CHRISTIANE YUMI OZAKI

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM FRAGMENTO
VARIÁVEL EM CADEIA ÚNICA CONTRA A TOXINA
TERMO-LÁBIL DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

**SÃO PAULO
2011**

CHRISTIANE YUMI OZAKI

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM FRAGMENTO
VARIÁVEL EM CADEIA ÚNICA CONTRA A TOXINA
TERMO-LÁBIL DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora:
Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

Versão Original

**SÃO PAULO
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ozaki, Christiane Yumi.

Clonagem e expressão de um fragmento variável em cadeia única contra a toxina termo-lábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica / Christiane Yumi Ozaki. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de anticorpos recombinantes.

Versão do título para o inglês: Cloning and expression of single-chain fragment variable against heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*

Descritores: 1. *Escherichia coli* enterotoxigênica 2. LT 3. scFv 4. Clonagem 5. Expressão gênica 6. *Escherichia coli* I. Piazza, Dra. Roxane Maria Fontes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0197/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Christiane Yumi Ozaki.

Título da Dissertação: Clonagem e expressão de um fragmento variável em cadeia única contra a toxina termo-lábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica.

Orientador(a): Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o projeto intitulado "Clonagem e expressão da fração variável de um anticorpo recombinante contra a toxina termo-lábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)", sob responsabilidade de Roxane Maria Fontes Piazza, foi analisado pela CEUAIB - Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação do Instituto Butantan, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação de animal vertebrado que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta comissão.

São Paulo, 11 de fevereiro de 2010.

Dra. Denise V. Tambourgi
Laboratório de Imunoquímica
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Aos meus pais, Cleide e Massaru e
minha irmã Luciane pelo apoio
e incentivo constantes.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza por ter sido orientadora, mãe e amiga, me contagiando sempre com seu otimismo constante. Obrigada pelo carinho, pela paciência, por acreditar na minha capacidade, por me apoiar e me aguentar nos momentos difíceis, pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho, contribuindo muito para o meu crescimento não só profissional, como também pessoal.

Ao Dr. Oscar Henrique Pereira Ramos pela confiança, oportunidade e paciência.

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Jr. pelas orientações iniciais nos caminhos da Biologia Molecular, pelo cantinho em seu laboratório, que acabou se transformando em uma bancada inteira, pelo apoio, incentivo e carinho durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Patrícia Abreu pela disponibilidade em me socorrer sempre que precisei. Obrigada pelos ensinamentos em Biologia Molecular, que com certeza contribuíram muito no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Palma Sircilli por abrir as portas de seu laboratório e por me ensinar os conceitos iniciais em Biologia Molecular, sem os quais não teria iniciado este trabalho.

À Dra. Cláudia Trigo pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos e principalmente, pelas palavras de apoio e incentivo que foram essenciais para que eu conseguisse finalizar este trabalho com sucesso.

Às Dras. Marta Domingos, Rita, Monamaris, Márcia, Cecília e Denise pela amizade, carinho, apoio, atenção e incentivos.

À minha companheira de faculdade e mestrado Keyde. Muito obrigada por me aguentar todos esses anos, pela paciência, amizade, carinho, apoio e incentivo!

À Flor (Gabi) pelo carinho, amizade, apoio e incentivo. Muito obrigada!

Às alunas da Dra Patrícia, Denize e Demétria pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

Ao Márcio pelos chocolates, doces e cafés no final da tarde, pela amizade, carinho e momentos de descontração.

Ao Sérgio pelas dúvidas solucionadas, conselhos, amizade, apoio e carinho. Ainda quero ser igual você quando crescer!

À minha vizinha de bancada Letícia pela agradável convivência, parceria, apoio, amizade e carinho.

À Naty, que passou alguns fins de semana e feriados me fazendo companhia. Obrigada pela amizade, carinho e apoio!

À Andressa pela amizade, carinho, apoio e incentivo.

Aos alunos da Dra. Roxane que estão ou estiveram em seu laboratório: Anderson, Lucas, Cris Souza, Dani Mineira, Dani Luz, Dani Munhoz, Carol Menezes, Sarita, Carol Mag, Fernandinha, Júlia e Caio. Obrigada pela convivência e amizade!

Aos alunos Marina, Silvio, Silvia, Ana Ruela, Tati, Rosely, Livia, Daniel, Gleice, Priscila, Thiago, Fran (Rosa), Bianca, Luciano, Renato, Afonso, Fran (Verde), Ludmila, Lígia, Hebert, Cris Moda pelo carinho, amizade e convivência.

À Cinthya (Model) e Diego. Sem palavras para agradecer a amizade e o carinho de vocês!

À Vanessa Bueris pela amizade, carinho e incentivos. Afinal, a primeira PCR a gente nunca esquece!

À Tatiane Porangaba pela amizade, paciência e carinho.

Às minhas amigas Eliza, Kelinha, Danieli, Dani Kajihara pela amizade, apoio e incentivo sempre!

À Nadja Cleide e Luiza pela amizade, carinho e atenção.

Aos Funcionários do Laboratório de Bacteriologia pelo apoio técnico.

Aos professores do Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia por contribuírem na minha formação.

Aos funcionários da Secretária do Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia. Obrigada pela atenção e dedicação.

À Sra. Eva Oliveira, do Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas, pela revisão deste trabalho.

À Dra. Hiro Goto pela paciência, compreensão e incentivo.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Soroepidemiologia, do Instituto de Medicina Tropical. Apesar do pouco tempo de convivência, obrigada pelo incentivo, apoio, carinho e amizade.

À FAPESP e Cnpq pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares pela compreensão, carinho, apoio e incentivo constantes.

Muito obrigada à todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho!

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

Albert Einstein

RESUMO

OZAKI, C.Y. **Clonagem e Expressão de um Fragmento Variável em Cadeia Única contra a toxina Termo-lábil de *Escherichia coli* Enterotoxigênica.** 2011. 148 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é responsável por, pelo menos, 400 milhões de episódios de diarreia aguda e 700.000 mortes de crianças com menos de cinco anos de idade anualmente, sendo considerada também a principal causa da “diarreia dos viajantes”, que afetam turistas em trânsito em áreas endêmicas. O diagnóstico da infecção por ETEC é baseada na detecção dos seus principais fatores de virulência, as toxinas termo-lábil (LT) e termo-estável (ST), através de métodos de biologia molecular ou imunossorológicos. Através da utilização de anticorpos específicos, os ensaios imunossorológicos apresentam vantagens, como alta especificidade e sensibilidade, além da fácil preparação das amostras e execução dos testes. Avanços na tecnologia dos anticorpos recombinantes permitiram a obtenção de moléculas com baixo custo, afinidades e especificidades desejáveis. Uma das metodologias mais utilizadas é a clonagem dos domínios variáveis das cadeias leve (CL) e pesada (CP) da imunoglobulina fusionados a um ligante flexível, que permite a correta interação entre os domínios e a preservação do sítio de ligação ao antígeno. O objetivo desse estudo foi a construção de um fragmento variável em cadeia única (scFv), a partir de hibridomas produtores de anticorpo monoclonal anti-LT, seguida da sua produção em células bacterianas. Após a extração do RNA total de hibridomas, transcrição reversa, amplificação por PCR e sequenciamento dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada, estes foram fusionadas por um polipeptídeo flexível correspondente a (Gly₄Ser)₃, originando o inserto scFvLT. Uma vez obtido, este inserto foi subclonado nos vetores pET28a e pSMT3. Os plasmídios recombinantes foram utilizados para transformar células *E. coli* BL21-C43 e BL21(DE3) competentes, respectivamente. Após a indução da transcrição pelo promotor T7 por IPTG, anticorpos recombinantes scFvLT foram submetidos à cromatografia por afinidade a metal. Neste estudo um fragmento variável em cadeia única com 723 pb foi obtido, sendo expresso como uma proteína com peso molecular aparente de 30 kDa. Através de ELISA de captura observamos que a menor concentração capaz de reconhecer a toxina LT foi de 3,12 µg/mL. Por *immunodot*, uma concentração de 12,5 µg/mL de scFvLT foi necessária para reconhecer 10 µg/mL da toxina LT purificada. No entanto, o scFvLT não foi capaz de reconhecer as subunidades da toxina LT, por *immunoblotting*, nem neutralizar sua atividade em células adrenais Y1. Já os anticorpos recombinantes scFvLT expressos na forma solúvel, através da construção pSMT3-scFvLT, não foram eficientemente isolados por cromatografia de afinidade e, por isso, não foram testados. Os resultados obtidos demonstraram que os anticorpos recombinantes scFvLT, produzidos em células bacterianas, foram capazes de reconhecer a enterotoxina termo-lábil de ETEC por métodos imunossorológicos, podendo ser utilizados como ferramenta no diagnóstico de ETEC. Embora o método de renovelamento utilizado neste estudo fosse capaz de produzir um anticorpo recombinante com atividade biológica, a produção dessa molécula na forma solúvel é recomendável, uma vez que os processos de renovelamento são demorados e caros. Outros métodos de purificação devem ser testados para se obter um scFvLT puro, a partir da sua expressão na fração solúvel pela construção pSMT3-scFvLT.

Palavras-chave: ETEC. LT. scFv. Clonagem. Expressão. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

OZAKI, CY. **Cloning and Expression of a Single-chain Fragment Variable against Heat-labile toxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli***. 2011. 148 p. Master Thesis (Biotechnology) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) are responsible for at least 400 million acute diarrhea episodes and 700,000 childhood deaths under age of five per year. ETEC is also a prevalent cause of traveler's diarrhea, which affects tourists who visit endemic areas. Heat-labile (LT) and heat-stable (ST) toxins are the main ETEC virulence factors, and diagnosis of infection is based on their detection by molecular biology or immunoserological methods. Immunoserological assay has some advantages when using specific antibodies, including high specificity and sensitivity with convenient procedures for sample preparation and assay execution. Advances in antibody biotechnology provide alternatives to obtain low-cost antibodies with desirable affinities and specificities by cloning immunoglobulin heavy and light variable domains (HV and LV) as a single-chain fusion interspaced by a flexible linker, which allows the correct interaction between the domains and preserving the antigen-binding site. In this study, we aimed at the construction of a single-chain fragment variable (scFv) from hybridoma cells that produce an anti-LT monoclonal antibody following its bacterial production. After total RNA extraction from hybridoma cells, reverse transcription, PCR-amplification and sequencing, heavy and light variable domains were fused to a linker corresponding to (Gly₄Ser)₃, giving rise to scFvLT coding region. This insert was subcloned into pET28a and pSMT3 vectors. The new recombinant plasmids were used to transform competent *E. coli* BL21-C43 and BL21(DE3) cells, respectively. After induction of T7 promoter-associated transcription by IPTG, scFvLT recombinant antibody was submitted to metal affinity chromatography with step-wise elution and after refolding, it was tested against LT toxin recognition by immunoenzymatic assays. A scFv of 723 bp was obtained and expressed as a protein with an apparent molecular weight of 30 kDa. By capture ELISA, we determined that 3.12 µg/mL was the minimal concentration of refolded scFvLT capable of detecting LT toxin released from strain H10407 into culture medium. Immunodot assay showed that 12.5 µg/mL of refolded scFvLT was required for detection of 10 µg/mL of purified LT toxin. However, scFvLT was not able to recognize LT toxin subunits by immunoblotting or neutralize its activity in Y1 adrenal cells. However, the recombinant antibody expressed as a soluble fraction could not be isolated properly by affinity chromatography. Our results showed that scFvLT recombinant antibody obtained by bacterial expression was able to recognize ETEC heat-labile toxin by immunoenzymatic methods and could be use as a tool in ETEC diagnosis. Although the refolding method used in this study was efficient in producing a recombinant antibody with biological activity, its production as soluble molecule is recommended since the refolding processes are time-consuming and expensive. Other methods should be tested to purified scFvLT from soluble fraction.

Keywords: ETEC. LT. scFv. Cloning. Expression. *Escherichia coli*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos Fatores de Colonização dos isolados de ETEC.....	28
Tabela 2 – Classes dos anticorpos humanos e suas funções.....	40
Tabela 3 - Nomenclatura dos plasmídios obtidos com a clonagem dos insertos em vetor pGEM-T e seus respectivos tamanhos.....	76
Tabela 4 - Sequências de nucleotídeos das cadeias leve e pesada, obtidas a partir do sequenciamento dos plasmídios pCL e pCP.....	78
Tabela 5 - Sequência de nucleotídeos do gene sintético scFvLT inserido no plasmídio pMA.....	80
Tabela 6 - Sequência de aminoácidos, massas moleculares preditas e pI teóricos do gene sintético scFvLT e construções pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT.....	92

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema ilustrativo dos principais fatores de virulência das categorias de <i>Escherichia coli</i> Diarreio gênicas.....	25
Figura 2 – Estrutura da toxina LT.....	30
Figura 3 – Mecanismos de ação das toxinas ST e LT de ETEC.....	32
Figura 4 – Ilustração dos componentes envolvidos nas respostas imunes inata e adaptativa.....	35
Figura 5 – Estrutura de uma molécula de anticorpo e seus domínios.....	38
Figura 6 – Molécula de IgG e seus fragmentos, após digestão enzimática com pepsina e papaína.....	41
Figura 7 – Fragmento variável em cadeia única (scFv) e as variações na sua orientação.....	43
Figura 8 – Representação esquemática das etapas para obtenção dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada de anticorpos.....	51
Figura 9 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% da extração do RNA total de hibridomas anti-LT.....	75
Figura 10 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% da amplificação dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal anti-LT.....	76
Figura 11 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% após a digestão dos clones pCYL, pCYP com a enzima EcoRI.....	77
Figura 12 – Representação do gene sintético scFvLT inserido no plasmídio pMA.....	79
Figura 13 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% da amplificação do fragmento scFvLT.....	81
Figura 14 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,9% da amplificação do inserto scFvLT para confirmação dos clones pGEMT-scFvLT.....	82
Figura 15 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,9% a digestão dos clones pGEM-scFvLT com as enzimas BamHI e XhoI.....	83
Figura 16 – Esquema representativo do plasmídio recombinante pET-scFvLT.....	84
Figura 17 – Esquema representativo do plasmídio recombinante pSMT3-scFvLT.....	84
Figura 18 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da amplificação do inserto scFvLT para confirmação dos clones de pET-scFvLT.....	85
Figura 19 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da amplificação do inserto scFvLT para confirmação dos clones pSMT3-scFvLT.....	86
Figura 20 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% após a digestão dos clones de pET-scFvLT com as enzimas BamHI e XhoI.....	87
Figura 21 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da digestão dos clones de pSMT3-scFvLT com as enzimas BamHI e XhoI.....	87

Figura 22 – Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos do gene sintético scFvLT e dos insertos sequenciados a partir dos clones pET-scFvLT1 e pET-scFvLT2.....	89
Figura 23 – Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos do gene sintético scFvLT e dos insertos sequenciados a partir dos clones pSMT3-scFvLT1 e pSMT3-scFvLT2.....	90
Figura 24 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> do ensaio de indução de células <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas com os clones pET-scFvLT1 e pET-scFvLT2.....	93
Figura 25 – Gel de poliacrilamida-SDS 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> do ensaio de indução de células <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas com os clones pSMT3-scFvLT1 e pSMT3-scFvLT2.....	94
Figura 26 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> do ensaio de indução de células <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS transformadas com os clones pET-scFvLT1 e pET-scFvLT2.....	95
Figura 27 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue BioSafe</i> e <i>Immunoblotting</i> com anticorpo anti-His do ensaio de indução de células <i>E. coli</i> BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS transformadas com o clone pSMT3-scFvLT1.....	96
Figura 28 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R250</i> da localização celular do anticorpo recombinante scFvLT, após indução com IPTG de células <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas com os clones pET-scFvLT1 e pET-scFvLT2.....	97
Figura 29 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue BioSafe</i> da localização celular do anticorpo recombinante scFvLT, após indução com IPTG de células <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas com clone pSMT3-scFvLT1.....	98
Figura 30 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, a partir da fração insolúvel, de células BL21(DE3) induzidas por IPTG.....	99
Figura 31 – <i>Immunoblotting</i> com anticorpo anti-His. Membrana de nitrocelulose contendo as frações protéicas dos extratos celulares da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, a partir da fração insolúvel, de células BL21(DE3) induzidas por IPTG.....	100
Figura 32 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> e <i>Immunoblotting</i> com anticorpo anti-His da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, a partir da fração solúvel, de células BL21(DE3) induzidas por IPTG.....	101
Figura 33 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, a partir da fração insolúvel de células BL21-C43 induzidas por IPTG.....	103

Figura 34 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS 12% corado com <i>Coomassie Blue BioSafe</i> e <i>Immunoblotting</i> com anticorpo anti-His da purificação por <i>Batch</i> do anticorpo recombinante scFvLT, a partir da fração solúvel de células BL21(DE3) transformadas com o clone pSMT3-scFvLT1 e induzidas por IPTG.....	104
Figura 35 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> e <i>Immunoblotting</i> com anticorpo anti-His da padronização das condições de indução do anticorpo recombinante scFvLT, em células BL21(DE3) transformadas com o clone pSMT3-scFvLT.....	106
Figura 36 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> e <i>Immunoblotting</i> com anticorpo anti-His da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, por cromatografia de afinidade a níquel.....	108
Figura 37 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> da padronização dos meios de cultura utilizados para expressão de scFvLT.....	109
Figura 38 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, por cromatografia de afinidade a níquel.....	110
Figura 39 – Reatividade do anticorpo recombinante scFvLT contra a toxina LT purificada de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica por ensaio de ELISA de captura.....	112
Figura 40 – Reatividade do anticorpo recombinante scFvLT contra a toxina LT presente no sobrenadante da cepa H10407 de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica por ensaio de ELISA de captura.....	114
Figura 41 – Reatividade do anticorpo recombinante scFvLT contra a toxina LT produzida pela cepa H10407 por ensaio de ELISA indireto.....	115
Figura 42 – <i>Immunodot</i> com o anticorpo recombinante scFvLT.....	116
Figura 43 – Detecção das subunidades A e B da toxina LT por <i>Immunoblotting</i> , utilizando o anticorpo recombinante scFvLT.....	117
Figura 44 – Reatividade do anticorpo recombinante scFvLT contra a toxina LT em células adrenais Y1 por Imunofluorescência indireta.....	118
Figura 45 – Neutralização do efeito citopático da toxina LT em células adrenais Y1 utilizando o anticorpo recombinante scFvLT.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E – Adesão e apagamento

cDNA - DNA complementar

Meio 2YT - Meio Bacto-triptona

BFP – Pilina em forma de feixes

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CF - Fatores de Colonização

CO₂ - Dióxido de Carbono

CT - Toxina Colérica

D.O. - Densidade óptica

DAB - 3,3'-diaminobenzidina

DMEM - Meio mínimo essencial de Dulbecco

DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderente

DMEM-SFB - Meio mínimo essencial de Dulbecco acrescido de Soro Fetal Bovino

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos

DTT - Ditioneitol

EAEC - *Escherichia coli* Enteroagregativa

EAF – Fator de aderência de EPEC

E. coli - *Escherichia coli*

ECD - *Escherichia coli* Diarreioagênica

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-cético

EHEC - *Escherichia coli* Enterohemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* Enteroinvasora

ELISA – Ensaio imunoenzimático de fase sólida

EPEC - *Escherichia coli* Enteropatogênica

EspB – Proteína B secretada de EPEC

ETEC - *Escherichia coli* Enterotoxigênica

FTTC – Isotiocianato de fluoresceína

Gly - Glicina

GM1 - Monosialogangliosídeo

GST - Glutathione S-transferase

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

IgG - Imunoglobulina G

IgG2b - Imunoglobulina G do Isotipo 2b

IPTG - Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

Kb - Quilobases

kDa - Quilodáltons

LB - Luria-Bertani

LT - Toxina termo-lábil de ETEC

MBP - *Maltose binding protein*

Ni - Níquel

nm - Nanômetro

NUS-A - *N-utilizing substance A*

OPD - O-fenilenodiamina

pb - Pares de Bases

PCF – Possível fator de colonização

PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato

PBS-Tween - Solução Salina Tamponada com Fosfato adicionada de Tween

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

q.s.p. - Quantidade suficiente para

RIA – Imunoensaio com marcação de radioisótopo

RNA - Ácido ribonucleico

RPAS – *Recombinant Phage Antibody System*

rpm - Rotações por minuto

scFv - Fragmento variável em cadeia única ou *single chain Fragment variable*

scFvLT - Fragmento Variável em cadeia única anti-LT

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

Ser - Serina

SFB - Soro Fetal Bovino

ST - Toxina termo-estável de ETEC

Stx - Toxina de Shiga

STEC - *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga

SUMO - Pequeno modificador relacionado a ubiquitina ou *Small ubiquitin-related modifier*

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

VP - Domínio variável da cadeia pesada da imunoglobulina G

VL - Domínio variável da cadeia leve da imunoglobulina G

x g - Vezes a aceleração da gravidade

X-Gal -5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	23
1.1 <i>Escherichia coli</i>	23
1.2 <i>Escherichia coli</i> Diarreiogênica (ECD).....	23
1.3 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica em humanos.....	25
1.3.1 Epidemiologia.....	26
1.3.2 Fatores de Virulência.....	27
1.3.2.1 Fatores de Colonização.....	27
1.3.2.2 Toxinas.....	28
1.3.2.2.1 Toxina termo-estável (ST).....	29
1.3.2.2.2 Toxina termo-lábil (LT).....	30
1.3.3 Diagnóstico de ETEC.....	32
1.4 Aspectos gerais da resposta imune.....	34
1.4.1 Imunidade celular.....	35
1.4.2 Imunidade mediada por anticorpos.....	36
1.4.3 Imunoglobulinas.....	36
1.4.3.1 Estrutura dos anticorpos.....	37
1.4.3.2 Classificação dos anticorpos e suas funções.....	39
1.4.3.3 Fragmentos de anticorpo IgG.....	40
1.5 A engenharia genética aplicada na produção de fragmentos de anticorpos.....	42
1.5.1 Fragmento variável em cadeia única (scFv).....	42
1.5.2 Produção de fragmentos de anticorpos scFv em <i>Escherichia coli</i>	44
2 OBJETIVO.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 Meios de cultura e soluções	48
3.2 Cepas Bacterianas	48
3.3 Vetores	48

3.4 Células eucarióticas.....	49
3.4.1 Hibridomas anti-LT.....	49
3.4.2 Células adrenais Y1.....	49
3.5 Toxina LT.....	49
3.6 Anticorpo monoclonal anti-LT.....	50
3.7 Fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT.....	50
3.8 Clonagem das cadeias leve e pesada da porção variável do anticorpo monoclonal anti-LT para obtenção do anticorpo variável em cadeia única scFvLT	50
3.8.1 Cultivo dos hibridomas anti-LT.....	51
3.8.2 Extração do RNA total dos hibridomas anti-LT.....	52
3.8.3 Eletroforese em gel de agarose	52
3.8.4 Síntese de cDNA	52
3.8.5 Amplificação dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo anti-LT.....	53
3.8.6 Clonagem das cadeias leve, pesada e scFv no vetor de clonagem pGEM-T.....	53
3.8.7 Transformação bacteriana por choque térmico	54
3.8.8 Extração plasmidial.....	54
3.8.9 Análise de restrição dos plasmídios recombinantes.....	55
3.8.10 Sequenciamento e análise DNA.....	55
3.9 Clonagem e expressão do fragmento variável em cadeia única anti-LT a partir do gene sintético scFv-LT.....	56
3.9.1 Desenho de iniciadores para reamplificação do gene scFvLT.....	56
3.9.2 PCR para amplificação do inserto scFvLT.....	56
3.9.3 Adição da adenina terminal ao inserto scFvLT.....	57
3.9.4 Clonagem do inserto scFvLT ao vetor pGEM-T.....	57
3.9.5 Lisados Bacterianos.....	57
3.9.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação dos clones scFvLT.....	58
3.9.7 Extração Plasmidial.....	58
3.9.8 Análise de restrição dos plasmídios extraídos.....	58
3.9.9 Digestão dos vetores de expressão pET28a, pSMT3 e dos clones de pGEM-scFvLT.....	59
3.9.10 Clonagem do fragmento scFvLT aos vetores de expressão pET28a e pSMT3.....	59

<i>3.9.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação dos clones de pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT.....</i>	60
<i>3.9.12 Análise de restrição dos clones de pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT.....</i>	60
<i>3.9.13 Sequenciamento e análise de DNA.....</i>	60
<i>3.10 Padronização da indução da expressão do anticorpo recombinante scFvLT.....</i>	61
<i>3.10.1 Pré-análise da indução da expressão dos clones de pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT.....</i>	61
<i>3.10.2 Padronização da cepa de expressão.....</i>	62
<i>3.10.3 Padronização das condições de indução da expressão do anticorpo recombinante scFvLT em células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pSMT3-scFvLT.....</i>	62
<i>3.10.4 Padronização do meio de cultura utilizado para indução da expressão do anticorpo recombinante scFvLT em células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pSMT3-scFvLT</i>	63
<i>3.10.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).</i>	63
<i>3.10.6 Western-blotting.....</i>	64
<i>3.10.7 Immunoblotting.....</i>	64
<i>3.11 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT obtido a partir da indução de células BL21(DE3) e BL21-C43 transformadas com o plasmídeo pET-scFvLT.....</i>	65
<i>3.11.1 Indução da expressão do anticorpo recombinante scFvLT por IPTG para purificação.....</i>	65
<i>3.11.2 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT a partir da fração insolúvel de células E. coli BL21(DE3) induzidas.....</i>	65
<i>3.11.3 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT a partir da fração solúvel de células E. coli BL21(DE3) induzidas.....</i>	66
<i>3.11.4 Purificação da proteína recombinante em condições desnaturantes, a partir de corpúsculos de inclusão de células BL21-C43 induzidas.....</i>	66
<i>3.11.5 Renaturação do anticorpo recombinante scFvLT.....</i>	67
<i>3.12 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT por cromatografia de afinidade a Níquel, obtido a partir da indução de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pSMT3-scFvLT.....</i>	68
<i>3.12.1 Indução da expressão do anticorpo recombinante scFvLT por IPTG, para purificação.....</i>	68
<i>3.12.2 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT por Batch.....</i>	69
<i>3.12.3 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT em coluna pré-empacotada de Ni Sepharose.....</i>	69
<i>3.13 Análise da atividade biológica do anticorpo recombinante scFvLT</i>	70
<i>3.13.1 Teste de ELISA indireto para detecção da atividade biológica do scFvLT.....</i>	70

<i>3.13.2 Teste de ELISA de captura para detecção da atividade biológica do scFvLT.....</i>	<i>71</i>
<i>3.13.3 Reconhecimento da toxina LT pelo scFvLT através de Immunodot.....</i>	<i>71</i>
<i>3.13.4 Reconhecimento das subunidades da toxina LT pelo scFvLT através de Immunoblotting.....</i>	<i>72</i>
<i>3.13.5 Detecção da toxina LT em células Y1 por imunofluorescência indireta utilizando o scFvLT.....</i>	<i>73</i>
<i>3.13.6 Ensaio de neutralização do efeito citopático da toxina LT utilizando o scFvLT em células adrenais Y1.....</i>	<i>74</i>
4 RESULTADOS.....	75
4.1 Construção do inserto scFvLT a partir das sequências codificadoras das regiões variáveis das cadeias leve e pesada de anticorpos monoclonais anti-LT.....	75
4.2 Construção dos plasmídios recombinantes pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT.....	80
4.3 Pré-análise da expressão do anticorpo recombinante scFvLT.....	93
4.4 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT.....	98
4.5 Análise funcional do anticorpo recombinante scFvLT.....	110
5 DISCUSSÃO.....	121
6 CONCLUSÕES.....	135
REFERÊNCIAS.....	136

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, predominante na microbiota intestinal humana e de inúmeras espécies animais de sangue quente, capaz de desempenhar um papel importante na manutenção da fisiologia intestinal (EDWARDS, 1986). *E. coli* é membro da família *Enterobacteriaceae*, que permanece, geralmente, “sem causar danos” confinado à luz intestinal. No entanto, cepas não patogênicas de *E. coli* podem causar infecção em hospedeiro debilitado ou imunodeprimido, ou ainda quando barreiras intestinais são violadas (NATARO; KAPER, 1998).

Devido à grande capacidade de adaptação, determinadas linhagens de *E. coli* adquiriram elementos genéticos que propiciaram seu estabelecimento em novos nichos, como também propriedades específicas de virulência, causando um amplo espectro de doenças (KAPER et al., 2004). Cepas de *E. coli* causadoras de infecções extra-intestinais são conhecidas como ExPEC, enquanto amostras causadoras de doenças entéricas são conhecidas como *Escherichia coli* Diarreiogênica (ECD) (NATARO; KAPER, 1998).

1.2 *Escherichia coli* Diarreiogênica (ECD)

Amostras de *E. coli* diarreiogênicas são classificadas em seis categorias ou patotipos, de acordo com mecanismos específicos de virulência, síndromes clínicas, sorotipos O:H, aspectos epidemiológicos e/ou nos tipos de interação com linhagens celulares *in vitro*. Essas categorias são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente às células epiteliais (DAEC) (KAPER, 2004).

O patotipo EPEC é constituído por amostras associadas à diarreia aguda em crianças, principalmente, no primeiro ano de vida. Além de não secretar a toxina de Shiga (Stx), essa categoria causa uma lesão histopatológica no epitélio intestinal, como também em cultura celular, denominada de lesão *attaching and effacing* (A/E). As amostras de EPEC típicas se diferenciam das EPEC atípicas através da presença do plasmídeo EAF, que codifica uma fímbria do tipo IV, conhecida como BFP (*bundle-forming pilus*) (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

As amostras de EIEC possuem características bioquímicas, genéticas e patogênicas relacionadas à *Shigella* spp. Elas podem causar diarreia aquosa, colite inflamatória e, ocasionalmente, disenteria em humanos. A fase inicial da patogênese de EIEC é caracterizada pela invasão da mucosa intestinal, seguida de fagocitose e lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimentação no citoplasma e passagem para as células adjacentes (KAPER et al., 2004).

STEC é classificada como um patógeno zoonótico emergente, que causa gastroenterite e colite hemorrágica, podendo ainda produzir uma severa complicação renal, a SHU (Síndrome Hemolítica Urêmica), devido à translocação da toxina Stx através do intestino (FRANKEL et al., 1998). Amostras de STEC foram, primeiramente, identificadas nos Estados Unidos em 1982, como agentes de um surto de diarreia sanguinolenta e da síndrome hemolítica urêmica (RILEY et al., 1983). A EHEC constitui uma subcategoria de STEC, que diferenciam entre si através da capacidade das cepas de EHEC de produzirem a lesão A/E, semelhante à causada por EPEC (NATARO; KAPER, 1998).

As amostras de DAEC aderem-se de forma difusa sobre toda a superfície celular, em ensaios de adesão em células epiteliais *in vitro*, sendo assim denominada devido ao padrão de adesão difusa (AD) que apresentam (NATARO et al., 1987). A associação de DAEC com a diarreia é controversa, podendo estar associada ou não à diarreia em crianças maiores e menores de 12 meses, respectivamente (SCALETSKY et al., 2002).

EAEC é definida como o patotipo de *E. coli*, que apresenta o padrão de adesão denominado agregativo, em células epiteliais *in vitro* (NATARO et al., 1987), estando associada à diarreia persistente tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (KAPER et al., 2004).

ETEC é o patotipo de ECD que produz as enterotoxinas, denominadas termo-lábil (LT) e termo-estável (ST), causando diarreia em animais e humanos. Esse patotipo pode aderir à mucosa intestinal através dos seus vários fatores de colonização, que juntamente com as enterotoxinas levam a uma diarreia aquosa, tipicamente associada à infecção causada por ETEC, atingindo crianças e adultos. Além disso, é fortemente associada como agente de diarreia do viajante (LEVINE, 1987; NATARO; KAPER, 1998).

A Figura 1 ilustra as diferentes categorias de ECD e seus principais fatores de virulência.

Figura 1 – Esquema ilustrativo dos principais fatores de virulência das categorias de *Escherichia coli* diarreio gênicas.

FONTE: Adaptado de KAPER et al., 2004.

1.3 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) em humanos

Escherichia coli Enterotoxigênica (ETEC) é considerada uma das principais causas da diarreia que acomete crianças, em países em desenvolvimento, sendo também a principal causa da “diarreia dos viajantes”. Além disso, esse patotipo vem sendo associado à ocorrência crescente de surtos epidêmicos em países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América (DEVASIA et al., 2006; JAIN et al., 2007; QADRI et al., 2005).

Cepas de ETEC patogênicas para o homem se restringem a um número limitado de sorotipos e podem produzir, isoladamente ou simultaneamente, dois tipos de enterotoxinas: a toxina termo-lábil (LT) e a toxina termo-estável (ST), que diferem entre si em estrutura e mecanismos de ação (BEAUSOLEIL et al., 2002; LEVINE et al., 1983). Além das

toxinas, as adesinas são outros fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade das cepas e estabelecimento da infecção (TURNER et al., 2006).

1.3.1 Epidemiologia

A primeira descrição de cepas de ETEC associadas à diarreia em humanos foi feita em 1956, em Calcutá. Desde então, este patotipo vem sendo apontado como uma das principais causas de diarreia, principalmente, em crianças menores de cinco anos, além de acometer turistas provenientes de países desenvolvidos, que visitam áreas endêmicas (QADRI et al., 2005; WENNERAS et al., 1999).

Anualmente, ETEC é responsável por cerca de 279 milhões de episódios de diarreia em crianças menores de cinco anos de idade, em países em desenvolvimento, atingindo, também, cerca de 114 milhões de crianças na faixa etária entre 5 a 15 anos (WENNERAS, ERLING; 2004). Apesar de impressionantes, estes números podem estar subestimados, uma vez que a diarreia causada por ETEC é também associada com doença crônica nutricional. Esta correlação é encontrada, principalmente, em crianças nas localidades menos desenvolvidas da Ásia, África, Oriente Médio e América Latina (ABU-ELYAZEED et al., 1999). Estudos realizados no Egito e em Bangladesh apontaram cepas de ETEC, como a principal causa da diarreia, em crianças com menos de cinco anos de idade, acometendo 70% e 90% dos casos estudados, respectivamente (QADRI et al., 2005). Em outro estudo realizado com crianças menores de dois anos de idade, na cidade do México, foi constatado que 36% das infecções entéricas causadas por *Escherichia coli* diarreiogênica estavam associadas à ETEC (ESTRADA-GARCIA et al., 2009). No Brasil, estudos realizados na cidade de Salvador com crianças que apresentavam ou não diarreia aguda endêmica, detectaram ETEC em 3,7% dos casos, sendo também o segundo patotipo de *E. coli* diarreiogênica mais frequentemente isolado (7,5%) (BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005).

Em países desenvolvidos, as infecções endêmicas causadas por ETEC são raras, mas alguns surtos epidêmicos, envolvendo a ingestão de alimentos contaminados com cepas de ETEC, foram registrados nos EUA. Em 2004, amostras de ETEC foram consideradas como agente etiológico de um surto que acometeu clientes e funcionários de um restaurante japonês, em Nevada (JAIN et al., 2007). Em outro caso registrado, ocorrido em 2003 no estado do Tennessee, funcionários de uma empresa distribuidora de artigos em couro apresentaram sintomas relacionados à infecção por ETEC, após o consumo de refeições fornecidas por uma

empresa alimentícia local (DEVASIA et al., 2006). Em ambos os casos, a fonte de contaminação não pode ser determinada.

Outra população muito afetada por infecções causadas por ETEC é a de viajantes provenientes de países desenvolvidos, que visitam áreas endêmicas (TURNER et al., 2006). De acordo com um levantamento realizado sobre as causas da diarreia dos viajantes, em 51 artigos publicados no período entre 1973 e 2008, cepas de ETEC foram detectadas em 30.4% de todos os casos estudados. ETEC foi o patógeno mais frequentemente identificado em viajantes que visitaram a América Latina (33.6%) e África (31.2%), como também o sul (30.6%) e o sudeste da Ásia (7.2%) (SHAH; DUPONT; RAMSEY, 2009).

Os estudos apresentados, revelam que a ocorrência das infecções por ETEC constitui um importante fator que compromete a saúde pública de países em desenvolvimento. Já nos países desenvolvidos, a necessidade de um maior conhecimento sobre a identificação desse patógeno se faz presente, uma vez que o número de surtos envolvendo esse patótipo é crescente, podendo ser considerado reemergente (BEATTY et al., 2006; DEVASIA et al., 2006; MAZARIEGO-ESPINOSA et al., 2010).

1.3.2 Fatores de Virulência

1.3.2.1 Fatores de Colonização

Para que a infecção causada por amostras de *Escherichia coli* diarreiogênicas se estabeleça no hospedeiro, é necessária a adesão do patógeno ao epitélio intestinal. Na infecção por ETEC, os fatores de virulência que medeiam essa adesão são conhecidos como *colonization factor antigens* (CFA), sendo codificados em plasmídios, assim como as toxinas (LEVINE et al., 1983). Esses fatores de colonização são adesinas fimbriais, afimbriais, helicais ou fibrilares, localizadas na superfície bacteriana, com mais de 20 tipos já identificados (Tabela 1), sendo subdivididos de acordo com a antigenicidade, massa molecular, sequência de aminoácidos da região N-terminal da subunidade maior e estrutura morfológica. Os fatores de colonização encontrados em amostras isoladas de humanos foram designados como *coli surface antigen* (CS) seguido do número, que corresponde à ordem cronológica da identificação do mesmo, com exceção do fator de colonização CFA I (TURNER et al., 2006).

Tabela 1 – Características dos Fatores de Colonização dos isolados de ETEC.

Designação CF	Número CS	Morfologia	Massa Molecular (kDa)
CFA I	CFA I	Fimbrial	15.0
CFA II	CS1	Fimbrial	16.5
CFA II	CS2	Fimbrial	15.3
CFA II	CS3	Fibrilar	15.1
CFA IV	CS4	Fimbrial	17.0
CFA IV	CS5	Helical	21.0
CFA IV	CS6	Afimbrial	14.5/16.0
CS 7	CS7	Helical	21.5
CFA III	CS8	Fimbrial	18.0
2230	CS10	Afimbrial	16.0
PCF0148	CS11	Fibrilar	
PCF0159	CS12	Fimbrial	19.0
PCF09	CS13	Fibrilar	27.0
PCF0166	CS14	Fimbrial	15.5/17.0
8786	CS15	Afimbrial	16.3
CS17	CS17	Fimbrial	17.5
PCF020	CS18	Fimbrial	25.0
CS19	CS19	Fimbrial	16.0
CS20	CS20	Fimbrial	20.8
Longus	CS21	Fimbrial	22.0
CS22	CS22	Afimbrial	15.7

Fonte: Adaptado de TURNER et al., 2006.

NOTA: (Abreviaturas em inglês):

PCF – *Possible colonization factor*

1.3.2.2 Toxinas

Uma vez estabelecidas no epitélio intestinal, cepas de ETEC iniciam a produção de enterotoxinas, resultando em uma diarreia secretória e não-severa, com cura espontânea em até uma semana (WOLF, 1997). As características das toxinas termo-estável (ST) e termo-lábil (LT) estão descritas abaixo.

1.3.2.2.1 Toxina termo-estável (ST)

A enterotoxina termo-estável (ST) é considerada um importante fator de virulência em bactérias entéricas, constituindo uma família de peptídeos ricos em cisteínas, que se ligam a receptores específicos de células intestinais de mamíferos, causando a diarreia em humanos e animais (NAIR; TAKEDA, 1998).

Duas classes de ST foram descritas, de acordo com suas estruturas, funções e antigenicidades. A classe STI ou STa são solúveis em metanol, resistentes a proteases, sendo associadas com a doença tanto em humanos, quanto em animais. Já a classe STII ou STb são insolúveis em metanol, sensíveis a proteases, estando, primeiramente, associada com diarreia em porcos jovens, sendo posteriormente também relacionada à doença humana (SVENNERHOLM et al., 1986; TURNER et al., 2006). Cepas de ETEC podem produzir dois tipos de STa, denominados STp e STh, que diferem entre si através do número e composição de aminoácidos, como também na origem do hospedeiro do qual foram isoladas (NAIR; TAKEDA, 1998).

Os genes *estA* que codificam STa estão associados a um transposon, localizado em plasmídeo. Estes genes codificam uma molécula precursora da toxina, contendo 72 aminoácidos, que são clivados através de dois eventos pós-traducionais, necessários para o transporte da molécula através das membranas interna e externa da bactéria (SCHMITT; MEYSICK; O'BRIEN, 1999; SO; MCCARTHY, 1980). A toxina secretada para o meio de cultura constitui o peptídeo maduro, rico em cisteínas, com o número variável de resíduos entre 18 (STp) e 19 (STh) aminoácidos. Sua região C-terminal é conservada apresentando 13 aminoácidos, dos quais seis resíduos são cisteínas que formam três pontes de dissulfeto, responsáveis pela atividade enterotóxica e a natureza termo-estável da toxina (RASHEED; GUZMAN-VERSEZCO; KUPERSZTOCH, 1990; THOMPSON; GIANNELLA, 1985).

Uma vez secretada no lúmen intestinal, ST se liga ao receptor guanilato ciclase C, localizado nas microvilosidades intestinais, resultando na estimulação do seu domínio guanilato ciclase. Essa estimulação leva a um aumento intracelular de GMP cíclico, seguida da ativação da proteína quinase dependente de GMPc, culminando na alteração do fluxo eletrolítico, com a inibição da absorção de sódio e estímulo na secreção de cloretos. Essas alterações resultam na diarreia característica das infecções por ETEC (GIANNELLA, 1995; NAIR; TAKEDA, 1998).

1.3.2.2 Toxina termo-lábil (LT)

Em contraste com ST, a toxina termo-lábil (LT) é uma toxina grande, oligomérica, com estrutura do tipo AB₅. Ela pode ser considerada como o fator de virulência de ETEC melhor caracterizado, devido à sua similaridade com a toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae*. Como membro da família das toxinas do tipo AB₅, a toxina LT possui 84 kDa, sendo composta por uma subunidade A e uma subunidade B. Os genes que codificam essas subunidades estão organizados em um *operon*, denominado *eltAB*, localizado em plasmídio que pode conter genes que codificam tanto ST, como também os CFAs (NATARO; KAPER, 1998; SPANGLER, 1992). Podemos observar a estrutura da toxina LT, ilustrada na Figura 2.

Figura 2 – Estrutura da toxina LT.

Fonte: Adaptado de FLECKESTEIN et al., 2009.

A subunidade A possui 28 kDa, sendo dividida em duas frações ligadas entre si através de pontes de dissulfeto. A fração A₁ é enzimaticamente ativa, apresentando atividades de ADP ribosilase e de NAD glicohidrolase, enquanto a fração A₂ é a porção helicoidal da molécula, que ancora a subunidade A ao pentâmero B. A subunidade B, contendo cinco subunidades idênticas e simétricas arranjadas em forma de anel, possui 56 kDa, sendo responsável pela ligação da toxina ao seu receptor nas células eucarióticas, os gangliosídeos GM1 [Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)(NeuAc(α2-3))Gal(β1-4)Glc(β1)ceramida] (MILLAR et al., 2001; RAPPUOLI et al., 1999; SIXMA et al., 1991; SPANGLER, 1992). Além dos

receptores GM1, a toxina LT pode se ligar a glicoconjugados N-acetilados com terminações lactosaminas, como também a poliglicosilceramidas (PCGs) e paraglobosídeos (ANGSTRON et al., 1994; ANGSTRON et al., 2000; HOLMGREN; SVENNERHOLM, 1973; HOLMGREN et al., 1982; HOLMGREN et al., 1985; MENEZES et al., 2002a; ORLANDI et al., 1994; TENEBERG et al., 1994).

De acordo com a especificidade da ligação entre o receptor da célula eucariótica e a subunidade B, além das diferenças genéticas e afinidades ao hospedeiro, a toxina LT pode ser dividida em dois grupos: LT-I e LT-II. As toxinas LT-I estão relacionadas com a toxina CT, apresentando 75% e 77% de identidade entre as sequências de nucleotídeos das subunidades A e B, respectivamente. Já as toxinas LT-II, apesar de possuírem atividade biológica semelhante à toxina LT-I, não apresentam reação cruzada imunologicamente. Suas subunidades A apresentam identidades entre si, como também com as toxinas CT e LT-I, diferentemente das suas subunidades B. Essa diferença entre as sequências na subunidade B confere à toxina LT a habilidade de se ligar a diferentes receptores (FUKUTA et al., 1988; SPANGLER, 1992). Outra propriedade biológica que a subunidade B de LT apresenta é a adjuvante, podendo ser considerada potente imunógeno, que pode evitar a indução de tolerância quando administrada via mucosa, como também gerar fortes respostas secretórias e sistêmicas de anticorpos (MILLAR et al., 2001).

A sequência de eventos que culmina na ocorrência da diarreia se inicia com a ligação da toxina LT, através da subunidade B, ao receptor GM1, sendo internalizada por endocitose e transportada através do complexo de Golgi, onde ocorre a dissociação das subunidades A e B. Uma vez dissociadas, a subunidade A é transportada para o retículo endoplasmático, enquanto a subunidade B permanece no complexo de Golgi para posterior degradação. A subunidade A é, então, translocada para o citosol, onde irá interagir com as ARFs (*ADP-ribosylation factors*), sendo ativada. Após ativação, a fração A₁ migra para a membrana plasmática, onde a proteína estimulatória G (Gs) está localizada, ribosilando sua subunidade α , levando a ativação permanente do complexo adenilato ciclase e aumento de AMP cíclico intracelular. O aumento dos níveis de AMPc intracelular leva à ativação da proteína quinase dependente de AMPc, que causa a fosforilação dos canais de cloretos, estimulando a secreção de cloretos e reduzindo a absorção de sódio (FLECKESTEIN et al., 2010; RAPPUOLI et al., 1999; TURNER et al., 2006). Na Figura 3 estão ilustrados os mecanismos de ação das enterotoxinas ST e LT de ETEC.

Figura 3 – Mecanismos de ação das toxinas ST e LT de ETEC.

Fonte: Adaptado de CROXEN; FINLAY, 2010.

1.3.2.2.3 Diagnóstico de ETEC

A detecção das toxinas ST e/ou LT é o modo mais simples de identificar amostras de *Escherichia coli* diarréogênicas como ETEC, já que é a expressão dessas enterotoxinas que as caracterizam. Diferentes metodologias já foram descritas para identificação das enterotoxinas de ETEC, incluindo ensaios em modelos animais, em culturas celulares *in vitro*, como também ensaios moleculares e imunossorológicos.

Dentre as técnicas de Biologia Molecular existentes, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é amplamente utilizada para diferenciar as diferentes categorias de ECD. Cepas de ETEC são identificadas através da amplificação dos genes que codificam as toxinas ST e LT, utilizando-se iniciadores específicos, em reações em cadeia da polimerase convencional ou multiplex (GALBADAGE; JIANG; DUPONT, 2009; MÜLLER et al., 2007; NATARO; KAPER, 1998; STACY-PHIPPS; MECCA; WEISS, 1995; YANO; ISHIMARU; HUIKATA, 2006; YAVZORI et al., 1998). Outra técnica baseada na detecção de ácidos nucleicos, utilizada na identificação de amostras de ETEC é o ensaio de hibridização de colônias (*Colony hybridization*). Sondas de DNA específicas para os genes das toxinas ST e LT, marcadas radioativamente, enzimaticamente ou quimicamente, são empregadas na

hibridização com o material genético presente nas colônias, após transferência e tratamento das membranas. Quando comparada à PCR, a hibridização apresenta menor sensibilidade, além das dificuldades técnicas que alguns laboratórios podem ter, principalmente, quando utilizadas sondas marcadas radiotivamente (MOSELEY et al. 1980; SOMMERFELT et al. 1993; YAVZORI et al., 1998).

Os primeiros ensaios para identificação da toxina ST foram realizados em modelos animais, como o ensaio em alça ligada em intestino de coelhos. Neste ensaio, a ocorrência de acúmulo de fluidos nas alças indica a positividade para a toxina (EVANS; EVANS; PIERCE, 1973). No entanto, devido à exigência da manipulação de animais com metodologia cirúrgica, a sua aplicação tornou-se inviável em laboratórios. Outro modelo animal passou, então, a ser utilizado na identificação da toxina ST, tornando-se o ensaio-padrão. O acúmulo de fluidos nas alças intestinais de camundongos recém nascidos, após injeção percutânea ou administração oral do sobrenadante de cultura, identificava a cepa como produtora da toxina ST (DEAN et al., 1972). Uma vez que ensaios empregando animais são extremamente trabalhosos, ensaios imunológicos foram desenvolvidos para detecção de ST, incluindo RIA (*radioimmunoassay*) (GIANNELLA; DRAKE; LUTTRELL, 1981) e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (CRYAN, 1990).

Os ensaios biológicos tradicionais para detecção de LT envolvem culturas celulares, como as células adrenais Y1 ou células epiteliais CHO (*Chinese Hamster Ovary*). Em ambos os ensaios, o sobrenadante de cultura de ETEC é adicionado às células, que apresentam alterações morfológicas causadas pelo efeito citopático da toxina, após o período de incubação. As células Y1 tornam-se arredondadas, enquanto as células CHO tornam-se alongadas (DONTA et al., 1974; GUERRANT et al., 1974).

Assim como para ST, diferentes ensaios imunológicos foram descritos para detecção de LT, dentre os quais podemos citar: o teste Biken (HONDA et al., 1981), ELISA (YOLKEN et al., 1977), ensaios de aglutinação (ITO; KUWAHARA; YOKOTA, 1983), ensaio de aglutinação de látex passiva reversa e ensaio de coaglutinação estafilocócica (CHAPMAN; DALY, 1993). O ELISA-GM1 (SACK et al., 1980; SVENNERHOLM; HOLMGREN, 1978; SVENNERHOLM; WIKLUD, 1983) foi desenvolvido primeiramente para detectar LT, sendo, subsequentemente, combinado para detecção de ST e LT. No entanto, ele tem sido utilizado somente em estudos epidemiológicos (QADRI et al., 2005). Como alternativa ao ELISA GM-1, devido ao seu elevado custo e sensibilidade dependente do antissoro utilizado, um ELISA de captura foi desenvolvido utilizando a fração enriquecida em IgG de coelho anti-LT-I e um anticorpo monoclonal anti-LT-I, caracterizado como IgG2b. Este ELISA

apresentou 100% de sensibilidade e 99% de especificidade diante das cepas testadas (MENEZES et al., 2006).

Outra ferramenta importante na detecção das toxinas de ETEC são os anticorpos monoclonais. A obtenção de anticorpos monoclonais anti-ST-I foi descrita por BRANDWEIN et al. (1985) e SVENNERHOLM et al. (1986), enquanto LINDHOLM et al. (1983) descreveram a obtenção de anticorpos monoclonais contra a toxina colérica, que também reconheciam a toxina LT. Em sua tese de mestrado, MENEZES (2002b) obteve anticorpos monoclonais contra as toxinas LT-I e ST-I, que apresentaram especificidades e sensibilidades satisfatórias.

Apesar das inúmeras técnicas descritas acima, poucas são aplicáveis em laboratórios com infraestruturas mínimas. Diante da ausência de teste simples, que possam ser utilizados na identificação de ETEC, o desenvolvimento de um ensaio simples, barato, com sensibilidades e especificidades desejáveis se faz presente (QADRI et al., 2005).

1.4 Aspectos gerais da resposta imune

O sistema imune é constituído por células e moléculas responsáveis pela defesa do organismo contra substâncias consideradas estranhas como vírus, bactérias, fungos e parasitas, ou ainda células tumorais e proteínas próprias. O contato do sistema imune com essas substâncias desencadeia uma série de eventos com o intuito de eliminá-las, denominada resposta imune (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A resposta imune é constituída por dois componentes: a imunidade inata e a adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa da resposta imune contra infecções, respondendo rapidamente contra elas. Ela é específica contra estruturas que são comuns a grupos de microorganismos semelhantes, porém não possui a habilidade de distinguir diferenças discretas entre substâncias estranhas. Os componentes da imunidade inata, que tentam impedir a entrada do agente estranho no organismo são: barreiras físicas e químicas (pele, membranas de mucosa, lisozima), proteínas (proteínas do sistema complemento, citocinas) e células (fagocitárias e NK). Já a imunidade adaptativa é estimulada através da exposição a agentes infecciosos. Sua magnitude e capacidade de defesa aumentam, devido às suas características de especificidade, com a qual consegue distinguir diferentes moléculas, e memória, habilidade de se “lembrar” do microrganismo, respondendo com mais intensidade a exposições subsequentes ao mesmo. Os linfócitos e seus produtos são componentes da imunidade adaptativa, que constituem a imunidade celular e a imunidade humoral, responsáveis

pela eliminação dos diferentes tipos de microrganismos (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Na Figura 4 podemos observar os componentes envolvidos nas respostas imunes inata e adaptativa.

Figura 4 – Ilustração dos componentes envolvidos nas respostas imunes inata e adaptativa.

Fonte: Adaptado de ABBAS; LICHTMAN, 2005.

1.4.1 Imunidade celular

A imunidade mediada por células envolve linfócitos especializados denominados células T (ou linfócitos T) e suas populações. Assim como as células B e todas as outras células envolvidas na resposta imune, as células T se desenvolvem a partir de células-tronco da medula óssea, sendo diferenciadas em células T maduras no timo. Durante o processo de maturação, as células T passam a expressar receptores de superfície, que permitem o reconhecimento e a ligação a um antígeno específico, migrando em seguida para órgãos linfóides, onde estão aptas a encontrar antígenos. A interação entre as células T e os antígenos promove a ativação dos linfócitos, estimulando a sua diferenciação em células T efetoras, que realizam a imunidade mediada por células e se proliferam. Essas células agem contra microrganismos intracelulares, que sobrevivem e se proliferam no interior de células fagocitárias e de outras células do hospedeiro, reconhecendo seus antígenos e destruindo-os ou ainda promovendo a destruição das células infectadas para eliminação dos reservatórios de infecção. Além disso, a produção de proteínas denominadas citocinas, por determinadas

populações de células T ativadas, regulam a proliferação e ativação não só das células T, como também de outras células do sistema imune, como macrófagos e células B (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

1.4.2 Imunidade mediada por anticorpos

A resposta imune mediada por anticorpos ou resposta imune humoral é caracterizada pela presença de substâncias solúveis, principalmente os anticorpos, que são produzidos por uma subpopulação de linfócitos, denominada linfócitos B. Os linfócitos B se desenvolvem na medula óssea, e após maturação migram para os órgãos linfóides periféricos, onde podem ser estimuladas por antígenos livres ou extracelulares. A interação de antígenos com imunoglobulinas de membranas do linfócito B resulta na sua ativação, culminando na transdução de uma série de sinais bioquímicos para o interior da célula, aumentando a expressão de seus receptores celulares. O linfócito B ativado pode, ainda, representar o papel de uma célula apresentadora de antígeno ao internalizá-lo por endocitose, processando-o e apresentando-o às outras células do sistema imune. Após ativação, as células B dividem-se e diferenciam-se em células de memória ou células efetoras produtoras de anticorpos, denominadas plasmócitos. Os plasmócitos irão produzir anticorpos com a mesma especificidade da imunoglobulina de membrana que o originou (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ECKERT; SIMON; SCROFENEKER, 1998).

1.4.3 Imunoglobulinas

O efeito protetor da imunidade humoral é mediado por imunoglobulinas ou anticorpos, glicoproteínas produzidas por células B efetoras do sistema imune. Quando secretadas, as imunoglobulinas se localizam no plasma sanguíneo, nas secreções mucosas e no líquido intersticial dos tecidos, apresentando duas funções distintas: a de se ligar de maneira específica ao antígeno que ativou a resposta imune e a de recrutar outras células e moléculas do sistema imune para destruir o patógeno ao qual está ligada. Dessa maneira, os anticorpos atuam no reconhecimento, destruição e inativação de microrganismos e seus fatores de virulência. Quando comparadas às outras moléculas envolvidas em reconhecimento antigênico, as imunoglobulinas apresentam a maior variabilidade de reconhecimento antigênico, a maior possibilidade de distinção entre antígenos diferentes e a maior força de

ligação com a molécula do antígeno (GOLDHART; ECKERT; REMIÃO, 1998; ROITT, BROSTOFF; MALE, 2001).

1.4.3.1 Estrutura dos anticorpos

Todas as moléculas de imunoglobulinas apresentam uma estrutura básica, simétrica, apresentando a forma da letra Y, composta por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) também idênticas. Em geral, as duas cadeias pesadas estão ligadas covalentemente entre si por duas ou mais pontes de dissulfeto, enquanto a cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ponte de dissulfeto. Essas pontes de dissulfeto variam em número e posição dependendo do tipo de imunoglobulina ou ainda da espécie que a produziu (MAK; SAUNDERS, 2008).

Tanto as cadeias leves quanto as cadeias pesadas das imunoglobulinas possuem regiões aminoterminais variáveis e regiões carboxiterminais constantes. As cadeias leves são constituídas por uma região variável (VL) e uma região constante (CL), enquanto as cadeias pesadas são constituídas por uma região variável (VH) e três ou quatro regiões constantes (CH). A justaposição das regiões variáveis de ambas as cadeias forma os dois sítios de ligação ao antígeno (região Fab), enquanto as regiões constantes são separadas do local de ligação ao antígeno e não participam do seu reconhecimento. Embora os domínios constantes das cadeias leves não participem das funções efetoras dos anticorpos e não se liguem a membranas celulares, os domínios constantes das cadeias pesadas (porção Fc) interagem com outras moléculas efetoras e células do sistema imune, participando como mediadores da maioria das funções biológicas dos anticorpos (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Na Figura 5 podemos observar a estrutura de uma molécula de anticorpo e seus domínios.

Figura 5 – Estrutura de uma molécula de anticorpo e seus domínios.

Fonte: Modificado de LEONG; CHEN, 2008.

As regiões variáveis são assim denominadas por conterem regiões em que a sequência de aminoácidos é variável. Essa variabilidade está concentrada em três regiões compostas por 5 a 7 aminoácidos cada, denominadas regiões hipervariáveis, presentes em cada uma das cadeias leves e pesadas, sendo responsáveis pela diversidade dos anticorpos e, consequentemente, permitindo o reconhecimento de quase todos os antígenos. As regiões hipervariáveis são espaçadas por quatro regiões que apresentam a sequência de aminoácidos mais conservada, denominados segmentos de moldura ou arcabouço. Devido a esse espaçamento, as regiões hipervariáveis só formam o sítio de ligação ao antígeno através do dobramento do anticorpo, e uma vez que essas sequências formam uma estrutura que é complementar à estrutura tridimensional do antígeno ao qual estão ligadas, as regiões hipervariáveis também são chamadas de regiões determinantes de complementariedade (CDRs). A diversidade presente nas sequências dos CDRs e o seu confinamento a três pequenas extensões resultam em estruturas químicas únicas, expostas na estrutura tridimensional do anticorpo, resultando em diferentes especificidades para os antígenos, porém mantendo a estrutura básica do anticorpo (ABBAS; LICHTMAN, 2005; MAK; SAUNDERS, 2008).

Em contraste com a região variável, a região constante apresenta pequenas variações na sua sequência de aminoácidos. Essas variações são responsáveis pela determinação das classes ou isotipos dos anticorpos, afetando o seu tamanho, a sua carga, além da solubilidade, influenciando também na distribuição e funções que desempenham. As cadeias pesadas são classificadas em cinco tipos, designadas por letras gregas, em: *gamma* (γ), *mu* (μ), *delta* (δ),

alpha (α) e *epsilon* (ϵ), podendo ser combinadas com qualquer um dos dois tipos de cadeias leves *kappa* (κ) ou *lambda* (λ) (ABBAS; LICHTMAN, 2005; MAK; SAUNDERS, 2008; ROITT; BROSTOFF; MALE, 2001).

1.4.3.2 Classificação dos anticorpos e suas funções

As imunoglobulinas são classificadas em cinco principais classes, de acordo com suas cadeias pesadas, em IgA, IgM, IgD, IgG e IgE, sendo produzidas como receptores de membranas ou como anticorpos secretados. As classes IgG e IgA podem apresentar ainda subtipos ou subclasses, mas o mesmo não ocorre com as classes IgM, IgD e IgE (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2008).

Após a sua produção, os anticorpos desempenham suas funções efetoras em locais distantes daqueles nos quais foram produzidos. As principais funções efetoras são: a de neutralização e eliminação de microrganismos infecciosos e toxinas microbianas. A neutralização de microrganismos e toxinas por anticorpos requer apenas a ligação do sítio de ligação do anticorpo, podendo ser efetuada por qualquer classe de anticorpos circulante ou em secreções mucosas. A maioria dos anticorpos neutralizantes presentes no sangue são da classe IgG, enquanto em mucosas predominam a classe IgA. Os anticorpos que apresentam alta afinidade a seus antígenos são os que melhor apresentam atividade neutralizante, mediada pela ligação das regiões constantes da cadeia pesada a receptores em diferentes células e proteínas plasmáticas do sistema imune. Devido às diferenças apresentadas nas regiões constantes dos anticorpos, seus diversos isotipos e subtipos desempenham funções efetoras diferentes ao se ligarem a substratos diferentes. Eles entram nas secreções mucosas, nas quais agem proporcionando defesa contra microrganismos inalados e ingeridos, e frequentemente no sangue, de onde são capazes de circular para qualquer lugar onde o antígeno esteja localizado. Os anticorpos também são ativamente transportados através da placenta para dentro da circulação do feto em desenvolvimento, conferindo-lhe imunidade após o nascimento (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Na Tabela 2 estão listadas as principais funções efetoras dos anticorpos mediadas pelas diferentes classes e subtipos.

Tabela 2 – Classes dos anticorpos humanos e suas funções.

Classe do anticorpo	Subtipo	Forma secretada	Funções
IgA	IgA1 e IgA2	IgA1 – Monômero IgA2 – Monômero, dímero, trímero	Imunidade de mucosa
IgD	Nenhum	Nenhuma	Receptor de antígenos das células B inativas
IgE	Nenhum	Monômero	Hipersensibilidade imediata
IgG	IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4	Monômero	Opsonização, ativação do complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, imunidade neonatal, inibição por <i>feedback</i> das células B
IgM	Nenhum	Pentâmero	Receptor de antígenos das células B inativas, ativação do complemento

Fonte: Adaptado de ABBAS; LICHTMAN, 2005.

1.4.3.3 Fragmentos de anticorpo IgG

No final dos anos 50, estudos demonstraram que fragmentos de IgG poderiam ser obtidos após o tratamento da molécula de IgG com enzimas proteolíticas. Rodney Porter fragmentou a molécula de IgG através da clivagem proteolítica com a enzima papaína, produzindo três fragmentos com pesos moleculares aproximados (50 kDa), porém com cargas diferentes. Dois dos três fragmentos eram idênticos e possuíam a habilidade de se ligar especificamente ao antígeno, sendo conhecidos como fragmentos Fab (*fragment antigen-binding*). A partir da bivalência da molécula original de IgG, Porter concluiu que cada fragmento Fab poderia ser monovalente. O terceiro fragmento não podia se ligar ao antígeno e cristalizava quando armazenado em baixas temperaturas, sendo denominado de fragmento

Fc (*fragment cristallizable*). Em estudo similar, Alfred Nisonoff usou a pepsina para a fragmentação da molécula de IgG, obtendo um fragmento com peso molecular de 100 kDa e outros pequenos fragmentos originados a partir da cadeia pesada. O fragmento maior ainda possuía a capacidade de se ligar ao antígeno, sendo denominado $F(ab')_2$ e, quando tratado com substâncias redutoras, originavam dois fragmentos Fab' (ELGERT, 2009). Os fragmentos da molécula de IgG obtidos após a digestão com as enzimas papaína e pepsina estão ilustrados na Figura 6.

Figura 6 – Molécula de IgG e seus fragmentos, após digestão enzimática com pepsina e papaína.

Fonte: Modificado de LIPMAN et al., 2005.

A proteólise com as enzimas papaína e pepsina vem sendo utilizada para a remoção da porção Fc, indicada quando deseja-se evitar determinadas funções efetoras da molécula de IgG, como a liberação exacerbada de citocinas e seus efeitos tóxicos causada pela ativação inadequada de células que expressam os receptores para Fc, ou ainda evitar os baixos níveis de contraste em exames por imagem, causada pela longa meia-vida do soro no organismo. Além da proteólise, outra metodologia utilizada para produção de fragmentos de anticorpos é a engenharia genética (HOLLIGER; HUDSON, 2005).

1.5 A engenharia genética aplicada na produção de fragmentos de anticorpos

A propriedade única que os anticorpos possuem de se ligarem especificamente à seus antígenos fazem deles uma excelente ferramenta, podendo ser amplamente utilizada tanto na pesquisa quanto na medicina. A partir de 1975, a produção de anticorpos, que era limitada à imunização de animais, foi revolucionada com o desenvolvimento da tecnologia de hibridomas, causando grande impacto na sua obtenção. Anticorpos monoclonais passaram a ser produzidos *in vitro*, apresentando homogeneidade e especificidade, características não observáveis nos anticorpos policlonais. Apesar de possuir características desejáveis, tanto para o diagnóstico como para a terapia, a produção dos anticorpos monoclonais apresentam limitações na sua obtenção, como o alto custo e longos períodos de cultivo, além de causar intensa resposta imune provocada pela administração dos anticorpos. Com o intuito de se manter a homogeneidade dos anticorpos monoclonais, além da sua especificidade, aliados ainda à produção em larga escala com baixo custo, a engenharia genética tem sido utilizada para obtenção de anticorpos recombinantes. A tecnologia do DNA recombinante permite o desenvolvimento de construções que mantenham ou aperfeiçoem as propriedades funcionais de um anticorpo, através da produção de fragmentos de anticorpos como proteínas recombinantes, utilizando diferentes sistemas de expressão para obtê-los (DE MARCO, 2011; HAGEMEYER et al., 2009; PUCCA et al., 2011; NELSON et al., 2000).

1.5.1 Fragmento variável em cadeia única (scFv)

Dentre os diferentes formatos de fragmentos de anticorpos, o fragmento variável em cadeia única (*single chain Fragments variable*) ou scFv é o mais popular, devido à grande versatilidade que apresenta. O scFv é o menor fragmento de anticorpo que ainda retém a capacidade de se combinar com o antígeno, mantendo a especificidade de ligação do hibridoma do qual foi derivado. Podendo apresentar massa molecular entre 27 e 30 kDa, o scFv é formado através dos domínios variáveis das cadeias pesada (V_P) e leve (V_L), ligados por um polipeptídeo flexível (*linker*). A inserção do polipeptídeo ligante permite o distanciamento entre as porções C-terminal e N-terminal dos domínios, preservando a flexibilidade da molécula para melhor ligação ao antígeno, além de evitar a dissociação dos mesmos. Geralmente, polipeptídeos com 15 aminoácidos de comprimento apresentando os aminoácidos $(Gly_4Ser)_3$ na sua composição são os mais utilizados, uma vez que *linkers* com comprimento superior a 12 resíduos de aminoácidos permitem interações entre V_P e V_L

semelhantes às nativas. No entanto, o comprimento do *linker* pode variar de acordo com a aplicação do scFv. A ligação do polipetídeo com os domínios pode ocorrer na orientação V_P -*Linker*- V_L ou V_L -*Linker*- V_P , sendo esta a mais usual. A eficiência da expressão, como também a estabilidade e a atividade de ligação do scFv podem ser afetadas pela orientação dos domínios (HOLLIGER; HUDSON, 2005; JOOSTEN et al., 2003; KORTT et al., 1997; LEONG; CHEN, 2008; WEISSER; HALL, 2009; ZDANOV et al., 1994). Na Figura 7 podemos observar a ilustração de um fragmento variável em cadeia única (scFv) e as variações na sua orientação.

Figura 7 - Fragmento variável em cadeia única (scFv) e as variações na sua orientação.

Fonte: Modificado de WEISSER; HALL, 2009.

Quando comparados às moléculas de anticorpos convencionais, os scFvs apresentam inúmeras vantagens como biofármacos, atribuídas ao tamanho reduzido e a ausência da porção Fc. Seu tamanho reduzido proporciona uma penetração rápida e uniforme em tumores e tecidos, alcançando seus alvos em menor tempo, enquanto a ausência da porção Fc contribui na diminuição tanto da imunogenicidade da molécula, quanto da ligação em alvos inespecíficos. Além disso, a molécula de scFv apresenta curto tempo de circulação e rápida eliminação do organismo, facilitando sua administração em radioimunoterapias e desintoxicação de drogas (LEONG; CHEN, 2008).

Diferentes abordagens vêm sendo utilizadas para a produção de moléculas de scFvs, visando a implementação da sua atividade, principalmente através da geração de scFvs conjugados ou multivalentes, que são aplicados no diagnóstico e tratamento de doenças como o câncer. As imunotoxinas, por exemplo, são moléculas híbridas constituídas por um anticorpo anti-tumor e moléculas citotóxicas, como toxinas. Nessa abordagem, o scFv seria utilizado para a ligação ao antígeno na superfície celular, enquanto a toxina agiria como um efector secundário dentro da célula, matando-a após internalização. Outra aplicação de moléculas de scFv conjugadas seria no diagnóstico por imagem *in vivo*, através da utilização

de scFvs conjugados a isótopos. A especificidade do scFv ao antígeno aliada à sua alta capacidade de penetração e a distribuição homogênea facilitam o acesso ao tumor, contribuindo ainda com uma melhora no contraste das imagens devido à baixa meia-vida das moléculas (LEONG; CHEN, 2008; WEISSER; HALL, 2009).

Moléculas de scFv também podem ser produzidas em fusão com proteínas repórter, como proteínas fluorescentes, fosfatase alcalina e estreptoavidina, mostrando-se extremamente úteis, principalmente em testes diagnósticos através de reações imunoenzimáticas. Quando comparadas aos anticorpos quimicamente acoplados à essas proteínas, os scFvs apresentam a vantagem de desenvolverem reações em menor tempo, já que a detecção do antígeno é feita diretamente com a molécula marcada, diminuindo o número de incubações e reagentes utilizados (CONROY et al., 2009; PETRENKO; SOROKULOVA, 2004; WEISS; ORFANOUDAKIS, 1994).

Diferentes moléculas de scFvs foram desenvolvidas para a detecção de antígenos pertencentes às diferentes categorias de *Escherichia coli* diarreigênicas. Menezes e colaboradores (2011) desenvolveram o scFv-intimina, que reconhece tanto a proteína Intimina presente na cepa protótipo de EPEC, quanto a proteína recombinante intimina. Já Baskharan e colaboradores (2005) produziram uma molécula de scFv que reconhece a fímbria F5 de ETEC, adesina responsável pela adesão da bactéria ao enterócito do animal. As proteínas EspA e Intimina da cepa O157:H7 de EHEC foram alvos para o desenvolvimento de scFvs que reconheceram ambos os antígenos nos sorogrupos O157 e O111 testados (KHÜNE et al., 2004). Outro fator de virulência de ETEC, a fímbria K99, também foi detectada por moléculas de scFv, desenvolvidas por Golchin e Aitken (2008). Ma e colaboradores (2008) desenvolveram um scFv anti-Stx2 capaz de reconhecer a toxina Stx2, além de neutralizar a sua atividade citotóxica. Além dos outros dois scFvs citados acima, desenvolvidos contra fatores de virulência de ETEC, outro scFv também foi desenvolvido contra a subunidade B da toxina LT produzida por ETEC (CHUNG et al., 2008).

1.5.2 Produção de fragmentos de anticorpos scFv em *Escherichia coli*

Dentre os sistemas de expressão disponíveis para a produção de fragmentos de anticorpos, a bactéria *Escherichia coli* tem sido amplamente utilizada, por apresentar diversas vantagens como fácil manipulação, crescimento rápido, expressão da proteína de interesse em pouco tempo, meios de cultura simples e barato para seu cultivo, além de alto rendimento. Outro fator que contribui para sua ampla utilização é a disponibilidade de um grande número

de cepas e vetores, que facilitam a obtenção dos mais diversos tipos de proteínas. Diversos trabalhos têm descrito altos rendimentos na expressão de fragmentos de anticorpos nesta espécie bacteriana, chegando a 2g/L. A principal indicação da utilização deste sistema é para expressão de fragmentos de anticorpos desprovidos de modificações pós-traducionais (CARTER et al., 1992; RODRIGUES et al., 1992; SØRENSEN, 2010).

Como ocorre com a expressão de outras proteínas heterólogas, a eficiência na expressão de scFvs é dependente da eficiência de transcrição, tradução e/ou dobramento e renaturação da molécula. Outros fatores como solubilidade, estabilidade, tamanho e a sequência primária dos aminoácidos também podem influenciar diretamente no rendimento da expressão e na atividade biológica do fragmento de anticorpo. A expressão bacteriana de moléculas de scFv pode correr tanto no citoplasma bacteriano, nas formas solúveis e insolúveis (corpúsculos de inclusão), como também no periplasma (VERMA; BOLETI; GEORGE, 1998; LEONG; CHENG, 2008).

Altas concentrações de fragmentos de anticorpos podem ser produzidos no citoplasma bacteriano, utilizando promotores como o T7. No entanto, esses fragmentos são expressos na forma de corpúsculos de inclusão, que necessitam da solubilização com agentes desnaturantes, seguida da purificação e posterior renaturação para a aquisição da conformação nativa da molécula. O processo de renaturação nem sempre é eficiente, podendo ser dependente da sequência de aminoácidos da molécula. A renaturação realizada através de diálise para retirada gradual do agente desnaturante, na presença de aditivos como a glutathione reduzida/oxidada, tem se mostrado eficiente na recuperação de fragmentos de anticorpos biologicamente ativos (FERNÁNDEZ, 2004).

Uma das abordagens utilizada para se obter o anticorpo recombinante solúvel no citoplasma ou periplasma é produzi-la em fusão com outras proteínas, como a GST (*Glutathione S-transferase*), a MBP (*Maltose-binding protein*) e a SUMO (*Small ubiquitin-related modifier*), facilitando a obtenção das mesmas. Essas proteínas de fusão parecem apresentar atividade de chaperoninas, protegendo a proteína a elas fusionadas contra degradação proteolítica, aumentando a solubilidade e o dobramento e diminuindo significativamente a formação de corpúsculos de inclusão. Apesar de todas as vantagens listadas, uma das limitações dos sistemas de fusão é a clivagem da proteína de fusão que pode ser ineficiente (ARBABI-GHAHROUDI; TANHA; MACKENZIE, 2005).

A expressão do anticorpo recombinante fusionado a um peptídeo sinal, pode propiciar a secreção do mesmo para o espaço periplasmático da célula bacteriana. O ambiente oxidativo do periplasma bacteriano pode favorecer a correta interação entre as pontes de dissulfeto,

garantindo o correto dobramento da molécula. A expressão do anticorpo recombinante no espaço periplasmático bacteriano pode ser vantajosa para produção em larga escala, já que o seu isolamento se torna extremamente fácil através de choque osmótico da membrana externa bacteriana. Outra vantagem da expressão periplasmática é a diminuta concentração de proteínas contaminantes, o que propicia a obtenção de proteínas relativamente puras. Entretanto, a utilização de peptídeos sinais não garante a solubilidade da proteína, já que esta tende a se acumular no espaço periplasmático na forma de corpúsculos de inclusão, quando expressas em grandes quantidades. O sucesso para o processamento correto do fragmento do anticorpo no espaço periplasmático parece estar relacionado com a sequência primária dos aminoácidos nos domínios variáveis (KIPRIYANOV; LE GALL, 2004; LEONG; CHENG, 2008).

As facilidades promovidas pela engenharia genética permitiram o desenvolvimento de anticorpos recombinantes na forma de scFv contra as difentes categorias de *E. coli* dirreiogênicas. A sua produção em um sistema de expressão tradicionalmente utilizado para a produção de proteínas heterólogas, possibilita a obtenção de moléculas com especificidades desejáveis, com baixo custo e altas concentrações, que possam ser utilizadas como ferramenta na detecção dos diferentes patotipos. A partir dessa premissa surgiu objetivo deste trabalho, que consiste no desenvolvimento de uma ferramenta que possa ser utilizada na identificação de cepas de ETEC.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a obtenção de um anticorpo recombinante na forma de um fragmento variável em cadeia única, contra a toxina termo-lábil de *Escherichia coli* Enterotoxigênica, bem como a avaliação da sua capacidade em reconhecer a toxina LT. Para isso, as seguintes estratégias foram utilizadas:

- Construção do inserto scFvLT, a partir da clonagem dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal anti-LT;
- Subclonagem do inserto scFvLT nos vetores de expressão pET28a e pSMT3;
- Expressão do anticorpo recombinante scFvLT em cepas de *Escherichia coli*;
- Purificação do anticorpo recombinante scFvLT, através de cromatografia de afinidade;
- Análise funcional do anticorpo recombinante scFvLT, através de ensaios imunoenzimáticos e ensaios de neutralização da toxina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura empregados, assim como as soluções utilizadas nas diversas técnicas descritas a seguir, foram preparados de acordo com Sambrook et al. (1989), exceto quando indicado.

3.2 Cepas bacterianas

A cepa de *Escherichia coli* JM109 (Promega, EUA) foi utilizada para a propagação dos plasmídios recombinantes, enquanto as cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen, EUA), *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen, EUA) e *Escherichia coli* BL21-C43 (MIROUX; WALKER, 1996) foram utilizadas para expressão do anticorpo recombinante. Já a cepa H10407, protótipo de ETEC (EVANS et al., 1975), foi utilizada como controle positivo nos ensaios funcionais do anticorpo recombinante.

Os ensaios funcionais do anticorpo recombinante scFvLT foram realizados com a utilização do sobrenadante de cultura da cepa H10407 cultivada em caldo *E. coli*, na presença de 100 µg/mL de lincomicina, a 37 °C, 250 rpm por 8 horas. O sobrenadante da cultura foi obtido após centrifugação a 4.500 x g, por 15 minutos, 4 °C (*Eppendorf 5804-R*), sendo mantida a -20 °C até o momento do uso.

3.3 Vetores

Os vetores utilizados nas etapas de clonagem e expressão deste estudo foram:

- pGEM-T Easy (Promega, EUA): vetor de clonagem com 3015 pb, resistente a ampicilina, com sítio múltiplo de clonagem e promotores T7 e SP6;
- pET28a (Novagen, EUA): vetor de expressão com 5369 pb, resistente a canamicina, com sítio múltiplo de clonagem e promotor T7. Este vetor codifica a cauda de histidina na região N-terminal e C-terminal da proteína recombinante;
- pSMT3 (BUTT et al., 2005): vetor de expressão com 5633 pb, resistente a canamicina, com sítio múltiplo de clonagem e promotor T7. A cauda de

histidina e a proteína de fusão SUMO são codificadas na porção N-terminal da proteína recombinante. Este vetor foi gentilmente cedido pelo Dr. Geraldo Santana Magalhães, do Laboratório de Imunopatologia, do Instituto Butantan.

3.4 Células eucarióticas

3.4.1 Hibridomas anti-LT

Os hibridomas produtores de anticorpos anti-LT foram obtidos por Caroline Menezes no Laboratório de Bacteriologia, do Instituto Butantan (MENEZES, 2002b). Esses hibridomas são produtores de anticorpos monoclonais do isotipo IgG2b, que reconhecem ambas as unidades da toxina LT.

3.4.2 Células adrenais Y1

Células adrenais Y1 foram utilizadas nos ensaios de neutralização da toxina LT e de imunofluorescência indireta. Estas células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 mm² (TPP, Suíça) em meio DMEM contendo 4,5 g/mL de glicose (Cultilab, Brasil) e 10% de Soro Fetal Bovino (GibcoBRL, EUA), a 37°C, com 5 % de CO₂ atmosférico até atingirem a confluência de 70%. Para o preparo das placas, as células foram tripsinizadas com a adição de 2 mL de tripsina, sendo neutralizada com 2 mL de DMEM-10% SFB após a observação do descolamento celular. As células foram transferidas para tubo de polipropileno de 50 mL para centrifugação a 259 x g, a 4 °C por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado em 5 mL de meio DMEM-10% SFB para contagem em câmara de Neubauer.

3.5 Toxina LT

A toxina LT, utilizada nos ensaios de ELISA indireto e de captura, neutralização da toxina e imunofluorescência indireta, foi purificada segundo Bowman e Clements (2001), sendo gentilmente cedida pelo Dr. John D. Clements do Departamento de Microbiologia e Imunologia, da Universidade de Tulane, New Orleans, Louisiana, Estados Unidos da América.

3.6 Anticorpo monoclonal anti-LT

O anticorpo monoclonal anti-LT utilizado neste trabalho foi obtido após purificação do sobrenadante de cultura de hibridomas produtores de anticorpos anti-LT, por cromatografia de afinidade em coluna de Proteína A-Sepharose (Pharmacia Fine Chemical, EUA). Após purificação, os anticorpos foram liofilizados e estocados a – 20 °C até o momento do uso.

3.7 Fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT

A fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT foi obtida por Menezes et al. (2003), a partir do soro de coelhos imunizados com a toxina LT submetido a precipitação por ácido caprílico e sulfato de amônio, segundo McKinney e Parkinson (1987).

3.8 Clonagem dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal anti-LT, para obtenção do anticorpo variável em cadeia única scFvLT

A clonagem da porção variável das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal anti-LT foi realizada a partir de hibridomas produtores de anticorpos anti-LT, utilizando os iniciadores que compõem o kit *Mouse scFv Module/Recombinant Phage Antibody System* (GE Healthcare, EUA), segundo recomendações do fabricante. As etapas necessárias para a obtenção das cadeias estão representadas na Figura 8.

Figura 8 – Representação esquemática das etapas para obtenção dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada de anticorpos.

FONTE: Adaptado de *Recombinant Phage Antibody System Booklet*, 2002.

3.8.1 Cultivo dos hibridomas anti-LT

Hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-LT (MENEZES, 2002b) foram cultivados em garrafas de cultura celular de 75 mm² (TPP, Suíça) com meio RPMI (GibcoBRL, EUA) enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (GibcoBRL, EUA), 2% de aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich, EUA) e 1% de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA). Após a determinação do número total de células através da contagem em câmara de Neubauer, as células foram distribuídas em alíquotas de 1 mL e centrifugadas a 259 x g, a 4 °C (Centrifuge 5804 R – Eppendorf, Alemanha) para a formação do precipitado. Após a retirada do meio de cultura, as células precipitadas foram armazenadas a -80 °C para posterior extração de RNA total.

3.8.2 Extração do RNA total dos hibridomas anti-LT

O RNA total dos hibridomas anti-LT foi extraído a partir de 6×10^5 células/mL, através do kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Após a eluição do RNA total com água *DNase* e *RNAse free* (GibcoBRL, EUA), o volume obtido foi fracionado em alíquotas de 20 µL e armazenados a -80°C . A análise da integridade do RNA foi realizada em gel de agarose 1,5% em tampão TAE (40 mM de tris-acetato; 2 mM de ácido etilenodiaminotetracético).

3.8.3 Eletroforese em gel de agarose

A extração de RNA total, assim como os produtos obtidos por PCR, extrações plasmidiais e análises de restrição foram analisadas em géis de agarose, preparados em diferentes concentrações, conforme indicado, dissolvendo-se a agarose (GE Healthcare, EUA) por aquecimento em tampão TAE. Uma alíquota de 5 µL das amostras foi homogeneizada com 1 µL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol; 30% de glicerol), submetida à migração sob corrente constante de 90 V juntamente com padrão molecular de 1 Kb DNA Ladder ou 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). O gel foi corado em solução de brometo de etídio (Invitrogen, EUA) a 0,5 µg/mL e fotografado no sistema de captação de imagem AlphaImagerTM 2200 (Alpha Innotech, EUA).

3.8.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído dos hibridomas anti-LT, com a utilização do kit *First-Strand cDNA Synthesis* (GE Healthcare, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Um volume de 20 µL de RNA total foi aquecido a 65°C por 10 minutos e resfriado em gelo por 2 minutos, antes da adição de 11 µL do *Bulk first-strand mix*, 1 µL de solução de DTT e 1 µL de iniciadores pd(N)₆ totalizando um volume final de 33 µL. Após a homogeneização da reação, esta foi incubada a 37°C por 1 hora.

3.8.5 Amplificação da porção variável das cadeias leve e pesada do anticorpo anti-LT

Uma vez realizada a síntese de cDNA, este foi utilizado como molde para a amplificação da porção variável das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal anti-LT. Para as reações de amplificação foram utilizados iniciadores que compõem o kit *Mouse ScFv Module/Recombinant Phage Antibody System* (GE Healthcare, EUA).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 100 µL em microtubos de 0,6 mL de polipropileno (Axygen, EUA). Para a amplificação da região variável da cadeia leve foram utilizados 33 µL de cDNA, 2 µL de *Light primer mix* e 64 µL de água ultrapura estéril. Já nas reações para a amplificação da região variável da cadeia pesada foram utilizados 33 µL de cDNA, 2 µL de *Heavy primer 1*, 2 µL de *Heavy primer 2* e 62 µL de água ultrapura estéril. Para ambas as amplificações foram adicionadas 5 U de *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, EUA), após o aquecimento das reações a 95 °C, por 5 minutos. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) sob as seguintes condições: 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 2 minutos, 72 °C por 2 minutos, totalizando 30 ciclos .

Após amplificação, os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5% preparado em TAE. Feita a identificação dos fragmentos referentes às porções variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal, estes foram purificados do gel de agarose, com o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN, Alemanha) e posteriormente analisados em gel de agarose 1,5% (item 3.8.3).

3.8.6 Clonagem das regiões variáveis das cadeias leve e pesada no vetor de clonagem pGEM-T

Para sequenciamento das regiões variáveis de ambas as cadeias do anticorpo monoclonal anti-LT foi realizada a clonagem desses fragmentos utilizando o kit *pGEM-T Easy Vector Systems* (Promega, EUA). Para cada 50 ng de vetor foram utilizados 17,5 ng de cada uma das cadeias, 1 X de tampão de ligação fornecido pelo fabricante, 3 U de *T4 DNA Ligase* e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. As reações de ligação foram incubadas a 4 °C, por 18 horas.

3.8.7 Transformação bacteriana por choque térmico

Células da cepa *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen, EUA) e *E. coli* BL21-C43 competentes foram transformadas por choque térmico com o produto das reações de ligação ou minipreparações. Em alíquotas de 50 μ L de células competentes foram adicionadas 2 μ L do produto das reações de ligação ou 1 μ L das minipreparações, sendo incubadas em gelo por 30 minutos. As células foram submetidas a choque térmico a 42 °C por 45 segundos e mantidas novamente em gelo por 2 minutos. As células transformadas foram recuperadas com o acréscimo de 950 μ L de meio SOC (2% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 10 mM de cloreto de sódio; 2,5 mM de cloreto de potássio; 10 mM de sulfato de magnésio; 10 mM de cloreto de magnésio; 20 mM glicose), sendo mantidas sob agitação de 150 rpm por 1 hora, a 37 °C (C25 *Incubator Shaker* – New Brunswick Scientific, EUA). Para as transformações realizadas com o produto da reação de ligação entre o vetor pGEM-T e os insertos, um volume de 100 μ L de cada uma das culturas foi plaqueado, em duplicata, em placas de LB ágar (1% de bacto-triptona, 0,5% de extrato de levedo, 1% de cloreto de sódio, 1,5% de bacto-agar), contendo 100 μ g/mL de ampicilina (Invitrogen, EUA), 40 μ g/mL de X-Gal (Invitrogen, EUA) e 1 mM de IPTG (Sigma-Aldrich, EUA). Já as demais transformações foram plaqueadas em placas contendo 100 μ g/mL de ampicilina ou 50 μ g/mL de canamicina. Essas placas foram incubadas a 37 °C, por 18 horas e colônias resultantes do crescimento bacteriano foram selecionadas para extração plasmidial ou utilizadas para expressão do anticorpo recombinante.

3.8.8 Extração Plasmidial

A extração plasmidial foi realizada de acordo com Birnboim e Doly (1979) com modificações. Colônias brancas provenientes do crescimento da transformação das células *E. coli* JM109 com o produto das reações de ligação entre o vetor pGEM-T e os insertos foram inoculadas em 5 mL de meio LB com 100 μ g/mL de ampicilina (Invitrogen, EUA) e mantidas sob agitação de 180 rpm, a 37 °C por 18 horas. Do crescimento bacteriano, um volume de 4,5 mL foi centrifugado a 16000 x g, por 5 minutos a 4 °C (Centrifuge 5402 – Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 300 μ L de solução I (0,5 M de EDTA, 1 M de Tris pH 8,0, 20% de glicose, água ultrapura q.s.p.), incubando-o 5 minutos em gelo. Em seguida foram adicionados 600 μ L da solução II (10 N de hidróxido de

sódio, 20% de dodecil sulfato de sódio, água ultrapura q.s.p.), homogeneizado lentamente por inversão e incubado em gelo por 5 minutos. A solução III (3 M de acetato de sódio, pH 4,8) foi adicionada após incubação em um volume de 450 µL, homogeneizada lentamente por inversão e incubada por 30 minutos em gelo. O lisado celular foi centrifugado a 16000 x g por 15 minutos, a 4 °C.

Após centrifugação, ao volume de 1,2 mL do sobrenadante coletado foram adicionados 2,5 volumes de etanol 100%, previamente resfriado a -20 °C e homogeneizados lentamente por inversão, incubados a -20 °C por 1 hora e centrifugados a 16000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% resfriado a -20 °C, sendo centrifugado a 16000 x g por 5 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi seco em temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol e ressuspenso em 50 µL de água ultrapura estéril.

3.8.9 Análise de restrição dos plasmídios recombinantes

Para verificar se os fragmentos ligados ao vetor pGEM-T correspondiam aos fragmentos de interesse, foi realizada a análise de restrição dos plasmídios extraídos com a enzima de restrição EcoRI. Essa enzima foi escolhida devido a presença de dois sítios de restrição na região múltipla de clonagem do vetor pGEM-T, liberando assim o fragmento clonado.

Para cada reação foram utilizados 250 ng de DNA plasmidial, 1 X tampão React 3 (Invitrogen, EUA), 10 U de enzima EcoRI (Invitrogen, EUA) e água ultrapura estéril para um volume final de 15 µL, sendo incubada a 37 °C por 2 horas. As análises de restrição foram analisadas em gel de agarose 1,0% em TAE, conforme descrito no item 3.8.3.

3.8.10 Sequenciamento de DNA e análises das sequências

O sequenciamento dos fragmentos correspondentes às regiões variáveis das cadeias leve e pesada da região variável do anticorpo monoclonal anti-LT, clonados no plasmídio pGEM-T, foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo). Para as reações de sequenciamento foi utilizado o sequenciador automático *MegaBACE 1000* (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o kit *APBiotech DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing*, a enzima *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase* e os

iniciadores PUC/M13 *forward* e *reverse*. As sequências obtidas foram manipuladas com auxílio dos *softwares* *BioEdit* e *Generunner*[®], e em seguida comparadas com o banco de dados GenBank, com auxílio do programa *BLASTn* (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A análise da sequência do inserto scFvLT para verificação da ocorrência de códons raros foi realizada pela ferramenta *Rare Codon Calculator (RaCC)*, no servidor *NHI MBI Laboratory Servers* (disponível em: <http://nihserver.mbi.ucla.edu>).

3.9 Clonagem do fragmento variável em cadeia única anti-LT, a partir do gene sintético scFvLT

3.9.1 Desenho de iniciadores para reamplificação do gene scFvLT

Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados com auxílio do programa *Generunner*[®], a partir da sequência do gene sintético. Esses oligonucleotídeos foram necessários, uma vez que os sítios de restrição presentes no gene sintético foram incompatíveis com os vetores de expressão escolhidos. As sequências dos iniciadores e seus respectivos sítios de restrição estão descritas abaixo:

scFvLT *Forward*: 5' GGATCC – GTGAAACTGCAGGAAAGCG 3'
BamHI

scFvLT *Reverse*: 5' CTCGAG – TCATTTCAGTTCCAGTTTGGTGC 3'
XhoI

3.9.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do inserto scFvLT

Uma vez realizada a síntese de novos iniciadores, estes foram utilizados para reamplificação do fragmento variável em cadeia única (scFv) anti-LT. O plasmídeo contendo o gene sintético foi utilizado como molde para amplificação do fragmento scFvLT.

Para a amplificação do inserto scFvLT foram utilizados 0,2 mM de uma mistura de dNTPs (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 1X tampão de PCR, 2,5 U de *Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA), 50 ng de DNA plasmidial contendo o gene sintético. Como controle negativo foi utilizado 1 µL de água ultrapura. A reação de amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System

9700 (Applied Biosystems, EUA) sob as seguintes condições: 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 68 °C por 1 minuto, totalizando 35 ciclos. Após amplificação, o produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1,0 %, conforme descrito no item 3.8.3. Feita a identificação do fragmento scFvLT, este foi purificado do gel de agarose, com o kit *PureLink™ Quick Gel Extraction* (Invitrogen, EUA), segundo recomendações do fabricante.

3.9.3 Adição da adenina terminal ao produto de PCR scFvLT

A adição da adenina terminal ao inserto scFvLT foi realizada para sua clonagem no vetor de clonagem pGEM-T. Neste procedimento foram utilizados 750 ng do fragmento scFvLT, 0,2 mM de dATP, 1,5 mM de MgCl₂, 5 U de Taq DNA Polimerase, 1 X tampão de PCR e água ultrapura estéril para um volume final de 50 µL. Essa reação foi incubada a 72 °C por 20 minutos em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA), sendo o produto purificado com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Reino Unido), seguindo as recomendações do fabricante, após corrida eletroforética em gel de agarose 1,0%.

3.9.4 Clonagem do inserto scFvLT ao vetor pGEM-T

Uma vez purificado, o fragmento scFvLT foi recombinado com o vetor pGEM-T *Easy* (Promega, EUA) utilizando a razão molar inserto:vetor de 3:1. Para cada 50 ng de vetor foram utilizados 40 ng de fragmento, 3 U de *T4 DNA Ligase* (Promega, EUA), tampão de ligação fornecido pelo fabricante e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. A reação de ligação foi incubada a 4 °C, por 18 horas, sendo um volume de 2 µL do produto da reação de ligação utilizado para transformar células *E. coli* JM109 competentes, conforme descrito no item 3.8.7.

3.9.5 Lisados bacterianos

Os clones obtidos durante os processos de clonagem foram confirmados através de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os lisados bacterianos utilizados nessas reações foram preparados, a partir do crescimento dos clones escolhidos aleatoriamente, em 3 mL de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina ou 50 µg/mL de canamicina, a 37 °C, por 18 horas, a 250 rpm. Um volume de 1 mL dos crescimentos bacterianos foram centrifugados e os precipitados

ressuspendidos em 300 µL de água ultrapura estéril. Essas suspensões foram submetidas a dois ciclos de fervura e incubação em gelo, por 10 minutos cada, sendo centrifugados brevemente.

3.9.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação dos clones scFvLT

As reações de PCR, com volume final de 50 µL foram realizadas conforme descrito no item 3.9.2, com a exceção da DNA polimerase e do DNA molde. A *Pfx DNA Polymerase* foi substituída pela *Taq DNA Polymerase* e como DNA molde foi utilizado 1 µL dos lisados bacterianos preparados conforme descrito no item 3.9.7. O plasmídeo contendo o gene sintético foi utilizado como controle positivo, enquanto o lisado bacteriano resultante do crescimento da colônia azul ou água ultrapura estéril foram utilizados como controle negativo. Após amplificação, os fragmentos foram analisados em gel de agarose 0,9% (item 3.8.3).

3.9.7 Extração Plasmidial

A extração plasmidial foi realizada a partir da cultura de seis colônias brancas e uma colônia azul, escolhidas aleatoriamente, provenientes do crescimento da transformação das células *E. coli* JM109. Estas colônias foram crescidas em meio LB com 100 µg/mL de ampicilina, a 37 °C, por 18 horas e agitação de 150 rpm (C25 *Incubator Shaker* – New Brunswick Scientific, EUA), sendo utilizado para extração plasmidial o kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen, EUA), conforme recomendação do fabricante.

3.9.8 Análise de restrição dos plasmídios extraídos

Para verificar se os plasmídios extraídos apresentavam o fragmento de interesse, estes foram digeridos com as enzimas de restrição Bam HI e XhoI. Devido à incompatibilidade entre os tampões das enzimas, primeiramente foi realizada a digestão com a enzima XhoI. Para um volume final de 10 µL, foram utilizados 100 ng de DNA plasmidial, 1 X tampão *React 2* (Invitrogen), 10 U de enzima XhoI (Invitrogen) e água ultrapura estéril, sendo a reação incubada a 37 °C por 2 horas. Para a digestão com a enzima BamHI, ao produto da digestão com a enzima XhoI foram adicionados 1 X tampão *React 3* (Invitrogen), 10 U de enzima BamHI (Invitrogen) e água ultrapura estéril para um volume final de 15 µL, sendo novamente incubada a 37 °C por 2 horas. As digestões foram analisadas após corrida

eletroforética, em gel de agarose 0,9% em TAE, e coloração em solução de brometo de etídio, conforme descrito no item 3.8.3.

3.9.9 Digestão dos vetores de expressão pET28a, pSMT3 e dos clones de pGEM-scFvLT

Os vetores de expressão pET28a e pSMT3, como também dois clones pGEM-scFvLT foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e XhoI. Os clones de pGEM-scFvLT foram digeridos para obtenção do fragmento scFvLT, enquanto os vetores de expressão foram digeridos para linearização e posterior ligação do fragmento scFvLT. Nessas reações de digestão foram utilizadas as mesmas concentrações de DNA e volumes de reagentes, como também as mesmas condições de incubação.

Para cada uma das reações foram utilizados 750 ng de DNA plasmidial, 1 X tampão *React 2*, 10 U de enzima XhoI (Invitrogen, EUA) e água ultrapura estéril para volume final de 15 µL, sendo incubadas a 37 °C por 2 horas. Ao produto dessa primeira digestão foram adicionados 1 X tampão *React 3*, 10 U de enzima BamHI (Invitrogen, EUA) e água ultrapura estéril, totalizando 25 µL, sendo também incubadas a 37 °C por 2 horas. As digestões foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,9% em TAE, e após coloração em solução de brometo de etídio, os fragmentos liberados e os vetores de expressão digeridos foram purificados do gel de agarose com o kit *PureLink™ Quick Gel Extraction* (Invitrogen, EUA), segundo recomendações do fabricante.

3.9.10 Clonagem do fragmento scFvLT aos vetores de expressão pET28a e pSMT3

Para a reação de ligação com o vetor pET28a, utilizando a razão molar inserto:vetor de 3:1, foram utilizados 25 ng de fragmento scFvLT, 50 ng de vetor pET28a, 1 X tampão de ligação fornecido com a enzima e 40 U de *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs, EUA) e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. Já na reação de ligação com o vetor pSMT3 foram utilizados 33 ng de fragmento scFvLT, 50 ng de vetor pSMT3, 1 X tampão de ligação, 40 U de *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs, EUA) e água utrapura estéril para 20 µL. Após incubação das reações em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) a 16 °C por 18 horas, 10 µL do produto das reações de ligação foram utilizados para transformação de células *E. coli* JM109 competentes, por choque térmico, conforme descrito no item 8.7. Um volume de 100 µL da cultura foi plaqueado em duplicata

em placas de LB ágar com canamicina 50 µg/mL (Invitrogen, EUA), sendo incubadas a 37 °C, por 18 horas.

3.9.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação dos clones de pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT

Colônias resultantes das transformações de células *E. coli* JM109, com o produto das reações de ligação entre os vetores de expressão pET28a e pSMT3 com o fragmento scFvLT, foram crescidas em 5 mL de meio LB com 50 µg/mL de canamicina, a 37 °C, sob agitação de 150 rpm por 18 horas. Tanto a preparação dos lisados bacterianos, quanto as reações de PCR foram realizadas conforme descrição nos itens 9.7 e 9.2, respectivamente. Após amplificação, os produtos foram analisados em gel de agarose 0,8%, conforme descrito no item 3.8.3.

3.9.12 Análise de restrição dos clones de pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT

Uma vez realizada a confirmação dos clones positivos para o gene scFvLT, dois clones de pET-scFvLT e cinco clones de pSMT3-scFvLT foram submetidos a análise de restrição com as enzimas Bam HI e XhoI. Após extração plasmidial, com o kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen, EUA), as reações de digestão foram realizadas com 250 ng de DNA plasmidial, 1 X tampão *React 2*, 10 U de XhoI (Invitrogen, EUA) e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. Estas reações foram incubadas a 37 °C por 2 horas. Após digestão com a enzima XhoI, realizou-se a digestão com a enzima BamHI, sendo acrescentadas à reação de digestão 1 X tampão *React 3*, 10 U de BamHI (Invitrogen, EUA) e água ultrapura estéril totalizando um volume final de 15 µL. Estas reações também foram incubadas a 37 °C, por 2 horas e a análise de restrição foi feita após migração dos produtos da digestão em gel de agarose 0,8 %, conforme descrito no item 3.8.3.

3.9.13 Sequenciamento de DNA e análises das sequências

Com a confirmação da presença do inserto de interesse, dois clones de pET-scFvLT e dois clones de pSMT3-scFvLT foram submetidos a sequenciamento para verificação de fase de leitura e presença de mutações. As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, com a utilização dos iniciadores T7 *forward* e *reverse*, sequenciador *ABI 3730 DNA Analyser*

(Applied Biosystems, EUA) e kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, conforme instruções do fabricante. As sequências obtidas foram manipuladas com auxílio dos *softwares* *BioEdit*, e em seguida alinhadas com auxílio do programa ClustalW2 (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). A tradução da sequência de DNA em proteína foi realizada com o auxílio do programa Genrunner®, enquanto os cálculos do ponto isoelétrico e de massa molecular foram calculados por meio da ferramenta *ProtParam*, presente no servidor *Expasy* (disponível em: <http://expasy.org/tools/protparam.html>).

3.10 Padronização da indução da expressão do anticorpo recombinante scFvLT

Duas abordagens metodológicas, utilizando-se dois vetores de expressão diferentes, foram adotadas para obtenção do anticorpo recombinante scFvLT. Para cada uma das abordagens foram realizadas padronizações para obtenção das melhores condições de expressão do anticorpo scFvLT.

3.10.1 Pré-análise da indução da expressão dos clones de pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT

Dos diversos clones obtidos a partir da ligação entre os vetores pET28a e pSMT3 com o inserto scFvLT, dois foram escolhidos aleatoriamente para os ensaios iniciais de indução de expressão. Colônias provenientes das transformações das células BL21(DE3) com os plasmídios recombinantes pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT foram utilizadas para ensaios de expressão do anticorpo recombinante. Três colônias provenientes de cada uma das transformações, conforme citado no item 3.8.7, foram crescidas em 3 mL de meio LB com 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen, EUA), a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, por 18 horas (C25 *Incubator Shaker* – *New Brunswick Scientific*). Uma diluição 1:100 dessas pré-culturas, em 10 mL de meio LB com antibiótico, foi mantida sob agitação de 200 rpm, a 37 °C, por aproximadamente 3 horas (C25 *Incubator Shaker* – *New Brunswick Scientific*). O crescimento celular foi monitorado através da leitura da absorbância a 600 nm (A_{600nm}) (Spectronic 20 – Genesys) até atingir o intervalo entre 0,6 e 0,8. Uma vez nesse intervalo, uma alíquota de 1 mL da cultura (controle não-induzido) foi retirada, sendo acrescentado IPTG (Isopropil β-D-1 Thiogalactopiranosídeo) (Sigma-Aldrich, EUA) em uma concentração final de 1 mM. A cultura foi mantida sob agitação por mais 3 horas, sendo um 1 mL da cultura (controle induzido) coletada ao final dessa incubação. Os volumes restantes das culturas celulares

foram centrifugados e os precipitados ressuspensos em 1 mL de PBS 10 mM (137 mM de cloreto de sódio, 10 mM de fosfato de sódio, 2,7 mM de cloreto de potássio, 2 mM de fosfato de potássio) para lise celular por sonicação. Após lise, a suspensão foi centrifugada e as frações solúveis e insolúveis do extrato celular separadas. Os ensaios de expressão do anticorpo recombinante foram analisados através de SDS-PAGE e *Immunoblotting*, conforme descrito nos itens 3.10.5 e 3.10.7.

3.10.2 Padronização da cepa de expressão

Após a escolha de um dos clones de pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT, este foi utilizado para transformar células *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS competentes por choque térmico, conforme citado no item 3.8.7. Três colônias provenientes de cada uma das transformações foram crescidas em 3 mL de meio LB com 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen, EUA) ou 50 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol, a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, por 18 horas (C25 *Incubator Shaker* – *New Brunswick Scientific*). Uma diluição 1:100 dessas pré-culturas, em 10 mL de meio LB com seus respectivos antibióticos, foi incubada conforme descrição no item 3.10.1, sendo os extratos totais dos controles não-induzidos e induzidos analisados por SDS-PAGE e *Immunoblotting* (itens 3.10.5 e 3.10.7), conforme indicado.

3.10.3 Padronização das condições de indução da expressão do anticorpo recombinante scFvLT em células BL21(DE3) transformadas com o plasmídio pSMT3-scFvLT

Para a otimização das condições de indução da expressão do anticorpo scFvLT, diferentes concentrações de IPTG e períodos de incubação foram testados, além das citadas no item 3.10.1. Para obtenção da pré-cultura, uma colônia resultante do crescimento de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídio pSMT3-scFvLT foi cultivada em tubo de polipropileno de 50 mL contendo 5 mL de meio LB com 50 µg/mL de canamicina, a 37 °C, 200 rpm até a A_{600nm} de 0,5. Uma vez atingida essa absorbância, as células foram armazenadas a 4 °C, por 18 horas, sendo centrifugadas a 4.500 x g, por 5 minutos a 4 °C (*Eppendorf 5804-R*) e ressuspensas em 5 mL de meio LB com canamicina. Uma diluição de 1:50 dessa pré-cultura foi utilizada para inocular 30 mL de meio LB contendo antibiótico em *erlenmeyer* de 50 mL, sendo mantida sob agitação de 200 rpm, a 37 °C até a A_{600nm} atingir o intervalo entre 0,6 – 0,8. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL do controle não-induzido foi

retirada antes da adição das diferentes concentrações de IPTG testadas: 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM. Outra alíquota de 1 mL foi retirada como controle induzido, após 3 horas, 6 horas e 18 horas de incubação a 20 °C, 200 rpm (GyromaxTM 737R - Amerex Instruments, Incorp., EUA), de cada uma das concentrações de IPTG utilizadas. Os extratos totais das alíquotas retiradas foram analisados por SDS-PAGE e *Immunoblotting* (itens 3.10.5 e 3.10.7).

3.10.4 Padronização do meio de cultura utilizado para indução da expressão do anticorpo recombinante scFvLT, em células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pSMT3-scFvLT

Além do meio LB, outro meio de cultura foi utilizado para avaliação do perfil de expressão do anticorpo recombinante scFvLT, em vetor de expressão pSMT3. Células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pSMT3-scFvLT foram cultivadas em 5 mL dos meios LB e 2YT contendo 50 µg/mL de canamicina, em tubos de polipropileno de 50 mL, a 37 °C, 200 rpm até a A_{600nm} de 0,5. Uma vez atingida essa absorbância, as células foram armazenadas a 4 °C, por 18 horas, sendo centrifugadas a 4.500 x g, por 5 minutos, a 4 °C (*Eppendorf 5804-R*) e ressuspensas em 5 mL de meio LB ou 2YT com canamicina. Uma diluição de 1:50 dessas pré-culturas foi utilizada para inocular 30 mL de meio LB ou 2YT contendo antibiótico, em *erlenmeyer* de 50 mL, sendo mantidos sob agitação de 200 rpm, a 37 °C até a A_{600nm} atingir o intervalo entre 0,6 – 0,8. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL do controle não-induzido foi retirada antes da adição de IPTG para uma concentração final de 0,5 mM, sendo mantidas sob agitação de 200 rpm, a 20 °C, por 6 horas. Após esse período de incubação, uma alíquota de 1 mL foi retirada como controle induzido. Os extratos totais das alíquotas coletadas foram analisados através de SDS-PAGE, conforme descrito no item 3.10.5.

3.10.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os ensaios de indução, como também as etapas de purificação da proteína recombinante foram analisadas através de SDS-PAGE em condições redutoras e desnaturantes, segundo protocolo descrito por Laemmli (1970). Alíquotas de 80 µL das etapas de lavagem e eluição, como também os precipitados dos controles não-induzidos e induzidos ressuspensos em 80 µL de água ultrapura, foram homogeneizados com tampão de amostra (60 mM de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto pH 6,8; 2% de dodecil sulfato de sódio;

10% de glicerol; 0,01% de azul de bromofenol; 5% de β -mercaptoetanol). Em seguida foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE na concentração de 12%. A eletroforese foi efetuada a 15 mA, por cerca de 2 h em Tampão Tris-Glicina (3% de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto, 1% de dodecil sulfato de sódio, 14% de glicina), juntamente com o padrão de massa molecular *Protein Mixture* (GE Healthcare, Reino Unido). Após eletroforese, os géis foram corados por *Coomassie Blue R-250* (BioRad, EUA) ou *Coomassie Blue Bio Safe* (BioRad, EUA), sob suave agitação, a temperatura ambiente por 1 hora e descorados com tampão descorante (30% de metanol, 7% de ácido acético e água ultrapura q.s.p.) ou água destilada, por 18 horas.

3.10.6 Western-blot

As proteínas separadas através de SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond-C Extra* (GE Healthcare, EUA), utilizando o aparato de transferência em sistema úmido (BioRad Laboratories, EUA), sob corrente elétrica constante de 150 mA, a 4 °C, por 18 horas em tampão de transferência (250 mM de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto, pH 8,3; 192 mM de glicina; 20% de metanol v/v), segundo Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Uma vez feita a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S (Sigma-Aldrich, EUA) para coloração do padrão molecular, sendo bloqueadas com solução 10% de leite desnatado (Nestlé, Brasil) em PBS 10 mM, por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação.

3.10.7 Immunoblotting

Após o bloqueio, a membrana foi submetida à imunodeteção empregando o anticorpo monoclonal IgG2a anti-His (GE Healthcare, EUA) diluído 1:3.000 em solução de leite desnatado 10%. Após incubação de 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação, a membrana foi lavada, por 3 vezes de 5 minutos cada, com PBS-Tween 20 a 0,05% (Synth). Uma vez lavada, a membrana foi incubada com IgG de cabra anti-camundongo conjugado a peroxidase (Zymed) diluído 1:1.000 em solução de leite desnatado 10%, por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Antes da revelação com uma solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (5 mg de DAB, 30 mL de PBS, 150 μ L de peróxido de hidrogênio), o ciclo de lavagem das membranas foi repetido. A revelação foi interrompida com a adição de água destilada.

3.11 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT obtido a partir da indução de células BL21(DE3) e BL21-C43 transformadas com o plasmídio pET-scFvLT

3.11.1 Indução da expressão do anticorpo recombinante scFvLT por IPTG, para purificação

Para purificação do anticorpo recombinante, cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas com plasmídios recombinantes pET-scFvLT foram cultivadas em 500 mL de meio LB com 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen, EUA) e induzidas de acordo com as condições descritas no item 10.1. Após indução, o volume total da cultura bacteriana foi centrifugado a 4.500 x g, por 15 minutos, a 4 °C (*Eppendorf 5804-R*), sendo o precipitado e o sobrenadante armazenados. O precipitado foi ressuspensionado em 30 mL de tampão PBS 10 mM ou tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de cloreto de sódio, 5 mM de imidazol, pH 7,4), sendo a suspensão bacteriana lisada por pressão de 2.000 psi utilizando *French Pressure* (Thermo Scientific, EUA) e centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos, a 20 °C (*Eppendorf 5804-R*). As frações solúveis e insolúveis do extrato bacteriano foram separadas e armazenadas a -20 °C até o momento da purificação.

3.11.2 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT a partir da fração insolúvel de células *E. coli* BL21(DE3) induzidas

A fração insolúvel da suspensão bacteriana obtida após centrifugação foi ressuspensionada em 50 mL de solução 8 M de ureia em PBS 10 mM, sendo mantida sob agitação por 18 horas, a temperatura ambiente (Agitador Kline – Nova Ética). Após solubilização, o volume de 50 mL da solução 8 M de ureia foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos, a 20 °C (*Eppendorf 5804-R*), sendo o sobrenadante armazenado e o precipitado descartado. Para o renovelamento da proteína, o volume do sobrenadante foi gotejado em 2 L de solução 5 mM de imidazol em PBS 10 mM, pH 8, com o auxílio da bomba peristáltica e suave agitação em agitador magnético (Corning, EUA). Este volume foi então passado em 5 mL de resina *Ni Sepharose High Performance* (GE Healthcare, EUA) empacotada em coluna C10/10 (GE Healthcare, EUA), por 18 horas com fluxo constante de 1,5 mL/minuto. Para as lavagens foram utilizados tampões com diferentes concentrações de imidazol: 5 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM e 100 mM em 50 mL de PBS 10 mM, pH 8, sendo coletados os primeiros 10 mL de cada lavagem. A eluição foi realizada com 50 mL de solução de Imidazol 500 mM em PBS 10 mM, pH 8,

com a coleta de 20 alíquotas de 1,5 mL cada. Todos os processos de lavagem e eluição foram monitorados com reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, EUA), sendo analisados por SDS-PAGE e *Immunoblotting*, conforme descritos nos itens 3.10.5 e 3.10.7, respectivamente. As frações da eluição que continham a proteína recombinante foram dialisadas contra tampão PBS 10 mM, com três trocas de tampão em um período de 36 horas. Após diálise, a proteína recombinante foi concentrada em Polietilenoglicol 6000, por 5 horas, a 4 °C e sua concentração determinada com o kit *Micro BCAProtein Assay* (Pierce, EUA), conforme recomendações do fabricante.

3.11.3 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT a partir da fração solúvel de células *E. coli* BL21(DE3) induzidas

A fração solúvel obtida após lise da suspensão bacteriana foi filtrada em membrana de 0,45 µm (Millipore, EUA) e incubada com 5 mL de resina de *Ni Sepharose High Performance* (GE Healthcare, EUA), por 18 horas, a 4 °C, sob suave agitação. Após incubação, a resina foi empacotada em coluna C10/10 (GE Healthcare, EUA), sendo os processos de lavagens e eluição realizados conforme descritos no item 11.2. Após purificação, as frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE e *Immunoblotting*, conforme descritos nos itens 3.10.5 e 3.10.7, respectivamente, sendo sua concentração determinada com o kit *Micro BCAProtein Assay* (Pierce, EUA), conforme recomendações do fabricante.

3.11.4 Purificação da proteína recombinante em condições desnaturantes, a partir de corpúsculos de inclusão de células BL21-C43 induzidas

A purificação do anticorpo recombinante também foi realizada após a indução de células *Escherichia coli* BL21-C43 transformadas com o plasmídio recombinante pET-scFvLT, conforme as condições descritas no item 8.7. Uma vez induzida, a cultura bacteriana foi centrifugada a 4.500 x g por 15 minutos, a 4 °C (*Eppendorf 5804-R*), sendo o precipitado armazenado a -20 °C. Este precipitado foi ressuscitado em 30 mL de tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio e 5 mM de imidazol, pH 7,4), lisado por pressão de 2.000 psi, utilizando *French Pressure* (Thermo Scientific, EUA) e centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos, a 20 °C (*Eppendorf 5804-R*). Para o isolamento dos corpúsculos de inclusão, a fração insolúvel foi ressuscitada em 20 mL de tampão de lise acrescidos de 10% de Triton X-100, sendo incubada por 10 minutos no gelo e centrifugada por 15 minutos a

15.000 x g, 4 °C (*Eppendorf 5804-R*). Este processo foi repetido novamente com tampão de lise acrescido de 1% de Triton X-100 e, após centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de lise e centrifugado novamente a 15.000 x g, 4 °C, por 15 minutos. Os corpúsculos de inclusão foram, então, solubilizados com 20 mL de tampão de solubilização (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio e 5 mM de imidazol, 8 M de ureia, pH 7,4), sob agitação, a 4 °C por 18 horas e centrifugados a 12.000 x g, por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e submetido à purificação.

A purificação em coluna de afinidade a Ni²⁺ foi realizada utilizando a coluna pré-empacotada *HisTrapTM HP* 5mL (GE Healthcare, EUA), após seu equilíbrio com 25 mL de tampão de solubilização. O sobrenadante dos corpúsculos de inclusão solubilizados foi aplicado na coluna utilizando-se uma bomba peristáltica. Para a retirada das proteínas contaminantes, a coluna foi lavada com 25 mL de tampão de solubilização (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 5 mM de imidazol; 8 M de ureia; pH 7,4), seguida da lavagem com 50 mL de tampão de lavagem (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 30 mM de imidazol; 8 M de ureia; pH 7,4). A eluição foi realizada com 35 mL de tampão de eluição (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 500 mM de imidazol; 8 M de ureia; pH 7,4). Todas as etapas da purificação foram realizadas com fluxo constante de 1 mL/minuto e monitoradas com o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, EUA), sendo analisadas por SDS-PAGE e *Immunoblotting*, conforme descritos nos itens 3.10.5 e 3.10.7, respectivamente. A concentração da proteína recombinante eluída foi determinada através do kit *Micro BCA Protein Assay* (Pierce, EUA), conforme recomendações do fabricante.

3.11.5 Renaturação do anticorpo recombinante scFvLT

Após purificação, o processo de renaturação do anticorpo recombinante foi realizado através da retirada gradual do agente desnaturante, utilizando o método de diálise, segundo Tsumoto et al. (1998), com modificações. Em um volume final de 20 mL, o anticorpo recombinante foi diluído nas seguintes concentrações: 3,76 µg/mL; 4,7 µg/mL; 18,8 µg/mL; 37,6 µg/mL; 94 µg/mL e 188 µg/mL. Após a diluição, o anticorpo recombinante foi submetido à redução das pontes de dissulfeto, através da adição de 10 mM de 2-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EUA), sendo mantida a temperatura ambiente, sob suave agitação por 1 hora. As diluições foram, então, transferidas para membranas de diálise *Spectra/Por* (Spectrum Laboratories, Inc., EUA) com *cut-off* de 14 kDa e dialisadas em

tampão de renaturação (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 8 M de ureia; pH 7,4), para retirada do agente redutor, por 18 horas, a 4 °C com suave agitação. Posteriormente, sucessivas diálises foram realizadas em tampão de renaturação com concentrações decrescentes de 6 M, 4 M, 2 M, 1 M e 0,5 M de ureia, por 12 horas a 4 °C com suave agitação. Ao tampão de renaturação contendo 1 M e 0,5 M de ureia foram adicionados 400 mM de L-arginina (Sigma-Aldrich,EUA) e 375 µM de glutathione oxidada (USB, EUA). A diálise final foi realizada em tampão de renaturação sem ureia, por 18 horas a 4 °C com suave agitação. Após a última diálise, as diluições do anticorpo recombinante foram concentradas em Polietilenoglicol 6000, por 5 horas, a 4 °C e suas concentrações protéicas determinadas com o kit *Micro BCAProtein Assay* (Pierce, EUA), conforme recomendações do fabricante.

3.12 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT por cromatografia de afinidade a Níquel, obtido a partir da indução de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pSMT3-scFvLT

3.12.1 Indução da expressão do anticorpo recombinante scFvLT por IPTG, para purificação

O anticorpo recombinante scFvLT foi purificado após a indução da expressão de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo recombinante pSMT3-scFvLT. As células cultivadas em 500 mL de meio LB com 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen, EUA) foram induzidas, de acordo com as condições descritas no item 10.1. Já as células cultivadas em meio 2YT com antibiótico foram induzidas com 0,5 mM de IPTG, por 6 horas a 20 °C, 200 rpm. Após indução, o volume total da cultura bacteriana foi centrifugado a 4.500 x g, por 15 minutos, a 4 °C (*Eppendorf 5804-R*), sendo o precipitado ressuspensionado em 30 mL de tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de cloreto de sódio, 5 mM de imidazol, pH 7,4). Esta suspensão bacteriana foi lisada por pressão de 2.000 psi utilizando *French Pressure* (Thermo Scientific, EUA) e centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos, a 20 °C (*Eppendorf 5804-R*). As frações solúveis e insolúveis do extrato bacteriano foram separadas e armazenadas a -20 °C até o momento da purificação.

3.12.2 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT pelo sistema *Batch*

A purificação do anticorpo recombinante scFvLT foi realizada após indução da expressão em células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pSMT3-scFvLT, conforme descrito no item 8.7, por *Batch*. Um volume de 0,5 mL de resina *Ni Sepharose High Performance* (GE Healthcare, EUA) foi incubada com 5 mL de tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; pH 7,4), por 3 vezes de 10 minutos cada, para equilíbrio do pH. Após lavagem, a resina foi incubada com 30 mL da fração solúvel do extrato bacteriano, sendo lavada sucessivamente com 5 mL de tampão de lise, contendo diferentes concentrações de imidazol: 20 mM, 40 mM e 60 mM, por 10 minutos cada, para eliminação das proteínas contaminantes. A eluição do anticorpo recombinante foi realizada com 2 mL de tampão de eluição (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 500 mM de imidazol; pH 7,4), incubando-o com a resina por 1 hora. Todas as etapas de incubação foram realizadas em tubo de polipropileno de 50 mL, sob agitação suave, a 4 °C, tendo suas frações coletadas após centrifugação a 700 x g, a 4 °C por 4 minutos em centrífuga *Eppendorf 5804-R*. O processo de purificação foi analisado através de SDS-PAGE e *Immunoblotting*, conforme descrito nos itens 3.10.5 e 3.10.7, respectivamente.

3.12.3 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT em coluna pré-empacotada de *Ni-Sepharose*

O anticorpo recombinante scFvLT também foi purificado com a utilização da coluna pré-empacotada *HisTrapTM HP* 5mL (GE Healthcare, EUA), após o equilíbrio do seu pH com 25 mL de tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 5 mM de imidazol, pH 7,4). Em seguida, a fração solúvel foi aplicada à coluna com a ajuda de uma bomba peristáltica, com fluxo constante de 1 mL/min. As proteínas contaminantes foram retiradas com duas lavagens utilizando-se 25 mL de tampão de lise e 50 mL de tampão de lavagem (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 30 mM de imidazol; pH 7,4), sendo coletados os primeiros 10 mL de cada lavagem. A eluição do anticorpo recombinante foi realizada com 20 mL de tampão de eluição (20 mM de fosfato de sódio; 500 mM de cloreto de sódio; 500 mM de imidazol; pH 7,4) fracionados em alíquotas de 1 mL cada. Todo o processo de purificação foi monitorado com o reagente de Bradford e analisados por SDS-PAGE e *Immunoblotting*, conforme descritos nos itens 3.10.5 e 3.10.7, respectivamente.

3.13 Análise da atividade biológica do anticorpo recombinante scFvLT

A atividade biológica do anticorpo recombinante foi analisada através de testes imunoenzimáticos, como ELISA (ENGVALL; PERLMANN, 1971), *immunodot*, *immunoblotting* e imunofluorescência indireta, além da neutralização da atividade da toxina purificada LT, em células Y1.

3.13.1 Teste de ELISA indireto para detecção da atividade biológica do anticorpo recombinante scFvLT

O teste de ELISA indireto foi realizado para testar a capacidade do anticorpo recombinante scFvLT em reconhecer a toxina LT. Placas de poliestireno Maxisorp (Nunc, EUA) foram sensibilizadas, em câmara úmida, a 4 °C, por 18 horas utilizando-se 2 µg/mL da toxina LT purificada em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, sobrenadante de cultura da cepa H10407 de ETEC ou tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, em volumes de 100 µL/poço. A sensibilização foi realizada em duplicata para cada um dos antígenos utilizados. Após sensibilização, as placas foram lavadas com 200 µL/poço de PBS-Tween 0,05% por 5 vezes, sendo bloqueadas com 200 µL/poço de solução de bloqueio preparada com 5% de leite desnatado em pó em 10 mM de PBS pH 7,2, por 30 minutos a 37 °C. As lavagens com PBS-Tween 0,05% foram repetidas antes da adição da diluição seriada 1:2, em solução de bloqueio, do anticorpo recombinante partindo-se de 200 µg/mL até 1,56 µg/mL. Além das diluições do anticorpo recombinante, também foram utilizados 240 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-LT. Ambos os anticorpos foram incubados a 37 °C, por 1 hora, sendo o excesso removido com cinco lavagens sucessivas com 200 µL/poço de PBS-Tween 0,05%. Em seguida, o anticorpo monoclonal IgG2a anti-His (GE Healthcare, EUA) diluído 1:6.000 em solução de bloqueio foi utilizado, incubando-o por 30 minutos a 37 °C. O anticorpo IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado em uma diluição 1:2.000 em solução de bloqueio, após lavagem da placa com 200 µL/poço de PBS-Tween 0,05% por 5 vezes. Este anticorpo também foi incubado por 30 minutos a 37 °C. Após lavagem da placa com 200 µL/poço de PBS-Tween 0,05% por 5 vezes, o teste foi revelado 100 µL da solução cromógena contendo 0,5 mg/mL de *o*-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão citrato-fosfato pH 5, na presença de 0,01% de H₂O₂ (Merck). Após 15 minutos de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de 1 N de HCl, e a leitura da absorbância realizada em leitor de ELISA Multiskan EX

(Labsystems, EUA) a $A_{492 \text{ nm}}$. A absorbância obtida utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-LT contra a toxina LT foi considerada como controle positivo da reação, enquanto a absorbância obtida utilizando-se a menor diluição do anticorpo recombinante contra o tampão carbonato/bicarbonato foi considerada como o branco da reação. As absorbâncias foram analisadas pelo *GraphPad Prism 5.0*[®].

3.13.2 Teste de ELISA de captura para detecção da atividade biológica do anticorpo recombinante scFvLT

A atividade de reconhecimento do anticorpo recombinante scFvLT também foi testada através do teste de ELISA de captura. Placas de poliestireno Maxisorp (Nunc, EUA) foram sensibilizadas, em câmara úmida, a 4 °C, por 18 horas com 100 µL/poço contendo 30 µg/mL da fração enriquecida em IgG de coelho anti-LT, em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6. Após sensibilização, as placas foram lavadas com 200 µL/poço de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) por 5 vezes, sendo bloqueadas com 200 µL/poço de solução de bloqueio preparada com 5% de leite desnatado em pó em 0,01 M de PBS pH 7,2, por 30 minutos a 37 °C. As lavagens com PBS-T 20 foram realizadas por cinco vezes antes da adição de 2 µg/mL da toxina LT purificada, em 100 µL/poço de solução de bloqueio ou 100 µL/poço de sobrenadante de cultura da cepa H10407 de ETEC, em duplicatas, incubando-os por 1 hora, a 37 °C. O excesso de antígeno foi removido com 5 lavagens sucessivas utilizando 200 µL/poço de PBS-T. Uma concentração de 18,5 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-LT, como também as mesmas concentrações da diluição seriada 1:2 do anticorpo recombinante, utilizadas no ELISA indireto, foram empregadas na detecção dos antígenos com incubação de 1 hora a 37 °C. As etapas seguintes até a revelação do ensaio foram realizadas conforme descrito no item 13.1. A absorbância obtida utilizando-se a menor diluição do anticorpo recombinante contra a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT foi considerada como branco da reação, sendo as absorbâncias obtidas analisadas pelo *GraphPad Prism 5.0*[®].

3.13.3 Reconhecimento da toxina LT pelo anticorpo scFvLT através de *Immunodot*

A interação entre o anticorpo recombinante scFvLT e a toxina LT foi detectada através da técnica de *Immunodot*. Utilizando-se o aparato *Hybri Dot Manifold* (Life Technologies, Inc., EUA), membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas, em duplicatas, com volumes de

100 µL contendo 10 µg/mL da toxina LT purificada, 10 µg/mL da proteína recombinante EspB, sobrenadante de cultura da cepa H10407 ou PBS. A proteína recombinante EspB e o PBS foram utilizados como controles positivo e negativo da reação, respectivamente. Após sensibilização, as membranas foram bloqueadas com 1 mL de solução de bloqueio preparada com 5% de leite desnatado em PBS, por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Uma vez bloqueadas, as membranas foram incubadas com 50 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-LT, como também com diferentes concentrações do anticorpo recombinante scFvLT, obtidas a partir de diluições seriadas 1:2 partindo-se de 200 µg/mL até 3,125 µg/mL, por 18 horas, a 4 °C, sob agitação. Após a retirada do excesso de anticorpos com a lavagem das membranas por três vezes de cinco minutos cada, a imunodeteção da interação foi realizada conforme descrito no item 10.7.

3.13.4 Reconhecimento das subunidades da toxina LT pelo anticorpo recombinante scFvLT através de *Immunoblotting*

Com o intuito de se conhecer qual das subunidades da toxina LT é reconhecida pelo anticorpo recombinante, 100 µg/mL da toxina LT foi reduzida e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 15%, seguida de *Western Blotting*, conforme descritos nos itens 3.10.5 e 3.10.6, respectivamente. Após eletrotransferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com solução de bloqueio preparada com 5% de leite desnatado em PBS, por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram, então, incubadas por 18 horas, a 4 °C, sob agitação com as mesmas concentrações do anticorpo recombinante utilizadas na técnica de *Immunodot*, como também com 50 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-LT e com 20 µg/mL da fração enriquecida em IgG de coelho anti-LT. Após incubação, a detecção e revelação da interação antígeno-anticorpo entre os anticorpos utilizados e a toxina LT foram realizadas conforme descrita no item 3.10.7, com exceção da interação utilizando a fração enriquecida em IgG de coelho, que foi detectada com IgG de cabra anti-coelho conjugado a peroxidase (Zymed) diluído 1:5.000 em solução de bloqueio.

3.13.5 Detecção da toxina LT em células Y1, por imunofluorescência indireta, utilizando o anticorpo recombinante scFvLT

Além de serem utilizadas no teste de neutralização da toxina LT, as células Y1 também foram empregadas na detecção da toxina LT, através do ensaio de imunofluorescência indireta (DORSEY; FISCHER; FLECKESTEIN, 2006), utilizando o anticorpo recombinante scFvLT. Para este ensaio células Y1, cultivadas conforme descrito no item 4.2, foram tripsinizadas e distribuídas sobre lamínulas de vidro estéreis com 13 mm de diâmetro, presentes em placas para cultura celular de 24 poços, na concentração de 2×10^5 células/poço.

Após 18 horas de incubação, um volume de 1 mL/poço contendo 2,5 µg/mL da toxina LT em DMEM - 2% SFB foi adicionado às células, sendo incubadas a 37 °C, com 5% de CO₂ atmosférico, por 7 horas. As células foram, então, lavadas 4 vezes com meio DMEM - 2% SFB, com o auxílio de uma bomba a vácuo e examinadas ao microscópio óptico invertido Axiovert 25 (Zeiss, França), para verificação das alterações morfológicas. Para a fixação das células foram utilizados 1 mL/poço de 4% de paraformaldeído em PBS 10 mM, sendo incubadas a 4 °C, por 18 horas. Após fixação, as células foram lavadas com 1% de glicina em PBS 10 mM por 3 vezes, utilizando a bomba a vácuo, e bloqueadas com um volume de 1 mL/poço de solução de bloqueio preparada com 1% de BSA em PBS 10 mM, a temperatura ambiente por 1 hora. Após a retirada das lamínulas da placa de cultura celular, estas foram dispostas em uma placa de cera e incubadas com 50 µL/lamínulas com as seguintes concentrações dos anticorpos: 100 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-LT, 100 µg/mL da fração enriquecida em IgG o soro de coelho anti-LT e 100 µg/mL de scFvLT. Todos os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio e a incubação foi realizada em câmara úmida, a temperatura ambiente por 1 hora. As lamínulas foram recolocadas na placa de cultura celular e o excesso dos anticorpos retirado com 3 lavagens sucessivas utilizando PBS 10 mM e o auxílio da bomba a vácuo.

Após lavagens, as lamínulas incubadas com o anticorpo scFvLT foram previamente incubadas com anticorpo monoclonal IgG2a anti-His (GE Healthcare, EUA) diluído 1:2.000 em solução de bloqueio, por 1 hora a temperatura ambiente. Após incubação, as lavagens com PBS 10 mM foram repetidas e as lamínulas retiradas novamente da placa de cultura celular, para a incubação com uma diluição de 1:200 em solução de bloqueio, do anticorpo IgG de cabra anti-camundongo ou anticorpo IgG de cabra anti-coelho conjugados a FITC (Sigma Aldrich, EUA), por 1 hora em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente. As lamínulas

foram colocadas novamente na placa de cultura celular, coberta com papel alumínio, para mantê-las ao abrigo da luz e lavadas 3 vezes com PBS 10 mM, sendo mantidas nessa solução até a montagem das lâminas. As lamínulas foram montadas com 10 µL de Mowiol (Sigma Aldrich, EUA) em lâminas para microscopia, sendo vedadas com esmalte e acondicionadas em -20 °C até o momento da leitura. Como controle negativo, todas as etapas de incubação com os anticorpos e conjugados foram realizadas, com exceção da adição da toxina LT. A leitura das lâminas foi realizada em Microscópio de Fluorescência Axioskop (Zeiss, Alemanha), com aumento de 40X.

3.13.6 Ensaio de neutralização do efeito citopático da toxina LT, utilizando o anticorpo recombinante scFvLT, em células Y1

A capacidade neutralizante do anticorpo recombinante scFvLT foi testada através do teste de neutralização da toxina LT. Células Y1, cultivadas conforme descrito no item 4.2, foram utilizadas no preparo de uma placa de 96 poços na concentração de 5×10^4 células/poço. As células foram incubadas durante 18 horas a 37 °C, com 5% de CO₂ atmosférico. Para a neutralização da toxina LT, diluições seriadas 1:2 em meio DMEM-SFB 10%, partindo-se de 200 µg/mL até 1,56 µg/mL do anticorpo recombinante scFvLT, do anticorpo monoclonal anti-LT e da fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT foram pré-incubados com 2,5 µg/mL da toxina LT purificada em um volume final de 100 µL, por 2 horas a temperatura ambiente, sendo posteriormente, adicionados às células Y1 em duplicatas. Uma concentração de 2,5 µg/mL da toxina LT purificada foi utilizada como controle positivo do efeito citopático, enquanto a célula Y1, na ausência da toxina LT ou na presença do tampão de diálise diluído 1:8, foi considerada como controle negativo. A leitura do teste foi realizada após 6 horas de incubação, a 37 °C, com 5% de CO₂ atmosférico, em microscópio invertido Axiovert 25 (Zeiss, França) com objetiva de aumento de 10X. As fotos foram tiradas com máquina digital Nikon, utilizando-se adaptador para microscópio óptico invertido.

4 RESULTADOS

4.1 Construção do inserto scFvLT, a partir das sequências codificadoras das regiões variáveis das cadeias leve e pesada de anticorpos monoclonais anti-LT

A clonagem da fração variável das cadeias leve e pesada de anticorpos monoclonais anti-LT foi iniciada com a extração do RNA total de hibridomas produtores de anticorpos anti-LT. Na Figura 9 podemos verificar a integridade do RNA total extraído, após eletroforese em gel de agarose, através da definição das bandas referentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S.

Figura 9 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% da extração do RNA total de hibridomas anti-LT.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado com transiluminador com luz ultravioleta. As setas indicam as bandas referentes aos RNAs ribossômicos 18S e 28S.

FONTE: OZAKI, 2011.

Uma vez obtido, o RNA total foi reversamente transcrito, servindo como DNA molde para amplificação da fração variável das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal anti-LT. A amplificação dessas cadeias originou fragmentos com, aproximadamente, 320 pb para cadeia leve (Canaleta 1) e 350 pb para cadeia pesada (Canaleta 2), como podemos observar na Figura 10.

Figura 10 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% da amplificação dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal anti-LT.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: PM - Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder, 1 - Cadeia leve anti-LT, 2 - Cadeia pesada anti-LT.

FONTE: OZAKI, 2011.

Uma vez amplificados, esses fragmentos foram clonados em vetor de clonagem pGEM-T Easy, originando os plasmídios pCL e pCP. Como podemos verificar na Tabela 3, o plasmídio recombinante pCL possui tamanho aproximado de 3335 pb, enquanto o plasmídio pCP possui, aproximadamente, 3365 pb.

Tabela 3 - Nomenclatura dos plasmídios obtidos com a clonagem dos insertos em vetor pGEM-T e seus respectivos tamanhos.

Plasmídio	Inserto clonado	Tamanho
pCL	Cadeia Leve	3335 pb
pCP	Cadeia pesada	3365 pb

Antes de serem submetidos a sequenciamento, os plasmídios pCL e pCP foram analisados através de análise de restrição com a enzima EcoRI, para verificar se os insertos clonados correspondiam aos de interesse. Após eletroforese da reação de digestão, podemos observar na Figura 11 (Canaletas 2 e 4) a presença de quatro bandas: duas referentes a liberação dos fragmentos clonados, apresentando tamanhos aproximados de 320 pb (Canaleta 2) e 350 pb (Canaleta 4), e outras duas referentes aos plasmídios pGEM-T, com 3015 pb.

Figura 11 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% após a digestão dos clones pCYL, pCYP com a enzima EcoRI.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** - Padrão molecular 1Kb Plus DNA Ladder, **1** - pCL não digerido, **2** - pCL digerido, **3** - pCP não digerido, **4** - pCP digerido.

FONTE: OZAKI, 2011.

Com a confirmação da presença dos insertos correspondentes às regiões variáveis das cadeias leve e pesada nos plasmídios recombinantes pCL e pCP, estes foram sequenciados para determinação das sequências codificadoras, além dos seus respectivos tamanhos. As sequências obtidas foram comparadas às sequências depositadas no banco de dados GenBank, com o auxílio do programa BLASTn. O fragmento correspondente à região variável da cadeia leve apresentou 324 pb, sendo encontradas identidades que variavam entre 88% a 96% com 103 sequências depositadas. Essas sequências correspondiam às regiões variáveis de cadeias

leves de imunoglobulinas de camundongos (*Mus musculus*), obtidas contra diferentes antígenos. Já o fragmento referente à região variável da cadeia pesada apresentou 354 pb, com identidades variando entre 84% a 95% com 108 sequências depositadas. As identidades foram encontradas com sequências que codificam a região variável da cadeia pesada de imunoglobulinas produzidas por camundongos.

Após a identificação das sequências de nucleotídeos correspondentes à região variável das cadeias leve (V_L) e pesada (V_H), estas foram unidas por uma sequência de DNA com 45 pb que codifica o *linker* (Gly₄Ser)₃, na orientação V_H -*Linker*- V_L , originando a região codificante do anticorpo recombinante scFvLT, com 723 pb. Na Tabela 4, podemos observar as sequências de nucleotídeos referentes às regiões variáveis das cadeias leve e pesada da imunoglobulina anti-LT, como também a sequência completa do anticorpo recombinante scFvLT.

Tabela 4 – Sequências de nucleotídeos correspondentes às regiões variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal anti-LT e do fragmento scFvLT.

Cadeia Leve (324 pb)	GACATTGTGCTAACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGT CAGTCTTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAAGTGTTAGAAGCAACCTACACTGGTATCAAC AAAAATCACATGAGTCTCCGAGGCTTCTCATCAAGTTTGCTTCCCAGTCCATATCT GGGATCCCCTCCAAGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACGGATTTCACTCTCAGTAT CAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGAATGTATTTCTGTCAACAGAGTGACAGCT GGCCTCAGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
Cadeia Pesada (354 pb)	GTGAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCTCAGAGCCTGTCCAT CACATGCACTGTCTCTGAATTCTCATTAATCAGCTATGCTATAAGCTGGGTTCGCC AGTCACCAGGAAAGGATCTACAATGGCTTGGAATAATATGGACTGGTGGAGGCACA AATTATAATTCAGTCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAG TCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCAGGTACTACT GTGTCAGAATGGATGGTTACTACTTTCGGTAGTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACC ACGGTCACCGTCTCCTCA
scFvLT (723 pb)	GACATTGTGCTAACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGT CAGTCTTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAAGTGTTAGAAGCAACCTACACTGGTATCAAC AAAAATCACATGAGTCTCCGAGGCTTCTCATCAAGTTTGCTTCCCAGTCCATATCT GGGATCCCCTCCAAGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACGGATTTCACTCTCAGTAT CAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGAATGTATTTCTGTCAACAGAGTGACAGCT GGCCTCAGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGGCGGTGGTGGT AGCGGTGGCGGCGGTAGCGGTGGTGGTGGCAGCGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGACC TGGCCTGGTGGCGCCCTCTCAGAGCCTGTCCATCACATGCACTGTCTCTGAATTCT CATTAATCAGCTATGCTATAAGCTGGGTTCGCCAGTCACCAGGAAAGGATCTACAA TGGCTTGGAATAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTATAATTCAGTCTCAAATC CAGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAAATGAACA GTCTGCAAACCTGATGACACAGCCAGGTACTACTGTGTCAGAATGGATGGTTACTAC TTCGGTAGTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Uma vez que a sequência de nucleotídeos que codifica o scFvLT era derivada de organismo eucarioto e a sua expressão seria realizada em organismo procarioto, esta sequência foi analisada para verificação da ocorrência de códons que poderiam ser considerados raros quando comparados ao *codon usage* de *Escherichia coli*. A partir dessa análise, 14 códons foram identificados como raros, dos quais 6 codificavam o aminoácido Arginina, 4 codificavam o aminoácido Leucina, 2 codificavam o aminoácido Isoleucina e outros 2 codificavam o aminoácidos Prolina.

Após a análise da sequência codificadora do fragmento scFvLT, esta foi otimizada para o *codon usage* de *E. coli*, através da síntese de um gene sintético pela empresa de biotecnologia GENEART (Regensburg/Bavária, Alemanha), sendo inserido em um plasmídeo que apresenta resistência a ampicilina. A Figura 12 ilustra a inserção do gene sintético scFvLT no plasmídeo pMA, enquanto a sequência de nucleotídeos do gene sintético scFvLT pode ser observada na Tabela 5. As sequências das regiões variáveis das cadeias pesada e leve, como também do *linker* foram diferenciadas através da utilização de cores distintas no sublinhamento. A sequência da região variável da cadeia pesada apresenta-se sublinhada com a cor vermelha, enquanto as sequências do *linker* e da região variável da cadeia leve apresentam-se sublinhadas com a cor preta e verde, respectivamente.

Figura 12 – Representação do gene sintético scFvLT inserido no plasmídeo pMA.

FONTE: GENEART, 2009.

Tabela 5 – Sequência de nucleotídeos do gene sintético scFvLT inserido no plasmídio pMA.

Sequência de nucleotídeos do gene sintético scFvLT (723 pb)	<u>GTGAAACTGCAGGAAAGCGGTCCGGGTCTGGTTGCGCCGAGCCAGAGCCTGAGC</u> <u>ATTACCTGCACCGTGAGCGAATTTAGCCTGATTAGCTATGCGATTAGCTGGGTG</u> <u>CGTCAGAGCCCGGGCAAAGATCTGCAGTGGCTGGGCATTATTTGGACCGGCGGT</u> <u>GGCACCAACTATAACAGCGCCCTGAAAAGCCGTCTGAGCATTAGCAAAGATAAC</u> <u>AGCAAAAGCCAGGTGTTTCTGAAAATGAACAGCCTGCAGACCGATGATACCGCG</u> <u>CGTTATTATTGCGTGCGTATGGATGGCTATTATTTTCGGCAGCATGGATTATTGG</u> <u>GGCCAGGGTACGACGGTTACCGTGAGCAGCGGCGGTGGTGGTAGCGGTGGCGGC</u> <u>GGTAGCGGTGGTGGTGGCAGCGATATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCTG</u> <u>AGCGTTACCCCGGGTGATAGCGTGAGCCTGAGCTGCCGTGCGAGCCAGAGCGTG</u> <u>CGTAGCAACCTGCATTGGTATCAGCAGAAAAGCCATGAAAGCCCGCTCTGCTG</u> <u>ATTAAATTGCAAGCCAGTCTATTAGCGGCATTCCGAGCAAATTTAGCGGCAGC</u> <u>GGTAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAACCGAAGATTTT</u> <u>GGCATGTATTTTGGCCAGCAGAGCGATAGCTGGCCGAGCTGACCTTTGGTGCG</u> <u>GGCACCAAACTGGAAGTGAAG</u>
---	---

— Sequência da cadeia pesada;
 — Sequência do *Linker*;
 — Sequência da cadeia leve

4.2 Construção dos plasmídios recombinantes pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT

Para que o gene sintético scFvLT fosse clonado nos vetores pET28a e pSMT3 foi necessária a sua amplificação, utilizando iniciadores com sítios de restrição compatíveis com seus sítios múltiplos de clonagem. Os iniciadores foram desenhados com os sítios de restrição BamHI e XhoI, sendo utilizados para a amplificação do fragmento scFvLT através de PCR, utilizando o gene sintético scFvLT como molde de DNA. Na Figura 13 podemos observar o fragmento scFvLT amplificado, apresentando 720 pb, aproximadamente (Canaleta 2).

Figura 13 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% da amplificação do fragmento scFvLT.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** - Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder, **1** – Água ultrapura estéril (Controle negativo), **2** - Fragmento scFvLT amplificado.

FONTE: OZAKI, 2011.

Após amplificação, nas extremidades do novo fragmento scFvLT foram adicionadas adeninas terminais, para clonagem em vetor de clonagem pGEM-T Easy. Das colônias obtidas após o plaqueamento da transformação de células *E. coli* JM109 competentes, seis colônias brancas e uma colônia azul foram selecionadas para pesquisa do fragmento de interesse, por análise de restrição e reação em cadeia da polimerase (PCR). Na Figura 14, podemos observar a presença de *amplicons* com tamanhos esperados de 723 pb tanto no controle positivo (Canaleta 1), quanto nos clones testados (Canaletas 2 a 7), como também a ausência do fragmento amplificado no controle negativo (Canaleta 8).

Figura 14 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,9% da amplificação do inserto scFvLT para confirmação dos clones pGEMT-scFvLT.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** - Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder, **1** – Plasmídeo pMA contendo o gene sintético scFvLT (Controle positivo), **2 a 7** - Clones 1 a 6, **8** – Água utrapura estéril (Controle negativo).

FONTE: OZAKI, 2011.

Para confirmar o resultado obtido através da reação em cadeia da polimerase, as colônias brancas e a colônia azul foram submetidas à extração plasmidial, sendo posteriormente submetidos à análise de restrição com as enzimas BamHI e XhoI. A Figura 15 ilustra a eletroforese realizada após as reações de digestão, na qual podemos observar a presença de duas bandas (Canaletas 2 a 7) referentes ao fragmento scFvLT liberado (723 pb) e ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (3015 pb), respectivamente, enquanto na Canaleta 1 podemos observar a ausência do fragmento liberado.

Figura 15 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,9% a digestão dos clones pGEM-scFvLT com as enzimas BamHI e XhoI.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Canaletas: **PM** - Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder, **1** – vetor pGEM-T vazio, **2 a 7** - Clones 1 a 6 digeridos. As setas indicam as bandas correspondentes ao vetor pGEM-T e ao inserto scFvLT liberado.

FONTE: OZAKI, 2011.

Dos seis clones positivos para o inserto, dois foram escolhidos aleatoriamente para digestão dos fragmentos e posterior clonagem em vetores de expressão pET28a e pSMT3. A ligação entre os fragmentos digeridos e os vetores de expressão originaram os plasmídios recombinantes denominados pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT com 6092 pb e 6356 pb, respectivamente. Na Figura 16 e 17, podemos observar o esquema representativo dos plasmídios pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT, após a ligação do inserto scFvLT aos vetores.

Figura 16 – Esquema representativo do plasmídio recombinante pET-scFvLT.

FONTE: OZAKI, 2011.

Figura 17 – Esquema representativo do plasmídio recombinante pSMT3-scFvLT.

FONTE: OZAKI, 2011.

Dos inúmeros clones obtidos através das transformações de células *E. coli* JM109 competentes com as reações de ligação, quatro clones de pET-scFvLT e cinco de pSMT3-scFvLT foram escolhidos aleatoriamente, sendo testados por PCR para verificação da presença do inserto de interesse. Na Figura 18, podemos observar a amplificação de um fragmento com 723 pb correspondente ao inserto scFvLT, nos clones de pET-scFvLT (Canaletas 3 a 6) e no controle positivo (Canaleta 2) testados, como também a ausência da amplificação no controle negativo (Canaleta 1).

Figura 18 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da amplificação do inserto scFvLT para confirmação dos clones de pET-scFvLT.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** - Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder, **1** – Água ultrapura estéril (Controle negativo) **2** – Plasmídeo pMA contendo o gene sintético scFvLT (Controle positivo), **3 a 6** - Clones 1 a 4.

FONTE: OZAKI, 2011.

Já a Figura 19 apresenta o perfil eletroforético da PCR realizada para a confirmação dos clones de pSMT3-scFvLT. Também podemos observar a amplificação de um produto com 723 pb (Canaletas 2 a 7), confirmando o sucesso da ligação entre o inserto scFvLT e o vetor pSMT3.

Figura 19 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da amplificação do inserto scFvLT para confirmação dos clones pSMT3-scFvLT.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** - Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, **1** – Água ultrapura estéril (Controle negativo), **2** – Plasmídeo pMA contendo o gene sintético scFvLT (Controle positivo), **3 a 7** - Clones 1 a 5.

FONTE: OZAKI, 2011.

Confirmada a ligação entre os vetores de expressão e o inserto scFvLT por PCR, dois clones de pET-scFvLT e os cinco clones de pSMT3-scFvLT foram submetidos à análise de restrição com as enzimas BamHI e XhoI. Ao analisarmos o perfil eletroforético dos plasmídios pET-scFvLT digeridos, podemos verificar a presença de duas bandas referentes ao plasmídeo pET28a com 5369 pb e ao inserto clonado scFvLT com 723 pb, respectivamente (Figura 20, Canaletas 1 e 2). Já o perfil eletroforético da digestão dos plasmídios recombinantes pSMT3-scFvLT (Figura 21) também apresenta duas bandas: uma referente a liberação do inserto scFvLT com 723 pb e outra referente ao plasmídeo pSMT3 com 5633 pb. No entanto, a liberação do fragmento scFvLT ocorreu somente em três dos cinco clones testados (Canaletas 1 a 3), apesar da amplificação de um produto com o tamanho esperado nos cinco clones testados por PCR.

Figura 20 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% após a digestão dos clones de pET-scFvLT com as enzimas BamHI e XhoI.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** - Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, **1** – Clone 3, **2** - Clone 4. As setas indicam o vetor pET28a e o inserto scFvLT liberado.

FONTE: OZAKI, 2011.

Figura 21 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da digestão dos clones de pSMT3-scFvLT com as enzimas BamHI e XhoI.

Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Canaletas: **PM** - Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, **1 a 5** – Clones 1 a 5 digeridos. As setas indicam o vetor pSMT3 e o inserto scFvLT liberado.

FONTE: OZAKI, 2011.

Após as análises de restrição, dois clones de ambos os plasmídios recombinantes pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT foram submetidos a sequenciamento para verificação de fase de leitura e presença de mutações. Os sequenciamentos dos clones pET-scFvLT utilizaram os iniciadores T7 *Foward* e *Reverse*, enquanto os clones pSMT3-scFvLT utilizaram o iniciador scFvLT *Forward*, além dos iniciadores T7 *Foward* e *Reverse*. As sequências obtidas foram analisadas através de alinhamento com a sequência do gene sintético, fornecida pela empresa GENEART, utilizando o programa Clustal W2. As quatro sequências analisadas apresentaram 100% de identidade com a sequência do gene sintético, como podemos observar nas Figuras 22 e 23, confirmando a clonagem em fase de leitura correta e ausência de mutações.

Figura 22 – Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos do gene sintético scFvLT e dos insertos sequenciados a partir dos clones pET-scFvLT1 e pET-scFvLT2.

scFvLT	GTGAAACTGCAGGAAAGCGGTCCGGGTCTGGTTGCGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACC	60
pET-scFvLT2	GTGAAACTGCAGGAAAGCGGTCCGGGTCTGGTTGCGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACC	60
pET-scFvLT1	GTGAAACTGCAGGAAAGCGGTCCGGGTCTGGTTGCGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACC	60

scFvLT	TGCACCGTGAGCGAATTTAGCCTGATTAGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGTCAGAGCCCG	120
pET-scFvLT2	TGCACCGTGAGCGAATTTAGCCTGATTAGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGTCAGAGCCCG	120
pET-scFvLT1	TGCACCGTGAGCGAATTTAGCCTGATTAGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGTCAGAGCCCG	120

scFvLT	GGCAAAGATCTGCAGTGGCTGGGCATTATTTGGACCGGCGGTGGCACCAACTATAACAGC	180
pET-scFvLT2	GGCAAAGATCTGCAGTGGCTGGGCATTATTTGGACCGGCGGTGGCACCAACTATAACAGC	180
pET-scFvLT1	GGCAAAGATCTGCAGTGGCTGGGCATTATTTGGACCGGCGGTGGCACCAACTATAACAGC	180

scFvLT	GCCCTGAAAAGCCGTCTGAGCATTAGCAAAGATAACAGCAAAGCCAGGTGTTTCTGAAA	240
pET-scFvLT2	GCCCTGAAAAGCCGTCTGAGCATTAGCAAAGATAACAGCAAAGCCAGGTGTTTCTGAAA	240
pET-scFvLT1	GCCCTGAAAAGCCGTCTGAGCATTAGCAAAGATAACAGCAAAGCCAGGTGTTTCTGAAA	240

scFvLT	ATGAACAGCCTGCAGACCGATGATACCGCGCGTTATTATTGCGTGCGTATGGATGGCTAT	300
pET-scFvLT2	ATGAACAGCCTGCAGACCGATGATACCGCGCGTTATTATTGCGTGCGTATGGATGGCTAT	300
pET-scFvLT1	ATGAACAGCCTGCAGACCGATGATACCGCGCGTTATTATTGCGTGCGTATGGATGGCTAT	300

scFvLT	TATTTTCGGCAGCATGGATTATTGGGGCCAGGGTACGACGGTTACCGTGAGCAGCGGCGGT	360
pET-scFvLT2	TATTTTCGGCAGCATGGATTATTGGGGCCAGGGTACGACGGTTACCGTGAGCAGCGGCGGT	360
pET-scFvLT1	TATTTTCGGCAGCATGGATTATTGGGGCCAGGGTACGACGGTTACCGTGAGCAGCGGCGGT	360

scFvLT	GGTGGTAGCGGTGGCGGCGGTAGCGGTGGTGGTGGCAGCGATATTGTGCTGACCCAGAGC	420
pET-scFvLT2	GGTGGTAGCGGTGGCGGCGGTAGCGGTGGTGGTGGCAGCGATATTGTGCTGACCCAGAGC	420
pET-scFvLT1	GGTGGTAGCGGTGGCGGCGGTAGCGGTGGTGGTGGCAGCGATATTGTGCTGACCCAGAGC	420

scFvLT	CCGGCGACCCCTGAGCGTTACCCCGGGTGATAGCGTGAGCCTGAGCTGCCGTGCGAGCCAG	480
pET-scFvLT2	CCGGCGACCCCTGAGCGTTACCCCGGGTGATAGCGTGAGCCTGAGCTGCCGTGCGAGCCAG	480
pET-scFvLT1	CCGGCGACCCCTGAGCGTTACCCCGGGTGATAGCGTGAGCCTGAGCTGCCGTGCGAGCCAG	480

scFvLT	AGCGTGCGTAGCAACCTGCATTGGTATCAGCAGAAAAGCCATGAAAGCCCGCGTCTGCTG	540
pET-scFvLT2	AGCGTGCGTAGCAACCTGCATTGGTATCAGCAGAAAAGCCATGAAAGCCCGCGTCTGCTG	540
pET-scFvLT1	AGCGTGCGTAGCAACCTGCATTGGTATCAGCAGAAAAGCCATGAAAGCCCGCGTCTGCTG	540

scFvLT	ATTAAATTTGCAAGCCAGTCTATTAGCGGCATTCCGAGCAAATTTAGCGGCAGCGGTAGC	600
pET-scFvLT2	ATTAAATTTGCAAGCCAGTCTATTAGCGGCATTCCGAGCAAATTTAGCGGCAGCGGTAGC	600
pET-scFvLT1	ATTAAATTTGCAAGCCAGTCTATTAGCGGCATTCCGAGCAAATTTAGCGGCAGCGGTAGC	600

scFvLT	GGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAACCGAAGATTTTGGCATGTATTTT	660
pET-scFvLT2	GGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAACCGAAGATTTTGGCATGTATTTT	660
pET-scFvLT1	GGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAACCGAAGATTTTGGCATGTATTTT	660

scFvLT	TGCCAGCAGAGCGATAGCTGGCCGCGAGCTGACCTTTGGTGCGGGCACCAAACCTGGAAC	720
pET-scFvLT2	TGCCAGCAGAGCGATAGCTGGCCGCGAGCTGACCTTTGGTGCGGGCACCAAACCTGGAAC	720
pET-scFvLT1	TGCCAGCAGAGCGATAGCTGGCCGCGAGCTGACCTTTGGTGCGGGCACCAAACCTGGAAC	720

scFvLT	AAA	723
pET-scFvLT2	AAA	723
pET-scFvLT1	AAA	723

FONTE: OZAKI, 2011.

Figura 23 – Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos do gene sintético scFvLT e dos insertos sequenciados a partir dos clones pSMT3-scFvLT1 e pSMT3-scFvLT2.

scFvLT	GTGAAACTGCAGGAAAGCGGTCCGGGTCTGGTTGCGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACC	60
pSMT3-scFvLT2	GTGAAACTGCAGGAAAGCGGTCCGGGTCTGGTTGCGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACC	60
pSMT3-scFvLT1	GTGAAACTGCAGGAAAGCGGTCCGGGTCTGGTTGCGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACC	60

scFvLT	TGCACCGTGAGCGAATTTAGCCTGATTAGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGTCAGAGCCCCG	120
pSMT3-scFvLT2	TGCACCGTGAGCGAATTTAGCCTGATTAGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGTCAGAGCCCCG	120
pSMT3-scFvLT1	TGCACCGTGAGCGAATTTAGCCTGATTAGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGTCAGAGCCCCG	120

scFvLT	GGCAAAGATCTGCAGTGGCTGGGCATTATTTGGACCGGCGGTGGCACCAACTATAACAGC	180
pSMT3-scFvLT2	GGCAAAGATCTGCAGTGGCTGGGCATTATTTGGACCGGCGGTGGCACCAACTATAACAGC	180
pSMT3-scFvLT1	GGCAAAGATCTGCAGTGGCTGGGCATTATTTGGACCGGCGGTGGCACCAACTATAACAGC	180

scFvLT	GCCCTGAAAAGCCGTCTGAGCATTAGCAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTCTGAAA	240
pSMT3-scFvLT2	GCCCTGAAAAGCCGTCTGAGCATTAGCAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTCTGAAA	240
pSMT3-scFvLT1	GCCCTGAAAAGCCGTCTGAGCATTAGCAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTCTGAAA	240

scFvLT	ATGAACAGCCTGCAGACCGATGATACCGCGCGTTATTATTGCGTGCGTATGGATGGCTAT	300
pSMT3-scFvLT2	ATGAACAGCCTGCAGACCGATGATACCGCGCGTTATTATTGCGTGCGTATGGATGGCTAT	300
pSMT3-scFvLT1	ATGAACAGCCTGCAGACCGATGATACCGCGCGTTATTATTGCGTGCGTATGGATGGCTAT	300

scFvLT	TATTTTCGGCAGCATGGATTATTGGGGCCAGGGTACGACGGTTACCGTGAGCAGCGGCGGT	360
pSMT3-scFvLT2	TATTTTCGGCAGCATGGATTATTGGGGCCAGGGTACGACGGTTACCGTGAGCAGCGGCGGT	360
pSMT3-scFvLT1	TATTTTCGGCAGCATGGATTATTGGGGCCAGGGTACGACGGTTACCGTGAGCAGCGGCGGT	360

scFvLT	GGTGGTAGCGGTGGCGGCGGTAGCGGTGGTGGTGGCAGCGATATTGTGCTGACCCAGAGC	420
pSMT3-scFvLT2	GGTGGTAGCGGTGGCGGCGGTAGCGGTGGTGGTGGCAGCGATATTGTGCTGACCCAGAGC	420
pSMT3-scFvLT1	GGTGGTAGCGGTGGCGGCGGTAGCGGTGGTGGTGGCAGCGATATTGTGCTGACCCAGAGC	420

scFvLT	CCGGCGACCCCTGAGCGTTACCCCGGGTGATAGCGTGAGCCTGAGCTGCCGTGCGAGCCAG	480
pSMT3-scFvLT2	CCGGCGACCCCTGAGCGTTACCCCGGGTGATAGCGTGAGCCTGAGCTGCCGTGCGAGCCAG	480
pSMT3-scFvLT1	CCGGCGACCCCTGAGCGTTACCCCGGGTGATAGCGTGAGCCTGAGCTGCCGTGCGAGCCAG	480

scFvLT	AGCGTGCGTAGCAACCTGCATTGGTATCAGCAGAAAAGCCATGAAAGCCCGCGTCTGCTG	540
pSMT3-scFvLT2	AGCGTGCGTAGCAACCTGCATTGGTATCAGCAGAAAAGCCATGAAAGCCCGCGTCTGCTG	540
pSMT3-scFvLT1	AGCGTGCGTAGCAACCTGCATTGGTATCAGCAGAAAAGCCATGAAAGCCCGCGTCTGCTG	540

scFvLT	ATTAAATTTGCAAGCCAGTCTATTAGCGGCATTCCGAGCAAATTTAGCGGCAGCGGTAGC	600
pSMT3-scFvLT2	ATTAAATTTGCAAGCCAGTCTATTAGCGGCATTCCGAGCAAATTTAGCGGCAGCGGTAGC	600
pSMT3-scFvLT1	ATTAAATTTGCAAGCCAGTCTATTAGCGGCATTCCGAGCAAATTTAGCGGCAGCGGTAGC	600

scFvLT	GGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAACCGAAGATTTTGGCATGTATTTT	660
pSMT3-scFvLT2	GGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAACCGAAGATTTTGGCATGTATTTT	660
pSMT3-scFvLT1	GGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAACCGAAGATTTTGGCATGTATTTT	660

scFvLT	TGCCAGCAGAGCGATAGCTGGCCGCAGCTGACCTTTGGTGCGGGCACCAAACTGGAAGT	720
pSMT3-scFvLT2	TGCCAGCAGAGCGATAGCTGGCCGCAGCTGACCTTTGGTGCGGGCACCAAACTGGAAGT	720
pSMT3-scFvLT1	TGCCAGCAGAGCGATAGCTGGCCGCAGCTGACCTTTGGTGCGGGCACCAAACTGGAAGT	720

scFvLT	AAA	723
pSMT3-scFvLT2	AAA	723
pSMT3-scFvLT1	AAA	723

FONTE: OZAKI, 2011.

Antes do início dos ensaios de expressão do anticorpo recombinante scFvLT, as sequências de DNA do gene sintético, como também as construções nos vetores de expressão foram traduzidas através do programa *Generunner*[®] para conhecimento das sequências de aminoácidos. Com base nessas sequências, foram realizadas análises utilizando-se a ferramenta *ProtParam*, disponível no servidor *ExPasy*, para cálculos das massas moleculares e dos pontos isolelétricos. Na Tabela 6, podemos verificar as sequências de aminoácidos do anticorpo recombinante scFvLT traduzidas a partir das sequências de DNA do gene sintético e das construções pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT, como também seus respectivos pontos isolelétricos (pI) e massas moleculares.

De acordo com a Tabela 6, podemos verificar que o anticorpo recombinante scFvLT, quando expressos nos vetores de expressão pET28a e pSMT3, apresenta maior massa molecular quando comparado à sequência do gene sintético traduzida. Quando traduzido a partir do gene sintético, o anticorpo scFvLT apresenta massa molecular de, aproximadamente, 25 kDa. Já as traduções realizadas a partir das construções pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT apresentam massas moleculares de, aproximadamente, 30 kDa e 40 kDa, respectivamente. Assim como foram identificadas na Tabela 5 (sequência de nucleotídeos), as sequências de aminoácidos correspondentes às regiões variáveis das cadeias leve, pesada e ao *linker* estão sublinhadas com as cores verde, preta e vermelha, respectivamente. Já a sequência codificada pelo vetor pET28a encontra-se sublinhada com a cor azul, enquanto a sequência codificada pelo vetor pSMT3 encontra-se sublinhada com a cor roxa. Nas construções pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT, a sequência de aminoácidos referente ao gene scFvLT encontra-se identificada com sublinhado duplo de cor azul.

Tabela 6 – Sequência de aminoácidos, massas moleculares preditas e pI teóricos do gene sintético scFvLT e construções pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT.

Sequência de aminoácidos do gene sintético scFvLT	<p>Massa molecular predita: 25664.5</p> <p>pI teórico: 7.78</p> <p><u>VKLOESGPGGLVAPSOSLSITCTVSEFSLISYAIWVROSPGKDLWL</u> <u>GIIWTGGGTNYNSALKSRLSISKDNSKSOVFLKMNSLOTDDTARYYC</u> <u>VRMDGYYFGSMDYWGOGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVLTOSP</u> <u>ATLSVTPGDSVSLSCRASQSVRSNLHWYQOKSHESPRLLIKFASQSI</u> <u>SGIPSKFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQOSDSWPOLTFGAG</u> <u>TKLEL</u></p>
Sequência de aminoácidos da construção pET-scFvLT	<p>Massa molecular predita: 29380.6</p> <p>pI teórico: 8.64</p> <p><u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGOOMGRGSVKLOESGPGGLVAP</u> <u>SQSLSITCTVSEFSLISYAIWVROSPGKDLWLGI IWTGGGTNYNS</u> <u>ALKSRLSISKDNSKSOVFLKMNSLOTDDTARYYCVRMDGYYFGSMDY</u> <u>WGOGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVLTOSPATLSVTPGDSVSL</u> <u>SCRASQSVRSNLHWYQOKSHESPRLLIKFASQSIGIPSKFSGSGSG</u> <u>TDFTLSINSVETEDFGMYFCQOSDSWPOLTFGAGTKLELKTA</u></p>
Sequência de aminoácidos da construção pSMT3-scFvLT	<p>Massa molecular predita: 39043.4</p> <p>pI teórico: 5.89</p> <p><u>HHHHHHSSGLVPRGSHMASMSDSEVNOEAKPEVKPEVKPETHINLKV</u> <u>SDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFAKROGEKEMDSLEFLYDGIRIOA</u> <u>DOTPEDLDMEDNDIIEAHREOIGVKLOESGPGGLVAPSQSLSITCTVS</u> <u>EFSLISYAIWVROSPGKDLWLGI IWTGGGTNYNSALKSRLSISKD</u> <u>NSKSOVFLKMNSLOTDDTARYYCVRMDGYYFGSMDYWGOGTTVTVSS</u> <u>GGGGSGGGSGGGGSDIVLTOSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSVRSN</u> <u>LHWYQOKSHESPRLLIKFASQSIGIPSKFSGSGSGTDFTLSINSVE</u> <u>TEDFGMFCQOSDSWPOLTFGAGTKLELK</u></p>

— Cadeia leve;
 — Linker;
 — Cadeia Pesada;
 — His + Sítio de Clivagem Trombina;
 — His + SUMO;
 — scFvLT

4.3 Pré-análise da expressão do anticorpo recombinante scFvLT

Com a clonagem do fragmento scFvLT nos vetores de expressão concluída, iniciou-se o processo de expressão do anticorpo recombinante scFvLT. Os ensaios preliminares de indução foram realizados utilizando-se duas cepas de *Escherichia coli*: BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS, sendo transformadas com os clones pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT submetidos a sequenciamento. Primeiramente, cepas de *E. coli* BL21(DE3) competentes foram transformadas com ambos os clones de pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT, sendo submetidas a indução. Após a indução, os extratos totais das frações não-induzidas e induzidas das células foram submetidos à análise em SDS-PAGE. Ao compararmos as frações não-induzidas (Canaletas 1 e 3) com as frações induzidas (Canaletas 2 e 4), podemos observar a presença de uma banda de aproximadamente 30 kDa, nas frações induzidas das células BL21(DE3) transformadas com os clones de pET-scFvLT (Figura 24). Quanto ao nível de expressão da proteína recombinante, podemos verificar que não houve diferença entre os dois clones testados, já que as bandas correspondentes à expressão da proteína recombinante apresentam a mesma intensidade.

Figura 24 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* do ensaio de indução de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os clones pET-scFvLT1 e pET-scFvLT2.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não-induzida do clone pET-scFvLT1, **2** - Fração induzida do clone pET-scFvLT1, **3** - Fração não-induzida do clone pET-scFvLT2, **4** - Fração induzida do clone pET-scFvLT2. A seta indica a banda correspondente ao anticorpo recombinante scFvLT expresso.

FONTE: OZAKI, 2011.

Já no perfil eletroforético dos extratos totais das frações não-induzidas e induzidas de células BL21(DE3) transformadas com os clones de pSMT3-scFvLT (Figura 25), podemos observar a presença de uma banda de, aproximadamente, 40 kDa nas frações induzidas (Canaletas 2 e 4). No entanto, uma banda correspondente à mesma massa molecular pode ser observada também nas frações não-induzidas (Canaletas 1 e 3). Aos compararmos os níveis de expressão entre os clones, podemos verificar que o clone 1 (Canaleta 2) apresentou maior expressão quando comparado ao clone 2 (Canaleta 4). Através das análises preliminares realizadas com os ensaios de indução, podemos observar que os anticorpos recombinantes expressos com ambas as construções apresentaram massas moleculares compatíveis com as que foram previstas, através da análise com a ferramenta *ProtParam* (Tabela 7).

Figura 25 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* do ensaio de indução de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os clones pSMT3-scFvLT1 e pSMT3-scFvLT2.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não induzida do clone pSMT3-scFvLT1, **2** - Fração induzida do clone pSMT3-scFvLT1, **3** - Fração não induzida do clone pSMT3-scFvLT2, **4** - Fração induzida do clone pSMT3-scFvLT2. A seta indica a banda correspondente ao anticorpo scFvLT expresso.

FONTE: OZAKI, 2011.

Com o intuito de verificarmos se os níveis de expressão do anticorpo recombinante seriam maiores, quando comparados aos níveis de expressão obtidos com a cepa BL21(DE3), células *E. coli* BL21(DE3) pLysS foram transformadas com os clones pET-scFvLT, sendo submetidas às mesmas condições de indução da cepa *E. coli* BL21(DE3). A Figura 26 ilustra o perfil eletroforético dos extratos totais das frações não-induzidas e induzidas. Podemos observar que os níveis de expressão apresentados pelas frações induzidas da cepa BL21(DE3)

pLysS (canaletas 2 e 4) foram iguais ou menores quando comparados à cepa BL21(DE3), em ambos os clones testados.

Figura 26 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* do ensaio de indução de células *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformadas com os clones pET-scFvLT1 e pET-scFvLT2.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não induzida do clone pET-scFvLT1, **2** - Fração induzida do clone pET-scFvLT1, **3** - Fração induzida do clone pET-scFvLT2, **4** - Fração induzida do clone pET-scFvLT2. A seta indica a banda correspondente ao anticorpo recombinante scFvLT expresso.

FONTE: OZAKI, 2011.

Já a análise dos níveis de expressão de células BL21(DE3) pLysS transformadas com as construções pSMT3-scFvLT foi realizada com o clone 1, já que este apresentou maior nível de expressão quando comparado ao clone 2. Após transformação, células *E. coli* BL21(DE3) pLysS foram submetidas às mesmas condições de indução realizadas com as células BL21(DE3), sendo analisadas através de SDS-PAGE e *Immunoblotting*. A Figura 27 ilustra o perfil eletroforético e a reatividade do anticorpo anti-His, respectivamente, dos extratos totais das frações não-induzidas e induzidas de células BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS. Ao compararmos os níveis de expressão entre as cepas, podemos observar que a fração induzida de células BL21(DE3) (Canaleta 2) apresenta maior nível de expressão, em relação às células BL21(DE3) pLysS (Canaleta 4). Essa diferença pode ser constatada principalmente por *Immunoblotting*, já que a banda do anticorpo expresso na cepa BL21(DE3) pLysS é visualizada como uma banda tênue (Canaleta 4), ao contrário da expressão do anticorpo na cepa BL21(DE3) (Canaleta 2).

Figura 27 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue BioSafe* e *Immunoblotting* com anticorpo anti-His do ensaio de indução de células *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS transformadas com o clone pSMT3-scFvLT1.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** - Fração não-induzida de células BL21(DE3), **2** - Fração induzida de células BL21(DE3), **3** - Fração não-induzida de células BL21(DE3) pLysS, **4** - Fração induzida de células BL21(DE3) pLysS. As setas indicam as bandas correspondentes ao anticorpo recombinante scFvLT expresso.

FONTE: OZAKI, 2011.

Ainda utilizando a indução em pequena escala, analisou-se a localização celular da proteína recombinante nas células induzidas. Para isso, o volume total da cultura celular induzida (10 mL) de células BL21(DE3) transformadas com os clones pET-scFvLT foi centrifugado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL de PBS para sonicação. As frações não-induzidas, induzidas, solúveis e insolúveis foram analisadas, através de SDS-PAGE. Na Figura 28, podemos observar a banda correspondente à proteína de interesse presente nas frações induzidas e insolúveis tanto no clone 1 (Canaletas 2 e 4), quanto no clone 2 (Canaletas 6 e 8), indicando o direcionamento da proteína recombinante para corpúsculos de inclusão. Apesar da ausência de bandas na fração solúvel das células (Canaletas 3 e 7), indicando a ineficiência da sonicação, podemos observar uma banda muito tênue com massa molecular semelhante à proteína de interesse, indicando também a sua solubilidade, ainda que em menor proporção. Como os clones avaliados apresentaram resultados semelhantes entre si, o clone pET-scFvLT1 foi selecionado para expressão em maior escala em cepas *E. coli* BL21(DE3) e BL21-C43 para purificação.

Figura 28 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R250* da localização celular do anticorpo recombinante scFvLT, após indução com IPTG de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os clones pET-scFvLT1 e pET-scFvLT2.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não-induzida do clone pET-scFvLT1, **2** - Fração induzida do clone pET-scFvLT1, **3** – Fração solúvel do clone pET-scFvLT1, **4** – Fração insolúvel do clone pET-scFvLT1, **5** – Fração não-induzida do clone pET-scFvLT2, **6** - Fração induzida do clone pET-scFvLT2, **7** – Fração solúvel do clone pET-scFvLT2, **8** – Fração insolúvel do clone pET-scFvLT2. A seta indica a banda correspondente ao anticorpo recombinante scFvLT expresso.

FONTE: OZAKI, 2011.

O mesmo procedimento para determinação da localização celular do anticorpo recombinante foi realizado para células BL21(DE3) transformadas com o clone pSMT3-scFvLT. Após indução, as células foram submetidas à lise por pressão e centrifugadas para obtenção das frações solúveis e insolúveis. Através da eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS dos extratos totais das frações não-induzidas, induzidas, além das frações solúveis e insolúveis das células (Figura 29), podemos observar bandas referentes ao anticorpo recombinante presentes nas frações: induzida (Canaleta 2), solúvel (Canaleta 3) e insolúvel (Canaleta 4). No entanto, apesar da proteína de fusão SUMO possibilitar a solubilidade da proteína a ela fusionada, podemos verificar que a solubilidade da proteína de interesse ocorreu em menor proporção (Canaleta 3), uma vez que a banda presente nesta fração apresenta menor intensidade quando comparada à banda presente na fração insolúvel (Canaleta 4).

Figura 29 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue BioSafe* da localização celular do anticorpo recombinante scFvLT, após indução com IPTG de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com clone pSMT3-scFvLT1.

Canaletas: **PM** - Padrão de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não-induzida, **2** - Fração induzida, **3** – Fração solúvel, **4** – Fração insolúvel. A seta indica a banda correspondente ao anticorpo recombinante scFvLT fusionado à proteína SUMO expresso.

FONTE: OZAKI, 2011.

4.4 Purificação do anticorpo recombinante scFvLT

A purificação do anticorpo recombinante foi realizada a partir de corpúsculos de inclusão isolados de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET-scFvLT. Para

isso, as proteínas solubilizadas dos corpúsculos de inclusão foram submetidas à *refolding* por diluição. A Figura 30 ilustra o perfil eletroforético do processo de purificação do anticorpo recombinante scFvLT. Podemos observar a presença de uma banda de, aproximadamente, 30 kDa referente à proteína de interesse nas frações induzida (Canaleta 2) e insolúvel (Canaleta 4), como também nas três frações eluídas (Canaletas 11, 12 e 13). Apesar das diferentes concentrações de Imidazol utilizadas nos tampões de lavagem (Canaletas 6, 7, 8, 9, 10), estas não foram suficientes para remoção das proteínas contaminantes, já que podemos observar a presença das mesmas nas frações eluídas (Canaletas 11, 12 e 13).

O processo de purificação do anticorpo recombinante scFvLT também foi analisado através de *Immunoblotting* anti-His. Na Figura 31, podemos observar a presença de uma banda de, aproximadamente, 30 kDa presente nas frações: induzida, insolúvel, solúvel e volume do eluato morto (*flow-through*) (Canaletas 2, 3, 4 e 5), como também nas frações eluídas (Canaletas 11, 12 e 13). O *Immunoblotting* anti-His evidenciou ainda bandas inferiores a 30 kDa indicando, possivelmente, a degradação da proteína recombinante. A concentração do anticorpo recombinante obtida através desse processo de purificação foi de, aproximadamente, 1,4 mg/mL.

Figura 30 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, a partir da fração insolúvel, de células BL21(DE3) induzidas por IPTG.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não-induzida, **2** - Fração induzida, **3** – Fração solúvel, **4** – Fração insolúvel, **5** - Eluato do volume morto (*flow-through*), **6 a 10** – Lavagens com 5, 20, 40, 60 e 100 mM de Imidazol, respectivamente, **11 a 13** – Frações 3, 4 e 5 eluídas com 500 mM de Imidazol, respectivamente.

FONTE: OZAKI, 2011.

Figura 31 – *Immunoblotting* com anticorpo anti-His. Membrana de nitrocelulose contendo as frações protéicas dos extratos celulares da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, a partir da fração insolúvel, de células BL21(DE3) induzidas por IPTG.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não-induzida, **2** - Fração induzida, **3** – Fração insolúvel, **4** – Fração solúvel, **5** - Eluato do volume morto (*flow-through*), **6 a 10** – Lavagens com 5, 20, 40, 60 e 100 mM de Imidazol, respectivamente, **11 a 13** – Frações 3, 4 e 5 eluídas com 500 mM de Imidazol, respectivamente.

FONTE: OZAKI, 2011.

Ao analisarmos o processo de purificação do anticorpo scFvLT por *Immunoblotting* anti-His, realizado a partir de corpúsculos de inclusão (Figura 31), verificamos que o anticorpo também estava presente na fração solúvel (Figura 31, Canaleta 4). Utilizando-se a fração solúvel, o anticorpo recombinante scFvLT foi purificado em coluna de afinidade à Ni^{2+} , com as mesmas concentrações de Imidazol adotadas no processo de purificação realizado a partir de corpúsculos de inclusão. Este processo de purificação também foi analisado pelo perfil eletroforético, como podemos observar na Figura 32. As bandas referentes ao anticorpo recombinante podem ser visualizadas, com maior nitidez, nas frações induzida e insolúvel (Canaletas 2 e 3) e, com menor nitidez, nas frações solúvel e eluída (Canaletas 4 e 12). Na fração eluída (Canaleta 12), podemos observar, ainda, a presença de proteínas contaminantes, que não foram retiradas com as diferentes concentrações de Imidazol empregadas nas lavagens da resina. Somente as três primeiras concentrações utilizadas: 5 mM, 20 mM e 40 mM (Canaletas 6, 7 e 8) foram capazes de retirar parte das proteínas contaminantes ligadas à resina de Ni^{2+} , mas não foram suficientes, já que podemos verificar muitas dessas proteínas presentes na fração eluída, juntamente com a proteína de interesse.

Já na análise do *Immuniblotting* anti-His, podemos observar a presença de bandas referentes ao anticorpo recombinante nas frações induzida, insolúvel, solúvel, eluato do volume morto (*flow-through*) e eluída (Canaletas 2, 3, 4, 5 e 12), como também a ausência das bandas inferiores a 30 kDa na fração eluída (Canaleta 12). A concentração do anticorpo recombinante scFvLT obtida através desse processo de purificação foi de, aproximadamente, 175 µg/mL.

Figura 32 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* e *Immunoblotting* com anticorpo anti-His da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, a partir da fração solúvel, de células BL21(DE3) induzidas por IPTG.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** - Fração não-induzida, **2** - Fração induzida, **3** - Fração insolúvel, **4** - Fração solúvel, **5** - Eluato do volume morto (*flow-through*), **6 a 10** - Lavagens com 5, 20, 40, 60 e 100 mM de Imidazol, respectivamente, **11 e 12** - Frações 3 e 4 eluídas com 500 mM de Imidazol, respectivamente.

FONTE: OZAKI, 2011.

Além da *E. coli* BL21(DE3), outra cepa de *E. coli* foi utilizada para expressão do anticorpo recombinante em maior escala, para posterior purificação. Células *E. coli* BL21-C43 foram transformadas com o plasmídio pET-scFvLT e submetidas à indução. Após lise celular, isolamento e solubilização com ureia dos corpúsculos de inclusão, as proteínas solubilizadas foram purificadas sendo, posteriormente, submetidas à *refolding* por diálise em concentrações decrescentes de ureia. A Figura 33 ilustra o perfil eletroforético do processo de purificação realizado para obtenção do anticorpo scFvLT. Podemos observar a presença de bandas correspondentes ao anticorpo recombinante, com massa molecular aparente de 30 kDa, nas frações induzida, insolúvel, eluato do volume morto (*flow-through*) e eluída (Canaletas 2, 3, 6 e 9), como também nos corpúsculos de inclusão solubilizados (Canaleta 5). Nota-se, ainda, a ausência da banda na fração solúvel das células (Canaleta 4), indicando o total direcionamento da expressão da proteína recombinante para corpúsculos de inclusão. Já a presença de uma banda correspondente ao anticorpo scFvLT na fração do eluato do volume morto revela que a resina não foi capaz de reter toda a proteína recombinante aplicada à ela (Canaleta 6). As duas concentrações de Imidazol utilizadas para as lavagens da resina de Ni²⁺ foram suficientes para a retirada de grande parte das proteínas contaminantes (Canaletas 7 e 8), apesar da eluição de uma pequena parte juntamente com o anticorpo recombinante scFvLT (Canaleta 9). Se compararmos este processo de purificação aos realizados anteriormente (Figuras 30 e 32) podemos observar uma maior pureza na proteína de interesse obtida através dessa metodologia. A concentração do anticorpo recombinante scFvLT obtido através desse processo de purificação foi de 188 µg/mL.

Figura 33 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, a partir da fração insolúvel de células BL21-C43 induzidas por IPTG.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não induzida, **2** - Fração induzida, **3** – Fração insolúvel, **4** – Fração solúvel, **5** – Corpúsculos de inclusão solubilizados, **6** - Eluato do volume morto (*flow-through*), **7 e 8** – Lavagens com 5 e 30 mM de Imidazol, **9** – Fração eluída com 500 mM de Imidazol.

FONTE: OZAKI, 2011.

Outra abordagem adotada para obtenção do anticorpo recombinante scFvLT foi a purificação realizada, a partir da fração solúvel de células BL21(DE3) transformadas com a construção pSMT3-scFvLT. Após indução das células, o primeiro processo de purificação foi realizado através da metodologia *Batch*. Na Figura 34, podemos observar a análise do processo de purificação realizada através de SDS-PAGE. Em todas as canaletas, é possível visualizar bandas de, aproximadamente, 40 kDa correspondentes ao anticorpo recombinante scFvLT fusionado à proteína SUMO. Além da presença nas frações induzida, insolúvel e solúvel (Canaletas 2, 3 e 4), a proteína de interesse pode ser visualizada ainda nas frações correspondentes às lavagens da resina com os tampões contendo 20 mM, 40 mM e 60 mM de Imidazol (Canaletas 5, 6 e 7). Já na fração da eluição, além do anticorpo scFvLT, outras bandas correspondentes às proteínas contaminantes podem ser visualizadas (Canaleta 8).

Por *Immunoblotting* anti-His (Figura 34) o processo de purificação foi analisado, confirmando os resultados obtidos pela análise do perfil eletroforético em gel de SDS-PAGE. No entanto, com o *Immunoblotting* anti-His podemos verificar a presença de uma banda correspondente à proteína de interesse na fração não-induzida (Canaleta 1), indicando a ocorrência de expressão basal da mesma. Além disso, outras proteínas contaminantes não

visualizadas no gel de poliacrilamida-SDS foram evidenciadas na fração da eluição (Canaleta 8).

Figura 34 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS 12% corado com *Coomassie Blue BioSafe* e *Immunoblotting* com anticorpo anti-His da purificação por *Batch* do anticorpo recombinante scFvLT, a partir da fração solúvel de células BL21(DE3) transformadas com o clone pSMT3-scFvLT1 e induzidas por IPTG.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não-induzida, **2** - Fração induzida, **3** – Fração insolúvel, **4** – Fração solúvel, **5 a 7** – Lavagens com 20, 40 e 60 mM de Imidazol, respectivamente, **8** - Fração eluída com 500 mM de Imidazol. A seta indica a banda correspondente ao anticorpo recombinante scFvLT fusionado à proteína SUMO purificado.

FONTE: OZAKI, 2011.

Uma vez que a primeira tentativa de purificação do anticorpo recombinante scFvLT não foi satisfatória, outras condições de indução foram testadas, com o intuito de melhorar os

níveis de expressão da proteína de interesse, direcionando-a para fração solúvel das células. Dessa maneira, uma cinética de indução foi realizada variando-se a concentração de IPTG e o período de incubação, porém mantendo-se a temperatura constante em 20 °C. Ao final da cinética, todas as alíquotas coletadas foram analisadas por SDS-PAGE e *Immunoblotting* anti-His, como podemos observar na Figura 35. Ao analisarmos as alíquotas coletadas por tempo de incubação, podemos observar no gel de poliacrilamida-SDS, que as bandas correspondentes ao anticorpo scFvLT apresentam-se menos intensas nas alíquotas coletadas após 18 horas, independente da concentração de IPTG utilizada (Canaletas 8, 9, e 10). Já nas alíquotas coletadas após três e seis horas de incubação, as bandas apresentam intensidades diferentes, de acordo com a concentração de IPTG utilizada. Após três horas de incubação, as bandas da proteína de interesse presentes nas alíquotas induzidas com 0,1 e 0,5 mM de IPTG (Canaletas 2 e 3) apresentam-se mais intensas quando comparadas a banda presente na alíquota induzida com 1 mM de IPTG (Canaleta 4). Ao compararmos as alíquotas após seis horas de incubação, podemos verificar que a banda do anticorpo scFvLT se mostra mais intensa na alíquota induzida com 0,5 mM de IPTG (Canaleta 6), do que nas alíquotas induzidas com 0,1 e 1 mM, respectivamente (Canaletas 5 e 7).

Ao analisarmos o *Immuniblotting* anti-His podemos observar que as bandas correspondentes ao anticorpo scFvLT apresentam intensidades iguais, após três horas de incubação, independente da concentração de IPTG utilizada para a indução das células (Canaletas 2, 3 e 4). Já as alíquotas coletadas após 6 horas de incubação apresentam bandas com intensidades semelhantes nas alíquotas induzidas com as concentrações de 0,1 e 1 mM de IPTG (Canaletas 5 e 7), enquanto a banda obtida com a alíquota induzida com 0,5 mM de IPTG (Canaleta 6) apresenta-se ligeiramente mais intensa. Como observadas no gel de poliacrilamida-SDS (Figura 35), as bandas obtidas com as alíquotas retiradas após 18 horas apresentam-se menos intensas quando comparadas aos demais períodos de incubação. A banda obtida com a alíquota induzida com 1 mM de IPTG (Canaleta 10) se mostrou menos intensa do que as alíquotas coletadas no mesmo período (Canaletas 8 e 9). Ainda analisando as alíquotas coletadas após 18 horas de incubação, podemos observar a presença de bandas com massa molecular inferior a 20 kDa indicando, possivelmente, uma maior degradação da proteína recombinante do que nos outros períodos de incubação testados.

Figura 35 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* e *Immunoblotting* com anticorpo anti-His da padronização das condições de indução do anticorpo recombinante scFvLT, em células BL21(DE3) transformadas com o clone pSMT3-scFvLT.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não-induzida, **2, 5, 8** - Frações induzidas com 0,1 mM de IPTG, **3, 6, 9** – frações induzidas com 0,5 mM de IPTG, **4, 7, 10** – Frações induzidas com 1 mM de IPTG.

FONTE: OZAKI, 2011.

Utilizando as novas condições de indução padronizadas, células BL21(DE3) transformadas com a construção pSMT3-scFvLT foram induzidas em maior escala, sendo submetidas a purificação em coluna de Ni^{2+} pré-empacotada. As frações coletadas durante o processo de purificação foram analisadas através de SDS-PAGE e *Immunoblotting* anti-His,

como podemos observar nas Figuras 36. No perfil eletroforético em gel de SDS-PAGE, podemos observar que todas as frações coletadas durante o processo de purificação apresentam o mesmo perfil de bandas. Ao compararmos a fração não-induzida (Canaleta 1) com a fração induzida (Canaleta 2), podemos verificar que não há diferença na intensidade das bandas referentes à proteína de interesse, indicando possivelmente a expressão basal da mesma. Já na fração solúvel (Canaleta 3), podemos observar que a banda referente à proteína recombinante, com massa molecular aparente de 40 kDa, apresenta maior intensidade quando comparada à banda de mesma massa, presente na fração do eluato do volume morto (Canaleta 4). As lavagens realizadas com os tampões de lavagem contendo 5 mM e 30 mM de Imidazol não foram suficientes para retirada de todas as proteínas contaminantes (Canaletas 5 e 6), já que muitas delas podem ser observadas nas frações eluídas, juntamente com o anticorpo scFvLT (Canaletas 7, 8 e 9).

Para confirmar os resultados obtidos por SDS-PAGE, a análise por *Immunoblotting* anti-His foi realizada. Por essa análise foi possível constatar que as bandas visualizadas nas frações não-induzida, eluato do volume morto e nas lavagens (Canaletas 1, 4, 5 e 6) não correspondiam a proteína de interesse, já que estas não foram reveladas com as mesmas intensidades observadas no gel de poliacrilamida-SDS. A ausência da banda na fração não-induzida excluiu também a possibilidade de expressão basal da proteína recombinante. Podemos observar ainda que as bandas referentes ao anticorpo recombinante fusionado à SUMO foram reveladas nas frações induzida (Canaleta 2), solúvel (Canaleta 3) e eluídas (Canaletas 7, 8 e 9).

Figura 36 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* e *Immunoblotting* com anticorpo anti-His da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, por cromatografia de afinidade a níquel.

Canaletas: **PM** – Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não induzida, **2** - Fração induzida, **3** – Fração solúvel, **4** – Eluato do volume morto (*flow-through*), **5 e 6** – Lavagens com 5 e 30 mM de Imidazol, **7 a 9** - Frações eluídas com 500 mM de Imidazol. A seta indica a banda correspondente ao anticorpo scFvLT fusionado à proteína SUMO purificado.

FONTE: OZAKI, 2011.

A partir da análise do perfil eletroforético e do *Immunoblotting* anti-His, verificamos que a diferença de intensidade entre as bandas presentes nas frações não-induzida e induzida era mínima. Uma vez que diferentes concentrações de IPTG, temperatura e tempo de incubação já haviam sido testadas, outra variável que poderia influenciar no perfil de expressão da proteína recombinante era o meio de cultura. Para testarmos essa variável, células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pSMT3-scFvLT foram induzidas nos meios de cultura 2YT e LB. As alíquotas pré e pós-indução foram coletadas, sendo analisadas

por SDS-PAGE, como podemos observar na Figura 37. Ao compararmos as bandas correspondentes à proteína recombinante presentes nas frações induzidas de ambos os meios testados (Canaletas 2 e 4), podemos verificar que o meio 2YT promoveu uma maior expressão, já que a banda correspondente a ela se mostra muito mais intensa (Canaleta 4) do que a banda presente na fração do meio LB (Canaleta 2). Já as frações não-induzidas (Canaletas 1 e 3) também apresentam uma leve diferença, sendo a fração-não induzida do meio 2YT (Canaleta 3) muito semelhante a fração induzida (Canaleta 2) do meio LB.

Figura 37 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* da padronização dos meios de cultura utilizados para expressão de scFvLT.

Canaletas: **PM** - Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** - Fração não-induzida em meio LB, **2** - Fração induzida em meio LB, **3** - Fração não-induzida em meio 2YT, **4** - Fração induzida em meio 2YT.

FONTE: OZAKI, 2011.

Diante dos resultados obtidos com o meio de cultura 2YT, este foi utilizado para indução de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídio pSMT3-scFvLT, para posterior purificação. O processo de purificação foi realizado, a partir da fração solúvel do extrato bacteriano, em coluna de Ni²⁺ pré-empacotada, sendo as frações coletadas analisadas por SDS-PAGE, como podemos observar na Figura 38. O meio de cultura 2YT aumentou a expressão do anticorpo recombinante não só na fração solúvel (Canaleta 4), como também na fração insolúvel das células (Canaleta 3). As frações não-induzida e induzida podem ser diferenciadas entre si, através da presença de uma banda de grande intensidade presente na fração induzida (Canaleta 2) quando comparada à fração não-induzida (Canaleta 1), fato pouco observado nas induções realizadas com o meio LB. Apesar da banda correspondente à proteína de interesse poder ser visualizada nas frações do eluato de volume morto (Canaleta

5), como também na fração da lavagem com 5 mM de Imidazol (Canaleta 6), ela se mostra menos intensa na fração da eluição presente na Canaleta 9 e praticamente ausente na fração da eluição presente na Canaleta 8.

Figura 38 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* da purificação do anticorpo recombinante scFvLT, por cromatografia de afinidade a níquel.

Canaletas: **PM** – Marcador de massa molecular Protein Mixture, **1** – Fração não induzida, **2** – Fração induzida, **3** – Fração insolúvel, **4** – Fração solúvel, **5** – Eluato do volume morto (*flow-through*), **6 e 7** – Lavagens com 5 e 30 mM de Imidazol, **8 e 9** – Frações eluídas com 500 mM de Imidazol.

FONTE: OZAKI, 2011.

Uma vez que nenhuma das abordagens de purificação resultou na proteína SUMO-scFvLT pura, os experimentos posteriores de clivagem da proteína de fusão e isolamento do scFvLT não foram realizados.

5 Análise funcional do anticorpo recombinante scFvLT

Testes preliminares com os anticorpos recombinantes scFvLT obtidos através das diferentes abordagens de purificação adotadas, revelaram que somente um deles possuía atividade biológica. Os resultados apresentados a seguir foram obtidos com o anticorpo scFvLT, expresso na cepa *E. coli* BL21-C43 com a construção pET28a-scFvLT, sendo purificado em coluna de afinidade a Ni²⁺ pré-empacotada, a partir de corpúsculos de inclusão e submetido à *refolding* por diálise em concentrações decrescentes de ureia.

A capacidade do anticorpo recombinante scFvLT em reconhecer a toxina LT foi avaliada por ELISA de captura e ELISA indireto. Para os ensaios de ELISA de captura, placas

de poliestireno foram sensibilizadas com a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT, utilizando diferentes concentrações do anticorpo recombinante scFvLT para detecção da toxina LT purificada ou presente no sobrenadante de cultura da cepa H10407. Todas as diluições do anticorpo scFvLT submetidas à *refolding* foram testadas, sendo capazes de reconhecer tanto a toxina LT na forma purificada (Figura 39), quanto a toxina presente no sobrenadante de cultura da cepa H10407 (Figura 40). Ao analisarmos os gráficos da reatividade do anticorpo scFvLT contra a toxina LT purificada, podemos observar que a reatividade é proporcional à concentração do anticorpo utilizada, já que as maiores absorbâncias foram obtidas com as concentrações de 200, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$, que apresentaram valores idênticos, independente da concentração do anticorpo submetido à *refolding*. Já ao compararmos as absorbâncias obtidas com o anticorpo scFvLT renovado em diferentes concentrações, podemos observar que o scFvLT renovado a 37,6 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 39-C) apresentou as maiores absorbâncias, embora elas sejam muito próximas das obtidas com as concentrações de 94 $\mu\text{g/mL}$ e 18,8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 39-B e Figura 39-D), enquanto três outros scFvLTs renaturados (188 $\mu\text{g/mL}$, 4,7 $\mu\text{g/mL}$ e 3,76 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram as menores absorbâncias. A concentração mínima para o reconhecimento da toxina LT também variou, de acordo com a concentração do scFvLT submetido à *refolding*. Enquanto os scFvLTs renaturados a 37,6 $\mu\text{g/mL}$ e 18,8 $\mu\text{g/mL}$ necessitaram de 3,125 $\mu\text{g/mL}$ de scFvLT para o reconhecimento da toxina LT (Figuras 39-C e 39-D), os scFvLTs renaturados a 4,7 $\mu\text{g/mL}$ e 3,76 $\mu\text{g/mL}$ necessitaram de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 39-E e 39-F). Para que os scFvLTs renaturados a 188 $\mu\text{g/mL}$ e 94 $\mu\text{g/mL}$ reconhecessem a toxina foram necessários 25 $\mu\text{g/mL}$ e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de scFvLT, respectivamente (Figuras 39-A e 39-B).

Figura 39 – Reatividade do anticorpo recombinante scFvLT contra a toxina LT purificada de *Escherichia coli* enterotoxigênica por ensaio de ELISA de captura.

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 30 µg/mL da fração enriquecida em IgG de coelho anti-LT. Como antígenos foram utilizados 2 µg/mL da toxina LT purificada em solução de bloqueio. A detecção da reação foi realizada com diluições seriadas na razão 1:2 das diferentes concentrações do scFvLT submetidas à renaturação, seguidas das incubações com anticorpo anti-His, anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase e revelação com OPD e H₂O₂.

FONTE: OZAKI, 2011.

Quanto à reatividade do scFvLT contra a toxina LT presente no sobrenadante de cultura da cepa H10407, o mesmo padrão de dose-dependência observado entre o scFvLT e a toxina LT purificada é mantido, porém as absorbâncias obtidas foram maiores. O scFvLT renaturado a 37,6 µg/mL apresentou as maiores absorbâncias (Figura 40-C), enquanto os scFvLTs renaturados a 94 µg/mL (Figura 40-B), 18,8 µg/mL (Figura 40-D), 4,7 µg/mL (Figura 40-E) e 3,76 µg/mL (Figura 40-F) apresentaram absorbâncias semelhantes. Já o scFvLT renaturado a 188 µg/mL (Figura 40-A) apresentou as menores absorbâncias, como observado na reatividade entre o scFvLT e a toxina LT purificada. As concentrações mínimas para o reconhecimento da toxina LT também variaram, de acordo com a concentração do scFvLT renaturado. Para o reconhecimento da toxina LT presente no sobrenadante de cultura da cepa H10407, os scFvLT renaturados a 37,6 µg/mL e 18,8 µg/mL necessitaram de 3,125 µg/mL de scFvLT (Figuras 40-C e 40-D), a mesma concentração utilizada para o reconhecimento da toxina LT purificada. Já os scFvLTs renaturados a 94 µg/mL, 4,7 µg/mL e 3,76 µg/mL necessitaram de 6,25 µg/mL de scFvLT (Figuras 40-B, 40-E e 40-F), enquanto o scFvLT renaturado a 188 µg/mL necessitou de 25 µg/mL para o reconhecimento (Figura 40-A).

Figura 40 – Reatividade do anticorpo recombinante scFvLT contra a toxina LT presente no sobrenadante de cultura da cepa H10407 de *Escherichia coli* enterotoxigênica por ensaio de ELISA de captura.

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 30 µg/mL da fração enriquecida em IgG de coelho anti-LT. Como antígenos foram utilizados 100 µL do sobrenadante de cultura da cepa H10407. A detecção da reação foi realizada com diluições seriadas na razão 1:2 das diferentes concentrações do scFvLT submetidas à renaturação, seguidas das incubações com anticorpo anti-His, anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase e revelação com OPD e H₂O₂.

FONTE: OZAKI, 2011.

Diante dos resultados obtidos com o ensaio de ELISA de captura, o ensaio de ELISA indireto também foi realizado através da sensibilização da placa de poliestireno com o sobrenadante de cultura da cepa H10407 e a toxina LT purificada. As mesmas concentrações do anticorpo recombinante empregadas no ensaio de ELISA de captura foram utilizadas para detecção do antígeno. De acordo com as absorbâncias apresentadas na Figura 41, podemos observar que a reatividade entre o anticorpo recombinante e a toxina LT, presente no sobrenadante de cultura da cepa H10407, não pode ser detectada através do ensaio de ELISA indireto, com as concentrações do anticorpo scFvLT utilizadas. Observa-se apenas a absorbância obtida através da reatividade do anticorpo monoclonal anti-LT contra a toxina LT, que foi utilizado como controle positivo da reação. O mesmo resultado foi obtido com a reatividade do anticorpo recombinante contra a toxina LT purificada (dados não mostrados).

Figura 41 – Reatividade do anticorpo recombinante scFvLT contra a toxina LT produzida pela cepa H10407 por ensaio de ELISA indireto.

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com o 100 µL do sobrenadante de cultura da cepa H10407. A detecção da reação foi realizada após a incubação com diluições seriadas na razão 1:2 do anticorpo recombinante scFvLT, seguidas das incubações com anticorpo anti-His, anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase e revelação com OPD e H₂O₂.

FONTE: OZAKI, 2011.

Outras metodologias utilizando ensaios imunoenzimáticos, como a técnica de *Immunodot*, foram realizadas para verificar a capacidade do anticorpo recombinante scFvLT em reconhecer a toxina LT. Podemos observar na Figura 42, que a incubação das membranas

com as cinco maiores concentrações do anticorpo scFvLT: 200, 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (Canaletas 1 a 5) foram capazes de reconhecer a toxina LT purificada. No entanto, a toxina LT presente no sobrenadante de cultura da cepa H10407 não foi detectada com nenhuma das concentrações testadas. Já a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpo monoclonal anti-LT também foi capaz de reconhecer tanto a toxina presente no sobrenadante de cultura da cepa H10407, quanto a toxina LT purificada, ainda que com menor intensidade (Canaleta 8). A reatividade da proteína EspB assegurou a positividade do teste, assim como a não reatividade do PBS.

Figura 42 – *Immunodot* com o anticorpo recombinante scFvLT.

1 – 200 $\mu\text{g/mL}$ de scFvLT; 2 - 100 $\mu\text{g/mL}$ de scFvLT; 3 – 50 $\mu\text{g/mL}$ de scFvLT; 4 – 25 $\mu\text{g/mL}$ de scFvLT; 5 – 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de scFvLT; 6 - 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de scFvLT; 7 – 3,125 $\mu\text{g/mL}$ de scFvLT; 8 - 50 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpo monoclonal anti-LT. As membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com 100 μL de sobrenadante de cultura, 100 μL de PBS, 10 $\mu\text{g/mL}$ da toxina LT purificada e 10 $\mu\text{g/mL}$ da proteína EspB. A reatividade foi detectada após incubações com os anticorpos scFvLT, anti-His, anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase e revelação com DAB e H_2O_2 .

FONTE: OZAKI, 2011.

Para detecção das subunidades da toxina, diferentes concentrações do anticorpo recombinante, como também o anticorpo monoclonal anti-LT e a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT foram utilizadas. Podemos observar na Figura 43, que nenhuma das concentrações do anticorpo recombinante testadas foi capaz de detectar as subunidades da

toxina LT (Canaletas 1 a 6). Já o anticorpo monoclonal foi capaz de reconhecer tanto a subunidade A, quanto a subunidade B da toxina LT (Canaleta 7), assim como a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT (Canaleta 8).

Figura 43 – Detecção das subunidades A e B da toxina LT por *Immunoblotting*, utilizando o anticorpo recombinante scFvLT.

Membranas de nitrocelulose contendo as frações protéicas da toxina LT após SDS-PAGE a 12% foram submetidas ao *immunoblotting* com o anticorpo recombinante scFvLT. **1** – 200 µg/mL de scFvLT; **2** - 100 µg/mL de scFvLT; **3** – 50 µg/mL de scFvLT; **4** – 25 µg/mL de scFvLT; **5** – 12,5 µg/mL de scFvLT; **6** - 6,25 µg/mL de scFvLT; **7** – 50 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-LT; **8** - 20 µg/mL da fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT. A reatividade foi detectada após incubações com os anticorpos scFvLT, anti-His, anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase e revelação com DAB e H₂O₂.

FONTE: OZAKI, 2011.

A reatividade do anticorpo recombinante scFvLT contra a toxina LT também foi testada através do ensaio de imunofluorescência indireta. Neste ensaio, monocamadas de células Y1 foram incubadas com a toxina LT, sendo posteriormente incubadas com os anticorpos scFvLT, monoclonal anti-LT e a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT, após fixação. Na Figura 44, podemos observar que a fluorescência emitida pelas células tratadas com o anticorpo recombinante (Figura 44-C) se mostra mais intensa, quando comparadas às células tratadas com o anticorpo monoclonal anti-LT (Figura 44-A) ou com a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT (Figura 44-B). A especificidade dos anticorpos se mostra mais evidente quando comparamos as células tratadas com os anticorpos aos controles negativos, que consistem na incubação dos anticorpos com as células, porém na ausência da toxina. A fluorescência emitida pelos controles negativos é mínima, como podemos observar nas Figuras 44-D, 44-E e 44-F.

Figura 44 – Reatividade do anticorpo recombinante scFvLT contra a toxina LT em células adrenais Y1 por Imunofluorescência indireta.

A, B, C – Células adrenais Y1, na presença da toxina LT, incubados com 100 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-LT, 100 µg/mL da fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT e 100 µg/mL de anticorpo recombinante scFvLT, respectivamente; **D, E, F** – Células adrenais Y1, na ausência da toxina LT, incubados com 100 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-LT, 100 µg/mL da fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT e 100 µg/mL de anticorpo recombinante scFvLT, respectivamente. A reatividade foi detectada após incubações com os anticorpos anti-His, anti-IgG de camundongo, anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho conjugado à FITC. Aumento 40X.

Além da capacidade em reconhecer um antígeno, outra função desempenhada por um anticorpo é a de neutralizar a ação desse antígeno. A função de neutralização do anticorpo scFvLT foi testada contra o efeito citopático da toxina LT em células Y1. Além das diferentes concentrações do anticorpo recombinante, o anticorpo monoclonal anti-LT e a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT também foram testados. Esses anticorpos, juntamente com as diferentes concentrações do anticorpo recombinante foram previamente incubados com a toxina LT, antes de serem adicionados à monocamada de células Y1. Como controles negativos foram utilizados as monocamadas celulares na ausência da toxina LT, como também na presença do tampão de diálise, que contém altas concentrações de cloreto de sódio. Como o anticorpo recombinante encontra-se solubilizado neste tampão, a incubação deste com as células poderia causar alterações morfológicas. Como controle positivo do efeito citopático foi utilizado somente a toxina LT. A Figura 45 ilustra a leitura do teste de neutralização realizada após 6 horas de incubação. Na Figura 45-C, podemos observar as alterações morfológicas, causadas nas células Y1, pela ação da toxina LT. Elas se apresentam arredondadas quando comparadas ao controle negativo do teste (Figura 45-A). Já na Figura 45-D, podemos observar as mesmas alterações morfológicas, apesar da pré-incubação da toxina LT com o anticorpo scFvLT, o que evidencia a ausência da atividade neutralizante do anticorpo. Quando observamos as células na presença da pré-incubação do anticorpo monoclonal anti-LT com a toxina LT, podemos observar uma neutralização parcial, já que algumas células apresentam-se morfológicamente alteradas (Figura 45-E). A fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT foi capaz de neutralizar totalmente a ação da toxina LT (Figura X-F), uma vez que as células incubadas na presença da toxina LT com a fração apresentam-se íntegras, comparáveis ao controle negativo (Figura 45-A). Embora o tampão de diálise apresentasse grande concentração de cloreto de sódio, este não alterou a morfologia das células, como podemos observar na Figura 45-B.

Figura 45 – Ensaio citopático e neutralização da toxina LT em células adrenais Y1 utilizando o anticorpo recombinante scFvLT.

A – Células adrenais Y1; **B** – Células adrenais Y1 na presença de tampão de diálise; **C** – Células adrenais Y1 na presença de 2,5 µg/mL da toxina LT; **D** – Neutralização da toxina LT com 200 µg/mL do anticorpo recombinante scFvLT, **E** - Neutralização da toxina LT com 200 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-LT, **F** - Neutralização da toxina LT com 200 µg/mL da fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT. Aumento 10X.

5 DISCUSSÃO

A partir do desenvolvimento da tecnologia de hibridomas por KÖHLER e MILSTEIN (1975), a obtenção de anticorpos vem se tornando cada vez mais atraente, abrindo um extenso leque para o desenvolvimento de novas moléculas que possam ser utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças. O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante aliado ao conhecimento da estrutura e função dos anticorpos possibilitou a clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos em sistemas de expressão amplamente utilizados para produção de proteínas heterólogas, como *Escherichia coli* e *Pichia pastori*, com alto rendimento, baixo custo, afinidades e especificidades desejáveis (KIPRIYANOV; LITTLE, 1999; MAYNARD; GEORGIOU, 2000).

Com o intuito de implementar-se a tecnologia de anticorpos recombinantes em nosso laboratório e de obter-se uma ferramenta para a identificação de cepas de ETEC, um fragmento variável em cadeia única (scFv) contra a toxina termo-lábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica foi obtido. Dados da literatura apresentam relatos de outros fragmentos de anticorpos desenvolvidos contra fatores de virulência pertencentes às diferentes categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas (BASKHARAN et al., 2005; CHUNG et al., 2008; GOLCHIN; AITKEN, 2008; KHÜNE et al., 2004; MA et al., 2008; MENEZES et al., 2011).

A clonagem da porção variável das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal anti-LT foi realizada utilizando o módulo de clonagem do kit RPAS (*Recombinant Phage Antibody System*), já que este fornecia os oligonucleotídeos necessários para amplificação das regiões de interesse, sem a necessidade do desenho de iniciadores específicos. Este kit também foi utilizado para a obtenção de scFvs contra diferentes antígenos, confirmando sua praticidade e eficiência (BASKHARAN et al., 2005; CARDOSO et al., 2000; GAO; HUANG; ZHU, 1999; HE; TAUSSIG, 2002; LAMBERSKI; THOMOPSON; BURGESS, 2006; LEUNG et al., 2000; MENEZES et al., 2011; NORTON et al., 2001; SPATS et al., 2003; ZHANG et al., 2003).

Uma vez que linfócitos B ou hibridomas podem ser utilizados como fonte do material genético para amplificação das regiões variáveis das cadeias leve e pesada, o RNA total de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-LT foi utilizado. Os *amplicons* obtidos correspondiam aos tamanhos esperados, já que os mesmos deveriam apresentar, aproximadamente, 325 pb e 340 pb para as cadeias leve e pesada, respectivamente, de acordo com o manual do kit RPAS. O sequenciamento destes fragmentos revelou que estes

correspondiam aos genes que codificavam as regiões variáveis de anticorpos monoclonais de origem murina. Além disso, verificou-se que a cadeia leve do anticorpo monoclonal anti-LT pode ser classificada como *kappa*, já que a sua sequência apresentou identidade com 47 sequências de cadeias leves deste tipo. Como em camundongos, 95% das cadeias leves são do tipo *kappa* e os 5% restantes são do tipo *lambda*, os iniciadores que amplificam cadeias leves do tipo *lambda* não estão inclusos no kit RPAS. Portanto, a obtenção da região variável de cadeia leve do tipo *kappa* era esperada (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000; RECOMBINANT PHAGE ANTIBODY SYSTEM, 2002).

A produção de anticorpos recombinantes vem sendo realizada através dos mais diversos sistemas de expressão, como fungos, plantas, células de mamíferos e insetos. No entanto, o sistema de expressão amplamente utilizado para a produção de fragmentos de anticorpos, que não necessitem de modificações pós-traducionais é *Escherichia coli*, por apresentar diversas vantagens como fácil manipulação, crescimento rápido, alto rendimento e baixo custo, além da variedade de vetores e cepas para expressão, facilitando a sua escolha. Diante dessas vantagens, o sistema de expressão escolhido para a produção do anticorpo recombinante scFvLT foi *Escherichia coli* (BANEYX, 1999; HOLLIGER; BOHLEN, 1999).

Diferentes fatores podem influenciar nos níveis de expressão de proteínas heterólogas, como o sistema e o vetor de expressão, a genética da célula hospedeira e a adaptação dos códons preferenciais do gene transcrito aos códons preferenciais do sistema de expressão. A expressão de uma sequência não adaptada ao códon preferencial do hospedeiro pode acarretar em erros de tradução, substituição de aminoácidos ou em terminação prematura de tradução, influenciando no rendimento final da proteína. Uma vez que a análise da sequência codificadora original do anticorpo scFvLT revelou a presença de códons raros, quando comparado aos códons preferenciais de *E. coli*, a síntese do gene sintético scFvLT otimizado para este sistema de expressão foi realizada.

Apesar da síntese de genes sintéticos otimizados apresentarem a forma mais rápida e eficaz de se melhorar os níveis de expressão de proteínas heterólogas, alternativas podem ser utilizadas como: mutação sítio-dirigida para substituição dos códons, transformação da cepa de expressão com plasmídios que codifiquem os RNAt raros ou a utilização de cepas que já alberguem esses plasmídios. A adoção de genes otimizados para melhorar a expressão de anticorpos recombinantes já foi relatada. O anticorpo recombinante 5S-scFv, derivado de um anticorpo monoclonal 5S produzido contra um antígeno de superfície do vírus da hepatite B, teve a sua expressão aumentada em 100 vezes, quando comparada ao gene original. Esse aumento de expressão só foi possível após a otimização da sequência original para o *codon*

usage de *E. coli*. Outro fragmento de anticorpo, o anti-ErBb2 scFv, também teve seus níveis de expressão aumentados em 3 a 5 vezes, após a otimização da sua sequência para os códons preferenciais de *Pichia pastoris* (PUIGBÒ et al., 2007; HU et al., 2005; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005; TIWARI et al., 2010).

A abordagem inicial para a produção do anticorpo scFvLT foi delineada para que ocorresse no vetor pLIP6-GN (MULLER et al., 1999). Este vetor apresentava uma única opção de clonagem nos sítios SfiI e NotI, por isso a escolha dos sítios de restrição que flanqueavam o gene sintético, permitindo a expressão periplasmática de proteínas exógenas em fusão com uma variante de fosfatase alcalina de *E. coli*. Essa abordagem se mostrou extremamente atrativa para a produção do anticorpo recombinante scFvLT, já que o vetor pLIP6-GN e suas variantes foram utilizados para produção de diferentes scFvs, como também de outros marcadores biológicos. Além de promover a solubilidade do anticorpo scFvLT, facilitando a sua obtenção, a fosfatase alcalina fusionada ao anticorpo proporcionaria o desenvolvimento das reações imunoenzimáticas em menor tempo, já que o anticorpo recombinante estaria conjugado à enzima, evitando a incubação com o conjugado. No entanto, apesar dos esforços para obtenção dessa construção, ela não foi bem sucedida (dados não mostrados) (BETTSWORTH et al., 2001; BUTERA et al., 2003; CARRIER et al., 1995; DUCANCEL et al., 1993; MELO et al., 2007; MÉRIENNE et al., 1997; MOUSLI et al., 2007).

Como alternativa ao vetor pLIP6-GN, os vetores de expressão pET28a e pSMT3 foram escolhidos para a produção do anticorpo scFvLT. O vetor pET28a pertence ao sistema pET de expressão, composto por mais de 40 tipos de plasmídios utilizados na produção de diversas proteínas heterólogas, como também de anticorpos recombinantes, proporcionando a produção da proteína recombinante fusionada a seis resíduos de histidina, que facilitam a sua purificação e detecção. A combinação entre os vetores pET e cepas de *E. coli* geneticamente modificadas possibilitam a expressão da proteína com mais eficiência, facilitando a sua obtenção. Diferentes fragmentos de anticorpos scFvs foram eficientemente produzidos com a utilização do vetor pET28a. GUO et al. (2003) produziram um scFv anti-AIF, através da expressão do fragmento 4c9 clonado em pET28a. Outro scFv produzido com a expressão no vetor pET28a foi o scFv-tP, contra a hemaglutinina (HA) do vírus da gripe aviária H5N1. Ambos os anticorpos recombinantes apresentaram atividades biológicas semelhantes aos anticorpos monoclonais dos quais foram derivados (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; FANG et al., 2003; FURSOVA et al., 2009; GUO et al., 2006; MORI; KIM, 2008; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005; ZHANG et al., 2010).

Além dos resíduos de poli-histidina, alguns vetores de expressão podem produzir a proteína recombinante fusionadas à outra proteína, sendo conhecidos como sistemas de fusão. Diferentes proteínas têm sido utilizadas para promover a solubilidade das proteínas recombinantes, como a MBP (*Maltose binding protein*), a GST (*Glutathione S-transferase*) e a NUS-A (*N-utilizing substance A*). A proteína SUMO (*Small ubiquitin-related modifier*) também possui as mesmas propriedades descritas para as proteínas de fusão acima, mostrando-se eficiente na solubilidade de proteínas, sendo codificada pelo vetor de expressão pSMT3. Além de garantir a solubilidade, o vetor pSMT3 promove altos níveis de expressão da proteína recombinante por possuir o promotor T7, assim como o vetor pET. Uma das maiores vantagens do sistema de fusão SUMO é a sua protease, que remove a proteína SUMO através da clivagem precisa e eficiente ao reconhecer sua estrutura terciária, diferenciando-se das demais proteases de fusão que normalmente reconhecem sequências curtas e degeneradas de peptídeos. A protease SUMO apresenta ainda eficiente atividade de clivagem em diferentes condições de temperatura e pH, enquanto as outras proteases necessitam de condições específicas para que sua atividade seja eficiente. Proteínas de membrana já foram eficientemente produzidas no sistema de fusão SUMO, como também o fragmento de anticorpo scFv anti-VEGF165, que apresentou funcionalidade, altos níveis de expressão e 98% de pureza após a clivagem com a SUMO protease (BUTT et al., 2005; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005a; YE; LIN; LEI, 2008; ZUO et al., 2005).

A eficiência na produção de proteínas heterólogas está na combinação de fatores como o vetor de expressão, a célula hospedeira, a composição do meio de cultura e a temperatura de indução da expressão. Diferentes cepas de *Escherichia coli* podem ser utilizadas para a produção de fragmentos de anticorpos. Inicialmente, as cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysS foram utilizadas para a seleção daquela que apresentasse os melhores níveis de expressão do fragmento scFvLT, tanto para a construção pET-scFvLT quanto para pSMT3-scFvLT. A cepa BL21(DE3) pLysS apresentou níveis de expressão menores que os da cepa BL21(DE3) para ambas as construções, fato que pode ser explicado pelo controle da expressão exercido pela produção da T7 lisozima, o inibidor natural da T7 RNA polimerase, por essa cepa. Diante desse resultado, a cepa BL21(DE3) foi selecionada para a produção do fragmento scFvLT, utilizando-se ambas as construções plasmidiais pET-scFvLT e pSMT3-scFvLT. Posteriormente, a cepa *E. coli* BL21-C43 foi utilizada para a produção do fragmento scFvLT com a construção pET-scFvLT. A cepa BL21-C43 vem sendo utilizada para expressão de proteínas de membrana, como também de proteínas tóxicas que não são expressas em células BL21(DE3). Apesar do fragmento scFvLT não se encaixar em nenhuma

dessas categorias, ela foi utilizada por direcionar a expressão do scFvLT para a fração insolúvel das células, aumentando a concentração da proteína expressa em corpúsculos de inclusão, a partir dos quais o fragmento foi obtido. A seleção da cepa de expressão que garanta a eficiência da produção de fragmentos de anticorpos tem sua importância, já que não há uma cepa padrão para expressão dos mesmos. MENEZES (2010) testou as mesmas cepas de expressões utilizadas neste trabalho para selecionar aquela que produzisse eficientemente o fragmento scFv anti-intimina. Dentre as três cepas testadas, a cepa BL21(DE3) pLysS apresentou maiores níveis de expressão quando comparada à BL21(DE3), enquanto a BL21-C43 apresentou a produção do scFv anti-intimina truncado (HUNT, 2005; MAKINO; SKRETAS; GEORGIOU, 2011; pET SYSTEM MANUAL, 2003; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

Diferentes abordagens foram utilizadas para se obter o anticorpo recombinante scFvLT, a partir da construção pET28-scFvLT, uma vez que o anticorpo scFvLT apresentou-se tanto na fração solúvel (sobrenadante do lisado) quanto na fração insolúvel (corpúsculos de inclusão) das células BL21(DE3) quando expresso. Diversos trabalhos relataram que fragmentos de anticorpos clonados no vetor pET28a eram expressos, principalmente, em corpúsculos de inclusão. Esses agregados constituem uma das limitações apresentada pela expressão de proteína heterólogas em *E. coli*, tornando o processo de purificação mais trabalhoso. A purificação das proteínas agregadas nesses corpúsculos só é possível após a solubilização dos mesmos com agentes desnaturantes, e uma vez desnaturados, um processo de renaturação (*refolding*) é necessário para reconstituir a conformação original da proteína. Em se tratando de fragmentos de anticorpos, a renaturação na conformação original é essencial, pois a ineficiência nesse processo pode resultar em moléculas sem atividade biológica. No entanto, apesar da disponibilidade de diversas metodologias para renaturação na literatura, não há um protocolo universal que possa ser aplicado à todos os fragmentos, já que cada molécula de anticorpo, como também cada fragmento de anticorpo é única. Devido à essa característica dos anticorpos, as metodologias de renaturação devem ser otimizadas para cada molécula (BURGESS, 2009; pET SYSTEM MANUAL, 2003; PHAN et al., 2011; VERMA; BOLETI; GEORGE, 1998).

A primeira metodologia adotada para a recuperação da conformação nativa do anticorpo scFvLT foi a de diluição, por ser um dos processos mais simples de ser realizado. Nesta abordagem, a renaturação do anticorpo foi realizada antes do processo de purificação, com a solubilização dos corpúsculos feita sem o isolamento prévio dos mesmos. O isolamento dos corpúsculos de inclusão é recomendável para diminuir a presença de proteínas

contaminantes que podem induzir a formação de agregados e, conseqüentemente, reduzir a eficiência do processo (CLARK, 1998). Uma vez que proteínas contaminantes foram visualizadas na fração de eluição do scFvLT, através da análise em gel de poliacrilamida-SDS, estas poderiam ter interferido na renaturação do scFvLT, resultando em moléculas inativas.

Pelos testes preliminares de funcionalidade do scFvLT constatou-se que essa abordagem não se mostrou eficiente, já que o anticorpo scFvLT renaturado não foi capaz de reconhecer a toxina LT (dados não mostrados). Uma segunda tentativa de renaturação por diluição foi realizada, utilizando-se a fração insolúvel da expressão do anticorpo scFvLT em células *E. coli* BL21-C43. A expressão do fragmento scFvLT nessa cepa foi totalmente direcionada para corpúsculos de inclusão, diferentemente da expressão na cepa BL21(DE3), aumentando sua concentração. Nesta abordagem, a renaturação por diluição foi semelhante à utilizada na primeira tentativa, com exceção do isolamento prévio dos corpúsculos feito através da lavagem da fração insolúvel das células com tampão contendo ureia, 2-mercaptoetanol e Triton X-100.

Mesmo com a mudança da cepa hospedeira, como também do isolamento prévio dos corpúsculos, essas modificações não foram suficientes para que a conformação correta do fragmento scFvLT fosse alcançada, já que a toxina LT também não foi reconhecida pelo scFvLT renaturado (dados não mostrados). O tampão de renaturação utilizado neste processo, como também o da primeira tentativa estavam isentos de aditivos como L-arginina e glutatona reduzida/oxidada. Esses aditivos facilitam a renaturação das proteínas ao promover a formação das pontes de dissulfeto, prevenir a formação de agregados, além de estabilizar as proteínas renaturadas. A adição desses aditivos no tampão de renaturação do scFv anti-clenbuterol propiciou a sua correta conformação através da renaturação por diluição. A adição desses mesmos aditivos ao tampão de renaturação do scFvLT poderia ter proporcionado as condições necessárias para a recuperação da sua conformação nativa (CLARK, 1998; WANG et al., 2010).

Além da fração insolúvel, o anticorpo scFvLT também foi purificado da fração solúvel de células BL21(DE3) induzidas. Apesar da sua solubilidade quando expresso a 37 °C, esta temperatura parece não ter favorecido a correta conformação do scFvLT, já que este apresentou-se inativo nos testes funcionais de reconhecimento da toxina LT (dados não mostrados). Induções da expressão de proteínas recombinantes em temperaturas abaixo de 37 °C são recomendáveis para o aumento da solubilidade de proteínas heterólogas. CAETANO (2009) obteve um scFv solúvel e funcional contra o vírus da bronquite infecciosa, após a

indução da expressão do fragmento clonado em pET28a a 30 °C. A funcionalidade do anticorpo foi testada por *Immunoblotting*, contra antígenos do vírus da bronquite infecciosa, com o sobrenadante do lisado das células induzidas, sem a purificação prévia do mesmo. Porém, a indução da expressão de proteínas em temperaturas abaixo de 37 °C parece não ser uma regra para garantir a solubilidade e funcionalidade de fragmentos de anticorpos. A indução da expressão a 15 °C não favoreceu a solubilidade do scFv contra *Edwardsiella tarda*, clonado em vetor pET28a. O mesmo só foi obtido após renaturação do scFv expresso em corpúsculos de inclusão (QIN et al., 2010).

Uma vez que a renaturação por diluição não apresentou os resultados esperados, o método de renaturação foi modificado para a obtenção do fragmento scFvLT funcional. Nesta abordagem, corpúsculos de inclusão de células BL21-C43 induzidas foram isolados através de repetidas lavagens com Triton X-100, solubilizados e purificados em coluna de afinidade a Ni^{2+} em condições desnaturantes. Somente após a purificação, o scFvLT foi renaturado através de diálise, para a retirada gradual do agente desnaturante, com sucessivas trocas do tampão de renaturação. Tanto o isolamento dos corpúsculos de inclusão, como também a purificação do scFvLT antes da renaturação podem ter contribuído para que a conformação nativa do anticorpo scFvLT fosse obtida, já que esses dois procedimentos favoreceram a retirada de moléculas contaminantes, que poderiam formar agregados, influenciando na renaturação do scFvLT. A formação de agregados pode ser causada também por altas concentrações da proteína a ser renaturada. A renaturação da proteína em baixas concentrações (10-100 µg/mL) é recomendável para que a formação de agregados seja minimizada, aumentando a eficiência e o rendimento do processo (CABRITA; CHOW; BOTTOMLEY, 2004).

A renaturação por diluição foi realizada com diferentes concentrações do anticorpo scFvLT (3,76 µg/mL; 4,7 µg/mL; 18,8 µg/mL; 37,6 µg/mL; 94 µg/mL e 188 µg/mL). Como nenhuma metodologia para o cálculo da eficiência do processo de renaturação foi utilizada, não foi possível estimar a sua eficiência nas diferentes concentrações de scFvLT submetidas a renaturação. No entanto, os resultados obtidos através do ELISA de captura podem fornecer uma indicação da influência das concentrações do scFvLT no processo de renaturação, já que todas foram testadas e apresentaram diferenças tanto nas absorbâncias quanto nas concentrações mínimas necessárias para o reconhecimento da toxina LT. Ao correlacionarmos as concentrações do scFvLT submetido à renaturação com as absorbâncias obtidas, poderíamos afirmar que a renaturação do scFvLT a 37,6 µg/mL foi a mais eficiente, já que o scFvLT renaturado nessa concentração apresentou as maiores absorbâncias, tanto no

reconhecimento da toxina na forma purificada, quanto da toxina presente no sobrenadante da cepa H10407. A metodologia de renaturação aplicada nessa abordagem mostrou-se eficiente na recuperação da conformação nativa do fragmento scFvLT. Nesta metodologia, a introdução de aditivos como a L-arginina e glutatona oxidada ao tampão de renaturação, em determinadas fases do processo parecem garantir a obtenção da conformação nativa dos fragmentos de anticorpos, já que promovem a formação correta das pontes de dissulfeto, além de evitarem a agregação das proteínas (UMETSU et al., 2003). Outros trabalhos obtiveram fragmentos de anticorpos igualmente funcionais com a adoção desta metodologia (MENEZES et al., 2011; TAPRYAL et al., 2010).

As abordagens utilizadas para a obtenção do scFvLT, utilizando-se a construção pSMT3-scFvLT, consistiram tanto na padronização do processo de purificação, como também no aumento da expressão da proteína SUMO-scFvLT na forma solúvel, já que os ensaios preliminares de indução da expressão a 37 °C, por 3 horas revelaram que grande parte da proteína estava sendo expressa na forma insolúvel. A padronização do processo de purificação, utilizando diferentes metodologias de purificação, como também diferentes concentrações de Imidazol foi necessária para diminuir a presença de proteínas contaminantes observada na fração da eluição. A presença dessas proteínas dificultaria a quantificação da proteína SUMO-scFvLT, necessária para o cálculo da concentração de protease SUMO a ser utilizada para a clivagem da proteína de fusão.

A primeira abordagem para a purificação da proteína SUMO-scFvLT foi realizada por *Batch*, metodologia simples que consiste na separação das frações de lavagem e eluição através da decantação da resina. Apesar da proteína SUMO-PLP2a ter sido satisfatoriamente purificada por essa metodologia (PORTES JUNIOR, 2010), o mesmo não ocorreu na purificação da proteína SUMO-scFvLT, que apresentou não só proteínas contaminantes na fração da eluição, como também a proteína de interesse nas frações das lavagens. Na purificação por *Batch*, o tampão utilizado nas lavagens não pode ser removido totalmente, já que parte dele fica retido na resina. Este fato poderia explicar a presença da proteína de interesse nas frações das lavagens, que corresponderia à proteína recombinante que não se ligou à resina, ficando como resíduo e sendo retirada durante as lavagens (BATCH AND SPIN CUP METHODS FOR AFFINITY PURIFICATION OF PROTEINS, 2002).

Com o intuito de aumentarem-se os níveis de expressão da proteína SUMO-scFvLT na forma solúvel, outras condições de indução foram testadas. Como esperado, a indução da expressão realizada a 20 °C, por 6 horas, com 0,5 mM de IPTG, em meio LB aumentaram os níveis de expressão da proteína SUMO-scFvLT, quando comparada à indução realizada a 37

°C, por 3 horas e 1 mM de IPTG. A combinação entre a baixa temperatura de indução com a diminuição da concentração do indutor parece ter favorecido não só o aumento dos níveis de expressão, como também a solubilidade da proteína, além de diminuir a sua degradação, que pode ser observada na indução realizada a 37 °C. GAO e colaboradores (2010) alcançaram os maiores níveis de expressão da proteína SUMO-CVN utilizando as mesmas condições de temperatura e concentração de IPTG, porém com 24 horas de incubação. Após a indução da expressão sob as novas condições, a purificação da proteína SUMO-scFvLT foi realizada em coluna, na tentativa de diminuir a presença das proteínas contaminantes na fração da eluição. Apesar da modificação da metodologia de purificação, como também da adoção de diferentes concentrações de Imidazol para a lavagem da resina, não foi possível a retirada das proteínas contaminantes.

O aumento nos níveis de expressão de proteínas recombinantes pode ser influenciado não só pela alteração na temperatura e na concentração do indutor, como também pela composição do meio de cultura (MAKINO; SKRETAS; GEORGIOU, 2011). A utilização de meios de cultura ricos, como o 2YT, pode aumentar em até 4 vezes a expressão do scFv na forma solúvel, sendo por isso testado para a expressão da proteína SUMO-scFvLT (KIPRIYANOV, 2009). Esse aumento nos níveis de expressão pode ser constatado ao compararmos a expressão da proteína de interesse nos meios LB e 2YT. Em altas concentrações, mesmo que parte da proteína de interesse seja perdida durante as etapas de lavagem, com tampões contendo concentrações de Imidazol maiores do que as utilizadas, a concentração da proteína ainda ligada à resina seria suficiente para ser eluída, diminuindo assim a concentração das proteínas contaminantes. Outra alternativa para eliminação das proteínas contaminantes seria a utilização de outros métodos de purificação, como gel-filtração e troca-iônica, combinados com a cromatografia de afinidade a Ni^{2+} . Ao utilizarem a cromatografia de afinidade combinada com a de gel-filtração, WU e colaboradores (2009) obtiveram a proteína SUMO-hKGF-2 com 94% de pureza. Já WANG e colaboradores (2010) obtiveram a proteína SUMO-FGF21 com 96,5% de pureza, através da combinação entre a cromatografia de troca-iônica com a de afinidade. A proteína SUMO-scFvLT poderia ainda ser testada, sem a clivagem da proteína de fusão. Fragmentos de anticorpos scFvs produzidos em fusão com a MBP foram testados contra seus antígenos sem que a proteína de fusão fosse retirada, apresentando-se funcionais e estáveis (BACH et al., 2001). No entanto, a presença das proteínas contaminantes poderia interferir na interação entre a toxina LT e o anticorpo SUMO-scFvLT. Apesar de todos os esforços empregados para a padronização do processo de purificação, não foi possível obter a proteína SUMO-scFvLT, que pudesse ser utilizada nos

ensaios de funcionalidade. Somente um fragmento de anticorpo scFvLT funcional foi obtido, apesar de todas as abordagens utilizadas. O scFvLT foi testado para verificar a sua capacidade em reconhecer a toxina LT, como também a de neutralizar sua ação citotóxica. O primeiro ensaio adotado para verificar a capacidade de reconhecimento do scFvLT foi o ELISA de captura, desenvolvido por MENEZES e colaboradores (2006). Neste ensaio, a combinação da fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT com o anticorpo monoclonal anti-LT apresenta 100% de especificidade e 99% de sensibilidade, sendo utilizado em nosso laboratório para identificação de cepas de ETEC produtoras da toxina LT. As absorbâncias obtidas entre a reatividade dos scFvLTs com a toxina LT, presente no sobrenadante da cepa H10407, se mostraram maiores do que as obtidas com a toxina LT purificada. Como o crescimento da cepa H10407 foi feito em condições que aumentassem a expressão da toxina, com a associação entre um meio de cultura que favorecesse sua expressão e uma concentração subinibitória do antibiótico lincomicina, a diferença nas absorbâncias poderia ser explicada pela maior concentração da toxina LT, presente no sobrenadante de cultura, do que a concentração da toxina purificada utilizada, pois a produção de LT pelas cepas de ETEC pode variar entre 5 ng/mL a 2,4 µg/mL (ARIMITSU et al., 2009; LASARO et al., 2006).

Embora a capacidade de reconhecimento do scFvLT nos ensaios de ELISA de captura fosse comprovada, as concentrações necessárias do anticorpo recombinante para a detecção da toxina se mostraram superiores à concentração do anticorpo monoclonal anti-LT utilizada. Enquanto uma concentração de 18,5 µg/mL de anticorpo monoclonal é suficiente para detecção da toxina LT, apresentando absorbâncias superiores a 1, uma concentração 5 vezes maior (100 µg/mL) de scFvLT foi necessária para que uma absorbância de 0,5 fosse obtida. Este fato pode ser explicado pela menor afinidade do scFvLT pela toxina LT, quando comparada ao anticorpo monoclonal, já que a concentração do anticorpo necessária para se ligar ao antígeno é inversamente proporcional à sua afinidade. Quanto maior a afinidade do anticorpo pelo antígeno, menor será a concentração necessária do anticorpo para se ligar a ele (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2008).

Fragmentos de anticorpos quando gerados a partir de hibridomas, parecem apresentar afinidades menores que os anticorpos monoclonais dos quais foram derivados. Essa menor afinidade pode ser atribuída à diminuição da valência do scFv, já que o anticorpo monoclonal apresenta-se bivalente, enquanto o scFv é monovalente (ADAM; SCHIER, 1999). O fragmento de anticorpo anti-digoxina, obtido por HUSTON e colaboradores (1988) através da expressão em *E. coli* e, subsequente renaturação, apresentou especificidades a digoxina e aos glicosídeos cardíacos relacionados a ela, semelhantes às do fragmento Fab 26-10 do qual foi

derivado. Entretanto, o scFv apresentou uma constante de associação 6 vezes menor que o fragmento Fab 26-10. Para comprovarmos a hipótese de que o scFvLT apresenta menor afinidade que o anticorpo monoclonal anti-LT, seria necessário o cálculo da sua constante de afinidade.

A falta de reatividade entre o scFvLT e a toxina LT, presente tanto no sobrenadante de cultura quanto na forma purificada, observada no ensaio de ELISA indireto poderia ser explicada pela utilização de baixas concentrações do scFvLT. Quando o ensaio de ELISA indireto é realizado utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-LT, este é capaz de reconhecer a toxina, embora a concentração necessária seja superior à utilizada no ELISA de captura. Se a mesma proporção 1:5, observada no ELISA de captura, fosse aplicada ao ELISA indireto, seriam necessários 1,2 mg/mL de anticorpo scFvLT para que a toxina LT fosse detectada no ensaio. Como a maior concentração de scFvLT utilizada foi 200 µg/mL, essa se mostrou insuficiente para que a toxina fosse detectada. Apesar do ensaio de ELISA indireto apresentar uma alternativa ao ensaio de ELISA de captura, caso a reatividade do anticorpo scFvLT em concentrações superiores a 200 µg/mL fosse comprovada, a sua utilização em altas concentrações poderia inviabilizar a sua adoção como reagente. No entanto, a padronização da reação utilizando diferentes concentrações do scFvLT contra o sobrenadante da cepa H10407, como também contra diferentes concentrações da toxina LT purificada deverá ser realizado para determinação das melhores concentrações para este ensaio.

Embora a toxina LT não tenha sido detectada pelo scFvLT através do ensaio de ELISA indireto, uma variação deste ensaio, o *immunodot* foi realizado. Diferentemente do resultado obtido com o ensaio de ELISA indireto, a reatividade entre as diferentes concentrações de scFvLT e a toxina LT purificada foi observada, mas o mesmo não ocorreu com a toxina LT presente no sobrenadante da cepa H10407. Este fato poderia ser explicado pela maior concentração da toxina LT purificada utilizada neste ensaio, apresentando-se 5 vezes maior do que a utilizada no ELISA indireto, já que as concentrações do scFvLT foram as mesmas. Apesar da baixa intensidade observada entre a reatividade do anticorpo monoclonal anti-LT e a toxina presente no sobrenadante de cultura da cepa H10407, este foi capaz de detectá-la, como também a toxina na forma purificada, mostrando uma maior sensibilidade que pode ser conferida pela maior afinidade que apresenta pela toxina. Como era esperado, a proteína Esp B foi reconhecida em todas as membranas incubadas com o anticorpo recombinante, já que o anticorpo anti-His foi utilizado para detecção da reação entre o anticorpo scFvLT e o antígeno. A utilização do anticorpo anti-His na reação pode ter

contribuído para uma maior intensidade observada na reatividade entre a toxina e o scFvLT através da amplificação do sinal emitido.

Os resultados obtidos através de ensaio de ELISA de captura e *immunodot* revelaram que o anticorpo scFvLT é capaz de reconhecer a toxina LT. No entanto, através desses ensaios não foi possível determinar em qual subunidade da toxina LT o anticorpo recombinante se liga. Para respondermos a essa questão, o *immunoblotting* utilizando o anticorpo scFvLT foi realizado, após eletroforese da toxina LT em condições redutoras e transferência para membrana de nitrocelulose. Como o anticorpo monoclonal anti-LT é capaz de reconhecer ambas as subunidades, o mesmo era esperado para o scFvLT, porém a reatividade não foi observada. A baixa afinidade do fragmento scFvLT, a alteração na conformação dos epítomos ligantes ou ainda a baixa sensibilidade conferida pelo substrato cromogênico DAB podem ter contribuído para que a reatividade não fosse observada. O aumento da concentração da toxina LT, como também a utilização de sistemas quimioluminescentes para a revelação da reação poderiam ser utilizados para comprovar a ausência ou a presença da reatividade entre o anticorpo scFvLT e as subunidades da toxina LT. Coincidentemente ou não, o scFv-intimina também não foi capaz de reconhecer a intimina purificada por *immunoblotting* (MENEZES et al., 2011).

Em 1974, DONTA e colaboradores descreveram a utilização da cultura de células Y1 para detecção de cepas de ETEC produtoras da toxina LT, devido à alteração morfológica que causa nas células. Desde então esta técnica vem sendo utilizada para detectar e diferenciar cepas de ETEC produtoras das toxinas ST e LT, já que a toxina ST não causa tal alteração. A utilização da técnica de imunofluorescência indireta em células tratadas com a toxina LT permitiu não só a detecção do anticorpo scFvLT que se ligou a ela, como também a visualização da alteração morfológica causada pela toxina. Devido à maior capacidade de penetração do scFvLT, a fluorescência emitida pelas células tratadas com este anticorpo se mostrou mais intensa, quando comparada aos demais anticorpos testados, comprovando a especificidade ao antígeno. Uma vez que a imunofluorescência indireta utilizando células Y1 se mostra muito trabalhosa, uma alternativa seria a utilização desta técnica em células bacterianas. Como a toxina LT na célula bacteriana encontra-se localizada, principalmente, no espaço periplasmático ou associada a vesículas na membrana externa, o teste poderia ser realizado em células permeabilizadas, já que o tamanho reduzido dos scFvs permitiria uma maior penetração nas células, possibilitando a identificação de cepas produtoras da toxina, através da sua ligação à ela (HIRST; RANDALL; HARDY, 1983; KESTY et al., 2004; HOLLIGER; HUDSON, 2005). A técnica de imunofluorescência indireta em células

bacterianas, utilizando scFv, já foi descrita para a detecção da proteína intimina na cepa protótipo de EPEC E2348/69 (MENEZES et al., 2011).

Além da capacidade de reconhecimento do antígeno, outra função atribuída aos anticorpos que foi investigada no scFvLT foi a de neutralização da toxina. O bloqueio da ação da toxina ocorre através da ligação dos anticorpos a ela, prevenindo a sua ligação à seus receptores celulares. A neutralização da toxina LT pode ser observada através da utilização de células Y1, com a incubação prévia da toxina com anticorpos. Embora a ação da toxina LT fosse totalmente neutralizada pela fração enriquecida em IgG de coelho anti-LT, sendo parcialmente neutralizada pelo anticorpo monoclonal anti-LT, o mesmo não foi observado com o anticorpo scFvLT. A concentração de 2,5 µg/mL pode ter sido muito alta para que fosse neutralizada pelo scFvLT, já que concentrações ínfimas de toxina, na escala de picogramas é o suficiente para causar os efeitos citopáticos nas células. A realização de um ensaio de neutralização, no qual as concentrações da toxina LT são variáveis, porém mantendo-se uma concentração do scFvLT fixa poderia comprovar a ação neutralizante do anticorpo recombinante, caso ele a possua. No entanto, se a hipótese da baixa afinidade apresentada pelo scFvLT fosse comprovada, sua atividade neutralizante poderia estar ausente, já que os anticorpos que apresentam alta afinidade a seus antígenos são os que melhor apresentam atividade neutralizante (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ROBERTSON; McDONEL; DORNER, 1985).

Sendo assim, este trabalho permite uma continuidade onde a caracterização funcional do scFvLT, produzido a partir da construção pET-scFvLT, deverá ser realizada através da realização dos seguintes ensaios:

- Determinação da constante de afinidade do anticorpo scFvLT;
- Determinação da sensibilidade e especificidade do ensaio de ELISA de captura, utilizando diferentes cepas de ETEC produtoras ou não da toxina LT;
- Titulação do scFvLT com concentrações superiores a 200 µg/mL contra a toxina purificada LT através do ensaio de ELISA indireto;
- Detecção das subunidades da toxina LT em concentrações superiores a 10 µg/mL, utilizando o scFvLT, através de um sistema de revelação quimioluminescente;
- Técnica de imunofluorescência indireta utilizando cepas produtoras da toxina LT;

- Ensaio de neutralização da toxina LT, utilizando concentrações inferiores a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de toxina;

Além disso, a padronização do processo de purificação da proteína SUMO-scFvLT, como também a sua análise funcional serão necessárias, já que a produção do anticorpo na forma solúvel seria recomendável para minimizar o tempo e os custos para sua obtenção.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- O fragmento variável em cadeia única contra a toxina termo-lábil de *Escherichia coli* Enterotoxigênica foi eficientemente produzido no sistema de expressão *E. coli*;
- A recuperação da conformação nativa do anticorpo scFvLT foi realizada com sucesso, possibilitando a obtenção de uma molécula biologicamente funcional;
- O scFvLT renaturado foi capaz de reconhecer a toxina LT através de ensaios imunossorológicos, porém foi incapaz de neutralizar a atividade citotóxica da toxina nas concentrações utilizadas.

Portanto, neste trabalho obteve-se uma ferramenta com potencial uso para o diagnóstico de cepas de ETEC produtoras da toxina LT.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABU-ELYAZEED, R. et al. Epidemiology of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea in a Pediatric Cohort in a Periurban Area of Lower Egypt. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 382-389, 1999.

ADAMS, G. P.; SCHIER, R. Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. **J. Immunol. Meth.**, v. 231, p. 249–260, 1999.

ANGSTROM, J. et al. Novel carbohydrate binding site recognizing blood group A and B determinants in a hybrid of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B-subunits **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 3231-3238, 2000.

ANGSTROM, J.; TENEBERG, S.; KARLSSON, K. A. Delineation and comparison of ganglioside-binding epitopes for the toxins of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Clostridium tetani*: evidence for overlapping epitopes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 11859-11863, 1994.

ARBABI-GHAHROUDI, M.; TANHA, J.; MACKENZIE, G. Prokaryotic expression of antibodies. **Cancer and Metastasis Rev.**, v. 24, p. 501–519, 2005.

ARIMITSU, H. et al. Lincomycin-induced over-expression of mature recombinant cholera toxin B subunit and the holotoxin in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.**, v. 67, p. 96–103, 2009.

BACH, H. et al. *Escherichia coli* Maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic Single-chain antibodies. **J. Mol. Biol.**, v. 312, p. 79-93, 2001.

BATCH and spin cup methods for affinity purification of proteins. Pierce Biotechnology, Inc., 10/2002.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 10, p. 411-421, 1999.

BHASKARAN, S. et al. A single-chain fragment variable recombinant antibody against F5 fimbria of enterotoxigenic *Escherichia coli* inhibits agglutination of horse red blood cells induced by F5 protein. **Vet. Res. Commun.**, v. 29, p. 463-476, 2005.

BEATTY, M. E. et al. Epidemic Diarrhea due to Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, p. 329–334, 2006.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BEAUSOLEIL, H. E.; LABRIE, V.; DUBREUIL, J. D. Trypan blue uptake by chinese hamster ovary cultured epithelial cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. **Toxicon**, v. 40, p. 185-191, 2002.

BETTSWORTH, F. et al. Functional characterization of two anti-estradiol antibodies as deduced from modelling and sitedirected mutagenesis experiments. **J. Mol. Recognit.**, v. 14, p. 99-109, 2001.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

BOWMAN, C. C.; CLEMENTS, J. D. Differential biological and adjuvant activities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin hybrids. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1528-1535, 2001.

BRANDWEIN, H. et al. Production of neutralizing monoclonal antibodies to *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 47, p. 242-246, 1985.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007.

BURGESS, R. R. Refolding solubilized inclusion body proteins. **Methods Enzimol.**, v. 463, p. 259-282, 2009.

BUTT, T. R. et al. SUMO fusion technology for difficult to express proteins. **Protein Expr. Purif.**, v. 43, p. 1-9, 2005.

BUTERA, D. et al. Cloning, expression and characterization of a bi-functional desintegrin/alkaline phosphatase hybrid protein. **Prot. Expr. Purif.**, v.31, p. 286-291, 2003.

CABRITA, L. D; CHOW, M. K. M.; BOTTOMLEY, S. P. A practical guide to protein expression and refolding from inclusion bodies. **Biotechnol. Annu. Review**, v. 10, p. 31-50, 2004.

CAETANO, A. G. **Produção de fragmentos de anticorpos recombinantes scFv-N e scFv-S1 e suas aplicações na detecção e diferenciação do Vírus da Bronquite Infecciosa.** 2009. 78 f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

CARDOSO, D. F. et al. Neutralizing human anti-crotoxin scFv isolated from a nonimmunized phage library. **Scand. J. Immunol.**, v. 51, p. 337-344, 2000.

CARRIER, A. et al. Recombinant antibody-alkaline phosphatase conjugates for diagnosis of human IgGs: application to anti-HBsAg detection. **J. Immunol. Meth.** v. 181, p. 177-186, 1995.

CARTER, P. et al. High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. **Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 163-167, 1992.

CHAPMAN, P. A.; DALY, C. M. Evaluation of non-radioactive trivalent DNA probe (LT, ST1a, ST1b) for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Pathol.**, v. 46, p. 309-312, 1993.

CHUNG, E. Y. et al. Phage-display derived single-chain fragment variable (scFv) antibodies recognizing conformational epitopes of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B-subunit. **J. Immun. Meth.**, v. 339, p. 115-123, 2008.

CLARK, E. D. B. Refolding of recombinant proteins. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 9, p. 157-163, 1998.

CONROY, P. J. et al. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 10-26, 2009.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 26-38, 2010.

CRYAN, B. Comparison of three assay systems for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 792-794, 1990.

DEAN, A. G. et al. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis.** v. 125: 407-411, 1972.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotech. Advan.**, v. 27, p. 297-306, 2009.

DE MARCO, A. Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. **Microb. Cell Fact.**, v. 10:44, 2011.

DEVASIA, R. A. et al. Endemically Acquired Foodborne Outbreak of Enterotoxinproducing *Escherichia coli* Serotype O169:H41. **Am. J. Med.**, v. 119, p. 168.e7-168.e10, 2006.

DONTA, S. T.; MOON, H. W.; WHIPP, S. C. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. **Science**, v. 183, p. 334-336, 1974.

DORSEY, F. C.; FISCHER, J. F.; FLECKENSTEIN, J. M. Direct delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Cel. Microbiol.**, v. 8, n. 9, p. 1516-1527, 2006.

DUCANCEL, F. et al. Recombinant colorimetric antibodies: Construction and characterization of a bifunctional F(ab)₂/Alkaline Phosphatase conjugate produced in *Escherichia coli*. **Nature Biotech.**, v.11, p. 601 – 605, 1993.

ECKERT, G. U.; SIMON, T. K.; SCROFERNEKER, M. L. Imunidade Humoral. In: SCROFERNECKER, M. L.; POHLMANN, P. R. **Imunologia Básica e Aplicada**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1998. p. 173-189.

EDWARDS, W. H. Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. New York: Elsevier Science, 1986, 529 p.

ELGERT, K. D. **Immunology: Understanding the immune system**. 2nd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009, 726 p.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871, 1971.

ESTRADA-GARCIA, T. et al. Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. Jan, p. 93–98, 2009.

EVANS, D. G., EVANS, D. J. JR; PIERCE, N. F. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 7, p. 873-880, 1973.

EVANS, D. G.; SILVER, R. P.; EVANS, D. J. Jr; CHASE, D. G.; GORBACH, S. L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* Enterotoxigenic for humans. **Infect. Immun.**, v.12, p. 656-667, 1975.

FANG, J.; JIN, H.; SONG, J. Construction, expression and tumor targeting of a scFv against human colorectal carcinoma. **World J. Gastroenterol.**, v. 9, n. 4, p. 726-730, 2003.

FERNÁNDEZ, L. A. Prokaryotic expression of antibodies and affibodies. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 15, p. 364–373, 2004.

FLECKENSTEIN, J. M. et al. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microb. Infect.**, v. 12 , n. 2, p. 89-98, 2010.

FRANKEL, G. et al., Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversives elements. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 911-921, 1998.

FRANZOLIN, M. R. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 359-363, 2005.

FUKUTA, S. et al. Comparison of the Carbohydrate-Binding Specificities of Cholera Toxin and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 7, p. 1748-1753, 1988.

FURSOVA, K. K. et al. Refolding of scFv mini-antibodies using size-exclusion chromatography via arginine solution layer. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 877, p.2045-2051, 2009.

GALBADAGE, T.; JIANG, Z.; DUPONT, H. L. Improvement in detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in patients with Travelers' diarrhea by increasing the number of *E. coli* colonies tested. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 1, p. 20–23, 2009.

GAO, X.; HUANG, Y.; ZHU, S. Construction of murine phage antibody library and selection of ricin-specific single-chain antibody. **IUBMB Life**. n. 48, p. 513-517, 1999.

GAO, X. et al. Soluble cytoplasmic expression, rapid purification, and characterization of cyanovirin-N as a His-SUMO fusion. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 85, p. 1051-1060, 2010.

GIANNELLA, R. A. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins, guanylin, and their receptors: what are they and what do they do? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 125, p. 173-181, 1995.

GIANNELLA, R. A.; DRAKE, K. L.; LUTTRELL, M. Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 33, p. 186-192, 1981.

GOLCHIN, M.; AITKEN, R. Isolation by phage display of recombinant antibodies able to block adherence of *Escherichia coli* mediated by the K99 colonisation factor. **Vet. Imm. Immunopathol.**, v. 121, p. 321-331, 2008.

GOLDHARDT, R.; ECKERT, G. U.; REMIÃO, J. O. Anticorpos. In: SCROFERNECKER, M. L.; POHLMANN, P. R. **Imunologia Básica e Aplicada**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1998. p. 63-80.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby Imunologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002, 662 p.

GUERRANT, R. L. et al. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary morphology: a rapid, sensitive *in vitro* assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 10, p. 320-327, 1974.

GUO, J. et al. Efficient recovery of the functional IP10-scFv fusion protein from inclusion bodies with an on-column refolding system. **Protein Exp. Pur.**, v. 45, p. 168-174, 2006.

GUO, J. et al. Construction and high-level expression of a scFv for acidic isoferitin in *Escherichia coli*. **J. Biotech.**, v. 102, p. 177-189, 2003.

HAGEMEYER, C. E. et al. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents. **Thromb. Haemost.**, v. 101, p. 1012-1019, 2009.

HE, M.; TAUSSIG, M. J. Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for *in vitro* display and evolution of antibody combining sites. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 5132-5134, 2002.

HIRST, T. R.; RANDALL, L. L.; HARDY, S. J. S. Cellular location of heat-labile enterotoxin in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 157, n. 2, p. 637-642, 1984.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n. 9, p. 1126-1136, 2005.

HOLLIGER, P.; BOHLEN, H. Engineering antibodies for the clinic. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 18, p. 411-419, 1999.

HOLMGREN, J. et al. Comparison of receptors for cholera and *Escherichia coli* enterotoxins in human intestine. **Gastroenterology.**, v. 89, p. 27-35, 1985.

HOLMGREN, J. et al. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. **Infect. Immun.**, v. 38, p. 424-433, 1982.

HOLMGREN, J.; SVENNERHOLM, A. M. Enzyme-linked immunosorbent assays for cholera serology. **Infect Immun.**, v. 7, p. 759-763, 1973.

HONDA, T. et al. Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 13, p. 1-5, 1981.

HU, S. et al. Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris*. **Protein Expr. Purif.**, v. 47, p. 249-257, 2006.

HUNT, I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. **Protein Exp. Purif.**, v. 40, p. 1-22, 2005.

HUSTON, J. S. et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of a specific activity in an anti-digoxin single chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 5879-5883, 1988.

ITO, T.; KUWAHARA, S.; YOKOTA, T. Automatic and manual latex agglutination tests for measurement of cholera toxin and heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 17, p. 7-12, 1983.

JAIN, S. et al. An Outbreak of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Associated with Sushi Restaurants in Nevada, 2004. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, p. 1-7, 2008.

JOOSTEN, V. et al. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. **Microbial Cell Factories**, v. 2, n. 1, 2003.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-138, 2004.

KESTY, N. C. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. **EMBO J.**, v. 23, 4538-4549, 2004.

KÜHNE, S. A. et al. Isolation of recombinant antibodies against EspA and intimin of *Escherichia coli* O157:H7. **Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 7, p. 2966-76, 2004.

KIPRIYANOV, S.M. High-level periplasmic expression and purification of scFvs. In: AITKEN, R. (Ed.), **Antibody Phage Display**, New York: Human Press, 2009. p. 205 - 214.

KIPRIYANOV, S. M.; LE GALL, F. Generation and production of engineered antibodies. **Mol. Biotech.** v. 26, p. 39-60, 2004.

KIPRIYANOV, S. M.; LITTLE, M. Generation of recombinant antibodies. **Mol. Biotechnol.**, v. 12, p. 173-201, 1999.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

KORTT, A. A. et al. Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. **Protein Eng.**, v. 10, n. 4, p. 423-433, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBERSKI, J. A.; THOMPSON, N. E.; BURGESS, R. R. Expression and purification of a single-chain variable fragment antibody derived from a polyol-responsive monoclonal antibody. **Protein Exp. Purif.**, n. 47, p. 82-92, 2006.

LASARO, M. A. S. et al. Production and release of heat-labile toxin by wild-type human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 123-131, 2006.

LEONG, S. S. J.; CHEN, W. N. Preparing recombinant single chain antibodies. **Chem. Engin. Science**, v. 63, p. 1401 – 1414, 2008.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, p. 377-389, 1987.

LEVINE, M. M. et al. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microbiol. Rev.**, v. 47, p. 510-550, 1983.

LEUNG, D. T. et al. A human and a mouse anti-idiotypic antibody specific for human T14(+) anti-DNA antibodies reconstructed by phage display. **Gene**, v. 255, p. 373-380, 2000.

LIPMAN, N. S. et al. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR Journal**, v.46, n. 3, p. 258-268, 2005.

MA, Y. et al. Engineering an anti-Stx2 antibody to control severe infections of EHEC O157:H7. **Immunol. Lett.**, v. 121, n. 2, p. 110-115, 2008.

MAK, T. W.; SAUNDERS, M. E. **Primer to the immune response**. China: Elsevier, 2008, 436 p.

MAKINO, T.; SKRETAS, G.; GEORGIOU, G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. **Micrb. Cell Fac.**, v. 10, 2011.

MAYNARD, J.; GEORGIOU, G. Antibody engineering. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 02, p. 339-76, 2000.

MAZARIEGO-ESPINOSA, K. et al. Longus, a Type IV Pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli*, is Involved in Adherence to Intestinal Epithelial Cells. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 11, p. 2791-2800, 2010.

McKINNEY, M.; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **J. Immunol. Meth.**, v. 96, p. 271-278, 1987.

MELO, F. H. M. et al. Biological applications of a chimeric probe for the assessment of Galectin-3 ligands. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 55, n. 10, p. 1015–1026, 2007.

MENEZES, C. A. et al. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin (LT-I) for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 875 – 880, 2006.

MENEZES, C. A. et al. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. suppl 1, p. 11-13, 2003.

MENEZES, C. A. et al. Inhibition of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by neoglycoprotein and anti-lectins antibodies which mimics GM1 receptor. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 216, p. 67 –70, 2002a.

MENEZES, C. A. **Anticorpos monoclonais para detecção de amostras de *Escherichia coli* produtoras de ST-I e LT-I**. 2002. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002b.

MENEZES, M. A. et al. Cloning approach and functional analysis of anti-intimin single-chain variable fragment (scFv). **BMC Research Notes**. v. 4, n. 30, 2011.

MENEZES, M. A. **Anticorpos anti-intimina: análise da reatividade dos anticorpos policlonal e monoclonal, clonagem e expressão do fragmento variável de cadeia simples (scFv) do anticorpo monoclonal**. 2010. 126 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MÉRIENNE, K. et al. The functional architecture of an acetylcholine receptor-mimicking antibody. **The J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 38, p. 23775–23783, 1997.

MILLAR, D. G.; HIRST, T. R.; SNIDER, D. P. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit is a more potente mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3476-3482, 2001.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J. Mol. Biol.**, v. 260, n. 3, p. 289-298, 1996.

MORI, K.; KIM, Y. U. Molecular cloning and characterization of a single-chain variable fragment antibody specific for Benzoyllecgonine expressed in *Escherichia coli*. **J. of Microbiol.**, v. 46, n. 5, p. 571-578, 2008.

MOSELEY, S. L. et al. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. **J. Infect. Dis.**, v. 142, p. 892–898, 1980.

MOUSLI, M. et al. Recombinant single-chain Fv antibody fragment–alkaline phosphatase conjugate: A novel *in vitro* tool to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. **J. Virol. Meth.**, v. 146, p. 246–256, 2007.

MULLER, B. H. et al. Recombinant single-chain Fv antibody fragment–alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization. **J. Immunol. Meth.**, v. 227, p. 177–185, 1999.

MÜLLER, D. et al. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. **Applied Environ. Microbiol.**, v. 73, N. 10, p. 3380–3390, 2007.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Janeway's Immunobiology**. 7th ed. Estados Unidos da América: Garland Science, 2008, 887 p.

NAIR, G. B.; TAKEDA, Y. The heat-stable enterotoxins. **Microb. Pathog.**, v. 24, p. 123–131, 1998.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 142–201, 1998.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P. A.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 829–831, 1987.

NELSON, P. N. et al. Demystified... Monoclonal antibodies. **J. Clin. Pathol.**, v. 53, p. 111–117, 2000.

NORTON, E. J. et al. RASA, a single-chain variable fragment (scFv) antibody direct against the human sperm surface: implications for novel contraceptives. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 1854–1860, 2001.

ORLANDI, P. A.; CRITCHLEY, D. R.; FISHMAN, P. H. The heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* binds to polylactosaminoglycan-containing receptor in CaCo-2 human intestinal epithelial cells. **Biochemistry**, v. 33, p. 12886–12895, 1994.

pET system manual. 10th ed. Novagen, 2003.

PETRENKO, V. A.; SOROKULOVA, I. B. Detection of biological threats. A challenge for directed molecular evolution. **J. Microbiol. Meth.**, v. 58, p. 147–168, 2004.

PHAN, J. et al. Refolding Your Protein with a Little Help from REFOLD. In: HILL, A. F. et al. **Protein Folding, Misfolding, and Disease: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. New York: Human Press, 2011, p. 45–57.

PORTES JUNIOR, J. A. **Deteção da proteína PLP2 em glioblastomas**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PUCCA, M. B. et al. Therapeutic monoclonal antibodies: scFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 47, n. 1, p. 31–39, 2011.

PUIGBÒ, P. et al. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, Web Server issue, p. w126–w131, 2007.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 465-483, 2005.

QIN, H. et al. Production of an anti-idiotypic antibody single chain variable fragment vaccine against *Edwardsiella tarda*. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 42, p. 129–136, 2010.

RAPPUOLI R. et al. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. **Immun. Today**, v. 20, p. 493-500, 1999.

RASHEED, J. K.; GUZMAN-VERSEZCO, L. M.; KUPERSZTOCH, Y. M. Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Echerichia coli*: evidence of extracellular processing. **Mol. Microbiol.**, v. 4, p. 265-273, 1990.

RECOMBINANT phage antibody system. GE Healthcare, 2002.

RILEY, L. M. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New Engl. J. Med.**, v. 308, p. 681-685, 1983.

ROBERTSON, D. C.; MCDONEL, J. L.; DORNER, F. *E. coli* heat-labile enterotoxin. **Pharmac. Ther.**, v. 28, p. 303-339, 1985.

RODRIGUES, M. L. et al. Engineering a humanized bispecific F(ab')₂ fragment for improved binding to T cells. **Int. J. Cancer Suppl.** v. 7, p. 45-50, 1992.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 6th Ed. Londres: Mosby, 2001, 480 p.

SACK, D. A. et al. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxins. **J. Clin. Microbiol.**, v. 11, p. 35-40, 1980.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2344 p.

SCALETISKY, I. et al. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 645-648, 2002.

SCHMITT, C. K.; MEYSICK, K. C.; O'BRIEN, A. D. Bacterial toxins: friends or foes?. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, n. 2, p. 224- 234, 1999.

SHAH, N.; DUPONT, H. L.; RAMSEY, D. J. Global Etiology of Travelers' Diarrhea: Systematic Review from 1973 to the Present. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 4, p. 609–614, 2009.

SIXMA, T. K. et al. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. **Nature**, v. 351, p. 371-377, 1991.

SPATS, S. I. et al. Generation of chicken single-chain antibody variable fragments (scFv) that differentiate and neutralize infectious bursal disease virus (IBDV). **Arch. Virol.**, v. 148, p. 497-515, 2003.

SO, M.; MCCARTHY, B. J. Nucleotide sequence of transposon Tn1681 encoding a heat-stable toxin (ST) and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 4011-4015, 1980.

SOMMERFELT, H. et al. Evaluation of DNA-DNA hybridization for the direct detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool blots. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 25, p. 457-463, 1993.

SØRENSEN, H. P. Towards universal recombinant protein expression. **Microb. Cell Fac.**, v. 9, n. 27, 2010.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J. Biotech.**, n. 115, p. 113-128, 2005.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microb. Cell Fac.**, v. 4, 2005a.

SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 622-647, 1992.

SVENNERHOLM, A. M. et al. Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* heat-stable toxin (STa) and their use in a diagnostic ST ganglioside GM1-Enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 2, p. 585-590, 1986.

SVENNERHOLM, A. M.; WIKLUND, G. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 17, p. 596-600, 1983.

SVENNERHOLM, A. M.; HOLMGREN, J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA). **Cur. Microbiol.**, v. 1, p. 19-23, 1978.

STACY-PHIPPS, S.; MECCA, J. J.; WEISS, J. B. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect Enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 5, p. 1054-1059, 1995.

TAPRYAL, S. et al. Cloning, expression and efficient refolding of carbohydrate-peptide mimicry recognizing single chain antibody 2D10. **Protein Expr. Purif.**, v. 72, p. 162-168, 2010.

TENEBERG, S. et al. Characterization of binding of Gal-beta-4GlcNAc-specific lectins from *Erythrina cristagalli* and *Erythrina corallodendron* to glycosphingolipids. Detection, isolation, and characterization of a novel glycosphinglipid of bovine buttermilk. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 8554-8563, 1994.

THOMPSON, M. R.; GIANNELLA, R. A. Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. **Infect. Immun.**, v. 47, p. 834-836, 1985.

TIWARI, A. et al. Enhanced periplasmic expression of high affinity humanized scFv against Hepatitis B surface antigen by codon optimization. **Protein Expr. Purif.**, v. 74, p. 272-279, 2010.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

TSUMOTO, K. et al. Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent – application to a human single-chain Fv fragment. **J. Immun. Meth.**, v. 219, p. 119-129, 1998.

TURNER, S. M. et al. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 263, p. 10-20, 2006.

UMETSU, M. et al. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain fv fragment. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 11, p. 8979-8987, 2003.

VERMA, R.; BOLETI, E.; GEORGE, A.J. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. **J. Immunol. Methods**, v. 216, n. 1-2, p. 165-181, 1998.

WANG, H. et al. Expression and purification of an anti-clenbuterol single chain Fv antibody in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.**, v. 72, p. 26-31, 2010.

WANG, H. et al. High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnol.**, v. 10, n.14, 2010.

WEISS, E.; ORFANOUDAKIS, G. Application of an alkaline phosphatase fusion protein system suitable for efficient screening and production of Fab-enzyme conjugates in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v. 33, p. 43-53, 1994.

WEISSER, N. E.; HALL, J. C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, p. 502-520, 2009.

WENNERAS, C.; ERLING, V. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* –associated diarrhea and carrier state in developing world. **J. Health Popul. Nutr.**, v. 22, p. 370-382, 2004.

WENNERAS, C. et al. Intestinal responses in patients infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* and in vaccinees. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 6234-6241, 1999.

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of *enterotoxigenic Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 10, n. 4, p. 569-584, 1997.

WU, X. et al. Expression and Purification of Human Keratinocyte Growth Factor 2 by Fusion with SUMO. **Mol. Biotechnol.**, v. 42, p. 68–74, 2009.

YANO, A.; ISHIMARU, R.; HUIKATA, R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. **J. Microbiol. Methods**, v. 68, p. 414–420, 2007.

YAVZORI, M. et al. Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Stool Specimens by Polymerase Chain Reaction. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 31, p. 503–509, 1998.

YE, T.; LIN, Z.; LEI, H. High-level expression and characterization of an anti-VEGF165 single-chain variable fragment (scFv) by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 81, p. 311–317, 2008.

YOLKEN, R. H. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 5, p. 439-444, 1977.

ZDANOV, A. et al. Structure of a single-chain antibody variable domain (Fv) fragment complexed with a carbohydrate antigen at 1.7-Å resolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, n. 14, p. 6423-6427, 1994.

ZHANG, T. et al. Generation and characterization of a fusion protein of single-chain fragment variable antibody against hemagglutinin antigen of avian influenza virus and truncated protamine. **Vaccine**, v. 28, p. 3949–3955, 2010.

ZHANG, X. X. et al. Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display. **J. Med. Virol.**, v. 71, p. 511-517, 2003.

ZUO, X. et al. Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. **J. Struct. Funct. Genomics**, v. 6, p. 103–111, 2005.