning foram amplificadas e analisadas por ELISA quanto à ligação ao anticorpo específico anti-AFB1 adsorvido à placa. Fagos ligantes foram detectados utilizando anticorpo anti-M13 conjugado à peroxidase, produzido em camundongo. Reatividade demonstrada como absorbância (490 nm), tendo o fago silvestre como controle.

Após *screening* inicial, os fagos reativos foram titulados na concentração de 1×10^{12} TU/mL para avaliar a especificidade comparando com os resultados obtidos com fago irrelevante 3P25 e fago silvestre. Foram selecionados nove fagos com reatividade entre 1,267 e 2,709, sendo denominados de 3P4, 3P5, 3P8, 3P13, 3P16, 3P19, 3P20, 3P23, 3P30. A especificidade dos clones foi determinada como valores de absorbância com anticorpos monoclonal e policlonal anti-AFB1. O fago irrelevante 3P25 e o fago silvestre (FS) não apresentaram essas reatividades. A média da absorbância do fago silvestre foi subtraída da absorbância média de cada fago a 10^{12} TU/mL (GRÁFICO 5).

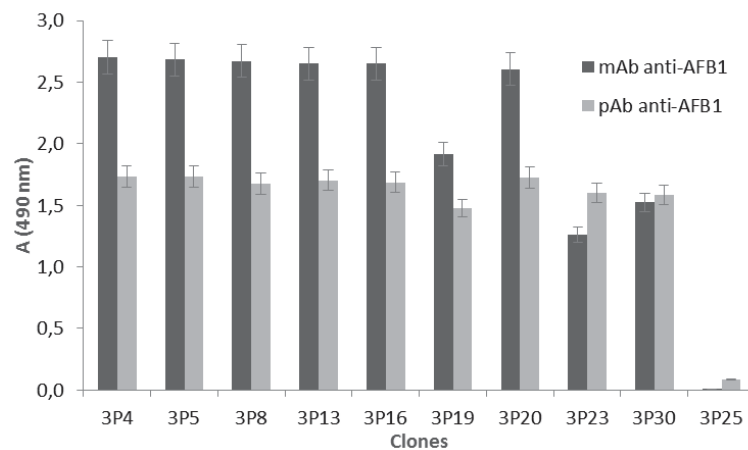


GRÁFICO 5: Especificidade de fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25) e silvestre (FS) na concentração de 10^{12} TU (*transduction units*)/mL contra anticorpo anti-AFB1 demonstrada como absorbância (490 nm). No ELISA, os anticorpos anti-AFB1 foram adsorvidos à placa na concentração fixa de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. A reação foi detectada pela adição de anticorpo anti-M13-peroxidase, produzido em camundongo.

Para determinar a especificidade da interação fago-anticorpo anti-AFB1, os fagos selecionados e amplificados foram testados contra anticorpos irrelevantes assim como contra BSA (GRÁFICO 6). Desta forma, a especificidade dos clones de fagos selecionados foi definida pela habilidade dos clones em serem reconhecidos somente por seus alvos cognatos – anticorpos monoclonal e policlinal anti-AFB1 – entre diferentes ligantes irrelevantes. Nenhum clone apresentou reatividade contra BSA e imunoglobulina de camundongo não imunizado (IgG murino). Por outro lado, os fagos 3P4, 3P5 e 3P16 exibiram reconhecimento contra anticorpos irrelevantes: imunoglobulina de coelho não-imunizado (IgG coelho) e anticorpo monoclonal anti-veneno loxoscélico (mAb 7), indicando que estes clones foram menos específicos que os outros clones selecionados.

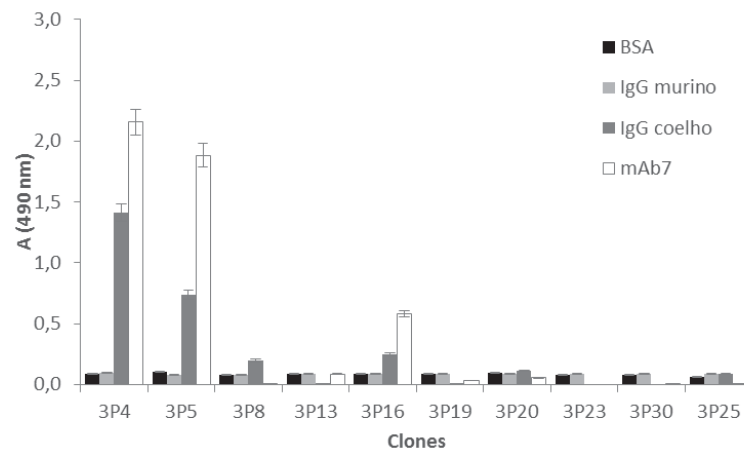


GRÁFICO 6: Especificidade de fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25) e fago silvestre (FS) na concentração de 10^{11} TU (*transduction units*)/mL contra BSA e anticorpos irrelevantes: policlinal de camundongo (IgG camundongo), policlinal de coelho não imunizado (IgG coelho) e monoclonal de camundongo (mAb7). No ELISA, os anticorpos citados foram absorvidos separadamente à placa na concentração fixa de $10 \mu\text{g/mL}$. A reação foi detectada por absorbância (490 nm) pela adição de anti-M13-peroxidase, produzido em camundongo.

Outros ensaios foram realizados para a caracterização da imunorreatividade e especificidade dos fagos selecionados, conforme descrito no item 4.2.3. A otimização da concentração de fagos para caracterizar a reatividade ao anticorpo anti-AFB1 foi observada em ensaio com diluições crescentes de fagos, em concentrações de 1×10^{11} TU/mL a 1×10^8 TU/mL (GRÁFICO 7). O ensaio imunoenzimático foi realizado em duplicata de cada diluição e tendo como controles negativos o fago irrelevante (3P25) e o fago silvestre nas mesmas concentrações. Desta forma, os fagos selecionados exibiram um perfil de reatividade dose-dependente, ou seja, a redução da concentração de fagos de 10^{11} a 10^8 TU/mL produziu um decréscimo na reatividade frente ao anticorpo monoclonal anti-AFB1. Todos estes resultados corroboram para indicação de que peptídeo expressos pelos fagos selecionados representam ligantes específicos do sítio de ligação do anticorpo mencionado.

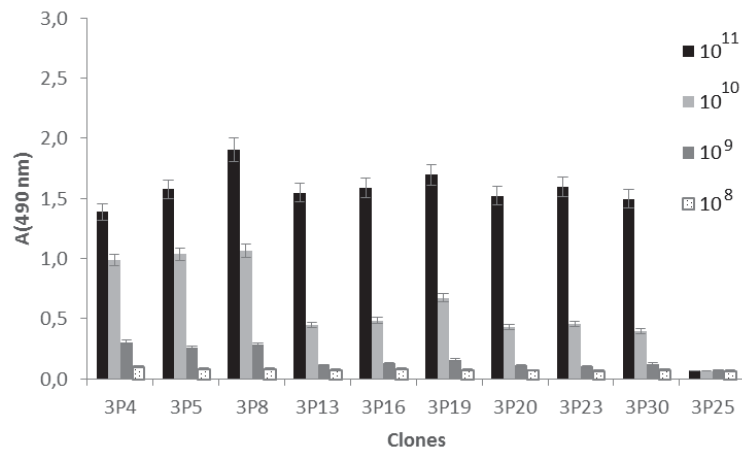


GRÁFICO 7: Especificidade de fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25) e silvestre (FS) nas concentrações de 10^{11} , 10^{10} , 10^9 e 10^8 TU (*transduction units*)/mL contra anticorpo monoclonal anti-AFB1 demonstrada como absorvância (490 nm). No ELISA, os anticorpos anti-AFB1 foram adsorvidos à placa na concentração fixa de $10 \mu\text{g/mL}$. A reação foi detectada por conjugado anti-M13-peroxidase, produzido em camundongo.

A fim de se verificar a especificidade do fago pelo anticorpo, foram realizados imunoenaios de competição por diferentes estratégias. Inicialmente o anticorpo anti-AFB1 foi adsorvido à placa na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ e diferentes concentrações de AFB1 (30-15-7,5-3,7-1,8-0,9-0,5-0 ng/mL) foram adicionadas com concentrações constantes de fagos específicos, fago irrelevante e fago silvestre (10^{11}TU/mL) (GRÁFICO 8). Todas as concentrações de aflatoxina estabelecidas foram capazes de inibir totalmente a ligação dos clones selecionados. Desta forma, as concentrações de aflatoxina foram suficientes para saturar o *input* de anticorpo, inibindo a reação com os mimotopos.

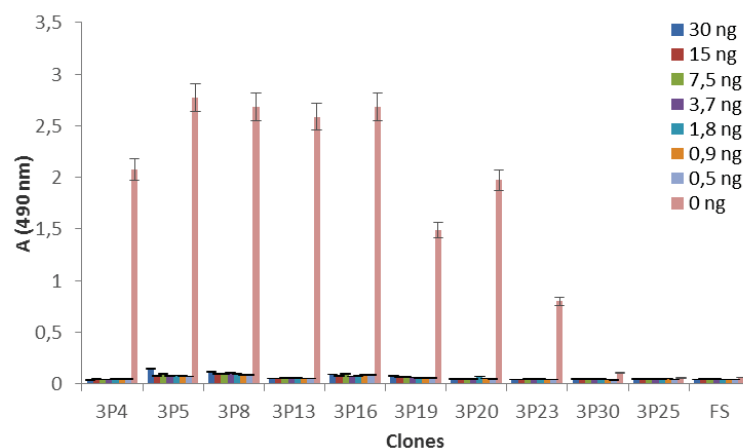


GRÁFICO 8: Reatividade de fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25) e silvestre (FS) por ELISA de competição com anticorpo anti-AFB1 adsorvido à placa. Fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25) e silvestre (FS) na concentração de 10^{11} TU (*transduction units*)/mL foram incubados com diferentes concentrações de AFB1 (30-15-7,5-3,7-1,8-0,9-0,5-0 ng/mL) e testados contra anticorpo anti-AFB1 adsorvidos à placa. A reação foi detectada por conjugado anti-M13-peroxidase, produzido em camundongo, como absorvância a 490 nm.

A mesma estratégia de competição foi realizada buscando respeitar as concentrações molares de antígeno e anticorpo para estabelecer a concentração de aflatoxina que permitiria a ligação dos mimotopos ao anticorpo. O anticorpo anti-AFB1 foi adsorvido à placa, conforme descrito anteriormente, tendo competição pelo alvo os fagos específicos, irrelevante e silvestre (10^{11} TU/mL) com as seguintes concentrações de aflatoxina: 400-200-100-50-25-12,5-6,25-0 pg/mL (GRÁFICO 9). Seria esperado o aumento da reatividade quando a concentração de aflatoxina diminuísse, entretanto também não foi possível estabelecer um padrão para o ensaio.

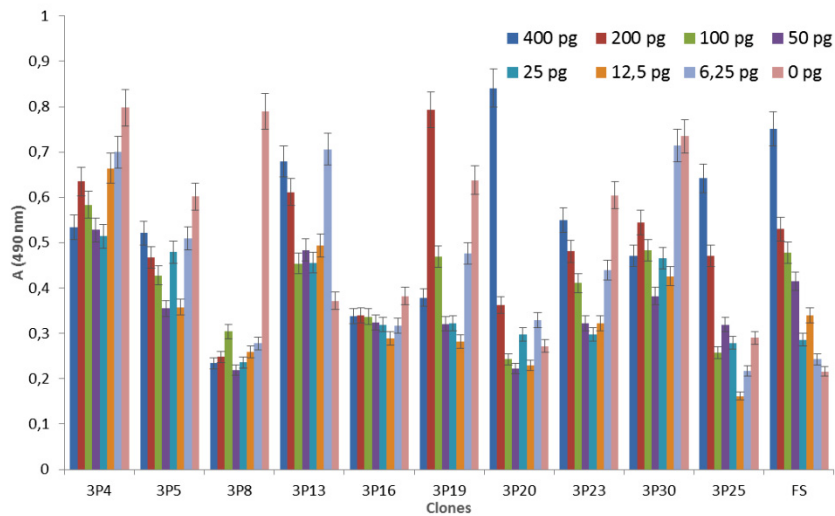


GRÁFICO 9: Reatividade de fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25) e silvestre (FS) por ELISA de competição com anticorpo anti-AFB1 adsorvido à placa, de acordo com a concentração molar de AFB1. Fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25) e silvestre (FS) na concentração de 10^{11} TU/mL foram incubados com diferentes concentrações de AFB1 (400-200-100-50-25-12,5-6,25-0 pg/mL) e testados contra anticorpo anti-AFB1 adsorvido à placa. A reação foi detectada por conjugado anti-imunoglobulina de coelho-peroxidase, produzido em cabra, como absorbância a 490 nm.

Uma segunda estratégia foi utilizada, adsorvendo à placa fagos específicos, fago irrelevante e fago silvestre em concentração fixa (10^{11} TU/mL) (GRÁFICO 10). Anticorpo anti-AFB1 foi incubado com diferentes concentrações de AFB1 (500-250-125-0 pg/mL), mas igualmente não foi possível verificar reatividade do fago na interação entre a toxina e seu anticorpo específico.

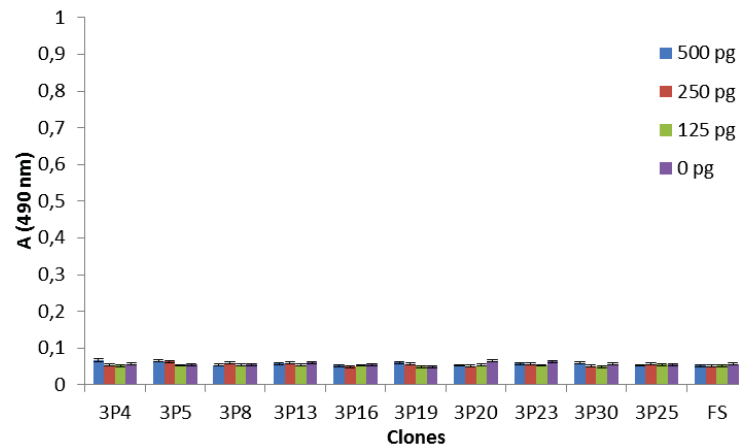


GRÁFICO 10: Reatividade de fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25) e silvestre (FS) por ELISA de competição com fagos na concentração de 10^{11} TU/mL adsorvidos à placa. Anticorpo policlonal anti-AFB1 foi incubado com diferentes concentrações de AFB1 (500-250-125-0 pg/mL). A reação foi detectada por conjugado produzido em cabra anti-imunoglobulina de coelho-peroxidase como absorvância a 490 nm.

Finalizando as alternativas de ensaio de competição foi testada a adsorção de AFB1-BSA à placa, em que fago e anticorpo anti-AFB1 poderia formar complexos antígeno-anticorpo durante a incubação, sendo posteriormente removidos por lavagem. O anticorpo restante ligaria à aflatoxina, permitindo o aumento da reatividade com a redução da concentração de fago estabelecida, entretanto independente da concentração de fago houve ligação entre anticorpo e aflatoxina (GRÁFICO 11).

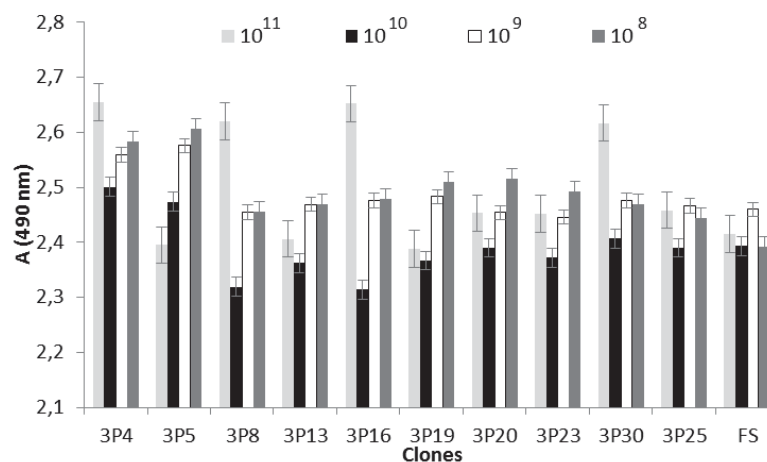


GRÁFICO 11: Reatividade de fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25) e silvestre (FS) por ELISA de competição com aflatoxina adsorvida à placa. Fagos selecionados (3P4 a 3P30), irrelevante (3P25) e silvestre (FS) nas concentrações de 10^{11} a 10^8 TU (*transduction units*)/mL foram incubados com anticorpo policlonal anti-AFB1, tendo a aflatoxina (AFB1-BSA) adsorvida à placa na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$. A reação foi detectada por conjugado produzido em cabra anti-imunoglobulina de coelho-peroxidase como absorvância a 490 nm.

Por fim, após processamento do DNA viral e sequenciamento, os clones válidos (3P8, 3P13, 3P19, 3P20, 3P23, 3P30) tiveram suas sequências identificadas e um alinhamento demonstrou um motivo consenso idêntico entre os clones de fagos selecionados. Os peptídeos foram selecionados da biblioteca X₁₅, que expressa peptídeos lineares com 15 resíduos de aminoácidos. Por outro lado, a sequência do clone 3P25, identificado como clone ligante irrelevante de anticorpo anti-AFB1, apresentou sequência aminoacídica completamente diferente e foi obtido da biblioteca de 17-mer (C₈XC₈).

A sequência peptídica do mimotopo identificado QTDLDYHLPLINSWN, com massa molar de 1.825 Da e ponto isoelétrico teórico de 3,91 foi deduzido utilizando o servidor ExPASy. A sequência exibe resíduos hidrofóbicos não carregados, como lisina, prolina e triptofano, que contribuem para o aumento da hidrofobicidade – acima de 40% - da sequência, exibindo parcial solubilidade em água. Essa sequência aminoacídica corresponde à seguinte sequência nucleotídica: CAG ACT GAT TTG GAT TAT CTT CAT CCT CTG ATT AAT TCG TGG AAT.

A comparação com sequências de mimotopos de aflatoxina previamente selecionadas por anticorpos anti-AFB1 (THIRUMALA-DEVI *et al.*, 2001, LI *et al.*, 2012 e WANG *et al.*, 2013) não revelou homologia em relação à sequência aminoacídica obtida (QUADRO 3), podendo sugerir que esses peptídeos correspondem a diferentes sítios de ligação ao antígeno em anticorpos anti-AFB1. Da mesma forma, não foram detectados domínios conservados putativos em bancos de dados disponíveis por BLAST 2.7.0 (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

ALVO	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
mAb anti-AFB1 1C11 (ZHANG <i>et al.</i> , 2009)	FPHPWNPP HTSHRNWD YPHPWNPT QTTHRNWA PRYLPWFP	WANG <i>et al.</i> , 2013
mAb anti-AFB1 da Academia Chinesa de Ciências Médicas (referência ausente no artigo)	YHWDPLP HPSYPRH HPSDPRH HHRDPCH	LIU <i>et al.</i> , 2012
mAb anti-AFB1 mAb 24 e mAb 13 (THIRUMALA-DEVI <i>et al.</i> (1999)	...CYMD-C... ...PW...	THIRUMALA-DEVI <i>et al.</i> , 2001

QUADRO 6: Comparação de peptídeos miméticos de aflatoxina obtidos anteriormente por outros pesquisadores a partir de diferentes anticorpos anti-AFB1.

A sequência aminoacídica foi sintetizada quimicamente incluindo resíduo C-terminal de cisteína para acoplamento à BSA e OVA, via SMCC, conforme descrito no item 4.2.5. Para avaliar o perfil proteico de cada sistema de acoplamento, as proteínas foram submetidas à eletroforese e o gel de poliacrilamida foi corado com prata. A diferença na mobilidade eletroforética indicou acoplamento entre peptídeo e proteína carreadora, como visualizado pelo incremento de massa molar de BSA (proteína nativa) e peptídeo-BSA (proteína conjugada) (FIGURA 13).

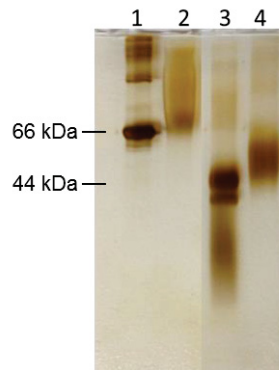


FIGURA 13: Perfil eletroforético de proteínas nativas e conjugados de peptídeo sintético, com aumento da massa molar dos conjugados de peptídeo sintético (linhas 2 e 4). Após etapa de acoplamento às proteínas carreadoras BSA e OVA, via resíduo de cisteína C-terminal, a migração das amostras foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, posteriormente corado por prata. (1) BSA; (2) peptídeo-BSA (3) OVA; (4) peptídeo-OVA.

Baseado neste resultado, o conjugado peptídeo-BSA foi utilizado na próxima etapa do experimento, visando à imunização de camundongos com bacteriófagos e peptídeo sintético.

5.3 ETAPA 3: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS INDUZIDOS POR ANTÍGENOS MIMÉTICOS DE AFLATOXINA

Os resultados da caracterização imunológica *in vitro* de seleção de mimotopos demonstraram que os clones de fagos selecionados foram capazes de mimetizar o sítio de reconhecimento do epítipo de aflatoxina em anticorpo anti-AFB1. Antes de obter o sequenciamento do peptídeo expresso pelos fagos selecionados foi avaliada a potencial imunogenicidade dos fagotopos, ou seja, a capacidade de induzir anticorpos que reconhecem o epítipo nativo. Desta forma foram realizadas imunizações com os próprios fagos selecionados, amplificados e titulados. Grupos de camundongos foram inoculados com *pool* de fagos específicos (3P19, 3P20, 3P23 e 3P30), somente fago 3P30 ou somente fago silvestre, na presença ou não de adjuvante, conforme descrito no item 4.3.1.

Primeiramente foram avaliados os soros pré-ímmunes, os quais não apresentaram reatividade contra BSA, AFB1-BSA, AFM1-BSA. Após a terceira inoculação, os animais imunizados com fagos relevantes apresentaram anticorpos contra AFB1 e AFM1, com maior reatividade ($p < 0,05$) nos grupos imunizados com fagos relevantes na presença do adjuvante (GRÁFICO 12A). Como indicativo de imunização, os animais também produziram anticorpos contra as demais proteínas do fago (GRÁFICO 12B).

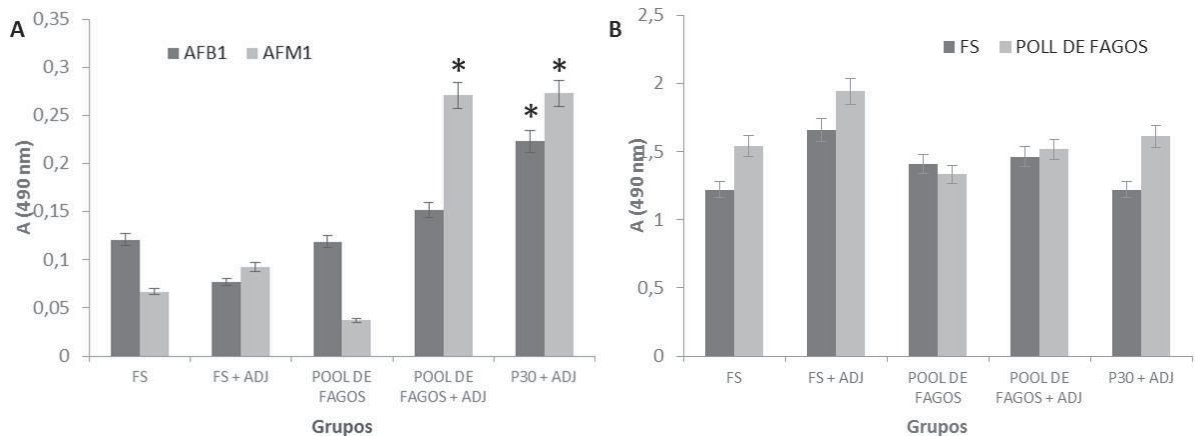


GRÁFICO 12: Reatividade de anticorpos produzidos em camundongos imunizados com fagotopos miméticos de AFB1, por ELISA. (A) As soluções de BSA, AFB1-BSA ou AFM1-BSA na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foram adsorvidas à placa; (B) As soluções de fago silvestre (FS) ou *pool* de fagos (3P19, 3P20, 3P23 e 3P30) na concentração de 10^{11} TU/mL foram adsorvidas à placa. Foram adicionados soros de camundongos diluídos 1:100 em tampão de incubação e posteriormente conjugado produzido em cabra anti-imunoglobulina de camundongo marcado com peroxidase e substrato específico. A absorbância de cada soro foi subtraída da absorbância da proteína BSA (490 nm).

* Médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Entretanto após a quarta imunização, em que foi realizada a sonicação dos fagos, os anticorpos específicos não persistiram, constatando ausência de reatividade frente à AFB1 e AFM1. Procedeu-se então a quinta imunização, em que foi mantida a alta produção de anticorpos contra as proteínas dos fagos, tanto *pool* de fagos quanto fago silvestre, mas sem detecção de anticorpos específicos contra aflatoxinas. Em resumo, este esquema de imunização foi importante para avaliar a produção de anticorpos específicos, como também estabelecer o uso de adjuvante na constituição da solução imunógeno.

Após síntese e conjugação do peptídeo sintético mimético de aflatoxina, foi realizada a imunização de camundongos com peptídeo sintético e peptídeo expresso em fagos, visando comparar os antígenos miméticos obtidos quanto à indução da produção de anticorpos específicos anti-AFB1. Desta forma, grupos de camundongos foram inoculados com BSA conjugada à AFB1 ou ao peptídeo sintético, assim como fago relevante 3P30, fago silvestre ou fago irrelevante 3P25.

Os resultados de ELISA revelaram a presença de anticorpos anti-peptídeo em todos os grupos analisados. Para o grupo imunizado com o peptídeo, o título de anticorpos anti-peptídeo foi ao menos duas vezes superior ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos imunizados com AFB1, 3P30, 3P25 e FS (GRÁFICO 13). Comprovando o mimetismo do peptídeo, os camundongos imunizados com peptídeo-BSA também produziram anticorpos anti-AFB1, apesar de menor título que o grupo imunizado com AFB1-BSA. Estes resultados destacam a habilidade do peptídeo mimético em induzir uma resposta imune humoral específica com produção de anticorpos anti-AFB1, sem os animais terem sido expostos à toxina.

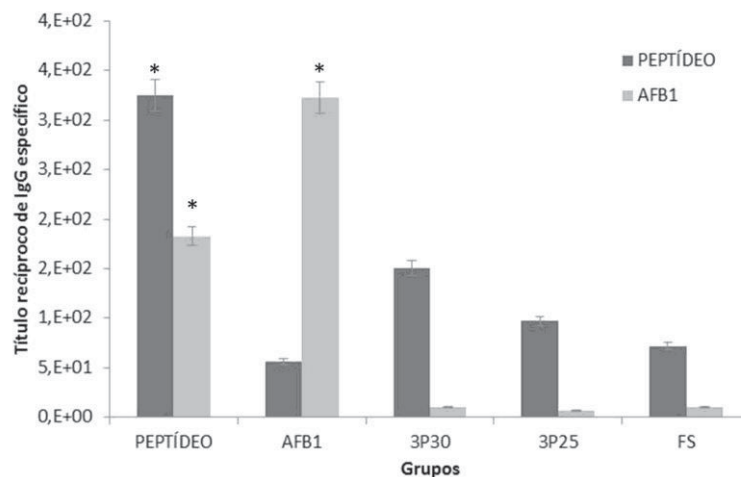


GRÁFICO 13: Reatividade dos anticorpos produzidos em camundongos imunizados com fago e peptídeo sintético, avaliada por ELISA. Os animais foram imunizados com peptídeo-BSA, AFB1-BSA, fago específico 3P30, fago irrelevante 3P25 ou fago silvestre. As soluções de BSA, AFB1-BSA ou peptídeo-BSA na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foram adsorvidas à placa. O título de anticorpos específico foi derivado como diluição recíproca da amostra correspondente à densidade ótica 490 nm $\geq 0,05$ após correção dos valores de reatividade da proteína carreadora.

* Médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Preliminar ao esquema de imunização seguinte foi avaliada a atividade fagocítica de macrófagos obtidos do sangue periférico das aves de experimentação, visando à padronização da técnica para posteriormente caracterização da resposta imune de produção de anticorpos específicos em camundongos imunizados com antígenos miméticos e desafiados com aflatoxina.

Os resultados de estimulação da atividade fagocítica de macrófagos isolados do sangue periférico de aves de postura são apresentados na Figura 14. Entre os dois animais amostrados não houve diferença na ativação de macrófagos por estímulo de lipopolissacarídeo (LPS). Por outro lado, o protocolo de isolamento e estimulação de macrófagos de aves foi eficiente para diferenciação celular, representando uma alternativa para o estudo da resposta imune *in vitro* frente à AFB1 e mimotopos.

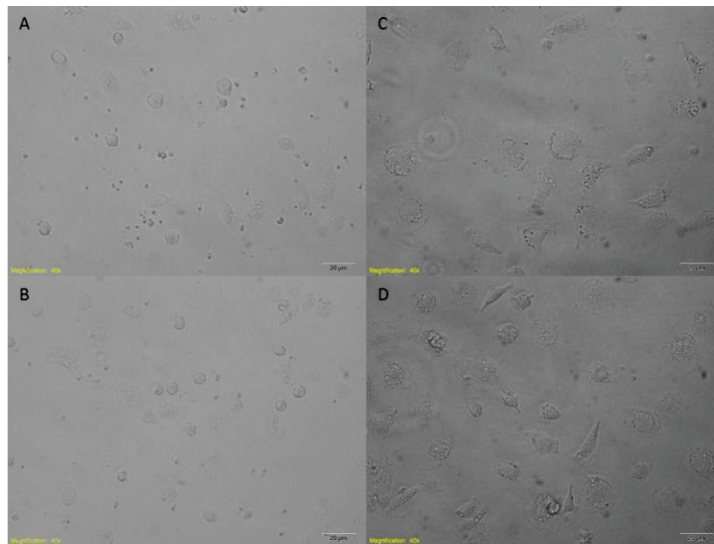


FIGURA 14: Macrófagos cultivados *in vitro* a partir de células do sangue periférico de aves imunizadas com AFB1-BSA. Os macrófagos da galinha 1 (A) e da galinha 2 (C) foram isolados com sucesso, sendo visualizados como células esféricas. Após estimulação com LPS, observa-se formação de prolongamentos na membrana citoplasmática e granulações citoplasmáticas nos macrófagos da galinha 1 (B) e da galinha 2 (D). Aumento de 40x.

Assim, no esquema de imunização seguinte, camundongos imunizados ou ainda aqueles que não receberam nenhum imunógeno, foram avaliados quanto à atividade fagocítica de macrófagos e viabilidade de esplenócitos após imunização com peptídeo sintético ou peptídeo expresso em fago. O mesmo esquema de imunização descrito no item 4.3.2 foi repetido, exceto por conter oito unidades experimentais por grupo, visando o desafio com aflatoxina *in vivo* e *in vitro*. Assim, os grupos imunizados com peptídeo, fago relevante 3P30, fago silvestre e não imunizados foram divididos para receberem aflatoxina antes (desafio *in vivo*) ou após a eutanásia (desafio *in vitro*).

Não foram observadas diferenças entre as condições de manutenção estabelecidas para desafio *in vitro* (FIGURA 15). Os macrófagos de animais imunizados com peptídeo, fago relevante 3P30, fago silvestre ou não imunizados foram igualmente ativados por LPS, na presença ou ausência de aflatoxina, ou seja, a dose de aflatoxina não teve efeito sobre as células cultivadas. O LPS constitui um reconhecido estimulante da ativação celular, promovendo a formação de prolongamentos na membrana celular e evidenciação de grânulos citoplasmáticos.

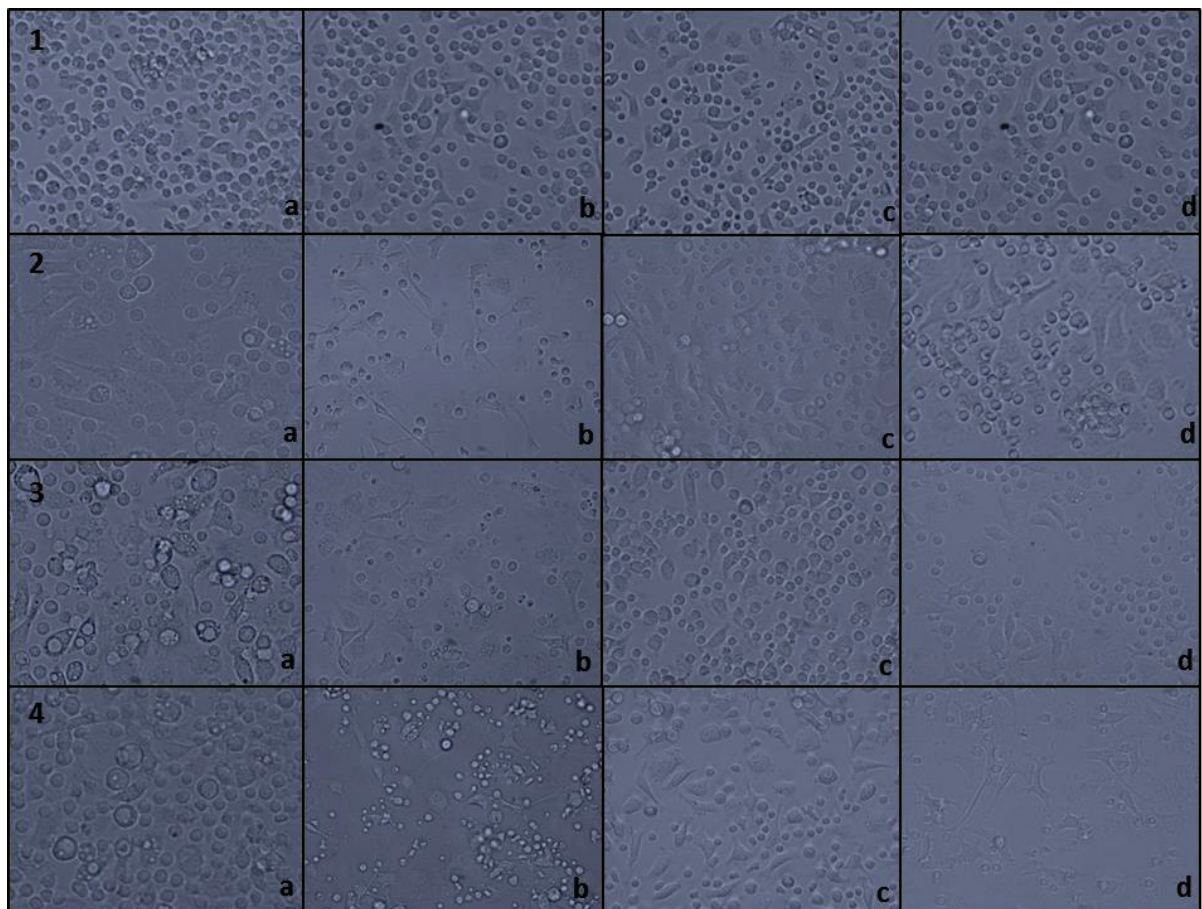


FIGURA 15: Macrófagos peritoneais cultivados *in vitro* a partir de células da cavidade peritoneal de camundongos imunizados e desafiados com AFB1 *in vitro*. Macrófagos peritoneais de camundongos imunizados com peptídeo (1), fago relevante 3P30 (2), fago silvestre (3) ou não imunizados (4) foram divididos em quatro condições: (A) controle (meio sem tratamento); (B) AFB1 (meio adicionado de AFB1, 20 ng/mL); (C) LPS (meio adicionado de LPS, 10 µg/mL) e (D) AFB1+LPS (meio adicionado de AFB1, 20 ng/mL e posteriormente LPS, 10 µg/mL). Aumento de 40x.

Da mesma forma, no desafio *in vivo*, os macrófagos peritoneais avaliados em cada tratamento – por 24 ou 48 horas, com ou sem estímulo por LPS – tiveram o mesmo padrão de resposta celular entre os animais imunizados com peptídeo, fago relevante 3P30, fago silvestre ou não imunizados (FIGURA 16).

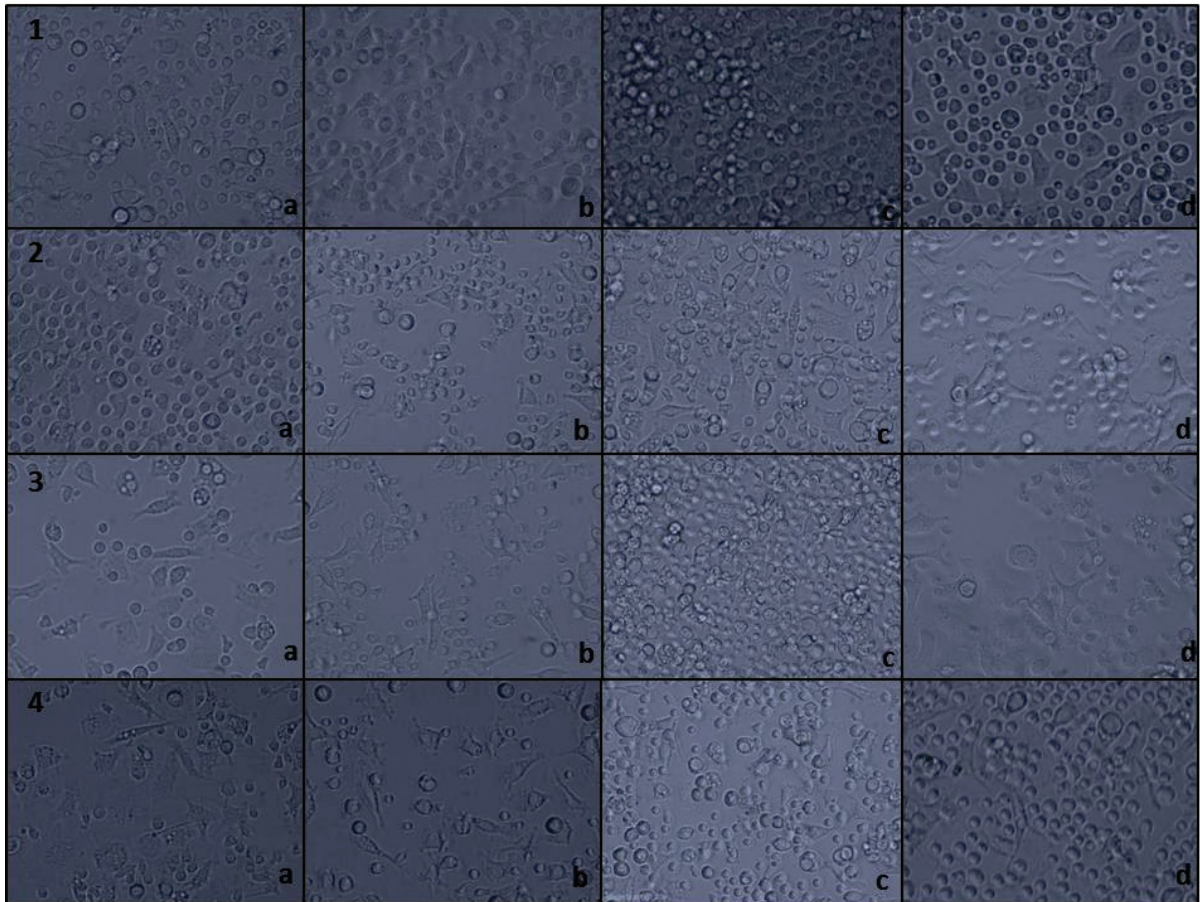


FIGURA 16: Macrófagos peritoneais cultivados *in vitro* a partir de células da cavidade peritoneal de camundongos imunizados e desafiados com AFB1 *in vivo*. Macrófagos peritoneais de camundongos imunizados com peptídeo (1), fago relevante 3P30 (2), fago silvestre (3) ou não imunizados (4) foram avaliados após: (A) 24 horas; (B) 48 horas com adição de LPS, 10 µg/mL por 24 horas; (C) 48 horas; (D) 72 horas com adição de LPS, 10 µg/mL por 48 horas. Aumento de 40x.

Também para avaliar a resposta imune protetora dos animais imunizados e o desafio com aflatoxina foram coletadas amostras de fígado e baço para análise histopatológica, assim como de sangue periférico total com anticoagulante EDTA para análise hematológica. As amostras de fígado e baço não foram devidamente armazenadas em formol 10%, que não estava tamponado, dificultando a análise histopatológica. Independentemente, o material foi processado e analisado, mas não foram encontradas lesões hepática ou esplênica indicativas de aflatoxicose. Com relação à análise hematológica, não foram observadas alterações entre os resultados obtidos no hemograma de camundongos desafiados *in vitro* (TABELA 4) e *in vivo* (TABELA 5).

TABELA:4: Valores hematológicos obtidos de camundongos imunizados com peptídeo, fago 3P30, fago silvestre (FS) ou não imunizados e desafiados com AFB1 *in vitro*. Valores numéricos de hemácias, hematócrito, hemoglobina, leucócitos totais, heterófilos e linfócitos.

Parâmetros \ Grupos	Valores de referência	PEPTÍDEO	3P30	FS	Não imunizados
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	5,2-10,4	11,44	11,09	11,8	10,59
Hematócrito (%)	32,1-46,5	51,5	47,5	48,65	48,55
Hemoglobina (g/dL)	11,1-14,8	13,65	12,4	13,55	13,1
VGM (fl)	44,2-58,5	45,5	43,3	42,7	45,5
HGM (pg)	14,0-18,7	13	12,4	13,1	12,9
CHGM (g/dL)	28,4-38,5	28,6	28,7	30,8	28,4
Leucócitos ($/\mu\text{L}$)	1900-7000	6900	8300	5000	4700
Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	1000-3100	5400	7300	3800	3700
Monócitos ($/\mu\text{L}$)	0-80	200	100	100	100
Granulócitos ($/\mu\text{L}$)	200-920	1300	900	1100	900
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	315-758	721	1550	1151	1066

FONTE: SANTOS *et al.* (2016) e a AUTORA.

TABELA:5: Valores hematológicos obtidos de camundongos imunizados com peptídeo, fago 3P30, fago silvestre (FS) ou não imunizados e desafiados com AFB1 *in vivo*. Valores numéricos de hemácias, hematócrito, hemoglobina, leucócitos totais, heterófilos e linfócitos.

Parâmetros \ Grupos	Valores de referência	PEPTÍDEO	3P30	FS	Não imunizados
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	5,2-10,4	10,18	10,65	10,47	10,48
Hematócrito (%)	32,1-46,5	47,15	46,15	46,55	48,4
Hemoglobina (g/dL)	11,1-14,8	13,3	13,55	13,65	13,55
VGM (fl)	44,2-58,5	46,35	43,35	44,5	46,2
HGM (pg)	14,0-18,7	13	12,7	13	12,85
CHGM (g/dL)	28,4-38,5	28,15	29,3	29,25	27,95
Leucócitos ($/\mu\text{L}$)	1900-7000	4450	5900	5050	5450
Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	1000-3100	3700	4700	4100	4400
Monócitos ($/\mu\text{L}$)	0-80	100	150	100	150
Granulócitos ($/\mu\text{L}$)	200-920	650	1050	850	900
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	315-758	910	836,5	1211,5	996,5

FONTE: SANTOS *et al.* (2016) e a AUTORA.

Em resumo, após comprovar a capacidade de induzir a produção de anticorpos específicos por meio de antígenos miméticos de aflatoxina, não foi possível caracterizar a resposta imune frente ao desafio com a toxina. Seja pela dificuldade de estabelecer a dose desafio ou por problemas operacionais para analisar os órgãos coletados, não foi possível observar diferenças significativas entre os animais imunizados e os não imunizados. Diante disso, não foi realizada a avaliação de citocinas produzidas pelos esplenócitos obtidos durante o experimento.

5.4 ETAPA 4: VACINA DE MUCOSA COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-BACTERIÓFAGO

Com o objetivo de desenvolver um imunógeno de mucosa baseado em peptídeos expressos em fago, assim como promover uma via de inoculação eficiente para utilização em animais de produção, foi executada a estratégia de encapsulamento de bacteriófagos em nanopartículas de quitosana. Inicialmente, a quitosana foi purificada por meio de ciclos de dispersão em solução de ácido acético 0,2 M e precipitação com NaOH até pH 8,0. O precipitado foi lavado com etanol 99% e acetona, resultando em um rendimento de 50% relativo à massa inicial. Após purificação da quitosana, foi determinado o grau de deacetilação por titulação potenciométrica e ressonância magnética nuclear ^1H , com caracterização dos deslocamentos químicos por ^{13}C . A massa molar e a viscosidade intrínseca do biopolímero foram determinadas por cromatografia de gel permeação.

O grau de deacetilação obtido foi de 80% utilizando a titulação potenciométrica com NaOH 0,2 M, de acordo com a equação 1 (BROUSSIGNAC, 1968), onde V1 representa o primeiro ponto de inflexão em relação ao volume de HCl em excesso, de 48,9 mL e V2 representa o segundo ponto de inflexão em relação ao volume de 53,9 mL de HCl que protonou o grupo NH_2^+ em excesso (FIGURA 17).

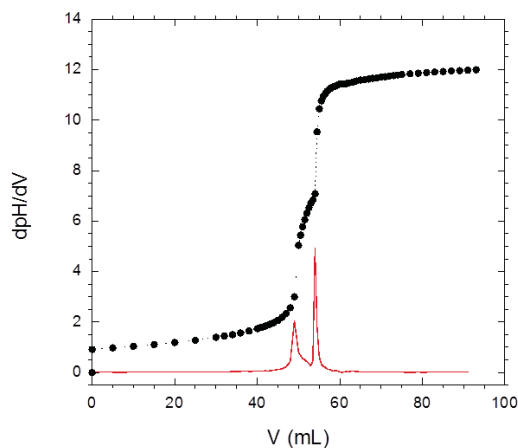


FIGURA 17: Curva de titulação de quitosana (0,2 g) em HCl 0,3 M, utilizando NaOH 0,2 M.

As amostras também foram caracterizadas utilizando ^1H e ^{13}C – RMN, determinando o grau de deacetilação de 82% por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, de acordo com equação 2 (HIRAI *et al.*, 1991). O deslocamento químico de H1 ocorreu a 4,86 e 4,84 ppm, relacionado a grupamentos D-glucosamina e N-acetil-glucosamina, assim como o deslocamento químico de H_{AC} ocorreu a 2,09 ppm, atribuído ao hidrogênio relacionado com grupamento acetil (FIGURA 18).

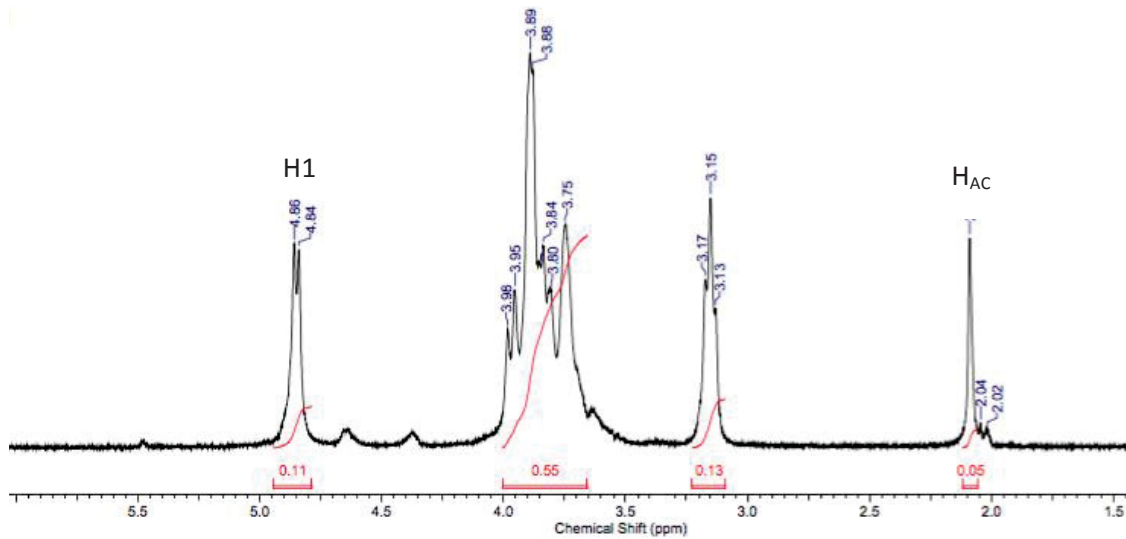


FIGURA 18: RMN ^1H de 10 mg/mL de quitosana em 0,1 M ácido acético deuterado (HAc-D4) em óxido deutérico, a 70°C.

A espectroscopia de RMN ^{13}C permitiu relacionar o número de sinais com o número de diferentes tipos de carbono, sendo o carbono C2, que se apresenta substituído por grupos N-acetil, indicado por sinal de 56,22 ppm, de acordo com Domard *et al.* (1987) e Kasaai (2010). Os sinais atribuídos à quitosana foram C1 a 99,0 ppm; C3 a 71,3 ppm; C4 a 77,8 ppm; C5 a 75,4 ppm; C6 a 60,86 ppm (desvio químico invertido) e C2 a 56,59 ppm (amina livre) e 56,22 ppm (acetilado) (FIGURA 19).

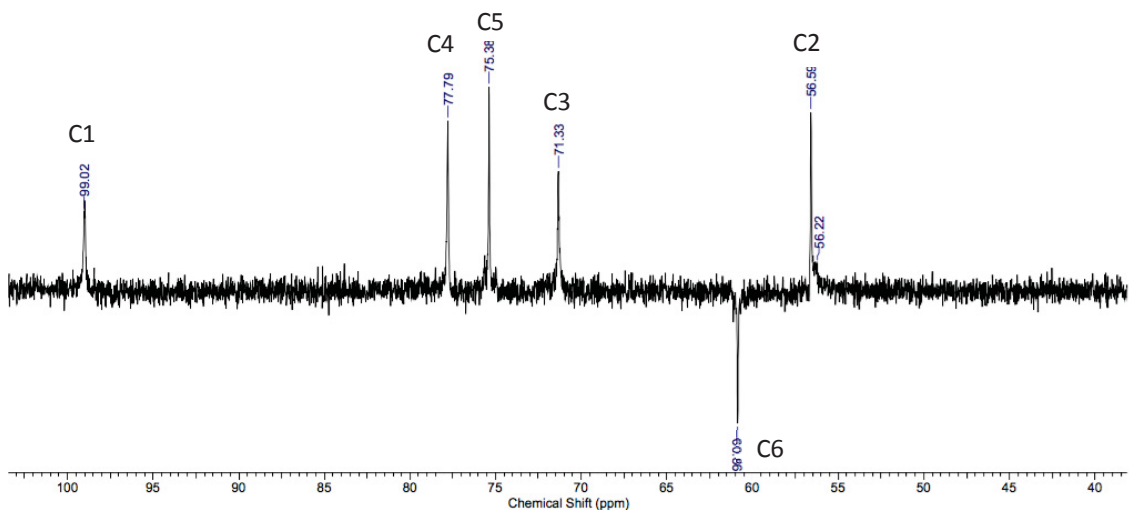


FIGURA 19: RMN ^{13}C de 10 mg/mL de quitosana em 0,1 M ácido acético deuterado (HAc-D4) em óxido deutérico (D_2O), a 70°C.

Por cromatografia de gel permeação ou cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi estabelecida a massa molar (M_n) de 113.318 Da, massa molar ponderal média (M_w) de 612.879 Da e viscosidade intrínseca de 4,0 dL/g (FIGURA 20).

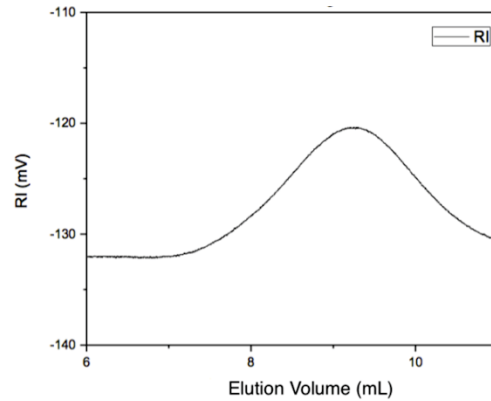


FIGURA 20: Perfil de eluição SEC de quitosana em ácido acético 0,3 M com 0,2 M acetato de sódio, pH 4,6, a 40°C.

Com relação ao fago, não houve correlação nos parâmetros de diâmetro efetivo, diâmetro médio e polidispersidade quando utilizada a solução 1:1.000 em DLS, ou seja, a concentração $1,78 \times 10^{10}$ TU/mL não foi adequadamente caracterizada, mas apresentou potencial zeta de -22 mV. Na diluição 1:100, concentração de $1,78 \times 10^{11}$ TU/mL, foi observado polidispersidade de 0,378, diâmetro efetivo médio de 132,9 nm e diâmetro médio de 67,8 nm em uma taxa de contagem média de 52,4 kcps, sendo o potencial zeta estabelecido em -30 mV, (FIGURA 21). Por fim, na diluição 1:10 o índice de polidispersidade foi de 0,310, com diâmetro efetivo médio de 142,7 nm e diâmetro médio de 60,1 nm em uma taxa de contagem média de 67,7 kcps. O potencial zeta foi estabelecido em -20 mV na concentração ideal de $1,78 \times 10^{12}$ TU/mL.

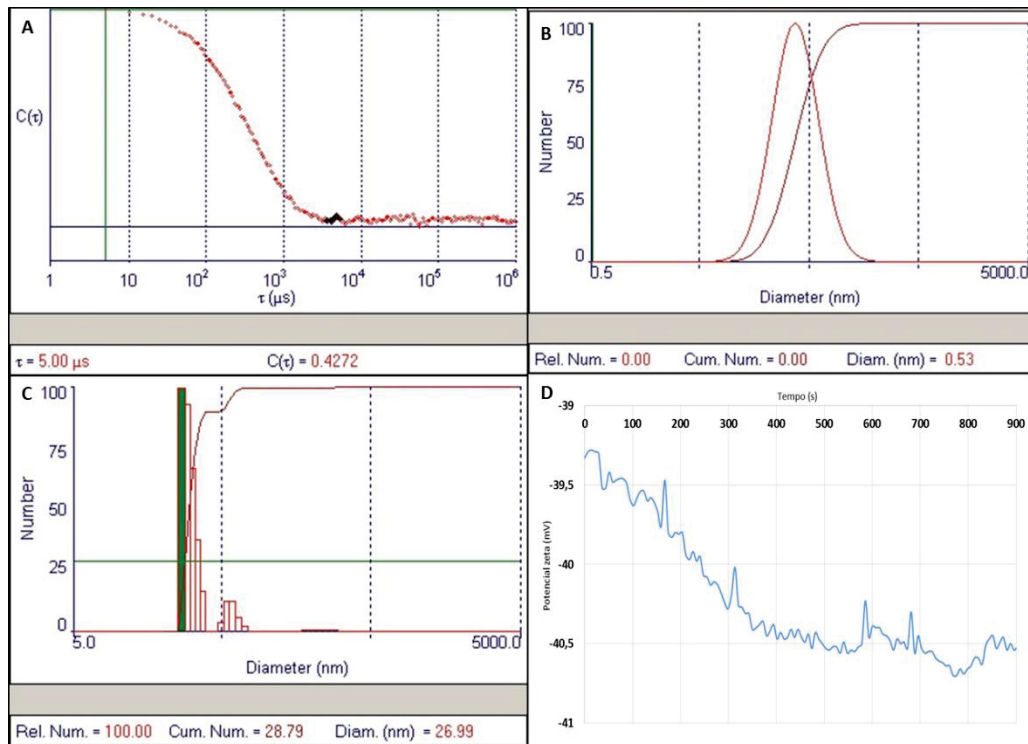


FIGURA 21: Análise de fago diluído 1:100 v/v por DLS, demonstrando (A) correlação; (B) diâmetro efetivo médio; (C) contagem de partículas e (D) potencial zeta (900 s).

Para quitosana foram avaliadas soluções com 10, 100, 1.000, 10.000 e 20.000 moléculas de quitosana por partícula viral. A solução mais adequada para o encapsulamento foi a de 20.000 moléculas de quitosana para cada molécula de fago (FIGURA 22).

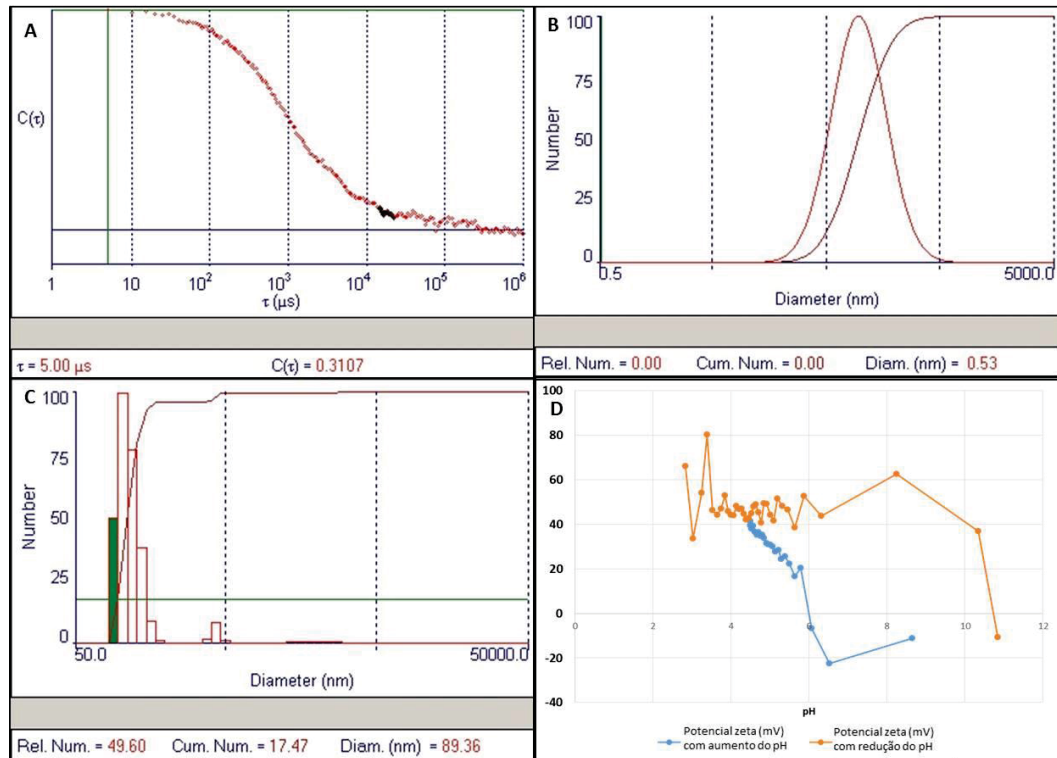


FIGURA 22: Análise de quitosana com 20.000 moléculas por molécula de fago por meio de equipamento DLS, demonstrando (A) correlação; (B) diâmetro efetivo médio; (C) contagem de partículas e (D) potencial zeta (900 s).

Assim, foi estabelecido o protocolo de encapsulamento de bacteriófagos, com solução de fagos 1:100 v/v e solução de quitosana 1 mg/mL com 20.000 moléculas de quitosana por molécula de fago, conforme descrito no item 4.4.2. As soluções empregadas no encapsulamento do bacteriófago em nanopartículas de quitosana podem ser observadas na Figura 23. A solução final de fagos na concentração de $1,78 \times 10^{11}$ TU/mL (FIGURA 23A) foi adicionada na solução de quitosana 1 mg/mL (FIGURA 23B), obtendo a solução fago + quitosana pH 4,6 (FIGURA 23C). Após titulação com NaOH até pH 7,3, a quitosana precipita (FIGURA 23D), encapsulando os fagos. As nanopartículas de quitosana-bacteriófago são obtidas após centrifugação.

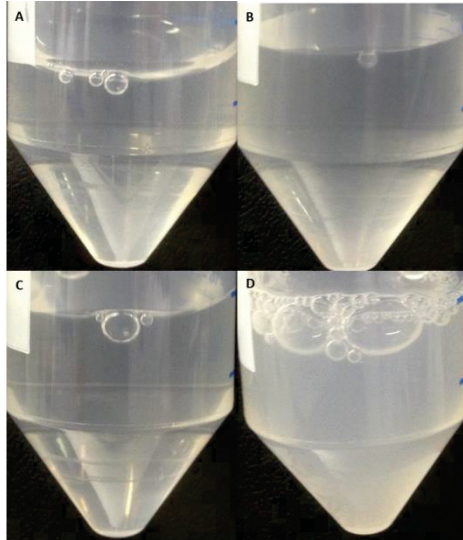


FIGURA 23: Encapsulamento de bacteriófagos em nanopartículas de quitosana, indicado pela turbidez da solução de fago+quitosana após alteração do pH (D). (A) solução final de fagos na concentração de $1,78 \times 10^{11}$ TU/mL (B) solução de quitosana 1 mg/mL (C) solução fago + quitosana pH 4,6 (D). solução fago + quitosana, pH 7,3.

Os parâmetros obtidos no DLS em pH 4,6 foram: índice de polidispersidade 0,344, diâmetro efetivo 342,5 nm, diâmetro médio 62,35 nm com taxa de contagem média 96,3 kcps. Em pH 7,3 foi estabelecido índice de polidispersidade 0,316, diâmetro efetivo 445 nm, diâmetro médio 148,8 nm com taxa média de contagem de 1,3 mcps (FIGURA 24). O potencial zeta da nanopartícula foi de +40 mV em pH 4,6 e +20 mV em pH 7,3 (GRÁFICO 14).

Desta forma, após o encapsulamento do fago em nanopartículas de quitosana o raio hidrodinâmico aparente aumentou de ~130 nm do fago sozinho para ~345 nm e 445 nm em pH 4,6 e pH 7,3, respectivamente. Adicionalmente, a presença da camada carregada positivamente causou variação de potencial ζ do fago de -30 mV para +40 mV em pH 4,6 e de -80mV para +20 mV em pH 7,3. Todos estes resultados indicaram um efetivo processo de encapsulamento do fago, que alterou as propriedades de superfície do fago.

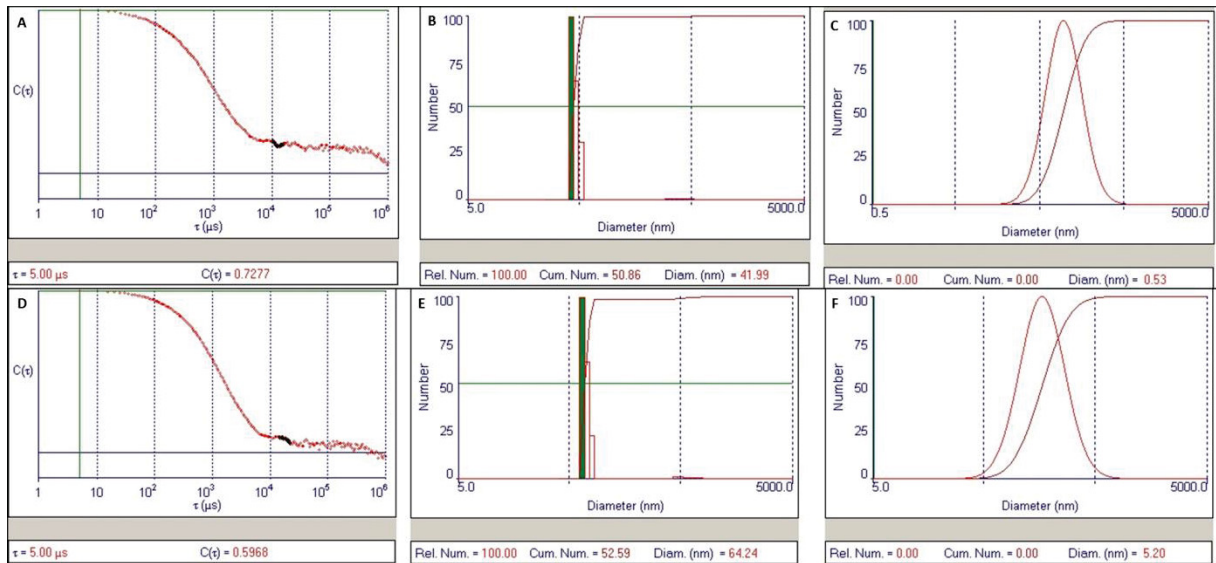


Figura 24: Análise de nanopartículas de fago diluído 1:100 v/v com 20.000 moléculas de quitosana por molécula de fago, demonstrando por DLS (A) correlação; (B) diâmetro efetivo médio; (C) contagem de partículas em pH 4,6. A análise também foi realizada em pH 7,3 por DLS, demonstrando (D) correlação ;(E) diâmetro efetivo médio e (F) contagem de partículas.

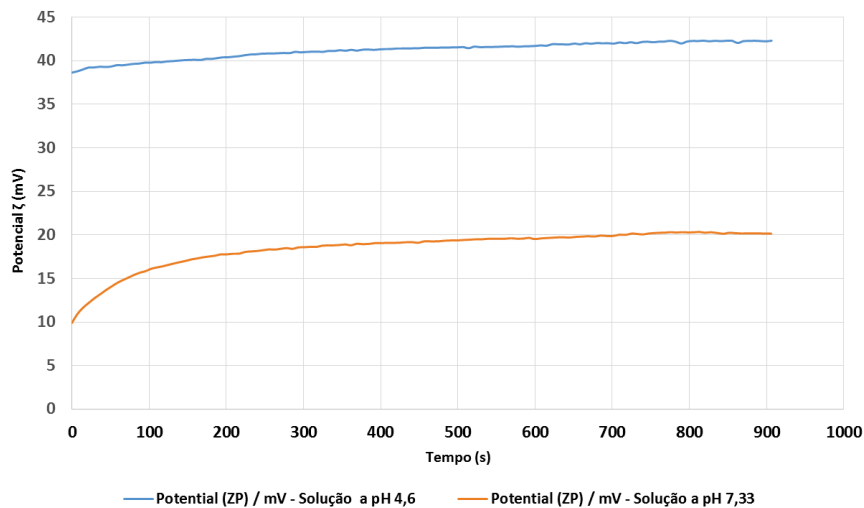


GRÁFICO 14: Potencial zeta de nanopartículas de fago diluído 1:100 v/v com 20.000 moléculas de quitosana por molécula de fago em pH 4,6 e pH 7,3 (900 s).

Com o processo de precipitação da quitosana, os fagos que foram encapsulados em nanopartículas do polímero também precipitaram após centrifugação, devido à complexação de quitosana com os fagos. O sobrenadante praticamente não apresentou sinal de fagos – 5 TU/mL – e confirmou um encapsulamento eficiente por meio de titulação conforme descrito em 4.4.2. Na ausência da quitosana, sob as mesmas condições experimentais, quase todo o conteúdo de fagos imputados – 10^{11} TU/mL – permaneceu no sobrenadante após centrifugação. Estes resultados indicam que o procedimento de preparação de nanopartículas precipitou 99,99 % dos fagos em solução e não afetou negativamente o antígeno, mantendo sua viabilidade durante o processo.

Para analisar a organização macromolecular de sistemas de nanopartículas, foi empregada a marcação de quitosana com FITC, assim como de fagos com anticorpo secundário conjugado ao Alexa-flúor 633, posteriormente avaliados em microscópio confocal. As imagens de microscopia confocal demonstram a presença de aglutinados de quitosana em verde, carregados com fagos marcados em vermelho (FIGURA 25). A co-localização do fago dentro de agregados de quitosana foi randomicamente verificada por varredura no eixo Z em amarelo.

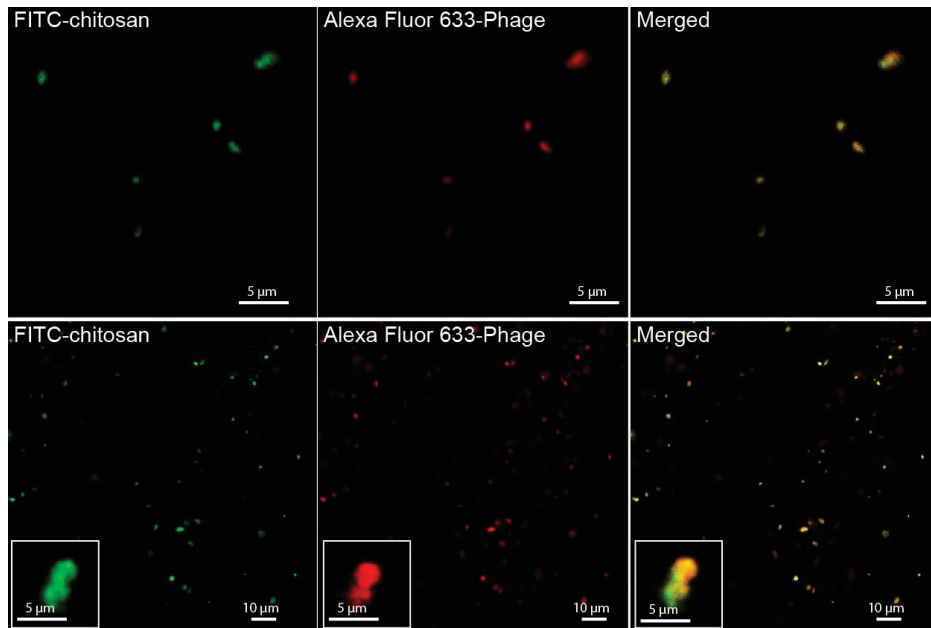


FIGURA 25: Imagens de microscopia confocal de nanopartículas de quitosana-bacteriófago. Estrutura de nanopartículas de quitosana marcada com FITC (verde), fagos marcados com anticorpo anti-M13, produzido em camundongo e posteriormente com anti-IgG camundongo produzido em cabra conjugado ao Alexa-flúor 633 (vermelho) e co-localização de quitosana e fagos (amarelo).

Com o auxílio da microscopia eletrônica de transmissão, a caracterização das nanopartículas de quitosana-bacteriófago foi realizada por visualização das partículas de fago sem ou com contraste. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas a partir de amostras diluídas e coradas com acetato de uranila 2%, revelando a estrutura do fago bem definida com contraste positivo somente sobre o capsídeo viral (FIGURA 26A). Por outro lado, as nanopartículas de quitosana-bacteriófago exibiram estruturas com maior densidade de elétrons – sem coloração – e similar proporção de tamanho, com comprimento médio de 450 nm, como demonstrado pelo fago não recoberto (FIGURA 26B e C). O polímero favoreceu a delimitação do contorno e contrastou com a partícula formada em comparação com o fago encapsulado. Estes resultados indicaram que a quitosana recobriu homogeneamente a estrutura completa do fago. Assim, fagos individualmente recobertos por quitosana foram visualizados com sucesso por TEM e provavelmente estão randomicamente distribuídos ao longo da matriz de quitosana, conforme observado nas imagens de microscopia confocal.

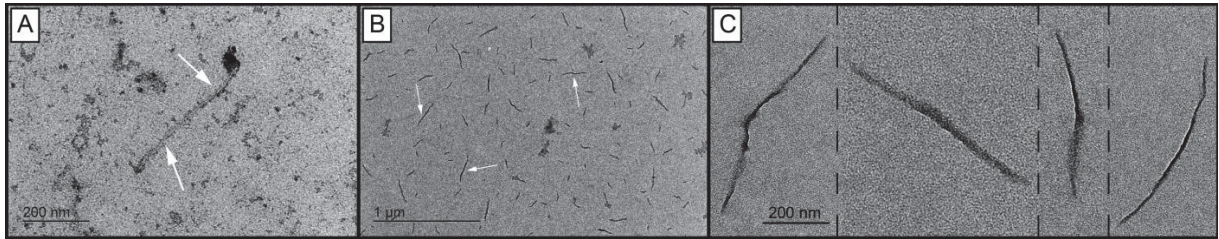


FIGURA 26: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do fago 3P30 sozinho em aumento de 40.000 x corado com acetato de uranila 2% (A) e após encapsulamento em nanopartículas de quitosana com aumento de 8.000 x (B) e 40.000 x (C), respectivamente. O fago individualizado pode ser observado com auxílio do contraste (A), mas após o encapsulamento em nanopartículas de quitosana o fago individualizado pode ser observado sem o auxílio do corante, devido ao recobrimento pelo polímero (C).

Após os ensaios para caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana-fagos foi iniciado o esquema de imunização dos animais, conforme descrito no item 4.4.3. Nenhum dos animais imunizados apresentou sinais ou reações adversas em decorrência da vacinação. Para avaliar a imunogenicidade de nanopartículas de quitosana-bacteriófagos foram comparadas as respostas séricas de camundongos após a administração de antígeno sozinho, nanopartículas de quitosana carregadas de antígenos ou co-administração de antígeno solúvel – fago 3P30 – com intervalo de 2 horas da administração de solução de quitosana.

Após o protocolo de imunização intranasal, o título de anticorpos nos soros de camundongos imunizados com nanopartículas de quitosana-bacteriófago foi ao menos 2,5 vezes maior do que os títulos de anticorpos nos soros de camundongos imunizados com antígenos solúveis (FIGURA 27A). Como demonstrado na Figura 27B, o título de anticorpos anti-peptídeo induzido por nanopartículas de quitosana-fago 3P30 também foi maior do que aquele correspondente ao fago em solução.

No estudo *pulse-chase*, os camundongos que receberam solução de quitosana antes da solução de fago 3P30 produziram títulos menores de IgG, indicando que a quitosana é menos efetiva quando administrada 2 horas antes da administração intranasal de fagos. Assim, o efeito adjuvante é baseado principalmente na melhoria da entrega do fago por nanopartículas de quitosana do que devido ao efeito estimulatório da quitosana sozinha. Ainda de acordo com estes resultados, nanopartículas de quitosana sem antígeno não demonstraram produção de títulos de anticorpos após a administração intranasal.

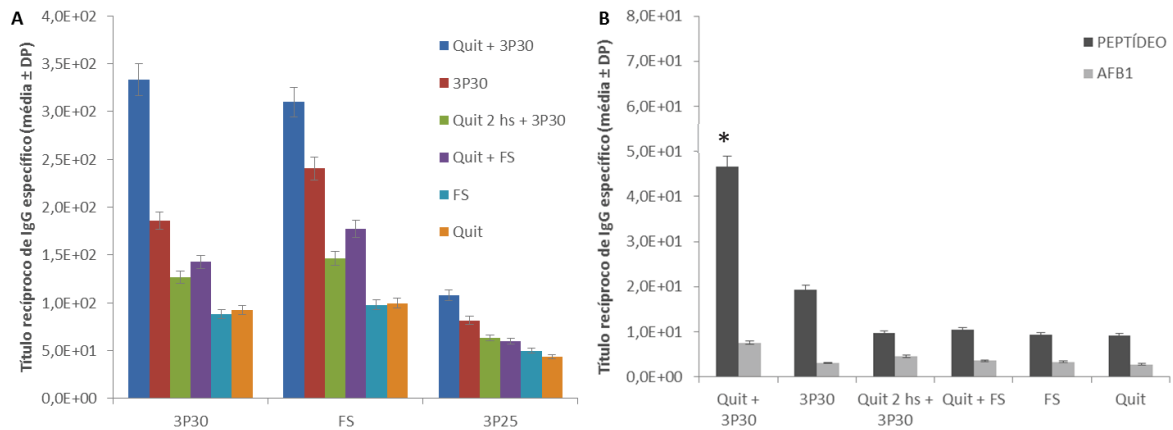


GRÁFICO 15: Reatividade dos anticorpos produzidos em camundongos imunizados via intranasal com nanopartículas de quitosana-fago, avaliada por ELISA. Os títulos recíprocos de anticorpos em soros de camundongos imunizados com nanopartícula de quitosana-fago 3P30 (QUIT + 3P30), solução de fago específico 3P30 (3P30), solução de quitosana 2 hs antes da solução de fago 3P30 (QUIT 2 hs + 3P30), nanopartícula de quitosana-fago silvestre (QUIT + FS), solução de fago silvestre (FS) e solução de quitosana (QUIT) foram avaliados frente às proteínas dos fagos 3P30, FS e 3P25 (A), assim como frente ao peptídeo e aflatoxina (B). Valores de média e desvio padrão de título recíproco de cada tratamento são indicados. * Médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Também foram coletadas amostras de lavado intestinal e broncoalveolar, conforme descrito no item 4.4.3, entretanto em lavados intestinais coletados de animais imunizados com fagos ou nanopartículas de quitosana não foi observada reatividade com conjugado anti-IgA de camundongo. Por outro lado, os resultados de títulos de anticorpos anti-peptídeo e anti-AFB1 em lavados broncoalveolares estão apresentados no Gráfico 16. Assim como na resposta humoral, os títulos de anticorpos do tipo IgA induzidos por nanopartículas de quitosana-bacteriófago foram maiores do que aqueles correspondentes ao antígeno livre, indicando a produção de anticorpos sítio-específicos.

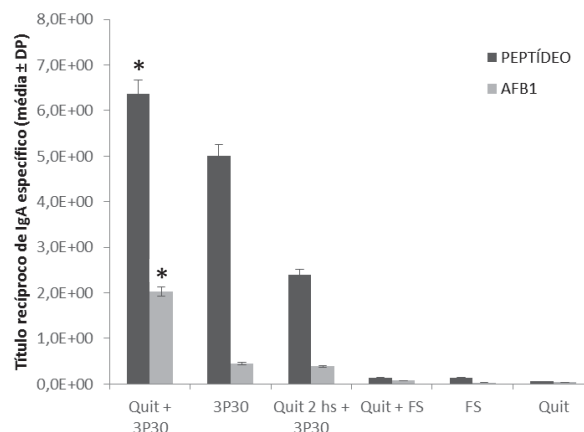


GRÁFICO 16: Reatividade dos anticorpos em lavado broncoalveolar de camundongos imunizados via intranasal com nanopartículas de quitosana-fago. Os títulos recíprocos de anticorpos específicos anti-peptídeo e anti-AFB1 em lavado broncoalveolar de camundongos imunizados com nanopartícula de quitosana-fago 3P30 (QUIT + 3P30), solução de fago específico 3P30 (3P30), solução de quitosana 2 hs antes da solução de fago 3P30 (QUIT 2hs + 3P30), nanopartícula de quitosana-fago silvestre (QUIT + FS), solução de fago silvestre (FS) e solução de quitosana (QUIT) são indicados como valores de média e desvio padrão de título recíproco de cada tratamento são indicados.

* Médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Todos estes resultados de imunização sugerem que nanopartículas de quitosana-bacteriófagos proporcionaram uma resposta imune de mucosa mais específica comparada com fagos não recobertos.

Em resumo, após a definição da concentração de fago e quitosana foi possível o encapsulamento de bacteriófagos em nanopartículas de quitosana, caracterizadas por microscopias confocal e eletrônica de transmissão, assim como por titulação das concentrações de fagos obtidas antes e após o encapsulamento. O fago selecionado 3P30 foi encapsulado em nanopartículas de quitosana com o objetivo de melhorar a resposta imune baseado no efeito sinérgico com o polímero. Assim, no ensaio *in vivo*, persistiram anticorpos IgG e IgA específicos anti-AFB1, destacando a eficiência da vacinação intranasal de nanopartículas de quitosana-bacteriófago.

6 DISCUSSÃO

Os objetivos deste trabalho foram identificar possíveis peptídeos miméticos de AFB1 por *phage display*, investigar suas propriedades imunológicas em comparação com o epítipo original e empregar esses antígenos miméticos como imunógenos para vacinação de mucosa contra aflatoxicose. Particularmente, a habilidade de peptídeos expressos na superfície de fagos em atuar como mimotopos antigênicos tem sido demonstrada em muitos trabalhos (RAMADA *et al.*, 2013; ALBAN *et al.*, 2013; FOGAÇA *et al.*, 2014). Baseado na engenharia genética de bacteriófagos, assim como na seleção guiada pela molécula alvo em repetidos *pannings* e na propagação de fagos, esta abordagem oferece a seleção *in vitro* para praticamente qualquer alvo (SCOTT & SMITH, 1990). Estas características tornam a tecnologia de *phage display* um método eficaz e econômico para identificar peptídeos que são capazes de ligar a um determinado alvo com alta afinidade e especificidade (HUANG *et al.*, 2011).

A estratégia inicial para realização dos ciclos de seleção na técnica de *phage display* consistiu em obter anticorpos contra aflatoxina B1 e M1, visando à utilização destas moléculas como alvo para seleção nos *pannings* com bibliotecas randômicas de peptídeos expressos em fagos. Desta forma, as toxinas foram conjugadas a proteínas carreadoras, constituindo imunógenos para imunização de camundongos e poedeiras comerciais. As aflatoxinas são consideradas haptenos, ou seja, pequenos compostos químicos que não estimulam respostas de anticorpos em sua forma solúvel livre, por incapacidade de sinalizar coreceptores de células B e recrutar células T. No entanto, quando acoplados às proteínas carreadoras, os conjugados se tornam imunogênicos, pois cada molécula de proteína transporta várias moléculas de haptenos que podem então coestimular receptores de células B e ativar células T. Desta forma, produtos da resposta imunológica (i.e. anticorpos anti-hapteno induzidos por conjugados hapteno-carreador) podem reagir a haptenos livres (GEFEN *et al.*, 2014).

As aflatoxinas também carecem de grupos potencialmente reativos para acoplamento a macromoléculas carreadoras. No entanto, por derivação, pode ser introduzido um grupo carboxílico livre, permitindo a ligação covalente com proteínas. Assim, a toxina pode ser primeiramente convertida em intermediário AFB1-O-carboximetiloxime e, posteriormente, conjugada via *crosslinker* EDC (CHU *et al.*, 1977). Alternativamente, visando eliminar a etapa de síntese de AFB1-O-carboximetiloxime, foi utilizado o protocolo de acoplamento em duas etapas por EDC-NHS (Thermo Scientific, Estados Unidos). O NHS é incluído nos protocolos de conjugação de EDC para melhorar a eficiência ou criar intermediários amino reativos (STAROS *et al.*, 1986).

No presente estudo, apesar de ter sido confirmada a conjugação da aflatoxina às proteínas carreadoras, foi observado que o protocolo de acoplamento apresentou baixo rendimento, indicando apenas uma molécula de aflatoxina por molécula de BSA (FIGURAS 8 e 9). Finalizados os esquemas de imunizações de camundongos e poedeiras comerciais, os animais apresentaram sinais de aflatoxicose aguda e crônica. A mortalidade sem sinais clínicos, durante o experimento com os camundongos, é característica de aflatoxicose aguda, permitindo inferir que os camundongos foram sensíveis à aflatoxina (DHANASEKARAN *et al.*, 2011). A intoxicação dos animais também confirma que a toxina carregada pode não representar o modelo ideal de imunógeno para vacinação, pelo risco de reversão de toxicidade e acúmulo de compostos potencialmente tóxicos que podem permanecer nas preparações vacinais (POLONELLI *et al.*, 2011).

De acordo com Manafi (2011), os sinais apresentados pelas aves indicaram um quadro de intoxicação crônica (TABELA 1, FIGURAS 11 e 12), sendo realizada a eutanásia dos animais. Na galinha 1 foi demonstrado anemia, leucopenia, redução do percentual de monócitos supressores da resposta de linfócitos T (MHCII-, Ku1A+), fígado gorduroso com degeneração de hepatócitos e redução de folículos linfóides no baço. A galinha 2 apresentou caquexia, com marcante redução de massa muscular peitoral, leve degeneração de hepatócitos e redução de folículos linfóides no baço. Assim, com os resultados de hemograma e citometria de fluxo foi possível observar alterações na resposta imune de animais intoxicados com aflatoxina, sendo referência para os experimentos seguintes. Essas ferramentas padronizadas foram utilizadas para avaliação da resposta imune em animais imunizados com peptídeos miméticos e desafiados com aflatoxina (item 4.3.3).

De acordo com DIAZ & MURCIA (2011), a suscetibilidade à intoxicação aguda ou crônica tem sido observada entre animais de diferentes espécies. Animais que demonstram alta sensibilidade são patos, perus, suínos, coelhos, cães e gatos, enquanto galinhas, camundongos, hamsters e chinchilas são relativamente sensíveis, possivelmente devido a diferenças nas vias de biotransformação de AFB1 entre as espécies (DHANASEKARAN *et al.*, 2011). Por outro lado, a suscetibilidade dos camundongos à aflatoxina trouxe à ciência um modelo de experimentação animal para triagem e caracterização do imunógeno. Pela disponibilidade, facilidade de manipulação e sensibilidade à aflatoxina o experimento foi direcionado para imunização de camundongos com bacteriófagos e peptídeos, visando determinar o melhor antígeno vacinal. Desta forma, a melhor estratégia vacinal observada no modelo murino poderá ser empregada em animais de produção, como frangos e perus de corte, poedeiras comerciais, suínos e gado leiteiro.

Frente às intoxicações dos camundongos imunizados com AFM1-BSA e de poedeiras comerciais imunizadas com AFB1-BSA foi sugerida a possível presença de dímeros de aflatoxina ou outros polímeros de baixa massa molecular que deveriam ter sido removidos por diálise da amostra conjugada (FIGURA 10). Esses resultados podem explicar parcialmente porque os camundongos imunizados com AFM1-KLH não produziram anticorpos específicos contra a toxina. O resultado esperado com a imunização dos camundongos seria a produção de anticorpos contra o conjugado AFM1-BSA superior à produção de anticorpos anti-BSA, sendo a diferença de reatividade devido à produção de anticorpos específicos anti-AFB1. Entretanto, foi observada reatividade maior contra BSA, assim como reatividade cruzada contra esta proteína que não constituiu o imunógeno utilizado (GRÁFICO 1).

Da mesma forma, as aves não produziram anticorpos específicos contra a aflatoxina B1, indicando que a toxina carregada foi menos imunogênica que a molécula carreadora (GRÁFICO 2). Além disto, as aves já apresentavam reatividade contra BSA antes das imunizações, indicando um contato prévio das aves com este imunógeno, possivelmente por vacinações anteriores, visto que os animais são submetidos ao programa compulsório de vacinação contra Doença de Marek.

O objetivo inicial da imunização das aves era a obtenção de anticorpos para serem empregados na técnica de *phage display* como alvo de seleção, produzidos na mesma espécie animal que se pretendia obter a vacina. Com isto foram eficientemente precipitados anticorpos policlonais isotipo IgY, a partir da gema do ovo produzido pela ave imunizada. Por outro lado, a imunização dos camundongos visava à produção de anticorpos monoclonais anti-AFM1, desvinculando a pesquisa de produtos adquiridos comercialmente. Como não foi possível comprovar a produção de anticorpos específicos, os anticorpos obtidos do soro de animais imunizados não foram utilizados para a seleção de peptídeos miméticos de aflatoxina por *phage display* e foram adquiridos anticorpos comerciais para o prosseguimento do trabalho.

Em relação à técnica de *phage display*, estudos utilizando bibliotecas de peptídeos apresentados em bacteriófagos têm demonstrado a importância da metodologia para a determinação de ligantes de anticorpos (ARAP, 2005; HASSAPIS *et al.*, 2014). Neste sentido, a técnica do *phage display* foi escolhida por identificar sequências aminoácidas miméticas do sítio de ligação ao antígeno em anticorpos anti-AFB1, para serem posteriormente utilizadas como antígenos vacinais.

Apesar de muitos peptídeos miméticos de antígenos proteicos terem sido isolados por *phage display* (KEHOE & KAY, 2005), há poucos casos em que peptídeos foram selecionados para mimetizar compostos químicos não proteicos como as micotoxinas deoxinivalenol (YUAN *et al.*, 1999), ocratoxina (LIU *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2013), zearalenona (HE *et al.*, 2011) e aflatoxina (LIU *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013). Estes estudos tinham como objetivo substituir as micotoxinas em imunodiagnósticos, porém uma visão mais ampla da técnica permite sua aplicação no desenvolvimento de vacinas. Assim, peptídeos miméticos obtidos pela técnica de *phage display* podem servir de imunógenos capazes de induzir a produção de anticorpos que reconhecem a molécula original (de MOURA *et al.*, 2011; CAPELLI-PEIXOTO *et al.*, 2011).

Inicialmente, quatro bibliotecas distintas foram amplificadas para utilização nos ciclos de seleção realizados (TABELAS 2). Na técnica de *phage display*, a habilidade de selecionar clones com propriedades desejáveis é altamente dependente da qualidade inicial da biblioteca. Quando a biblioteca é insuficiente em tamanho, pobre em diversidade, ou com *design* inapropriado, a biosseleção poderá não ter sucesso (RUSSEL *et al.*, 2004). O emprego de bibliotecas comerciais representa uma alternativa (YUAN *et al.*, 1999; HE *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013), mas mesmo assim podem persistir as dificuldades para seleção de peptídeos miméticos de haptenos.

Em experimentos de *phage display*, o processo de seleção de fagos, também referido como *panning*, é uma etapa de alta flexibilidade e dinamicidade (HUANG *et al.*, 2012). No presente estudo foram avaliadas diferentes estratégias de seleção, mas que não foram eficientes na recuperação de fagos específicos, sendo algumas destas consideradas improdutivas (TABELA 3). De fato, as dificuldades para obtenção de fagos reativos foram descritas anteriormente por Yuan *et al.* (1999) e Thirumala-Devi *et al.* (2001). Ainda que o princípio do *panning* seja simples, o processo pode variar com múltiplos fatores, como complexidade da biblioteca, natureza do alvo, afinidade e avidéz de ligação, entre outros parâmetros experimentais (HUANG *et al.*, 2012).

Outra estratégia apresentada foi a eliminação de fagos com reconhecimento inespecífico à fração constante do anticorpo para posterior seleção positiva com anticorpo de interesse. De acordo com HUANG *et al.* (2012), a seleção negativa contra moléculas carreadoras ou alvos não específicos pode ser incluída para aumentar a eficiência do *panning*. Além disto, bibliotecas de fagos podem conter populações de fagos não relacionados ao alvo, que podem reagir com materiais usados na técnica, como placas de poliestireno e albumina sérica bovina. Isto pode ser evitado por adição de etapa de *screening* negativo antes da seleção com alvo de interesse (MENENDEZ & SCOTT, 2005).

A estratégia de seleção de fagos específicos foi alcançada quando as bibliotecas (*input* total de 1×10^{11} TU/mL) foram apresentadas em fase sólida à molécula alvo, anticorpo monoclonal anti-AFB1, em quantidade decrescente entre os *pannings*. Fagos que interagiram fracamente com o alvo foram eliminados por sucessivas lavagens. Por outro lado, bacteriófagos que expõem moléculas com elevada afinidade pelo anticorpo foram recuperados por eluição com solução tamponada de glicina e sonicação (FIGURA 6). Esta estratégia repetida nos diversos *pannings* resultou na seleção de mimotopos com alta afinidade pelo anticorpo promovida pelo processo de sonicação durante a fase de eluição como discutido previamente por Lunder *et al.* (2008).

Yamanaka (2014) buscando a seleção de peptídeos ligantes à proteína BCR-ABL obteve sucesso por meio do protocolo de eluição ácida por sonicação em substituição à estratégia de recuperação de fagos específicos somente por alteração de pH. Apesar da técnica convencional (SCOTT & SMITH, 1990) permitir a recuperação de fagos ligantes (PEIXOTO, 2011), no presente estudo, estes não apresentaram reatividade frente ao anticorpo. A associação da eluição ácida e a sonicação para recuperação de fagos ligantes permitiu a obtenção de fagos altamente reativos, pois rompe interação antígeno-anticorpo com baixa constante de dissociação (κ_d). A oscilação de bolhas de cavitação produzidas por ultrassom é conhecida por causar estresse hidrodinâmico completo, que resulta em dissociação de imunocomplexos (PANDE *et al.*, 2010). Assim, em *phage display*, visando superar a limitação de métodos de eluição não específicos, algumas modificações foram implementadas (LUNDER *et al.*, 2008; VODNIK *et al.*, 2011).

Após serem eluídos, os fagos foram amplificados em cultivo bacteriano e submetidos a novos ciclos de seleção. Esse processo foi monitorado por meio da titulação dos fagos recuperados em cada ciclo, mas somente no terceiro *panning* foram recuperados fagos reativos ao anticorpo anti-AFB1 (GRÁFICO 3 e 4). Em geral, três a cinco ciclos são suficientes para recuperação de fagos expondo moléculas com elevada afinidade pelo ligante (ARAP, 2005; HUANG *et al.*, 2012). Com a diminuição da concentração da molécula alvo, a seleção de fagos com mais afinidade aumenta, permitindo o enriquecimento dos fagos obtidos ao final dos sucessivos ciclos de seleção (RUSSEL *et al.*, 2004).

Para o sucesso da recuperação dos fagos ter ocorrido, também foram padronizadas as melhores condições para a execução dos ensaios imunoenzimáticos. He *et al.* (2011) e Wang *et al.* (2013) utilizaram anticorpos adsorvidos à placa, com concentrações ótimas de 0,5 µg de anticorpo por poço e $2,5 \times 10^{10}$ fagos por mL. No presente estudo foram estabelecidas as melhores condições do imunoensaio com anticorpo adsorvido à superfície sólida na concentração de 1 µg/poço, assim como a concentração de fagos de 1×10^{11} TU/mL (FIGURA 7). Esta padronização, associada aos ajustes no protocolo da técnica de *phage display* foram decisivos na execução do experimento.

Após três ciclos de seleção, foram obtidos nove clones miméticos de AFB1, com alta reatividade frente a anticorpos monoclonais e policlonais anti-AFB1 (GRÁFICO 5). Considerando a reatividade cruzada dos fagos selecionados em relação a moléculas irrelevantes, foi possível classificar os fagos 3P4, 3P5 e 3P16 como de baixa especificidade, pois os mesmos apresentam reatividade cruzada com anticorpo irrelevante monoclonal anti-veneno loxoscélico (mAb 7, ALVARENGA *et al.*, 2005), assim como anticorpo irrelevante policlonal de coelho não imunizado. Possivelmente estes fagos sejam ligantes de porções constantes em anticorpos interespecies. Por outro lado, os demais fagos selecionados – 3P8, 3P13, 3P19, 3P20, 3P23 e 3P30 – foram específicos, apresentando alta reatividade frente ao anticorpo anti-AFB1, assim como baixa reatividade a moléculas irrelevantes (GRÁFICO 6).

A ligação do anticorpo especificamente aos mimotopos foi comparada com o auxílio de outro ensaio imunoenzimático que demonstrou que a interação com o anticorpo anti-AFB1 foi dependente da concentração de fago estabelecida, de 1×10^{11} a 1×10^8 TU/mL (GRÁFICO 7). Fagos expressando mimotopos com baixa reatividade (3P25 e fago silvestre) não foram capazes de estabelecer esta condição, indicando que os mimotopos selecionados e AFB1 competem pelo anticorpo anti-AFB1, por ligação a sítios similares.

Com relação ao ensaio de competição não foi possível estabelecer o alcance de concentrações de AFB1 como competidor, ou seja, a concentração suficiente de AFB1 para saturar o *input* de anticorpo, inibindo a ligação com os mimotopos reativos. O resultado esperado era estabelecer a concentração dependente de competidor para a inibição da ligação do fago ao anticorpo, entretanto, pelos ensaios executados não foi possível estabelecer esta variação (GRÁFICOS 8, 9, 10 e 11). Em ensaios de competição estabelecidos por Liu *et al.* (2012) e Wang *et al.*, (2013) também não foi possível estabelecer a concentração de aflatoxina que permitisse a ligação do anticorpo ao fago, indicando a dificuldade de estabelecer ensaios de competição com aflatoxina.

Em resumo, baseado nos resultados de reatividade dos fagos nos imunoenaios, mimotopos de alta qualidade com habilidade de mimetizar as funções básicas do epítipo, como reconhecimento e antigenicidade, foram obtidos. Este efeito não foi verificado pelo fago irrelevante 3P25 ou pelo fago silvestre, demonstrando que o peptídeo selecionado mimetiza *in vitro* as características imunológicas correspondentes à região do epítipo de AFB1. Em particular, o mimotopo obtido no presente trabalho apresentou eficiência de ligação ao menos oito vezes superior comparada a estudos recentes de Liu *et al.* (2012) e Wang *et al.* (2013), um reflexo da estratégia empregada nos *pannings*.

Com isto foram indicados os fagos 3P8, 3P13, 3P19, 3P20, 3P23 e 3P30, expressando peptídeos miméticos de aflatoxina, como imunógenos candidatos para a continuidade do estudo. Enquanto não foi possível determinar a sequência peptídica dos mimotopos selecionados, a imunização de camundongos sensíveis à aflatoxina com peptídeos miméticos expressos em bacteriófagos demonstrou ser um bom delineamento para determinação da imunogenicidade e da indução da produção de anticorpos específicos. A metodologia de imunização foi estabelecida de acordo com GALFRÉ *et al.* (1996), que indicaram que o aumento da dose, aproximadamente 10^{11} TU por imunização, pode resultar em títulos mais altos em menos tempo.

Assim, os animais que receberam fagotopos miméticos de AFB1 foram capazes de induzir uma resposta imune específica à AFB1 e AFM1 (GRÁFICO 12). Isto indica que os fagotopos foram capazes de mimetizar o sítio de ligação à aflatoxina B1 em anticorpo monoclonal anti-AFB1. Esses possíveis antígenos vacinais também foram capazes de induzir anticorpos contra o metabólito tóxico AFM1, indicando que a biotransformação hepática de AFB1 pode não reduzir a eficiência do imunógeno. Desta forma, mesmo após a metabolização inicial de AFB1, os produtos da resposta imune induzidos por fagotopos selecionados puderam reconhecer o composto tóxico AFM1.

A avaliação da resposta imune foi feita após a terceira injeção, pois em geral um maior número de doses ou um período mais prolongado de imunização é requerido para a produção de anticorpos específicos (GALFRÉ *et al.*, 1996). No total foram realizadas cinco imunizações para obtenção de melhor resposta, entretanto, após a quarta imunização, em que foi empregada a sonicação dos fagos, não houve aumento no título de anticorpos específicos. A sonicação dos fagos foi empregada com o propósito de direcionamento da resposta imune para os alvos – peptídeos recombinantes – solúveis e individualizados, no entanto a exposição do mimotopo na superfície do fago parece favorecer a indução de anticorpos específicos (HENRY *et al.*, 2011; HASSAPIS *et al.*, 2014).

Paralelamente, após a seleção de fagos que expressam peptídeos miméticos de AFB1 também foram iniciados os trabalhos de obtenção do DNA viral. O material genético foi extraído com auxílio do kit comercial, kit QIAprep M13 (Qiagen, Alemanha), baseado na purificação de DNA de fita simples de fagos M13, apesar das bibliotecas utilizadas no presente estudo apresentarem bacteriófagos do tipo fd. Isto ocorre porque fagos filamentosos fazem parte de um grupo de fagos intimamente relacionados, diferindo de 6408 nucleotídeos em fagos fd e f1 para 6407 nucleotídeos em fagos M13, com 98% de homologia de DNA (RUSSEL *et al.*, 2004). Assim, o DNA de fita simples é isolado de partículas de fagos no sobrenadante da cultura, após centrifugação para remoção de células de *E. coli.*, e utilizado para sequenciamento e mutagênese (QIAGEN, 2002).

Entretanto, o sequenciamento do material genético obtido foi possível somente após a amplificação do DNA por PCR de colônia e após o *primer* ser redesenhado. Com esta estratégia foi possível determinar a sequência aminoacídica dos mimotopos selecionados, por meio de comparação das sequências biológicas. Mesmo as bibliotecas tendo apresentação de peptídeos variando de 8 a 17 resíduos de aminoácidos, somente a que apresenta peptídeos de 15-mer gerou o melhor mimotopo – QTDLDYLHPLINSWN – com alta eficiência de ligação ao anticorpo monoclonal anti-AFB1.

A comparação com sequências de mimotopos de aflatoxina previamente selecionadas por anticorpos anti-AFB1 (THIRUMALA-DEVI *et al.*, 2001, LI *et al.*, 2012 e WANG *et al.*, 2013) não revelou homologia em relação à sequência aminoacídica obtida, assim como não foram detectados domínios conservados putativos em bancos de dados disponíveis por BLAST 2.7.0 (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Thirumala-Devi *et al.* (2001) e Liu *et al.* (2012) sugerem a sequência consenso ‘...CYMDXC...’ e ‘HXXXPXH’, respectivamente, para sequência de mimotopos selecionados (sendo X qualquer resíduo de aminoácido). Wang *et al.* (2013) obtiveram cinco sequências diferentes, obtendo as sequências consenso ‘PHPWNP’ e ‘TXHRNW’.

Desta forma, foi possível determinar que a sequência aminoacídica do mimotopo selecionado no presente estudo fosse diferente de estudos anteriores utilizando outros anticorpos monoclonais anti-AFB1 (QUADRO 3). Entretanto, todas as sequências peptídicas obtidas até então exibem domínios hidrofóbicos correspondentes aos resíduos de aminoácidos aromáticos, que podem refletir um grau de mimetismo molecular pelas estruturas anelares nas moléculas de aflatoxina. Por outro lado, os aminoácidos mais comuns foram prolina (P), triptofano (W) e histidina (H), revelando pouca similaridade de interação em diferentes anticorpos anti-AFB1.

Embora alguns estudos tenham produzido peptídeos miméticos de aflatoxina, nenhum deles traduziu esta tecnologia para o modelo de imunização *in vivo*. As sequências de aminoácidos dos mimotopos podem ser idênticas ao antígeno original ou apresentar organização espacial muito semelhante e conseqüentemente serem capazes de induzir uma resposta específica (CHOULIER *et al.*, 2001). Esta estratégia de peptídeos obtidos por *phage display* em induzir a proteção contra toxinas foi confirmada em estudos anteriores (DE MOURA *et al.*, 2011; SAGONA *et al.*, 2016), fundamentando o presente estudo para explorar o potencial de peptídeo sintético e mimotopo em induzir uma resposta imune contra aflatoxina. Possivelmente este seja o primeiro relato empregando peptídeos miméticos de aflatoxina obtidos por *phage display* como imunógeno de vacina baseada em epítomos.

Em consequência, os experimentos *in vivo* demonstraram que tanto o peptídeo sintético quanto o fago expressando peptídeo mimético de aflatoxina foram capazes de induzir a produção de anticorpos anti-AFB1 em camundongos imunizados, assim comprovando o conceito de mimetismo (GRÁFICO 13). Esta estratégia reflete o desenvolvimento e o refinamento da tecnologia de *phage display*, em que peptídeos expressos em fagos, ligantes de anticorpo monoclonal, são gerados com o propósito de imunização, com o objetivo de induzir a produção de anticorpos anti-peptídeo que também reconhecem o antígeno nativo (HENRY *et al.*, 2015). Em particular, o uso de peptídeos conjugados aos fagos como imunógenos é vantajoso comparado com peptídeos livres por assumir uma conformação favorável para atuar como ligante de anticorpos, expondo regiões de reconhecimento de forma mais eficiente (HENRY *et al.*, 2011).

Aliado à seleção de peptídeos por *phage display* foi avaliada a resposta imunológica protetora por técnicas imunoquímicas e ensaios de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*. Preliminarmente, foram apresentados resultados de estimulação de macrófagos de aves de postura comercial (FIGURA 14). A ativação de monócitos periféricos foi realizada por lipopolissacarídeos (LPS), levando à diferenciação celular para macrófagos. Esta ativação pode resultar em secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12, TNF- α e IL-6, seguido por secreção tardia de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, para inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e controlar a resposta imune (MOSSER & EDWARDS, 2008).

Desta forma, foi estabelecida a estratégia de desafiar com aflatoxina os animais imunizados com antígenos miméticos para avaliação da secreção de citocinas anti- e pró-inflamatórias. Foram coletados macrófagos peritoneais e linfócitos esplênicos, na presença ou ausência da toxina, entretanto não foi comprovada a intoxicação ou proteção dos animais por análises hematológica, histopatologia e ativação celular com LPS (TABELAS 4 e 5; FIGURAS 15 e 16). Tendo como base estudos com aflatoxinas (IARC, 1993), é possível verificar que em alguns casos as toxinas podem causar alterações no perfil imunológico celular, mas é difícil estabelecer a dose de desafio para ensaios *in vitro* e *in vivo*. Considerando os resultados obtidos na imunização de camundongos e aves com conjugados de aflatoxina foi possível caracterizar a resposta imune em animais intoxicados, entretanto, quando os animais foram imunizados com antígenos miméticos e desafiados com aflatoxina não foi obtido o mesmo padrão de resposta imune. Portanto, no presente estudo, apesar de comprovar a capacidade de induzir a produção de anticorpos específicos por meio de antígenos miméticos de aflatoxina, não foi possível caracterizar a resposta imune frente ao desafio com a toxina empregando esse formato de imunização e caracterização *in vitro*.

O uso de peptídeos contendo sequência do mimotopo pode ser uma alternativa útil de imunização, entretanto, devido à baixa massa molecular e baixa imunogenicidade, vacinas baseadas em epítomos usualmente requerem o uso de adjuvantes para aumentar as respostas imunes antígeno-específicas (HENRY *et al.*, 2015). Esses adjuvantes, como proteínas, lipossomas ou polissacarídeos, são ubíquos em permitir que fagos ou peptídeos possam transpassar barreiras biológicas, aumentar o tempo de residência na corrente sanguínea e melhorar o reconhecimento específico (SUN & XIA, 2016).

Para este propósito, a quitosana tem sido utilizada na forma de nanopartículas para entrega de antígenos através de diferentes superfícies mucosas (YOO *et al.*, 2010). Assim, visando aumentar a eficiência da resposta imune específica e melhorar a imunogenicidade do peptídeo expresso pelo fago, foi proposto o encapsulamento do fago 3P30 em nanopartículas de quitosana para entrega nasal. Inicialmente, o biopolímero quitosana foi purificado e caracterizado (FIGURAS 17, 18, 19, 20) para determinação da concentração ideal de fago em 1×10^{11} TU/mL (FIGURA 21) e 20.000 moléculas de quitosana por molécula de fago (FIGURA 22) que permitisse a alta eficiência de 99% de encapsulamento de bacteriófagos em nanopartículas de quitosana, baseado na análise de titulação em *E.coli* K91, fase exponencial.

Desta forma foi confirmado que o revestimento por quitosana alterou as propriedades do fago, causando sua precipitação após centrifugação (FIGURA 23). Este efeito pode ser correlacionado com a massa adquirida pelo fago durante seu aprisionamento na malha macromolecular do polímero. Assim, partículas que apresentam reduzido tempo de voo comparadas com nanoestruturas – como o fago sozinho – foram produzida e demonstraram potencial em carrear os fagos através das vias aéreas (TSAPIS *et al.*, 2002). Além disto, devido à carga negativa do fago em pH 4,6 (-33 mV), o fago representou um ótimo modelo para interagir eletrostaticamente com quitosana, positivamente carregada nesta condição (+35 mV), sendo capaz de recobrir fagos individualmente, que exibiram similar carga positiva em pH 4,6 (+40 mV) (GRÁFICO 14). Complementarmente, um aumento no tamanho aparente do fago para ~345 nm foi um reflexo do revestimento pelo polímero (FIGURA 24).

Com relação à inocuidade das preparações vacinais de quitosana, os animais não apresentaram reações locais ou de toxicidade residual pela administração do polímero e purificados de fagos. Não eram esperadas reações locais nas vacinas formuladas com polímeros de quitosana, pois a quitosana é um polissacarídeo natural, não tóxico e biodegradável, aplicado em engenharia de tecidos e liberação controlada de drogas (JAYAKUMAR *et al.*, 2010). Vários estudos relatam a inocuidade do biopolímero para utilização em vacinas e sua capacidade de potencializar respostas imunes celular e humoral (ILLUM *et al.*, 2001; DAVIS, 2006; SHARMA *et al.*, 2015).

Igualmente, estudos comprovaram a biocompatibilidade e a ausência de citotoxicidade da quitosana em cultivo *in vitro* de fibroblastos de origem humana e animal (CHEN *et al.* 2006). Portanto, a quitosana tem se mostrado mais eficiente e segura quando comparada ao adjuvante incompleto de Freund e ao hidróxido de alumínio (ZAHAROFF *et al.* 2007), isso porque a quitosana, uma vez presente no organismo, pode ser degradada por lisozimas, resultando na liberação de carboidratos aminados, facilmente incorporados às vias metabólicas (CHATELET *et al.*, 2001).

Em relação à validação do potencial imunogênico de formulações de quitosana, após o encapsulamento dos fagos em nanopartículas de quitosana foi possível comprovar o aumento da resposta imune específica e da imunogenicidade do fago administrado via intranasal (GRÁFICO 15 e 16). Como o polímero foi capaz de recobrir individualmente os fagos em escala nanométrica (FIGURA 26) e, simultaneamente promover agregados micrométricos de quitosana (FIGURA 25), foi configurado como uma plataforma atrativa para entrega intranasal de antígenos (DAVIS, 2006). Baseado nas propriedades aderentes, assim como alta densidade proporcionada pela organização macromolecular assumida pela quitosana após o processo de precipitação, um aumento na absorção e uma exposição mais eficiente de peptídeos ao sistema imune são esperados pelos fagos (SHARMA *et al.*, 2015).

A eficiência de sistemas de entrega de antígenos depende do polímero utilizado para construir o sistema, afetando as propriedades físicoquímicas na interface biológica (SHARMA *et al.*, 2015). Para qualquer sistema de nano ou microesferas, certa proporção de antígeno carregado será encontrada na superfície das partículas ao invés de preso na parte central. Esse material superficial é liberado rapidamente provendo uma dose inicial seguida de liberação lenta do material do núcleo (DAVIS, 2006). Como objetos nanométricos são caracterizados por baixa inércia e, conseqüentemente, por rápida exalação pulmonar, o encapsulamento em nanopartículas de quitosana promoveu altos conteúdos de fagos na corrente sanguínea, pela habilidade do polímero em ancorar ao epitélio e dissociar lentamente, liberando os fagos ao tecido linfóide associado à mucosa (TSAPIS *et al.*, 2002).

Em conclusão, os experimentos desenvolvidos neste estudo usando antígenos miméticos de aflatoxina demonstraram que mimotopos de alta afinidade representaram o sítio de ligação ao antígeno aflatoxina em anticorpo específico. Após encapsulamento em nanopartículas de quitosana, uma melhoria na resposta imune específica *in vivo* foi promovida, demonstrando a importância da tecnologia de *phage display* em desenvolver imunógenos para haptenos carcinogênicos como a aflatoxina. Baseado nesta abordagem, este modelo experimental pode ser aplicado a outras micotoxinas que afetam as populações humana e animal.

7 CONCLUSÕES

De acordo com o objetivo geral do presente estudo foi possível a prospecção e a caracterização de antígenos miméticos de aflatoxina obtidos por *phage display*, que puderam mimetizar as funções básicas do epítipo, como reconhecimento e antigenicidade, em anticorpo anti-AFB1, comprovando o potencial destes vetores virais como imunógenos.

Desta forma, de acordo com os objetivos específicos:

- 1) A estratégia proposta para produção de anticorpos anti-AFM1 em camundongos e anti-AFB1 em aves não demonstrou eficácia, sendo optado pela aquisição comercial de anticorpos monoclonais e policlonais anti-AFB1 para execução da técnica de *phage display*;
- 2) As adequações da técnica de *phage display* previamente estabelecida permitiram a seleção de mimotopos com afinidade pelo sítio de ligação ao antígeno em anticorpo anti-AFB1;
- 3) Os resultados dos imunoenaios executados indicaram a alta especificidade de peptídeos expressos em fagos em mimetizar *in vitro* as características imunológicas correspondentes à AFB1 em anticorpo anti-AFB1;
- 4) Tendo como imunógenos os bacteriófagos que expressam peptídeos miméticos de aflatoxina, foi possível induzir a produção de anticorpos específicos anti-AFB1 e anti-AFM1 em camundongos, assim como estabelecer o uso de adjuvante na constituição da solução imunógeno;
- 5) A obtenção da sequência peptídica dos mimotopos selecionados, QTDLDYHLPLINSWN, assim como a síntese e conjugação do peptídeo viabilizaram a etapa seguinte do experimento, visando à imunização dos animais com antígenos miméticos de aflatoxina;
- 6) As estratégias empregadas de imunização com mimotopos e peptídeo sintético sugeriram que os imunógenos foram eficientes na indução de anticorpos específicos anti-AFB1. Mesmo sem o contato prévio com a toxina houve produção de anticorpos específicos, comprovando o mimetismo molecular do peptídeo selecionado. Entretanto, não foi possível caracterizar a resposta imune frente ao desafio com a toxina;
- 7) Com o objetivo de melhorar a resposta imune induzida por bacteriófagos como vetor viral de peptídeos miméticos de aflatoxina foi estabelecida a estratégia de encapsulamento de bacteriófagos em nanopartículas de quitosana;
- 8) Os bacteriófagos administrados via intranasal em nanopartículas de quitosana reproduziram a imunogenicidade original, configurando uma plataforma eficiente na indução de anticorpos específicos anti-aflatoxina.

Com o objetivo de desenvolver imunógenos baseados em adjuvantes para vacinação e entrega de antígenos, a abordagem multidisciplinar estabelecida neste trabalho foi claramente a solução para a obtenção de máximos benefícios do sistema particulado. Desta forma, os resultados obtidos encorajam a continuidade da pesquisa para o desenvolvimento de um modelo racional de vacina de subunidades, visando uma alternativa e um novo nicho na indústria farmacêutica para medicina veterinária no controle da aflatoxicose em animais de produção. Futuramente esta abordagem também poderá ser aplicada a outras micotoxinas que afetam as populações humana e animal.

8 PERSPECTIVAS

Para que o sistema de nanopartículas de quitosana-bacteriófago possa ser aceito como método de controle da aflatoxicose, uma pesquisa ampla ainda deve ser executada. O desenvolvimento de um produto comercial inclui a execução de testes de esterilidade (ausência de micro-organismos), estabilidade ao longo de um período determinado e avaliação das propriedades farmacocinéticas dos compostos fabricados, considerando as propriedades biológicas distintas de sistemas particulados. Por exemplo, células apresentadoras de antígenos profissionais normalmente são os alvos de antígenos depositados na mucosa: células dendríticas capturam partículas menores (20-200 nm), enquanto macrófagos interagem com partículas maiores (0,5-5 μm), devendo ser avaliado o mecanismo de absorção e interação com APCs, de acordo com as propriedades das nanopartículas obtidas. Por outro lado, a imunomodulação das preparações vacinais pode ser avaliada quanto à ativação da resposta imune humoral e celular, expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo, expressão genética de transcritos imunologicamente relevantes e secreção de citocinas por ELISA. Por fim, a produção em escala industrial inclui a comprovação da produção de imunógenos em volumes superiores aos executados no presente trabalho, assim como a comprovação da eficiência do produto em grupos maiores de animais de experimentação.

Em relação à quitosana, estudos adicionais podem ser realizados, principalmente de toxicidade, como ensaio da membrana cório-alantóide de embrião de galinha ou ensaio de citotoxicidade e viabilidade *in vitro*, pois a aprovação de um produto implica na comprovação da baixa toxicidade do composto. Outras técnicas que poderiam ser aplicadas são: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, para avaliação da composição de quitosana e nanopartículas por níveis vibracionais específicos; difração em raios X, para estabelecer um padrão de difração do polímero e da interação com bacteriófagos; calorimetria de varredura diferencial, para caracterizar a estabilidade térmica e pureza das preparações, e microscopia de força atômica, para comprovação do revestimento dos fagos pela quitosana.

Assim, tendo sido configurada como uma plataforma eficiente e específica para entrega de antígenos via intranasal, alternativamente as nanopartículas de quitosana-bacteriófagos podem ser aplicadas pela via oral, que também permite a aplicação em massa em animais de produção por um sistema mais simples de administração, via água de bebida. As complexidades para essa preparação vacinal são maiores, pela diluição do antígeno em extensa área de superfície gastrointestinal, pelo contato com a acidez estomacal e inúmeras enzimas digestivas e pela tolerância imunológica na superfície da mucosa intestinal.

Comprovada a capacidade do peptídeo sintético de induzir resposta imune específica contra AFB1 poderá ser testado também o encapsulamento desse antígeno mimético de aflatoxina em nanopartículas de quitosana. A caracterização das concentrações de peptídeo e quitosana (DLS e potencial ζ) deve ser realizada novamente com o objetivo de estabelecer a formulação ideal para o eficiente aprisionamento do peptídeo na malha de quitosana, seja em escala nano ou micrométrica.

Visando à aplicação na medicina veterinária, esta abordagem pode ainda ser estendida para o controle de aflatoxinas em animais de produção, como suínos, frangos de corte, poedeiras comerciais, perus e gado leiteiro. Nesse caso, a incorporação de aflatoxinas para desafio *in vivo* pode ocorrer via ração, uma vez que esta é a via habitual de intoxicação dos animais e a concentração de aflatoxina necessária para o desenvolvimento da aflatoxicose está estabelecida.

Por fim este modelo racional de vacina de subunidades pode ser aplicado para outras micotoxinas que afetam as populações humana e animal. Em relação à aflatoxina, o apelo à saúde pública, pela ingestão de metabólitos de aflatoxina em produtos de origem animal, incentiva à aplicação de medidas de controle na produção animal. Por outro lado, micotoxinas, como zearalenona, apresentam sérias implicações clínicas, como a infertilidade e o hiperestrogenismo, assim como implicações econômicas, pois não são aplicáveis medidas de controle inespecíficas como a inclusão de adsorventes na ração.

REFERÊNCIAS

- ALBAN, S.M.; DE MOURA, J.F.; MINOZZO, J.C.; MIRA, M.T.; SOCCOL, V.T. Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. **BMC Infectious diseases**, v.13, n.42, p.1-9, 2013.
- ALVARENGA, L.M.; MACHADO DE AVILA, R.A.; AMIM, P.R.; KALAPOTHAKIS, E.; DE LIMA, M.E.; SANTOS, R.G.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v.46, n.6, p.664-671, 2005.
- AMIDI, M.; ROMEIJN, S.G.; VERHOEF, J.C.; JUNGINGER, H.E.; BUNGENER, L.; HUCKRIEDE, A.; CROMMELIN, D.J.A.; JISKOOT, W. N-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in mouse model. **Vaccine**, v.25, p.144-153, 2007.
- AMIDI, M.; MASTROBATTISTA, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W.E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.62, n.1, p.59-82, 2010.
- ARAP, M.A. *Phage display* technology – Applications and Innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.1-9, 2005.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databases search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- BACK, A. Micotoxicoses. In: _____. **Manual de Doenças de Aves**. 2.ed. Cascavel: Editora Integração, 2010, p. 207-219.
- BIRD, C.R.; THORPE, R. Purification of Immunoglobulin Y (IgY) from chickens eggs. **The Protein Protocols Handbook**, parte VII, p.1009-1011, 2002.
- BLOUNT, W.P. Turkey “X” disease. **Turkeys**, v.9, n.2, p.52-67.
- BONNYCASTLE, L.L.C.; MEHROKE, J.S.; RASHED, M.; GONG, X.; SCOTT, J.K. Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. **Journal of Molecular Biology**, v. 258, p.747-762, 1996.
- BORGES, O.; SILVA, M.; DE SOUSA, A.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H.E.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen. **International Immunopharmacology**, v.8, n.13-14, p.1773-1780, 2008.
- BORNE, P-M.; COMTE, S. **Vacinas e Vacinação na produção avícola**. 1 ed. Porto Feliz: Editora Gessulli, 2003, 140p.
- BOUTRIF E.; CANET, C. **Mycotoxin prevention and control**. FAO programmes. Revue méd. vet, v.149, n.6, p.681-694, 1998.
- BRASIL. Resolução – RDC 274, de 15 de outubro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n.201, p.45, 16 out. 2002. Seção 1.

BRODSKY, L. O tecido linfóide do anel de Waldeyer: tonsilas palatinas, nasofaríngeas e linguais. In: SIH, T.; CHINSKI, A.; EAVEY, R.; GODINHO, R. **IX Manual de otorrinolaringologia pediátrica IAPO**. Cap 9, p.69-80, 2011.

BROUSSIGNAC, P. Chitosan: a natural polymer not well known by the industry. **Chimie et industrie, Génie chimique**, v.99, p.1241-1247, 1968.

BUCZKOWSKI, H.; PARIDA, S.; BAILEY, D.; BARRETT, T.; BANYARD, A.C. A novel approach to generating morbillivirus vaccines: negatively marking the rinderpest vaccine. **Vaccine**, v.30, p.1927-1935, 2012.

CAPELLI-PEIXOTO, J.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; CHAVES-MOREIRA, D.; MINOZZO, J.C.; GABARDO, J.; TEIXEIRA, K.N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; ALVARENGA, L.M.; DE MOURA, J.F. Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis. **Vaccine**, v.29, p.9473-9479, 2011.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v.22, n.3, p.261-268, 2001.

CHEN, X. G.; LIU, C. S.; LIU, C. G.; MENG, X. H.; LEE, C. M.; PARK, H. J. Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. **Biochemical Engineering Journal**, v.7, n.3, p.269-274, 2006.

CHOULIER, L.; LAUNE, D.; ORFANOUDAKIS, G.; WLAD, H.; JANSON, J.C.; GRANIER, C.; ALTSCHUH, D. Delineation of a linear epitope by multiple peptide synthesis and *phage display*. **Journal of Immunological Methods**, v.249, p.253-264, 2001.

CHU, F.S.; HSIA, M.T.S.; SUN, P.S. Preparation and characterization of aflatoxin B1-1-(O-carboxymethyl) oxime. **Journal of the AOAC**, v.60, n.4, p.791-794, 1977.

CHU, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research**, v.259, n. 3-4, p. 291-306, 1991.

DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin b1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in argentina. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p 179-184, 1997.

DAVIS, S.S. The use of soluble polymers and polymer microparticles to provide improved vaccine responses after parenteral and mucosal delivery. **Vaccine**, 24S2, S2/7-S2/10, 2006.

DHANASEKARAN, D.; SHANMUGAPRIYA, S.; THAJUDDIN, J.; PANNEESESELVAM, A. Aflatoxins and Aflatoxicosis in human and animals. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.G. **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. 3ed. Croácia: InTech, 2011, p.221-254.

DE MOURA, J.; FELICORI, L.; MOREAU, V.; GUIMARÃES, G.; DIAS-LOPES, C.; MOLINA, L.; ALVARENGA, L.M.; FERNANDES, P.; FRÉZARD, F.; RIBEIRO, R.R.; FLEURY, C.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine**, v.29, n.45, p.7992-8001, 2011.

DIAZ, G.J.; MURCIA, H.W. Biotransformation of Aflatoxin B1 and its relationship with the differential toxicological response to aflatoxin in commercial poultry species. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.G. **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. 3ed. Croácia: InTech, 2011, p.1-20.

DOMARD, A.; GEY, C.; RINAUDO, M.; TERRASIN, C. ^{13}C and ^1H NMR spectroscopy of chitosan and N-trimethyl chloride derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.9, p.233-237, 1987.

FAIR, J. M.; TAYLOR-MCCABE, K. J.; SHOU, Y.; MARRONE, B. L. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.125, n.3-4, p.268-273, 2008.

FANG, J.; WANG, G.; YANG, Q.; SONG, J.; WANG, Y.; WANG, L. The potential of *phage display* virions expressing malignant tumor specific antigen mage-a1 epitope in murine model. **Vaccine**, v.23, p.4860-4866, 2005.

FDA, Food and Drug Administration. **Guidance for industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed**, August, 2000.

FOGAÇA, R.L.; CAPELLI-PEIXOTO, J.; YAMANAKA, I.B.; ALMEIDA, R.P.M.; MUZZI, J.C.D.; BORGES, M.; COSTA, A.J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; ALVARENGA, L.M.; DE MOURA, J.F. Phage-displayed peptides as capture antigens in an innovative assay for *Taenia saginata*-infected cattle. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p.8887-8894, 2014.

FRENKEL, D.; DEWACHTER, I.; VAN LEUVEN, F.; SOLOMON, B. Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease animal model improves behavioral performance in morris water maze trials. **Journal of Molecular Neuroscience**, v.24, p.105-113, 2004.

FUMAGALLI, M. **Proteção contra a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por *Phage display* e *Spot synthesis***. Dissertação de mestrado em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

GÁLÁN, A.; COMOR, L.; HORVATIC, A.; KULES, J.; GUILLERMIN, N.; MRLJAK, V.; BHIDE, M. Library-based display technologies: where do we stand? **Molecular Biosystems**, v.12, p. 2342-2358, 2016.

GALFRÉ, G.; MONACI, P.; NICOSIA, A.; LUZZAGO, A.; FELICI, F.; CORTESE, R. Immunization with Phage-Displayed Mimotopes. **Methods in Enzymology**, v.267, p.109-115, 1996.

GAZARIAN, K.G.; PALACIOS-RODRIGUEZ, Y.; GAZARIAN, T.G.; HUERTA, L. Hiv-1 v3 loop crown epitope-focused mimotope selection by patient serum from random *phage display* libraries: Implications for the epitope structural features. **Molecular Immunology**, v.54, p.148-156, 2013.

GEFEN, T.; VAYA, J.; KHATIB, S.; RAPOPORT, I.; LUPO, M.; BARNEA, E.; ADMON, A.; DAN HELLER, E.; AIZENSHTAIN, E.; PITCOVSKI, J. The effect of hapten on protein-carrier immunogenicity. **Immunology**, v.144, p.116-126, 2014.

GENTILUCCI, L.; TOLOMELLI, A.; SQUASSABIA, F. Peptides and Peptidomimetics in Medicine, Surgery and Biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, p.2449-2466, 2006.

GIOVATI, L.; GALLO, A.; MASOERO, F.; CERIOLI, C.; CIOCIOLA, T.; CONTI, S. Vaccination of heifers with aflatoxin improves the reduction of aflatoxin B1 carry over in milk of lactating dairy cows, **PlosOne**, v.8-9, n.4, e.94440, 2014.

GREEN, M.R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GREENWOOD, J.; WILIS, A.E.; PERHAM, R.N. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. **Journal of Molecular Biology**, v.220, p.821-827, 1991.

HALADI, S. **Micotoxins**. Disponível em: <<http://www.knowmycotoxins.com/archive.htm>>. Acesso em: janeiro de 2013.

HAMBY, C. V. Use of peptide library screening to detect a previously unknown linear diagnosis epitope: proof of principle by use of Lyme disease sera. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n.7, p. 801-807, 2005.

HAMZEH-MIVEHROUD, M.; ALIZADEH, A.A.; MORRIS, M.B.; CHURCH, W.B.; DASTMALCHI, S. *Phage display* as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.18, n.23-24, p. 1144-1157, 2013.

HARDY, B.; RAITER, A. A mimotope peptide-based anti-cancer vaccine selected by bat monoclonal antibody. **Vaccine**, v.23, p.4283-4291, 2005.

HARTMANN, C.; MULLER, N.; BLAUKAT, A.; KOCH, J.; BENHAR, I.; WELS, W.S. Peptides mimotopes recognized by antibodies cetuximab and matuzumab induce a functionally equivalent anti-egfr immune response. **Oncogene**, v.29, p.4517-4527, 2010.

HASSAPIS, K.A.; STYLIANOU, D.C.; KOSTRIKIS, L.G. Architectural insight into inovirus-associated vectors (IAVs) and development of IAV-based vaccines inducing humoral and cellular responses: implications in HIV-1 vaccines. **Viruses**, v.6, p.5047-5076, 2014.

HE, Q-H.; XU, Y.; HUANG, Y-H.; LIU, R-R.; HUANG, Z-B.; LI, Y-P. Phage-displayed peptides that mimic zearalenone and its application in immunoassay. **Food Chemistry**, v.126, p.1312-1315, 2011.

HE, Z-H.; HE, Q-H.; XU, Y.; LI, Y-P.; LUI, X.; CHEN, B.; DA, L.; SUN, C-H. Ochratoxin A mimotope from second-generation peptide library and its application in immunoassay. **Analytical Chemistry**, v.85, n.21, p.10304-10311, 2013.

HENRY, K.A.; MURIRA, A.; VAN HOUTEN, N.E.; SCOTT, J.K. Developing strategies to enhance and focus humoral immune responses using filamentous phage as a model antigen. **Bioengineered Bugs Journal**, v.2, p.275-283, 2011.

HENRY, K.A.; ARBABI-GHAHROUDI, M.; SCOTT, J.K. Beyond *phage display*: non-traditional applications of the filamentous bacteriophage as a vaccine carrier, therapeutic biologic, and bioconjugation scaffold. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 755, 2015.

HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v.26, p.87-94, 1991.

HUANG, J.X.; BISHOP-HURLEY, S.L.; COOPER, M.A. Development of anti-infective using *phage display*: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. **Antimicrobial and Chemotherapy**, v.56, n.9, p.4569-4582, 2012.

ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; FISCHER, A.N.; DAVIS, S.S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced drug delivery reviews**, v.51, n.1-3, p.81-96, 2001.

IRVING, M.B.; CRAIG, L.; MENENDEZ, A.; GANGADHAR, B.P.; MONTERO, M.; VAN HOUTEN, N.E.; SCOTT, J.K. Exploring peptide mimics for the production of antibodies against discontinuous protein epitopes. **Molecular Immunology**, v.47, p.1137-1148, 2010.

JAGER, A.V.; RAMALHO, F.S.; ZAMBELLI, L.A.; OLIVEIRA, C.A.F. Biomarkers of aflatoxin exposure and its relationship with the hepatocellular carcinoma. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.G. **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. 3ed. Croácia: InTech, 2011, p.108-126.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; NAIR, S. V.; TOKURA, S.; TAMURA, H.; SELAVAMURUGAN, N. Novel carboximethy derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. **Progress in Materials Science**, n.5, p.675-709, 2010.

JAYE, D.L.; GEIGERMAN, C.M.; FULLER, R.E.; AKYILDIZ, A.; PARKOS, C.A. Direct fluorochrome labeling of phage display library clones for studying binding specificities: applications in flow cytometry and fluorescence microscopy. **Journal of Immunological Methods**, v.295, p.119-127, 2004.

JIANG, H-L.; PARK, I-K.; SHIN, N-R.; KANG, S-G.; YOO, H-S.; KIM, S-I.; SUH, S-B.; AKAIKE, T.; CHO, C-S. In vitro study of the immune stimulating activity of an atrophic rhinitis vaccine associated to chitosan microspheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.471-476, 2004.

KASAAI, M.R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p.801-810, 2010.

KEHOE, J.W.; KAY, B.K. Filamentous *phage display* in the new millennium. **Chemical Reviews**, v.105, n.11, p.4056-4072, 2005.

KIM, B-G.; KANG, I-J. Evaluation of the effects of biodegradable nanoparticles on a vaccine delivery system using, AFM, SEM and TEM. **Ultramicroscopy**, v.108, n.10, p.1168-1173, 2008.

KOLOSSOVA, A.; STROKA, J.; BREIDBACH, A.; KROEGER, K.; AMBROSIO, M.; BOUTEN, K.; ULBERTH, F. **Evaluation of the effect of mycotoxin binders in animal feed on the analytical performance of standardized methods for the determination of mycotoxins in feed**. JRC Scientific and Technical Reports, European Commission, Bélgica, 2009.

LESSON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**, Guelph University Books, Ontario, Canada, 1995.

LIU, R.; YU, Z.; HE, Q.; XU, Y. An immunoassay for ochratoxin A without the mycotoxin. **Food Control**, v.18, p.872-877, 2007.

LIU, R.; XU, L.; QIU, X.; CHEN, X.; DENG, S.; LAI, W.; XU, Y. An immunoassay for determining aflatoxin B1 using a recombinant phage as a nontoxic coating conjugate. **Journal of Food Safety**, v.32, p.318-325, 2012.

LUNDER, M.; BRATKOVIC, T.; URLEB, U.; KREFT, S.; STRUKELJ, B. Ultrasound in *phage display*: a new approach to nonspecific elution. **Biotechniques**, v.44, p.893-900, 2008.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. Micotoxinas e suas interações na suinocultura, p.581-610. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**, Cãnone Editorial, 2 ed., 960p. 2012.

MANAFI, M. Aflatoxicosis in layer and breeder hen. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.G. **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. 3ed. Croácia: InTech, 2011, p.203-220.

MENENDEZ, A.; SCOTT, J.K. The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. **Analytical Biochemistry**, v.336, p.145-157, 2005.

MOON, E.Y.; RHEE, D.K.; PYO, S. Inhibition of various functions in murine peritoneal macrophages by aflatoxin B1 exposure in vivo. **International Journal of Immunopharmacology**, v.21, p.47-58, 1999.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p.958-969, 2008.

MOUREZ, M.; KANE, R.S.; MOGRIDGE, J.; METALLO, S.; DESCHATELETS, P.; SELLMAN, B.R.; WHITESIDES, G.M.; COLLIER, R. J. Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin. **Nature biotechnology**, v.19, p.958-961, 2001.

MURUGESAN, G.R.; LEDOUX, D.R.; NAEHRER, K.; BERTHILLER, F.; APPLGATE, T.J.; GRENIER, B.; PHILLIPS, T.D.; SCHATZMAYR, G. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. **Poultry Science**, v.94, p.1298-1315, 2015.

OSWALD, I. Mycotoxins and Immunity. Disponível em: <<http://www.knowmycotoxins.com/archive.htm>>. Acesso em: janeiro de 2013.

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

PARK, D.L. Effect of processing on aflatoxin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 504, p. 173-179, 2002.

PEIXOTO, J.C. **Tecnologia de *phage display* para obtenção de antígenos sintéticos e utilização no diagnóstico e imunoproteção da cisticercose**. 105f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PIZZOLITTO, R.P.; BUENO, D.J.; ARMANDO, M.R. Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.G. **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. 3ed. Croácia: InTech, 2011, p.323-346.

POLONELLI, L.; GIOVATI, L.; MAGLIANI, W.; CONTI, S.; SFORZA, S.; CASOLI, C.; RONZI, P.; GRILLI, E.; GALLO, A.; MASOERO, F.; PIVA, G. Vaccination of lactating dairy cows for the prevention of aflatoxina B1 carry over in milk. **PLoS ONE**, v. 6, n.10, e26777, 2011.

QUEMENEUR, F.; RAMMAL, A.; RINAUDO, M.; PÉPIN-DONAT, B. Large and giant vesicles “decorated” with chitosan: effects of pH, salt or glucose stress, and surface adhesion. **Biomacromolecules**, v.8, n.8, p.2512-2519, 2007.

QIAGEN. **QIAprep® M13 handbook**. Alemanha:QIAGEN, 2002.

QUINTEIRO FILHO, W.M. **Efeitos do estresse térmico por calor sobre os índices zootécnicos, a integridade intestinal e a imunidade inata em frangos de corte**. 138f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RAMADA, J.S.; BECKER-FINCO, A.; MINOZZO, J.C.; FELICORI, L.F.; AVILA, R.A.M.; MOLINA, F.; NGUYEN, C.; DE MOURA, J.F.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; ALVARENGA, L.M. Synthetic peptides for *in vitro* evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles* antivenoms. **Toxicon**, v.73, p.47-55, 2013.

RAUW, F.; GARDIN, Y.; PALYA, V.; ANBARI, S.; GONZE, M.; LEMAIRE, S.; VAN DER BERG, T.; LAMBRECHT, B. The positive adjuvant effect of chitosan on antigen-specific cell-mediated immunity after chickens vaccination with live Newcastle disease vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 134, n. 15, p. 249-258, 2010.

RAZZAGHI-ABYANEH, M; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; CHANG, P.K. Aflatoxins: mechanisms of inhibition by antagonistic plants and microorganisms. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.G. **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. 3ed. Croácia: InTech, 2011, p.285-304.

RECILLAS, M.; SILVA, L.L.; PENICHE, C.; GOYCOOLEA, F.M.; RINAUDO, M.; ARGUELLES-MONAL, W.M. Thermoresponsive behavior of chitosan-g-N-isopropylacrylamide copolymer solutions. **Biomacromolecules**, v.10, n.6, p.1633-1641, 2009.

RICHARD, J.L.; PAYNE, G.A. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems, **Council for Agricultural Science and Technology**, Task Force Report, n.139,199p. 2003.

ROYES, J.B.; YANONG, R.P. **Molds in fish feeds and aflatoxicosis**. Facts Sheet FA-95, University of Florida, Institute of Food and Agricultural Science, 2002

RUSSEL, M.; LOWMAN, H.B.; CLACKSON, T. Introduction to phage biology and *phage display*. In: **Phage display**. 1ed. New York: Oxford University Press, 2004, p.1-24.

SAITO, H.; TABETA, R.; OGAWA, K. High-resolution solid-state ¹³C NMR study oh chitosan and its salt with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent ¹³C chemical shifts. **Macromolecules**, v.20, p.2424-2430, 1987.

SARI, R.S. **Desenvolvimento de vacina de liberação controlada contra *C. botulinum* tipo C e tipo D utilizando quitosana**. 141f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

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

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em Alimentos**. Editora Insular, 144p. 1998.

SHARMA, R.; AGRAWAL, U.; MODY, N.; VYAS, S.P. Polymer nanotechnology based approaches in mucosal vaccine delivery: Challenges and opportunities. **Biotechnology Advances**, v.33, p.64-79, 2015.

SHARMA, S.; MUKKUR, T.K.S.; BENSON, H.A.E; CHEN, Y. Pharmaceutical aspects of intranasal delivery of vaccines using particulate systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.98, n.3, p.812-843, 2009.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

SILVA JR, A.; KAWAZOE, U.; FREITAS, F.F.T; GATTI, M.S.V.; DOLGER, H.; SCHUMACHER, R.I.; JULIANO, M.A.; SILVA, M.J.; LEITE, A. Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from *phage display* libraries. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.120, p.53-60, 2002.

SILVESTRE, B.T.; RABELO, E.M.L; VERSIANI, A.F.; DA FONSECA, F.G.; SILVEIRA, J.A.G.; BUENO, L.L.; FUJIWARA, R.T.; RIBEIRO, M.F.B. Evaluation of humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1 α from *Anaplasma marginale* using nanotubes as a carrier molecule. **Vaccine**, v.32, p.2160-2166, 2014.

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

SOARES, K.S.R. **Obtenção e avaliação do potencial imunoadjuvante de nanopartículas de quitosana na produção de antisseros contra venenos de serpentes e escorpiões**. 90f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**, Cânone Editorial, 2 ed., 960p. 2012.

SOLOMON, B. Active immunization against Alzheimer's beta-amyloid peptide using *phage display* technology. **Vaccine**, v.25, p.3053-3056, 2007.

STAROS, J.V.; WRIGHT, R.W.; SWINGLED.M. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. **Analytical Biochemistry**, v.156, p.220-222, 1986.

STOUTE, J.A.; BALLOU, W.R.; KOLODNY, N.; DEAL, C.D.; WIRTZ, R.A.; LINDLER, L.E. Induction of humoral immune response against *Plasmodium falciparum* sporozoites by immunization with a synthetic peptide mimotope whose sequence was derived from screening a filamentous phage epitope library. **Infection and Immunity**, v.63, p.934-939, 1995.

SUN, B.; XIA, T. Nanomaterial-based vaccine adjuvants. **Journal of Materials Chemistry B**, v.4, p.5496-5509, 2016.

TAJKARIMI, M.; SHOJAEI, M.H.; YAZDANPANA, H.; IBRAHIM, S.A. Aflatoxin in agricultural commodities and herbal medicine. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.G. **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. 3ed. Croácia: InTech, 2011, p.221-254.

THEUMER, M.G.; RUBISTEIN, H.R. The evolutionary dynamics in the research on aflatoxins during the 2001-2010 decade. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.G. **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. 3ed. Croácia: InTech, 2011, p.305-322.

THERMO SCIENTIFIC. **EDC Instructions**, 0475-5. Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos, 2011.

THIRUMALA-DEVI, K.; MAYO, M.A. Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B1. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.284-288, 1999.

THIRUMALA-DEVI, K.; MILLER, J.S.; REDDY, G.; REDDY, D.V.R.; MAYO, M.A. Phage-displayed peptides that mimic aflatoxin B1 in serological reactivity. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.330-336, 2001.

TOLEDO-MACHADO, C.M.; BUENO, L.L.; MENEZES-SOUZA, D.; MACHADO-DE-ÁVILA, R.A.; NGUYEN, C.; GRANIER, C.; BARTHOLOMEU, D.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; FUJIWARA, R.T. Use of *phage display* technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. **Parasites & Vectors**, v.8, n.133, p.1-8, 2015.

TSAPIS, N.; BENNETT, D.; JACKSON, B.; WEITZ, D.A.; EDWARDS, D.A. Trojan particles: large porous carriers of nanoparticles for drug delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.19, p.12001-12005, 2002.

ULIVIERI, C.; CITRO, A.; IVALDI, F.; MASCOLO, D.; GHITTONI, R.; FANIGLIULO, D.; MANCA, F.; BALDARI, C.T.; PIRA, G.L.; DEL POZZO, G. Antigenic properties of HCMV peptides displayed by filamentous bacteriophage vs. synthetic peptides. **Immunology Letters**, v.119, p.62-70, 2008.

VAN DER LUBBEN, I.M.; VERHOEF, J.C.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H.E. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.14, p.210-207, 2001.

VANDERBORGHT, T. Where next with mycotoxin control? **International Poultry Production**, v.18, n.1, p.7-9, 2010.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; JANES, K.; BEHRENS, I.; KISSEL, T.; JATO, J.L.V.; ALONSO, M.J. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.123-131, 2004.

VILLA-MANCERA, A.; QUIROZ-ROMERO, H.; CORREA, D.; IBARRA, F.; REYES-PEREZ, M.; REYES-VIVAS, H.; LOPEZ-VELAZQUEZ, G.; GAZARIAN, K.; GAZARIAN, T.; ALONSO, R.A. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin 1 selected from *phage display* library. **Parasitology**, v.135, p.1437-1445, 2008.

VODNIK, M.; ZAGER, U.; STRUKELJ, B.; LUNDER, M. *Phage display*: selecting straws instead of a needle from a haystack. **Molecules**, v.16, p.790-817, 2011.

WANG, G.; SUN M.; FANG, J.; YANG, Q.; TONG, H.; WANG, L. Protective immune responses against systemic candidiasis mediated by phage-displayed specific epitope of *Candida albicans* heat shock protein 90 in c57b1/6j mice. **Vaccine**, v.24, p.6065-6073, 2006a.

WANG, X.Z.; FU, Z.Q.; HUANG, S.P.; ZHU, G.Q.; CAI, Y.M.; LIN, J.J. Studies on *phage displayed* mimotopes of a protective monoclonal antibody (ssj14) against *Schistosoma japonicum*. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v.22, p.119–124, 2006b.

WANG, Y.; WANG, H.; LI, P.; ZHANG, Q.; KIM, H.J.; GEE, S.J.; HAMMOCH, B.D. Phage-displayed peptide that mimics aflatoxins and its application in immunoassay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.10, p. 2426-2433, 2013.

WANG, H.; LIU, R.; CUI, J.; DENG, S.; XIE, J.; NIN, Z.; ZHANG, G. Characterization and utility of phages bearing peptides with affinity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp7 protein. **Journal of Virological Methods**, v.222, p.231-241, 2015.

WEI, J.; GU, Y.; YANG, Y.; WANG, S.; CUI, S.; ZHU, X. Identification and characterization of protective epitope of *Trichinella spiralis* paramyosin. **Vaccine**, v.29, p.3162-3168, 2011.

WILD, C.P.; MILER, J.D.; GROOPMAN, J.D. **Mycotoxin control in low and middle income countries**. International Agency for Research on Cancer, WHO Press, Lyon, France, 2015.

WILKINSON, J.; ROOD, D.; MINIOR, D.; GUILLARD, K.; DARRE, M.; SILBART, L.K. Immune response to mucosally administered aflatoxina B1 vaccine. **Poultry Science**, v.82, p. 1565-1572, 2003.

WILKINSON, R.A.; EVANS, J.R.; JACOBS, J.M.; SLUNAKER, D.; PINCUS, S.H.; PINTER, A.; PARKOS, C.A.; BURRITT, J.B.; TEINTZE, M. Peptides selected from a *phage display* library with an HIV-neutralizing antibody elicit antibodies to HIV gp120 in rabbits, but not the same epitope. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.23, p.1416-1427, 2007.

WILSON R.; ZIPRIN, R.; RAGSDALE, S.; BUSBEE, D. Uptake and vascular transport of ingested aflatoxin. **Toxicology Letters**, v.29, n. 2-3, p.169-176, 1985.

WOGAN, G.N.; EDWARD, G.S.; SHANK, R.C. Excretion and tissue distribution of radioactivity from aflatoxin B1-C14 in rats. **Cancer Research**, v. 27, n.10, p. 1729-1736, 1967.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally Occuring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. IARC, v.56, 609p., 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the production and quality control of synthetic peptide vaccines. **WHO Technical Report Series**, n.889, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Public health strategies for preventing aflatoxin exposure**. Workgroup report for the International Mycotoxin Workshop: Geneva, 2005.

WU, Y.; WAN, Y.; BIAN, J.; ZHAO, J.; JIA, Z.; ZHOU, L.; ZHOU, W.; TAN, Y. *Phage display* particles expressing tumor-specific antigens induce preventive and therapeutic anti-tumor immunity in murine p815 model. **International Journal of Cancer**, v.98, p.748-753, 2002.

YAMANAKA, I.B. **Identificação de moléculas ligantes dos transcritos do cromossomo Philadelphia – Diagnóstico e monitoramento da doença residual mínima em leucemias**. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

YANG, Q.; WANG, L.; LU, D.N.; GAO, R.J.; SONG, J.N.; HUA, P.Y.; YUAN, D.W. Prophylactic vaccination with phage-displayed epitope of *C. albicans* elicits protective immune responses against systemic candidiasis in c57b1/6 mice. **Vaccine**, v.23, p.4088-4096, 2005.

YOO, M-K.; KANG, S-K.; CHOI, J-H.; PARK, I-K.; SA, H-S.; LEE, H-C.; KIM, E-B.; LEE, N-K.; NAH, J-W.; CHOI, Y-J.; CHO, C-S. Targeted delivery of chitosan nanoparticles to Peyer's patch using M cell-homing peptide selected by *phage display* technique. **Biomaterials**, v.31, p.7738-7747, 2010.

YU, J.; ERHLICH, K.C. Aflatoxin biosynthetic pathway and pathway genes. In: GUEVARA-GONZALEZ, R.G. **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. 3ed. Croácia: InTech, 2011, p.42-66.

YUAN, Q.; PESTKA, J.J.; HESPENHEIDE, B.M.; KUHN, L.A.; LINZ, J.E.; HART, L.P. Identification of mimotope peptides which bind to the mycotoxin deoxynivalenol-scpecific monoclonal antibody. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.8, p.3279-3286, 1999.

ZAHAROFF, D. A.; ROGERS, C. J.; HANCE, K. W.; SCHLOM, J.; GREINER, J. W. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. **Vaccine**, v.25, n.11, p.2085-2094, 2007.

ZHAO, K.; SHI, K.; ZHAO, Y.; WEI, H.; SUN, Q.; HUANG, T.; ZHANG, X.; WANG, Y. Preparation and immunological effectiveness of swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. **Vaccine**, v.26, n.47, p.8549-8556, 2011.

ZHANG, D.; LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; HUANG, Y.; DING, X.; JIANG, J. Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure. **Analytica Chimica Acta**, V.636, P.63-69, 2009.

ZHONG, Y.; CAI, J.; ZHANG, C.; XING, X.; QIN, E.; HE, J.; MAO, P.; CHENG, J.; LIU, K.; XU, D. Mimotopes selected with neutralizing antibodies against multiple subtypes of influenza A. **Virology Journal**, v.8, e542, 2011.

ANEXO I

ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO

Carbohydrate Polymers 185 (2018) 63–72



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Physicochemical and immunological characterization of chitosan-coated bacteriophage nanoparticles for *in vivo* mycotoxin modeling



Carla Yoko Tanikawa de Andrade^a, Isabel Yamanaka^a, Laís S. Schlichta^b, Sabrina Karim Silva^a,
Guilherme F. Picheth^b, Luiz Felipe Caron^a, Juliana de Moura^a, Rilton Alves de Freitas^{b,*},
Larissa Magalhães Alvarenga^{a,*}

^a *Limq, Basic Patology Department, Federal University of Paraná, 81530-900 Curitiba, PR, Brazil*

^b *Biopol, Chemistry Department, Federal University of Paraná, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil*

ARTICLE INFO

Keywords:

Phage display
Mimotope
Aflatoxin B1
Peptide carrier
Mucosal vaccine
Chitosan

ABSTRACT

To propose a novel modeling of aflatoxin immunization and surrogate toxin conjugate from AFB1 vaccines, an immunogen based on the mimotope, (*i.e.* a peptide-displayed phage that mimics aflatoxins epitope without toxin hazards) was designed. The recombinant phage 3P30 was identified by phage display technology and exhibited the ability to bind, dose dependent, specifically to its cognate target – anti-AFB1 antibody. In immunization assay, the phage-displayed mimotope and its peptide chemically synthesized were able to induce specific anti-AFB1 antibodies, indicating the proof of concept for aflatoxin mimicry. Furthermore, the phage 3P30 was homogeneously coated with chitosan, which also provided a tridimensional matrix network for mucosal delivery. After intranasal immunization, chitosan coated phages improved specific immunogenicity compared to the free antigen. It can be concluded that affinity-selected phage may contribute to the rational design of epitope-based vaccines in a prospectus for the control of aflatoxins and possibly other mycotoxins, and that chitosan coating improved the vectorization of the vaccine by the mucosal route.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.063>

ANEXO II
PATENTE REGISTRADA



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 020980 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 75095679000149

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Rua João Negrão, 280 2o andar

Cidade: Curitiba

Estado: PR

CEP: 80010-200

País: Brasil

Telefone: (41) 3360 7441

Fax: (41) 3360 7416

Email: inovacao@ufpr.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): SEQUÊNCIA PEPTÍDICA MIMÉTICA DE AFLATOXINA APLICADA COMO IMUNÓGENO

Resumo: A presente invenção está relacionada com o campo técnico da biotecnologia, sendo caracterizada por compreender a sequência aminoacídica QTDLDYHLPLINSWN capaz de induzir a produção de anticorpos específicos que reconhecem a aflatoxina B1. Com o objetivo de substituir conjugados de aflatoxina em imunizações e propor um modelo de imunização contra a toxina, foi obtido o imunógeno baseado no mimotopo, i.e. peptídeo mimético de aflatoxina expresso na superfície de bacteriófagos. O bacteriófago recombinante 3P30 foi selecionado pela técnica de phage display (Fig. 1, 2 e 3) e exibiu habilidade de ligação específica ao seu alvo cognato, anticorpo anti-AFB1 (Fig. 4), quando comparado a ligantes irrelevantes (Fig. 5), demonstrando perfil dose dependente (Fig. 6). Em ensaio de imunização, o mimotopo expresso em fago e o peptídeo sintetizado quimicamente foram capazes de induzir anticorpos anti-peptídeo que reconhecem a aflatoxina (Fig. 7). Esta estratégia comprova o mimetismo entre o peptídeo e a toxina, permitindo a aplicação do peptídeo mimético de aflatoxina para o desenvolvimento de vacinas.

Figura a publicar: 1

As figuras citadas no resumo da patente, FIG 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem às seguintes figuras da tese: FIG 6, GRÁF 3, GRÁF 4, GRÁF 5, GRÁF 6, GRÁF 7 e GRÁF 13.