

HÉRCULES OTACÍLIO SANTOS

**PRODUÇÃO DE CLONES SECRETORES DE
ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA ROTAVIRUS**

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

HÉRCULES OTACÍLIO SANTOS

**PRODUÇÃO DE CLONES SECRETORES DE
ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA ROTAVIRUS**

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.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Neuza M. Frazatti Gallina

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

Santos, Hércules Otacílio.

Produção de clones secretores de anticorpos monoclonais contra rotavírus / Hércules Otacílio Santos. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Neuza Maria Frazatti Gallina.

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: Anticorpos.

Versão do título para o inglês: Production of monoclonal antibodies against rotavirus.

Descritores: 1. Rotavírus 2. Anticorpos monoclonais 3. Camundongos BALB/c 4. Cepa G4 I. Gallina, Neuza Maria Frazatti II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0167/2011



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

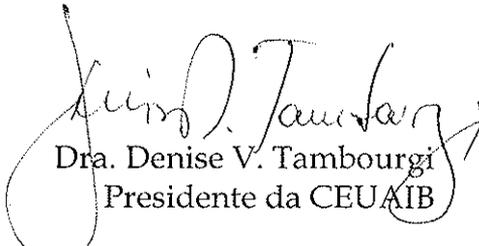
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Produção de clones secretores de anticorpos monoclonais contra Rotavírus”, protocolo nº 784/10, sob a responsabilidade de **Neuza M. Frazatti Gallina**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **09/12/2010**.

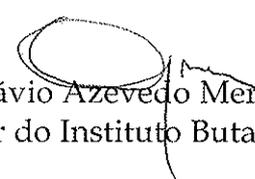
“We certify that the research entitled “Monoclonal antibody against Rotavirus production”, protocol nº 784/10, under the responsibility of Neuza M. Frazatti Gallina, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 12/09/2010”.

Vigência do Projeto: 01/10/2010 a 01/10/2011 Laboratório Experimental de Rotavírus	Nº de animais/espécie 106 / Camundongos BALB/c - F
--	--

São Paulo, 09 de dezembro de 2010.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

A Deus, por me guiar e por me proteger.

A minha mãe, que hoje mora no céu, e que sempre me despertou para a importância dos valores científicos e intelectuais

A minha família e amigos, pelo apoio, amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS** por estar presente em todos momentos na minha vida.

À ciência pelo fascínio dos seus desafios e por me dar a grandiosa oportunidade de fazer algo pela vida.

À minha orientadora Dra. Neuza Maria Frazatti Gallina pela orientação e oportunidade.

À Dra. Yasutaka Hoshino (Rotavirus Vaccine Section Development – National Institutes Health-USA), pela preciosa ajuda, ensinamentos e literatura sobre a glicoproteína VP7.

Ao Dr. Richard Ward e Dra. Monica Malone McNeal (Cincinnati Childre’s Hospital Medical Center-Division of Infections Diseases-USA) pela literatura e conhecimentos sobre imunização com rotavírus.

A Dra. Milene Tino de Franco pela ajuda e sugestões.

Aos meus mestres da Universidade Federal de Viçosa, da Universidade Federal de Lavras e da Universidade de São Paulo, pois para realizar este trabalho usei conhecimentos tão valiosos, também por vocês ensinados.

À fundação Butantan e ao Instituto Butantan pelo suporte financeiro e técnico na realização do trabalho.

Aos colegas e amigos dos laboratórios experimental de rotavírus (Rosana) e Dengue, do Laboratório de Imunopatologia (Maria Christina e Nicole), Laboratório de Imunogenética (Fernanda Ampessam), Laboratório Industrial da Raiva (Daniela, João e Claudia) e controle de qualidade (Patrícia Guglielmi) pela ajuda prestada a este trabalho.

Aos meus amigos da Overall Sports e do Futebol, da Universidade de São Paulo e do Instituto Butantan pela amizade.

As sensações e ambições humanas se perdem no tempo e no espaço, diferentemente, as conquistas da ciência são para todo sempre.

RESUMO

OTACILIO, H. S. **Produção de clones secretores de anticorpos monoclonais para rotavírus.** 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A vacina pentavalente de rotavírus desenvolvida no Instituto Butantan é constituída de cepas vacinais *reassortants* G1, G2, G3, G4 e G9 obtidas de um rearranjo genético entre cepas humanas de rotavírus do grupo A do sorotipo G (D, DS-1, P, ST-3 e AU32) e a cepa bovina *UK-Bovine*. As cepas *reassortants* possuem 11 segmentos gênicos, dos quais dez são provenientes da cepa animal e apenas um segmento da cepa humana, sendo que este último codifica para a glicoproteína VP7. Esta glicoproteína possui determinantes antigênicos em nove regiões variáveis que permitem diferenciar os sorotipos, e é fortemente indutora de anticorpos neutralizantes. Assim, para determinar a potência da vacina pentavalente de rotavírus é necessário a utilização de anticorpos específicos altamente reativos para cada cepa, e com baixa ou nenhuma reatividade para outras cepas presentes na vacina. Neste estudo, com a cepa *reassortant* de rotavírus IB-BRV-4-G4 foi produzida uma suspensão viral em células Vero, que após duas purificações por cromatografia de troca iônica, foi utilizada na imunização de camundongos Balb/c. Esta suspensão viral, após a purificação, foi submetida a diversas provas de controle de qualidade para assegurar a integridade e eficiência das partículas virais. Os camundongos Balb/c foram submetidos a dois esquemas de imunização, um que utilizou somente o antígeno de rotavírus IB-BRV-4-G4 purificado (Esquema1) e outro com o antígeno formulado com adjuvante (Esquema 2). Células do baço dos animais imunizados foram fusionadas com células SP2/O para a obtenção de hibridomas secretores de anticorpos. A reatividade desses anticorpos ao sorotipo de G4 de rotavírus foi testada por ELISA e os hibridomas positivos foram submetidos a duas clonagens sucessivas. Os anticorpos produzidos por estes clones foram então isotipados por ELISA, e caracterizados quanto à especificidade por *Dot* e *Western Blotting*. Três clones secretores de anticorpos monoclonais da classe IgM foram obtidos da fusão realizada com células esplênicas dos animais imunizados sem adjuvante (Esquema1). Com as células dos animais imunizados com antígeno e adjuvante (Esquema 2) foram obtidos 3 clones secretores de anticorpos monoclonais (AcMo), dois da classe IgA e um da subclasse IgG1. Destes últimos, dois anticorpos monoclonais (IgA) reconheceram somente epitopos conformacionais, pois foram reativos somente ao sorotipo G4 de rotavírus por *Dot-blot* em condições não redutoras ou desnaturantes. Entretanto, o AcMo secretado pelo clone 3 (IgG1) reconheceu um epitopo linear, pois foi reativo a proteínas virais também por *Western Blotting*, em uma região de perfil eletroforético coincidente com a glicoproteína VP7 de rotavírus. A análise dos resultados indica que os anticorpos monoclonais obtidos na fusão com células de animais imunizados com antígeno e adjuvante foram específicos para o sorotipo G4, sendo o AcMo IgG1 um forte candidato a ser utilizado nos testes de potência da vacina pentavalente de rotavírus do Instituto Butantan.

Palavras-chave: Cepa G4 *reassortant* de rotavírus. Camundongos Balb/c. Anticorpos monoclonais. Vacina pentavalente de rotavírus.

ABSTRACT

OTACILIO, H. S. **Production of monoclonal antibodies for rotavirus**. 2011. 94 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Pentavalent rotavirus vaccine developed at Instituto Butantan is formulated with five serotypes of rotavirus (G1, G2, G3, G4 and G9) obtained of reassortants between human rotavirus of the group A and G serotypes (D, DS-1, P, ST-3 and AU32) and a strain from bovine (UK-Bovine). These serotypes have 11 gene segments from bovine strain and one from the human. This human gene segment encodes the VP7 glycoprotein responsible for the serotype definition and induction of neutralizing antibodies. Thus, to determine the potency of pentavalent rotavirus vaccine it is necessary to use specific antibodies with a high reactivity for each serotype presented in this product. In this study it was produced a viral suspension in Vero Cells using the IB-BRV-4-G4 reassortant rotavirus strain. This rotavirus suspension was purified twice by ion exchange chromatography and after it was submitted to quality control tests to determine the integrity and efficiency of the viral particles, it was used to immunize Balb/c mice. Two schedules of immunization were used in the animals, one with IB-BRV-4-G4 purified antigen (E1) and other with purified rotavirus antigen and adjuvant (E2). Spleen cells from immunized mice were used in the fusion with SP2/O to obtain hybridomas producer of monoclonal antibodies. The reactivity of these antibodies to G4 serotype of rotavirus was tested by ELISA and hybridomas producers were submitted to two successive cloning. The antibodies produced by these clones were characterized by Dot and Western blotting test and the isotypes determined by ELISA. Three clone producers of monoclonal antibodies of IgM class were obtained of cells from mice immunized only with rotavirus antigen (E1). However, when the spleens cells from animals immunized with rotavirus antigen and adjuvant (E2) were used in the fusion with SP2/O cells it was obtained three clones, two producers the IgA class and one the IgG1 subclass of immunoglobulin. The IgA clones recognized the conformational epitopes because they were reactive to G4 serotype rotavirus antigen only in the Dot-blot test in non-reducing or denaturation conditions. The IgG1 clone recognized a linear epitope because it was also reactive to viral proteins in a region of electrophoresis profile in the Western blotting test that coincided with the glycoprotein VP7 of rotavirus. The analysis of these results indicate that the IgG1 clone obtained from spleens cells of mice that received rotavirus antigen and adjuvant produced monoclonal antibodies specific to G4 serotype of rotavirus. It is a high candidate to be a monoclonal for use in the potency test of pentavalent vaccine.

Keywords: G4 reassortant rotavirus strain. Monoclonal antibodies. Balb/c mice. Pentavalent rotavirus vaccine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo	Anticorpo monoclonal
BSA	Albumina Sérica Bovina
BHK21	Linhagem celular de rim de <i>hamster</i> neonato (<i>Baby hamster Kidney</i>)
cDNA	Ácido Deoxidorribonucléico complementar
CDR	Do inglês, <i>Complementarity determining regions</i>
DNA	Ácido Deoxidorribonucléico
D.O.	Densidade ótica
DMSO	Dimetil sulfóxido
ELISA	Ensaio de imuno-absorção por ligação enzimática.
Fab e F (ab') ₂	Fragmento de digestão enzimática que preservam o sítio combinatório da imunoglobulina
F _C	Fragmento funcional ou fragmento cristalizável que contém a região constante da cadeia pesada da imunoglobulina
FDA	Food and Drug Administration
F _V	Fragmento variável
G1	Sorotipo 1 de rotavírus
G2	Sorotipo 2 de rotavírus
G3	Sorotipo 3 de rotavírus
G4	Sorotipo 4 de rotavírus
G9	Sorotipo 9 de rotavírus
HAMA	Do inglês, <i>Human anti-murine antibody</i>
HAT	Hipoxantina-Aminopterina-Timidina
HGPRT	Do inglês, <i>Hypoxanthine phosphorribosil tranferase</i>
HT	Hipoxantina-Timidina
IgA	Imunoglobulina da classe A

IgD	Imunoglobulina da classe D
IgE	Imunoglobulina classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da subclasse G1
IgG2a	Imunoglobulina da subclasse G2a
IgG2b	Imunoglobulina da subclasse G2b
IgG3	Imunoglobulina da subclasse G3
IgM	Imunoglobulina da subclasse M
K ₀	Estágio dos hibridomas antes da primeira diluição limitante
K ₁	Estágio dos hibridomas após a primeira diluição limitante
K ₂	Estágio dos hibridomas após a segunda diluição limitante
kDa	Kilodalton
L15	Meio de cultura Leibovitz
mA	miliAmpere
mAbs	Do inglês, Monoclonal Antibody
MA-104	Linhagem celular de rim de macaco africano
MEM-E	Meio Essencial Mínimo-Eagle
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NIH	National Institutes of Health
NPS	Proteína não estrutural
NSO	Linhagem celular de mieloma murino
OPD	O-Fenilenodiamina
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PBS-T	Salina Tamponada com Fosfato - Tween
PEG	Polietilenoglicol

RPMI ⁻	Meio de cultura não suplementado com 10% de soro fetal bovino
RPMI ⁺	Meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino
SDS	Dodecil Sufato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS.
RNA	Ácido Ribonucléico
SP2/0-Ag14	Linhagem celular de mieloma derivada de um hibridoma de linfócito B murino.
Vero	Linhagem celular derivada de rim de macaco verde africano
V _H	Domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulinas
V _L	Domínio variável da cadeia leve de imunoglobulinas

LISTA DE SOLUÇÕES

SOLUÇÕES PARA O ENSAIO DE ELISA

Tampão de Diluição de Antígeno (carbonato-bicarbonato)

Bicarbonato de sódio (Merck 6329).....	7,662 g
Carbonato de sódio anidro (Merck 6392).....	0,923 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Acertar para pH 9,0.

Tampão PBS pH 7.4

Fosfato bibásico de sódio anidro (Qeel).....	17,91 g
Cloreto de sódio (Reagen).....	8,8 g
Água destilada q.s.p.1000 MI	1000 mL

Acertar para pH 7,4.

Tampão de Lavagem

Tween 20 (Sigma P 1379).....	1,0 mL
PBS 7,4.....	1000 mL

Tampão de Bloqueio

Leite Desnatado (Molico).....	10 g
PBS 7,4 q.s.p.....	100 mL

Tampão de Diluição de Amostras e Conjugado

Leite Desnatado (Molico).....	10 g
Cloreto de sódio (Reagen).....	2 g
Tween 20 (Sigma P 1379).....	250 µL
PBS 7,4.....	100 mL

Tampão Citrato-Fosfato

Ácido cítrico (Merck 21549)	7,4 g
Fosfato de sódio bibásico (Qeel).....	9,9 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Solução de substrato OPD

Tampão citrato-fosfato.....	25 mL
O-Phenylenediamine Dihydrochloride (Sigma P 8287).....	10 mg
Perhydrol 30% (H ₂ O ₂) (Merck 7209).....	5 µL

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Segmentos genômicos de rotavírus e suas respectivas proteínas estruturais e não-estruturais e funções.....	26
Tabela 2 - Nucleotídeos e aminoácidos idênticos da VP7 de oito diferentes sorotipos de rotavírus.....	37
Tabela 3 - Resultados dos testes de Controle de Qualidade realizados durante o preparo do antígeno purificado.....	65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Dados estimativos da OMS referentes a causas de 10,6 milhões de mortes por ano de crianças menores de 5 anos (média 2000-2003).....	22
Figura 2 - Principais agentes causadores de diarreia no mundo.....	23
Figura 3 - Distribuição mundial dos sorotipos G de rotavírus.....	24
Figura 4 - Estrutura de um rotavírus.....	25
Figura 5 - Estrutura genômica do rotavírus e suas respectivas proteínas estruturais e não estruturais.....	25
Figura 6 - Esquema ilustrativo da construção das cepas <i>reassortants</i> G1, G2, G3, G4, G8 e G9.....	30
Figura 7 - Análise do genótipo das cepas G3 <i>reassortant</i> (cepas <i>UK-bovine</i> x cepa P humana de rotavírus) feita por RNA – hibridização.....	30
Figura 8 - Genotipagem da cepa G4 de rotavírus <i>reassortant</i> (cepas <i>uk-bovine</i> x cepa ST-3 humana de rotavírus) feita por RNA – hibridização.....	31
Figura 9 - Comparação entre as 6 regiões com sequências de aminoácidos divergentes entre 17 cepas humanas e animais de rotavírus.....	34
Figura 10 - Comparação entre as seqüências de aminoácidos de VP7 de 13 cepas de rotavirus dos sorotipos 1, 2, 3, e 4.....	34
Figura 11 - Comparação da sequência de aminoácidos da VP7 de oito diferentes Sorotipos de rotavírus.....	35
Figura 12 - Definição do sorotipo de rotavírus através de resíduos de aminoácidos presentes nas regiões variáveis compreendidas entre os aminoácidos 87-101 e 208-211	36
Figura 13 - Estrutura tridimensional da molécula de IgG.....	42
Figura 14 - Fases da replicação viral de um RNA vírus.....	43
Figura 15 - Esquema de produção de hibridomas.....	48
Figura 16 - SDS – PAGE após coloração pela prata.....	66
Figura 17 - Padronização do ELISA para detecção de anticorpos anti-rotavírus no sobrenadante de cultura de hibridomas.....	67

Figura 18 - Pesquisa de anticorpos anti-substrato celular no soro de animais imunizados com sorotipo G4 de rotavírus.....	67
Figura 19 - Pesquisa de anticorpos no soro dos camundongos antes da imunização com sorotipo G4 de rotavírus.....	68
Figura 20. Titulação de anticorpos no soro dos camundongos imunizados com sorotipo G4 de rotavírus.....	69
Figura 21 - Primeiro teste de ELISA após a fusão.....	70
Figura 22 - Clones entre 24 e 48 horas após a fusão – microscopia ótica aumento de 20X.....	71
Figura 23 - Clones com 72 horas após a fusão – microscopia ótica aumento de 40X....	71
Figura 24 - Avaliação da especificidade do anticorpo monoclonal pela técnica de ELISA.....	72
Figura 25 - Comparação entre valores de D.O. por ELISA de diferentes clones secretores de anticorpos para rotavírus em seus estágios K ₀ , K ₁ , K ₂	73
Figura 26 - Caracterização de anticorpos monoclonais anti-rotavírus.....	73
Figura 27 - Pesquisa de anticorpos no soro dos camundongos antes da imunização com sorotipo G4 de rotavírus.....	75
Figura 28 - Titulação de anticorpos no soro dos camundongos imunizados com sorotipo G4 de rotavírus.....	75
Figura 29 - Primeiro teste ELISA após a fusão utilizando animais do experimento II.....	76
Figura 30 - Comparação entre valores de D.O. por ELISA de diferentes clones secretores de anticorpos para rotavírus em seus estágios K ₀ , K ₁ , K ₂	77
Figura 31 - Caracterização de anticorpos monoclonais anti-rotavírus.....	78
Figura 32 - Análise por <i>Dot Blotting</i> dos anticorpos monoclonais e do soro policlonal de camundongos anti- sorotipo G4 de rotavírus.....	79
Figura 33 - Análise por <i>Western Blotting</i> dos anticorpos monoclonais e do soro policlonal de camundongos anti- sorotipo G4 de rotavírus.....	80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Rotavírus.....	21
1.1.1 Importância no contexto nacional e internacional.....	21
1.1.2 Epidemiologia.....	23
1.1.3 Classificação, estrutura genômica e morfologia.....	24
1.1.4 Fisiopatologia, sinais clínicos, diagnóstico e profilaxia.....	26
1.1.5 Resposta imune aos rotavírus.....	27
1.1.6 Cepas de rotavirus <i>reassortants</i> de interesse no desenvolvimento de monoclonais.....	28
1.1.7 Estudo gênico e estrutural da glicoproteína VP7 das amostras <i>reassortants</i> de rotavírus G1,G2, G3, G4 e G9.....	31
1.1.8 Breve histórico de vacinas para rotavírus e a inserção do Brasil e do Instituto Butantan nesse contexto.....	37
1.2 Anticorpos monoclonais.....	39
1.2.1 Produção do antígeno viral.....	42
1.2.1.1 <i>Multiplicação do antígeno viral em culturas de células.....</i>	<i>42</i>
1.2.1.2 <i>Purificação de antígeno.....</i>	<i>44</i>
1.2.2 Imunização dos animais.....	45
1.2.3 Produção dos clones secretores de anticorpos.....	46
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAIS E METODOS.....	51
3.1 Preparo dos antígenos de rotavírus e do antígeno controle.....	51
3.1.1 Produção do antígeno de rotavírus.....	51
3.1.2 Purificação da suspensão viral de rotavírus.....	51
3.1.3 Preparo do antígeno controle.....	52
3.1.4 Testes controle de qualidade.....	52
3.1.4.1 <i>Teste de Esterilidade Fúngica e Bacteriana.....</i>	<i>52</i>
3.1.4.2 <i>Titulação em células– PFA (Plaque Forming Assay).....</i>	<i>53</i>

3.1.4.3 Dosagem de proteína – Método BCA.....	54
3.1.4.4 SDS-PAGE.....	54
3.1.4.5 DNA residual.....	55
3.1.4.6 Teste de micoplasma.....	55
3.2 Imunização dos animais.....	55
3.2.1 Teste de excreção viral.....	55
3.2.2 Inoculação intraperitoneal do antígeno viral.....	56
3.2.3 Coleta e processamento de sangue.....	56
3.2.4 Titulação de anticorpos por ELISA no soro de animais imunizados com sorotipo G4 de rotavírus.....	57
3.3 Produção de hibridomas.....	57
3.3.1 Descongelamento de células de mieloma SP2/O.....	57
3.3.2 Coleta de células peritoneais de camundongo – <i>Feeder layer</i>	58
3.3.3 Preparo da suspensão celular SP2/O.....	59
3.3.4 Extração de células do Baço.....	59
3.3.5 Fusão.....	59
3.3.6 Padronização do ELISA para dosagem de anticorpos anti-rotavírus.....	60
3.3.7 Clonagem dos hibridomas.....	61
3.3.8 Congelamento de células SP2/0 e hibridomas.....	62
3.3.9 Caracterização e análise da especificidade dos anticorpos monoclonais.....	62
3.3.9.1 <i>Isotipagem</i>	62
3.3.9.2 <i>Dot Blotting</i>	63
3.3.9.3 <i>Western Blotting</i>	63
4 RESULTADOS	65
4.1 Produção do antígeno.....	65
4.2 Padronização do teste de ELISA para dosagem de anticorpos anti- rotavírus....	66
4.3 Experimento I.....	68
4.3.1 Imunização dos camundongos com sorotipo G4 de rotavírus (esquema de imunização 1, sem adjuvante).....	68
4.3.2 Geração de hibridomas.....	69

4.4 Experimento II.....	74
4.4.1 Imunização dos camundongos com sorotipo G4 de rotavírus (esquema de imunização 2, com o adjuvante Marcol/Montanide.....	74
4.4.2 Geração de hibridomas.....	76
5 DISCUSSÃO.....	82
6 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Rotavírus

1.1.1 Importância no contexto nacional e internacional

Estudos de microscopia eletrônica, realizados no início da década de 70, demonstraram a presença de um tipo viral como causador de doença diarreica em crianças e adultos (KAPIKIAN et al., 1972). A partir daí, os rotavírus passaram a ser considerados como os principais agentes causadores de diarreia grave em crianças de até cinco anos (MIDTHUN e KAPIKIAN, 1996).

Os rotavírus são os principais agentes causadores de gastroenterites diarreicas principalmente em crianças com até 5 anos de idade, embora seja bastante comum a ocorrência de infecções em adultos humanos e animais. Dentre os rotavírus, assume importância os causadores de diarreia em crianças, bezerros da Nebraska e filhotes de camundongos e o vírus SA11 de macacos (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Em países desenvolvidos, os rotavírus têm sido responsáveis por aproximadamente 52% dos casos de internação hospitalar de crianças com diarreia aguda. Nos EUA, estima-se que 2.7 milhões de crianças/ano sejam acometidos por diarreias provocadas por rotavírus, levando a um total de 50.000 casos de internação hospitalar e a aproximadamente 20 mortes por ano, o que gera um custo anual de 1 bilhão de dólares com esta doença. Em países em desenvolvimento, os rotavírus são responsáveis por aproximadamente 650.000-800.000 mortes/ano de crianças menores que 5 anos (HOSHINO et al., 2003).

Um estudo publicado em 2009 pela Organização Mundial de Saúde mostra que entre 2001 e 2008 os rotavírus foram responsáveis por aproximadamente 40% das internações hospitalares causadas por diarreia em crianças menores que 5 anos em todo o mundo. Esse estudo ainda relata um total de 527.000 mortes/ano de crianças nesta faixa etária durante esse período, em sua grande maioria em países de baixa renda da África e Ásia (CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, 2009).

No Brasil, diante da grande importância das doenças diarreicas agudas, o Ministério da Saúde criou em 1994 um programa de Monitoramento para estas doenças, o Programa de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas – MDDA. Dados do MDDA mostram que em 2004 ocorreram 2.395.495 casos de diarreia em todo o país, sendo que 321.141 foram na região norte, 955.055 no nordeste, 212.321 no sul, 279.770 no centro-oeste e 586.171 casos

na região sudeste. O estudo ainda relata a ocorrência de 33.533 óbitos de crianças menores de 5 anos, vítimas de diarreias agudas entre 1996 e 2003 (BRASIL, 2008).

Um estudo realizado pela OMS entre 2000 e 2003, com dados estimativos da causa morte de crianças menores que cinco anos em todo o mundo, mostra a importância das doenças diarreicas, principalmente aquelas causadas por rotavírus, que está envolvido em 40% dessas gastroenterites em crianças menores de dois anos (BRYCE et al., 2005).

Estudos estimativos (Figuras 1 e 2) sobre os agentes causadores de diarreia com internação hospitalar em países desenvolvidos e em desenvolvimento apontam o rotavírus como o principal agente etiológico dessa doença (BRYCE et al., 2005).

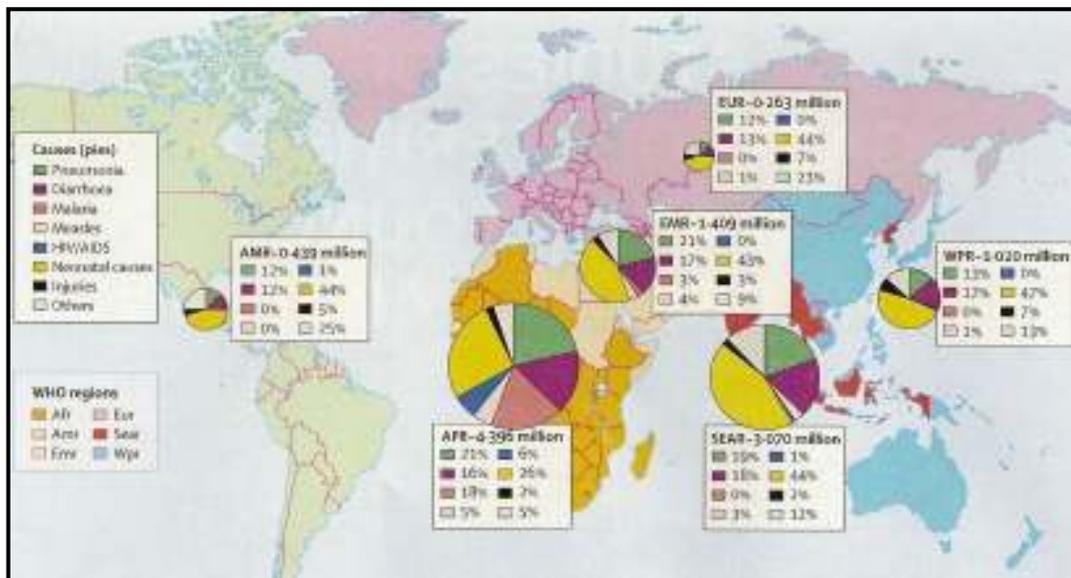


Figura 1 - Dados estimativos da OMS referentes a causas de 10,6 milhões de mortes por ano de crianças menores de 5 anos (média 2000-2003)
Fonte: Bryce et al., 2005.

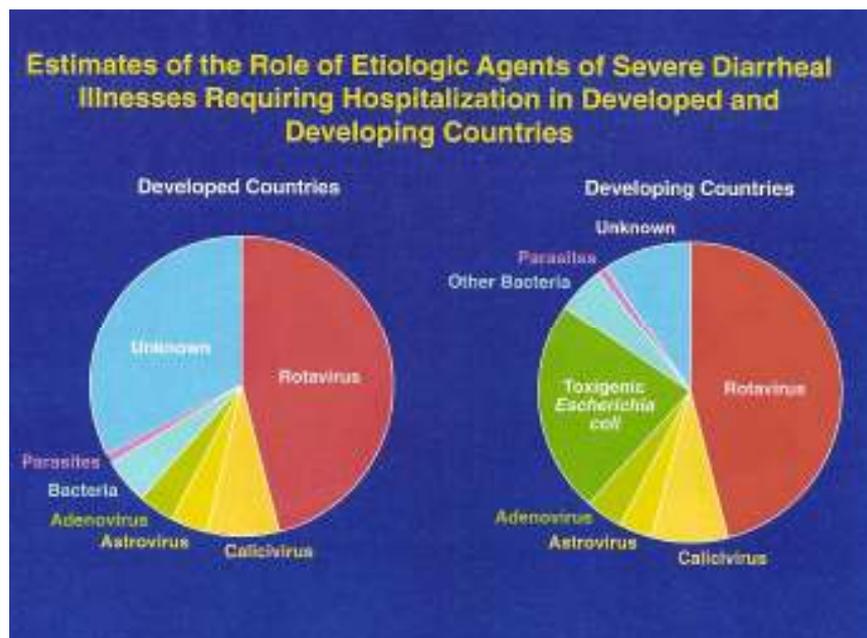


Figura 2 - Principais agentes causadores de diarreia no mundo.
Fonte: Bryce et al., 2005.

1.1.2 Epidemiologia

As rotavíroses possuem um grande significado de mortalidade e morbidade para seres humanos. O gênero *Rotavirus* compreende sete grupos (A-G), sendo o grupo A o responsável por aproximadamente 95% das infecções por rotavírus. Os sorotipos G1, G2, G3 e G4 têm distribuição mundial, G9 é encontrado na Índia, Austrália, Américas (Brasil em 1999 e 2002) e os sorotipos G8 e G5 tem alta prevalência na África e América do Sul, respectivamente (CDC, 2010). Dentre estes, o sorotipo G1 é o de maior incidência em todo o mundo (Figura 3), conforme demonstra um estudo realizado com a coleta e sorotipagem de amostras de rotavírus humanos entre os anos de 1973 e 2003 (SANTOS e HOSHINO, 2005).

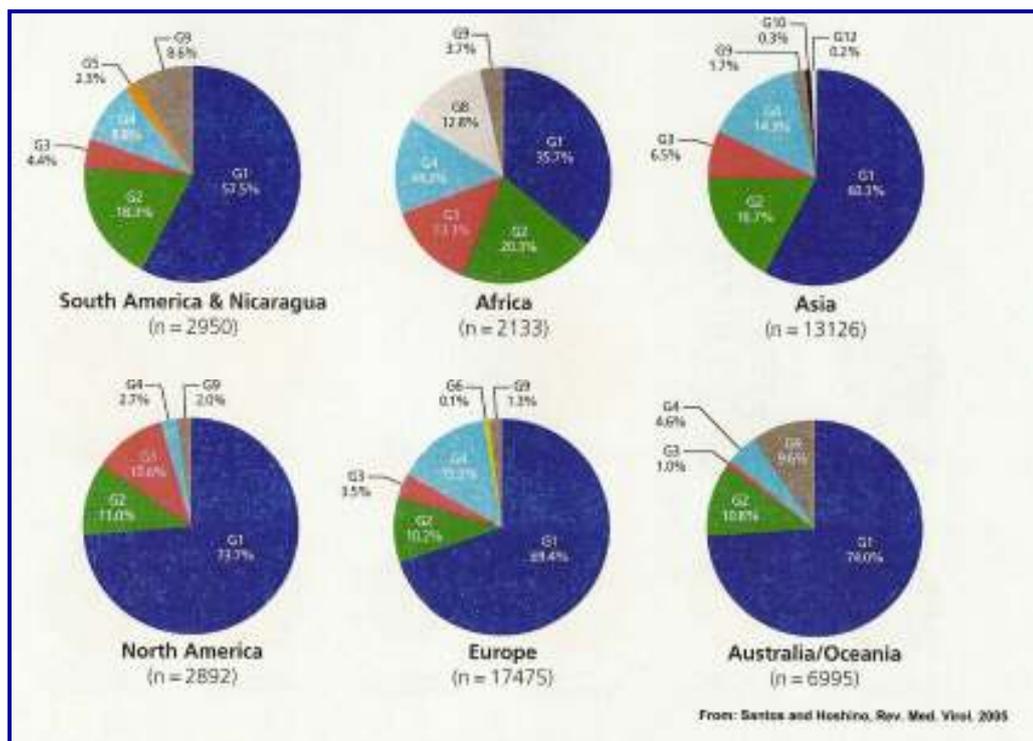


Figura 3 - Distribuição mundial dos sorotipos G de rotavírus
Fonte: Santos e Hoshino, 2005.

1.1.3 Classificação, estrutura genômica e morfologia estrutural

Membro da família *Reoviridae*, o gênero *Rotavirus* possui sete grupos (A-G) determinados por epítomos antigênicos presentes na proteína VP6. Dentre os sete grupos, o grupo A é o de maior importância por ser o principal agente causador de diarreia neonatal em seres humanos e em algumas espécies animais (SANTOS e GOUVEIA, 1997).

O grupo A de rotavírus possui 14 sorotipos e 23 genótipos classificados em função da proteína P (assim denominados em função da sensibilidade de VP4 a proteólise) e 14 sorotipos e genótipos G (assim denominados em função de VP7, que é uma glicoproteína).

Dentre os sorotipos/genótipos G, destacam-se 10 deles (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8, G9, G10, G11 e G12) com grande importância epidemiológica para seres humanos, e dentre os sorotipos/genótipos P, destaca-se o genótipo P[4] e P[8] predominante em seres humanos. Os genótipos P[6] é responsável por um terço das diarreias na África (KAPIKIAN e CHANOK, 1996).

Os rotavírus possuem um RNA de fita dupla segmentado em 11 partes, que codifica para seis proteínas não estruturais (NPS1-NPS6) e seis proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7), dentre as quais a VP6 é a mais abundante e define o grupo antigênico de rotavírus (Figuras 4 e 5). As proteínas VP4 e VP7 estão localizadas no capsídeo externo,

transportam importantes epítomos indutores de anticorpos neutralizantes e são muito importantes para o desenvolvimento de vacinas (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). O capsídeo externo é formado por 780 cópias da glicoproteína VP7 e 120 cópias de VP4 que se organizam em 260 trímeros e 60 espículas virais, respectivamente (JAYARAM; ESTES; PRASSA, 2004). Estas duas glicoproteínas estão intimamente ligadas ao processo de replicação viral (Tabela 1), pois executam importantes funções para a penetração do vírus na célula do hospedeiro (KAPIKIAN e CHANOK, 1996).

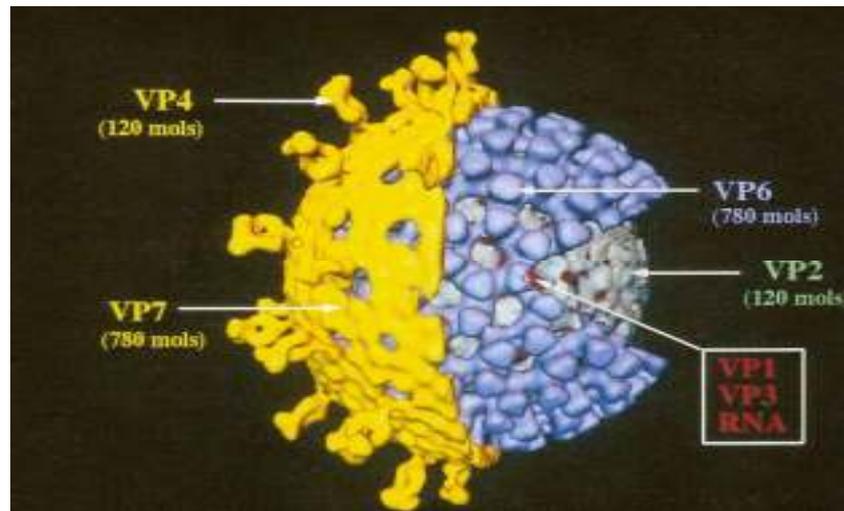


Figura 4 - Estrutura de um rotavírus.
Fonte: CDC, 2010.

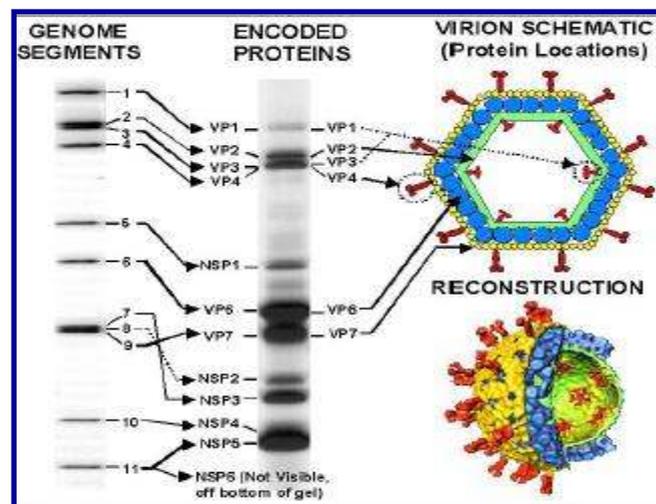


Figura 5 - Estrutura genômica do rotavírus e suas respectivas proteínas estruturais e não estruturais.
Fonte: Mossel, Estes e Ramig, 2003.

Tabela 1 – Segmentos genômicos de rotavírus e suas respectivas proteínas estruturais e não estruturais e funções

Segmento Genômico	Proteína/PM	Função
1	VP1 (125 kDa)	Polimerase. Constituinte da transcriptase e da replicase
2	VP2 (94 kDa)	Fixa os ácidos nucleicos do nucleocapsídeo. Constituinte da transcriptase e da replicase
3	VP3 (88 kDa)	Constituinte da transcriptase e da replicase. Guanilil transferase
4	VP4 (88 kDa)	Hemaglutinina. Antígeno de Neutralização.
5	NSP1 (53kDa)	Fixa o zinco e ácidos nucleicos
6	VP6 (41 kDa)	Antígeno de grupo e subgrupo.
7	NSP3 (34 kDa)	Fixa as extremidades 3'dos RNA mensageiros
8	NSP2 (35 kDa)	Fixa os ácidos nucléicos
9	VP7 (37 kDa)	Antígeno de neutralização
10	NSP4 (28 kDa)	Receptor das partículas no retículo endoplasmático. Enterotoxina viral.
11	NSP6 e NSP5(26 kDa)	-----

VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7: Proteínas estruturais

NSP1-NSP6: Proteínas não estruturais.

Fonte: Kapikian e Chanock, 1996 e Estes, 2001.

1.1.4 Fisiopatologia, sinais clínicos, diagnóstico e profilaxia

A via de contaminação é a oral-fecal, com aparecimento dos sintomas 48 horas após a infecção. Os rotavírus têm forte tropismo por células do intestino delgado, onde provoca descamação com conseqüente perda ou diminuição da capacidade absorptiva (SANTOS e GOUVEIA, 1997). Após a contaminação, o vírus se multiplica nas células do intestino delgado, liberando uma potente enterotoxina (NSP4), com conseqüente morte celular e descamação que comprometem a absorção de sódio e glicose gerando um desequilíbrio osmótico na luz intestinal do indivíduo culminando com uma severa diarreia.

A sintomatologia inclui diarreia, febre, náuseas e dor abdominal com desfecho de pronunciada desidratação que, se não assistida a nível hospitalar pode levar o paciente a óbito.

Estão disponíveis várias ferramentas de diagnóstico, a microscopia eletrônica foi pioneira, seguida de técnicas imunológicas (ELISA, imunofluorescência, APL) até as práticas atuais de PCR, eletroforese e hibridização de RNA viral (OLIVEIRA e LINHARES, 1999).

A profilaxia está concentrada na utilização de programas adequados de vacinação com imunógenos adequados (OLIVEIRA e LINHARES, 1999).

1.1.5 Resposta imune aos rotavírus

Os rotavírus produzem uma resposta imune típica, com produção de inicial de IgM específica, seguida de secreção de anticorpos da classe IgG e IgA. Embora ainda existam questões a serem respondidas ou entendidas sobre a verdadeira amplitude das linhas de defesa na resolução do processo infeccioso e proteção do indivíduo contra infecções por rotavírus, a IgA tem um papel importante na redução da incidência e na gravidade das infecções (DAVIDSON; HOGG; KIRUBAKARON, 1983). Neste caso, não só pela ação da IgA na luz intestinal, mas principalmente pela ação desta no meio intracelular, durante o processo de transcitose da IgA (BURNS et al., 1996).

Vários estudos têm mostrado que embora a IgA desempenhe um papel importante na proteção do indivíduo, ela não o faz isoladamente. Estudos associativos não têm encontrado relação entre altos títulos de anticorpos presente nas fezes e proteção dos indivíduos após imunização oral com rotavírus, o que demonstra a participação de outros mecanismos no processo de proteção (WARD e BERNSTEIN, 1995; WARD et al., 1997; WARD, 2003). A imunidade celular também demonstra exercer um papel importante no processo de proteção do indivíduo nas infecções por rotavírus. Ensaio imunoproliferativos conduzidos com células T do sangue de indivíduos expostos a rotavírus têm demonstrado uma correlação positiva com a quantidade de células de memória LT CD4+ encontradas (OFFIT et al., 1992). Estudos com camundongos BALB/c expostos a rotavírus têm demonstrado o papel essencial de células T CD4+ na resolução do processo infeccioso, muito provavelmente devido à estimulação dessa células sobre células B produtoras de anticorpos (MCNEAL; RAE; WARD, 1997)

Ainda relata-se a detecção altos níveis de interferon gama secretado por células T CD4+ e T CD8+ de indivíduos expostos a rotavírus quando comparados com população controle não exposta. Após aproximadamente 32 dias do início da doença, estes níveis de interferon gama caem para níveis não detectáveis, o que sugere que a população de linfócitos T CD4+ e T CD8+ não estão mais detectáveis no sangue de indivíduos após o transcurso da infecção (JAIMES et al., 2002). Neste momento, cogita-se uma possível ação efetora das

células *natural-killer* na resolução final do processo infeccioso, uma vez que elas têm sido encontradas exercendo papel protetor em outras infecções virais (MCNEAL et al., 1995).

Em relação à imunidade naturalmente adquirida alguns estudos apontam para a necessidade de apenas uma exposição neonatal, em geral assintomática, para conferir proteção contra diarreias graves, enquanto outros estudos apontam para necessidade de duas a três exposições para que o indivíduo esteja protegido contra formas severas de diarreias (OLIVEIRA e LINHARES, 1999).

1.1.6 Cepas de rotavírus *reassortants* de interesse no desenvolvimento de anticorpos monoclonais

O desenvolvimento de vacinas humanas para rotavírus foi um grande desafio devido ao fato de que as cepas virais isoladas de humanos apresentavam um baixo rendimento viral quando multiplicadas em cultura de células nos processos de produção de antígeno vacinal. A consequência disso é a elevação do custo das vacinas (GLASS et al., 2006).

O conhecimento de que cepas animais apresentam satisfatório crescimento em cultura de células foi a base para as próximas tentativas de desenvolvimento cepas vacinais de rotavírus (GLASS et al., 2006).

Assim, pesquisadores do *National Institutes of Health (NIH)* dos Estados Unidos, começaram a trabalhar no desenvolvimento de cepas vacinais de rotavírus utilizando a técnica de rearranjo genético (*reassortant*) entre cepas de rotavírus provenientes de humanos e animais tais como bovinos e macacos (MIDTHUN et al., 1985). As cepas humanas de rotavírus selecionadas para a construção dos rotavírus *reassortant* são do Grupo A e sorotipo G, levando-se em consideração a distribuição mundial destes sorotipos (KAPIKIAM et al., 2005).

Para a construção das cepas vacinais de rotavírus *reassortant* foram utilizadas as cepas de rotavírus humano D (sorotipo -1), DS-1 (sorotipo 2), P (sorotipo 3), ST3 (sorotipo 4), 1290 (sorotipo 8) e AU32 (sorotipo 9) e a cepa animal *UK- Bovine*, resultando respectivamente nas cepas *reassortants* de rotavírus G1, G2, G3, G4, G8 e G9 (Figura 6). Estas preservam apenas um gene de rotavírus humano que codifica para a glicoproteína VP7 e dez genes originários da cepa bovina (HOSHINO et al., 2003; MIDTHUN et al., 1985, 1986). As cepas assim construídas estão sendo utilizadas em projetos internacionais de produção de

vacinas para rotavírus inclusive na produção da vacina pentavalente de rotavírus do Instituto Butantan.

Para tanto e mais detalhadamente, culturas de células *AGMK* (*African green monkey kidney*) foram coinfectadas com cepas de um tipo selvagem de rotavírus animal a cepa *UK-Bovine*, e cepas de rotavírus humano D (sorotipo 1), DS-1 (sorotipo 2), P (sorotipo 3), cepa ST3 (sorotipo 4), cepa 1290 (sorotipo 8) e cepa AU32 (sorotipo 9), em meio Eagle Essencial Mínimo e incubadas a 37 °C por 36 horas. O rotavírus *reassortant* desejado foi selecionado expondo-se a progênie das culturas coinfectadas a anticorpos monoclonais e antissoros com capacidade neutralizar especificamente a cepa *UK-Bovine* e cepas *reassortant* com VP7 de rotavírus bovino. Este antissoro ainda possui uma importante característica para a seleção de cepas *reassortants*, embora ele neutralize VP7 de origem bovina, não neutraliza VP3 (MIDTHUN et al., 1985). Assim, após a coinfecção em cultura de células, a progênie viral de rotavírus *reassortant* foi incubada com o antissoro e anticorpos monoclonais descritos anteriormente, e em seguida inoculadas novamente em uma monocamada de células *AGMK* durante 4 a 5 dias de incubação a 37 °C. Este processo foi repetido mais duas vezes, com o intuito de purificar a progênie viral *reassortant*. Após a última inoculação, o sorotipo foi determinado por *PRNA* (*Plaque Reduction Neutralization Assay*) e confirmado por genotipagem conforme demonstrado nas figuras 7 e 8 (MIDTHUN et al., 1985).

Segundo Hoshino, 2003 o grande objetivo de construir estas amostras *reassortant* é reunir a atenuação implícita nos genes da cepa animal, no caso, dez seguimentos gênicos, com o estímulo a produção de anticorpos neutralizantes provocados pela glicoproteína VP7 das cepas humanas. Assim estas cepas *reassortant* possuem 10 segmentos gênicos de cepas de rotavírus animal e apenas um de cepas de rotavírus humano (Figura 6). Portanto, a única diferença estrutural existente entre as cepas *reassortant* G1, G2, G3, G4, G8 e G9 são regiões específicas da glicoproteína VP7 do capsídeo viral (HOSHINO et al., 2003).

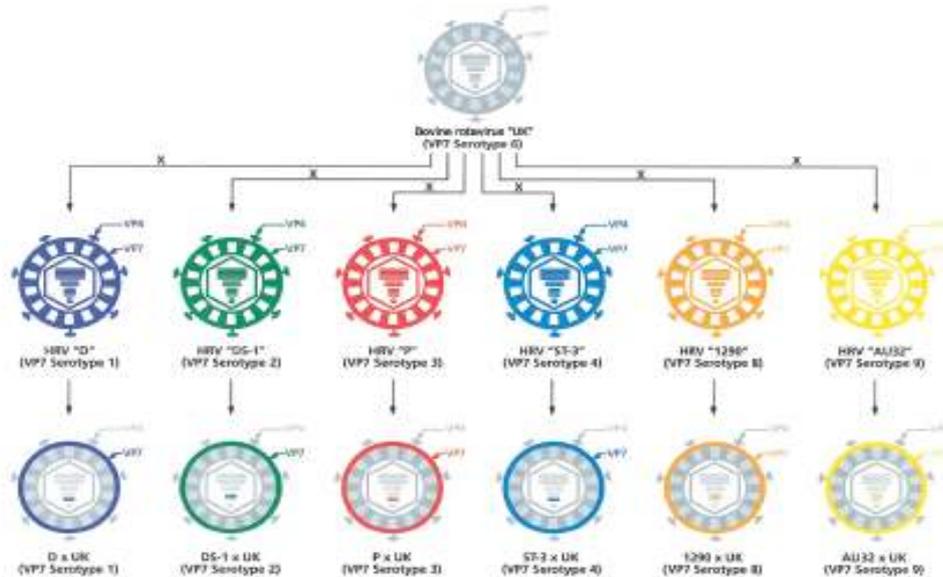


Figura 6 - Esquema ilustrativo da construção das cepas *reassortants* G1, G2, G3, G4, G8 e G9. Apenas o segmento gênico que codifica para glicoproteína VP7 é transferido para as cepas humanas de rotavírus para cepa bovina.
Fonte: Kapikiann et al., 2005.

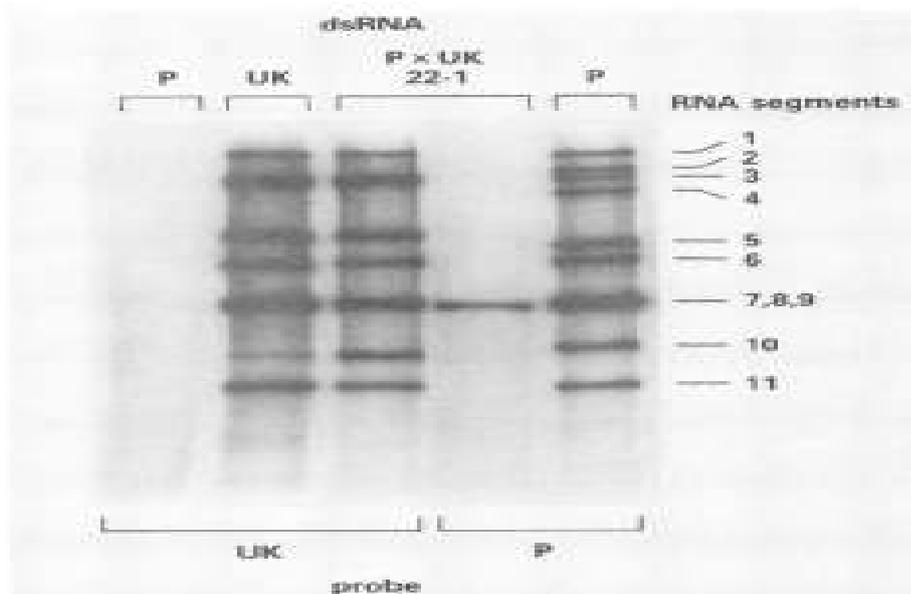


Figura 7 - Análise do genótipo da cepa G3 *reassortant* (cepas *UK-bovine* x cepa P humana de rotavírus) feita por RNA – hibridização. Quando a sonda para cepa bovina é utilizada para cepa humana não há hibridização (P), esta mesma sonda revela todos os 11 segmentos gênicos da cepa *UK-bovine* e 10 segmentos da cepa *P x UK- Bovine*. A sonda para cepa humana identifica os 11 segmentos gênicos da cepa P, porém apenas 1 segmento da cepa *P x UK- Bovine*.
Fonte: Adaptado de Midthun et al., 1986.

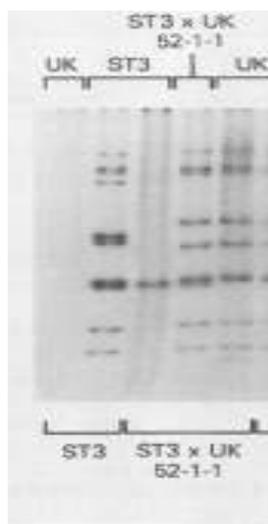


Figura 8 - Genotipagem da cepa G4 de rotavírus *reassortant* (cepas *UK-bovine* x cepa ST-3 humana de rotavírus) feita por RNA – hibridização. Quando a sonda para cepa humana de rotavírus ST3 é utilizada para cepa bovina (*UK-bovine*) não há identificação de nenhum segmento gênico (*UK-bovine*), esta mesma sonda revela todos os 11 segmentos gênicos da cepa humana ST3. Quando a sonda ST3 x UK *reassortant* é utilizada nas cepas ST3, UK-bovine e na ST3 x UK *reassortant* identifica apenas 1 segmento da primeira, 10 segmentos da segunda e todos os 11 segmentos gênicos da terceira cepa.

Fonte: Adaptado de Midthun et al., 1986.

1.1.7 Estudo gênico e estrutural da glicoproteína VP7 das amostras *reassortants* de rotavírus G1, G2, G3, G4 e G9

No início da década de 80 estudos com cepas de rotavírus demonstraram que a expressão segregada de um gene (7, 8 ou 9 dependendo da cepa) para uma glicoproteína do capsídeo viral denominada VP7 resulta em fenótipo de neutralização soro-específica (GREENBERG et al., 1983; KALICA et al., 1981).

Diante dessa descoberta, vários estudos sobre expressão gênica e sequenciamento da glicoproteína VP7 foram conduzidos com o intuito de identificar propriedades funcionais e estruturais que permitissem identificar os vários sorotipos de rotavírus, com destaque para os sorotipos humanos (GLASS et al., 1985).

Estudos comparativos analisando a sequência de aminoácidos da glicoproteína VP7 de rotavírus humano e bovino mostraram a existência de regiões divergentes nesta sequência e sugerem que estas regiões seriam sítios antigênicos (GLASS et al., 1985; GORZIGLIA et al., 1986; MASSON et al., 1985). Glass et al. (1985), ainda propõem que estas regiões soro-específicas, denominadas A, B, C, D, F, E e F, estão compreendidas entre os aminoácidos 30-50, 87-101, 120-130, 143-152, 208-221 e 233-242 respectivamente. Estas mesmas seis regiões estão correlacionadas com as encontradas por Green et al. (1987), ao comparar

sequências de aminoácidos de VP7 de rotavírus humano, sorotipos 1, 2, 3 e 4, deduzidas após sequenciamento (Figura 9). Esta comparação ainda revela que estas regiões possuem um alto grau de homologia dentro de um mesmo sorotipo (entre 91-99%), que as diferenças específicas entre os sorotipos de rotavírus podem ser resultado de sequências divergentes em discretas regiões do gene que codifica a VP7, e que estas regiões são altamente conservadas dentro do mesmo sorotipo. Neste estudo a cepa D mostra uma homologia de 95 a 100% com cepas do mesmo sorotipo 1. Porém, quando comparada com cepas de outros sorotipos revela menores graus de homologia. Percebe-se que esta cepa possui 75% de homologia com cepa DS1 (sorotipo 2), 83% com a cepa P (sorotipo 3) e 77% com a cepa ST3 (sorotipo 4) (GREEN et al., 1987). Além disso, os sítios de glicosilação da glicoproteína VP7 possuem pontos comuns e divergentes entre sorotipos, observa-se que o sítio de glicosilação nos resíduos 69-71 é comum para todas as cepas, enquanto que o sítio nos resíduos 146 e 148 está presente apenas em cepas do sorotipo 2 e o sítio nos resíduos 238-240 está presente no sorotipo 1 e 2, e nas cepas P e ST3 (Figura 10) (GREEN et al., 1987).

Três dessas divergentes regiões correspondem às três regiões (aminoácidos 87-96-VR5, 145-150-VR6 e 211-223-VR8) identificadas por Dyall-Smith et al., 1986, como potenciais epítomos de neutralização, determinados por estudos com mutantes de SA-11 resistentes a neutralização por anticorpos monoclonais. Este estudo ainda ressalta que dentre as três regiões, a região de aminoácidos 211-223 é a mais importante na determinação do sorotipo e que existe forte indicação de dobra tridimensional aproximando a primeira região (aminoácidos 87-96) com a terceira (aminoácidos 211-223).

Em outro estudo feito por Green et al., 1989, o sequenciamento do gene que codifica VP7 de cepas de rotavírus humano, sorotipos 9 e 8, e a deduzida sequência de aminoácidos de VP7 destas cepas W161 e F45 (sorotipo 9) e a cepa 69M (sorotipo 8), quando comparados com cepas dos sorotipos 1, 2, 3 e 4 de rotavírus humano revela a existência de mais três regiões divergentes entre estes sorotipos. Estas regiões foram denominadas VR1, VR2, VR3, VR4, VR5, VR6, VR7, VR8 e VR9, sendo que seis destas regiões estão correlacionadas com as anteriormente determinadas, bem como seus pontos de glicosilação (figura 11). Este estudo ainda estabelece a porcentagem de aminoácidos e os nucleotídeos do gene de VP7 (entre os nucleotídeos 49-1026) idênticos entre cepas de rotavírus dos sorotipos humanos 1, 2, 3, 4, 8 e 9, bem como das cepas de origem animal (Tabela 2) (GREEN et al., 1989).

Estes resultados vão de encontro ao estudo de Nishikawa et al., 1989, que ao mapearem sítios antigênicos de VP7 do sorotipo 3 de cepas humanas e animais de rotavírus

encontram regiões divergentes correlacionadas e ainda observa-se um alto grau de similaridade nas sequências de aminoácidos de VP7 de cepas da mesma espécie animal quando comparadas com cepas que acometem outras espécies animais, o que sugere um caráter espécie específico da sequência de aminoácidos da glicoproteína VP7.

Os vários estudos analisando a sequência gênica da glicoproteína VP7 e a correspondente sequência de aminoácidos, bem como o mapeamento de sítios antigênicos desta glicoproteína permitem concluir que é possível determinar o sorotipo de rotavírus através do sequenciamento do gene de VP7. Esses estudos demonstraram que dois sítios antigênicos desta glicoproteína compreendidos entre os aminoácidos 87-101 e 208-221 possuem resíduos nas posições 94, 96 e 211 altamente conservados dentro do mesmo sorotipo e divergente entre os sorotipos, conforme mostra figura 12 (GREEN et al., 1988). Porém, estudos posteriores com vírus submetidos a mutações controladas mostram que as regiões variáveis compreendidas entre os aminoácidos 87 a 100, 209 a 223 e 235 a 242 são monotipo específicas, sorotipo específicas ou de neutralização cruzada entre os sorotipos, ou seja, estas regiões permitem distinguir vírus do mesmo e de diferentes sorotipos e pode proporcionar reações cruzadas entre os sorotipos (HOSHINO et al., 1994).

Estudos específicos com amostras do sorotipo 4 de rotavirus mostram que substituições de aminoácidos nos sítios antigênicos das regiões entre os aminoácidos 87 a 100, 142 a 152, 208 a 221 e 235 a 245 permitem distinguir os subtipos ou monotipos a e b, sendo a primeira região a mais importante nesta determinação, o que provavelmente coloca esta região como sendo a mais importante na distinção deste sorotipo (COULSON et al., 1996).

Os vários estudos realizados até o momento mostram que os sorotipos de rotavirus podem ser distinguidos por variações na sequência de aminoácidos em regiões antigênicas da glicoproteína VP7, e que nestas mesmas regiões podem ocorrer reações cruzadas entre os sorotipos quando submetidos a estudos com anticorpos ou soro imunes específicos (HOSHINO et al., 1994). Isso dificulta bastante a produção de um anticorpo monoclonal para um sorotipo específico de rotavírus que não reaja com os outros sorotipos. Para os rotavírus *reassortant* esse grau de dificuldade aumenta ainda mais, pois a estrutura destes vírus é diferente somente para glicoproteína VP7, todo o restante da estrutura viral é idêntica, pois possuem 10 genes da cepa *UK- bovine* e apenas 1 gene do sorotipo humano.

SEROTYPE	Cepa	A		B		C		D		E		F																
		39	50	87	101	120	130	143	152	208	221	233	242															
1	D	L	E	T	A	S	T	E	A	S	T	I	N															
	MO																
	H37																
	MA																
2	DS1	L	L	A	L	S	P	F	V	-	T	A	-	K	N	E	-	S	-	D	E	-	E	N	T			
	HN126				
	HU5				
	S2				
3	P	-	-	I	-	S	P	-	L	N	-	-	-	A	E	-	-	-	-	H	S	-	-	T				
	RRV				
	SA11				
4	ST3	F	-	I	-	V	-	S	-	V	-	S	-	S	-	H	-	-	-	S	-	P	-	-	T			
	VA70				
5	OSU	-	V	-	V	-	A	P	-	I	K	-	-	-	N	-	A	-	E	-	A	-	T	K	-	T	E	T
	NC0V
	RF
6	UK

Figura 9 - Comparação entre as 6 regiões com seqüências de aminoácidos divergentes entre 17 cepas humanas e animais de rotavírus. Todas as cepas foram comparadas tendo com base a cepa D (sorotipo1). Apenas os aminoácidos divergentes foram mostrados.
 Fonte: Adaptado de Green et al., 1987

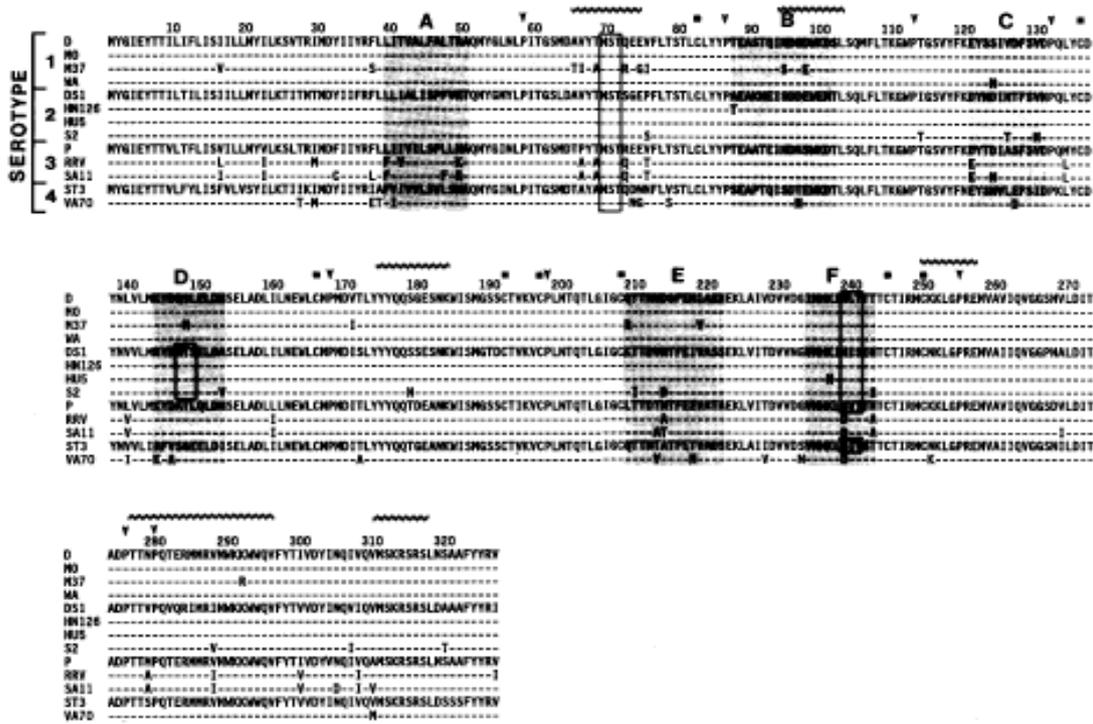


Figura 10 - Comparação entre as seqüências de aminoácidos de VP7 de 13 cepas de rotavírus dos sorotipos 1, 2, 3 e 4. A seqüência de aminoácidos de cada cepa foi comparada somente com cepas presentes no seu sorotipo. Cisteínas (▼), prolinas (■) e regiões hidrofílicas (~) são conservadas em todas as cepas. Sítios de glicosilação são mostrados em retângulos e as seqüências de aminoácidos divergentes A, B, C, D, E e F (intervalos de aminoácidos 39-50, 87-101, 120-130, 143-152, 208-221 e 233-242 respectivamente) são mostradas em escuro.
 Fonte: Adaptado de Green et al., 1987

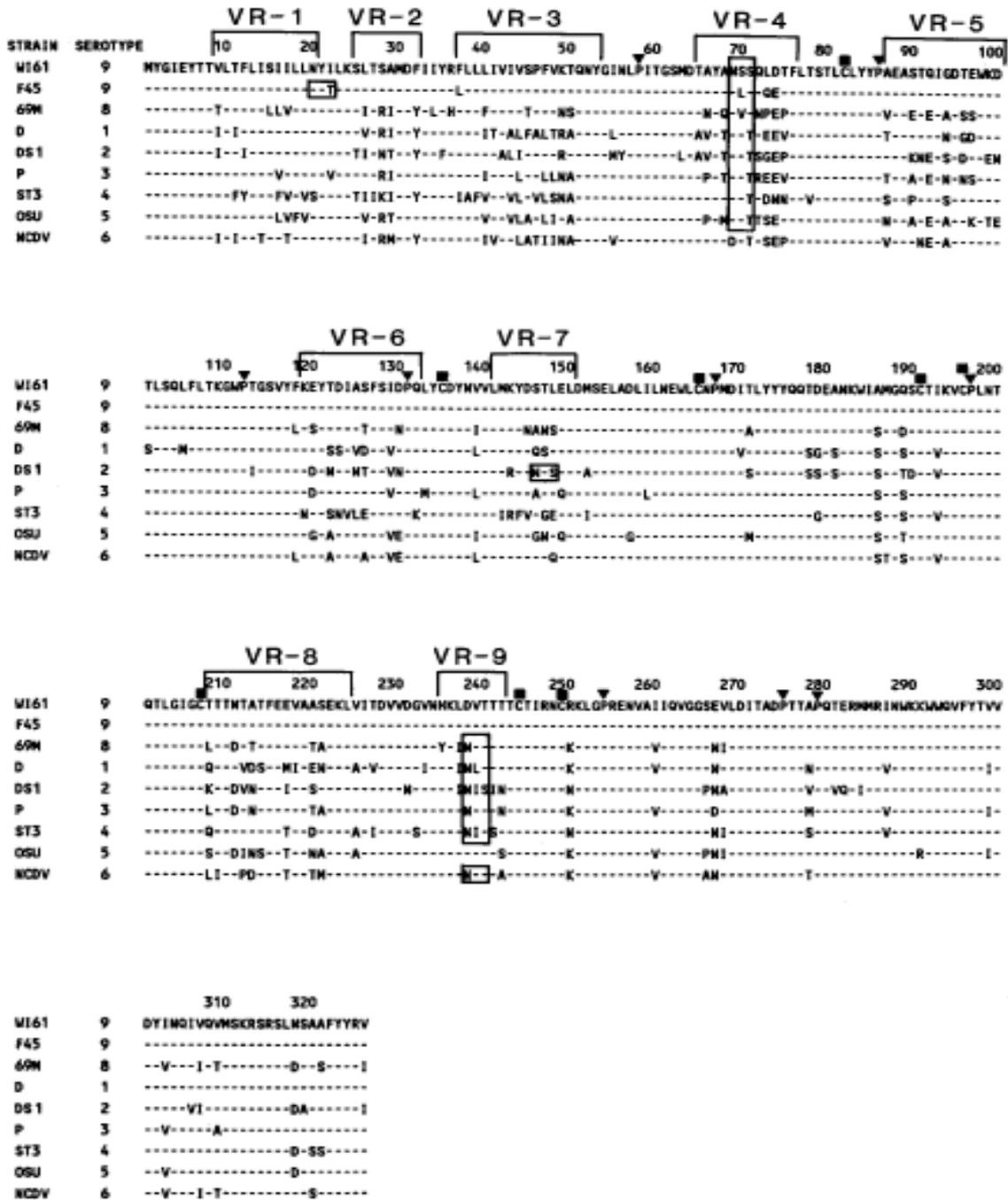


Figura 11- Comparação da sequência de aminoácidos da VP7 de oito diferentes sorotipos de rotavírus. Todas as cepas foram comparadas com a cepa W161 (sorotipo 9) e apenas os aminoácidos que diferem de uma cepa para outra são mostrados. As regiões variáveis são designadas como VR-1, VR-2, VR-3, VR-4, VR-5, VR-6, VR-7, VR-8 e VR-9 correspondem respectivamente as sequências de aminoácidos 9-20, 25-32, 37-32, 37-53, 65-76, 87-100, 119-132, 141-150, 208-224 e 235-242. Cisteínas (▼) e prolínas (■) são conservadas em todas as cepas. Potenciais sítios de N- glicosilação são mostrados em retângulos.

Fonte: Adaptado de Green et al., 1989

AMINO ACIDS 87-101											AMINO ACIDS 208-221																			
PREDICTED STRAIN SEROTYPE																														
aa:	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	
nt:307	351															670	715													
D	1	THR	GLU	ALA	SER	THR	GLR	ILE	ASN	ASP	GLY	ASP	TRP	LSP	ASP	SER	GLR	THR	ASN	VAL	ASP	SER	THR	GLU	MET	ILE	ALA	GLU	ASN	
HA209	1	ACU	GAA	GCA	AGU	ACU	CAA	AAC	AUU	GAU	GGU	GAC	UGC	AAA	GAC	UCA	CAA	ACA	ACA	AAC	GUA	GAC	UCA	UUU	GAA	AUG	AUU	GUU	GAG	AUU
HA256	1	ACU	GAA	GCA	AGU	ACU	CAA	AAC	AUU	GAU	GGU	GAC	UGC	AAA	GAC	UCA	CAA	ACA	ACA	AUU	GUA	GAC	UCA	UUU	GAA	AUG	AUU	GUU	GAG	AUU
HA507	1	ACU	GAA	GCA	AGU	ACU	CAA	AAC	AUU	GAU	GGU	GAC	UGC	AAA	GAC	UCA	CAA	ACA	ACA	AUU	GUA	GAC	UCA	UUU	GAA	AUG	AUU	GUU	GAG	AUU
HA7	1	ACU	GAA	GCA	AGU	ACU	CAA	AUU	AUU	GAU	GGU	GAA	UGC	AAA	GAC	UCA	CAA	ACA	ACA	AAC	GUA	GAC	UCA	UUU	GAA	AUG	AUU	GUU	GAG	AUU
B	1	ACU	GAA	GCA	AGU	ACU	CAA	AUU	AUU	GAU	GGU	GAA	UGC	AAA	GAC	UCA	CAA	ACA	ACA	AUU	GUA	GAC	UCA	UUU	GAA	AUG	AUU	GUU	GAG	AUU
C	1	ACU	GAA	GCA	AGU	ACU	CAA	AUU	AUU	GAU	GGU	GAA	UGC	AAA	GAC	UCA	CAA	ACA	ACA	AUU	GUA	GAC	UCA	UUU	GAA	AUG	AUU	GUU	GAG	AUU
P118	1	ACU	GAA	GCA	AGU	ACU	CAA	AUU	AUU	GAU	GGU	GAA	UGC	AAA	GAC	UCA	CAA	ACA	ACA	AUU	GUA	GAC	UCA	UUU	GAA	AUG	AUU	GUU	GAG	AUU
951	2	ALA	GLU	ALA	LYS	ASN	GLU	ILE	SER	ASP	ASP	GLU	TRP	GLU	ASN	THR	LTS	THR	THR	ASP	VAL	ASN	THR	PHR	GLU	ILE	VAL	ALA	SER	THR
HA226	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AAU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AAU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
2743	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AAU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AAU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
2899	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AAU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AAU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
C	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AAU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AAU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
V197	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AAU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AAU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
V286	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AAU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AAU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
F	3	THR	GLU	ALA	ALA	THR	GLU	ILE	ASN	ASP	ASN	SER	TRP	LYS	ASP	THR	LEU	THR	THR	ASP	THR	ASN	THR	PHR	GLU	GLU	VAL	ALA	THR	ALA
HA330	3	ACU	GAA	GCA	GCA	ACA	SAA	AUA	AAC	GAU	AAC	LCA	UGC	AAC	GAU	ACA	CUA	ACU	ACU	GAU	ACA	AUU	ACU	UAC	SAA	GAA	GUU	GCA	ACA	ACU
HA257	3	ACU	GAA	GCA	GCA	ACA	SAA	AUA	AUU	GAU	AUU	LCA	UGC	AAC	GAU	ACA	CUA	ACU	ACU	GAU	ACA	AUU	ACU	UAC	SAA	GAA	GUU	GCA	ACA	ACU
V251	3	ACU	GAA	GCA	GCA	ACA	SAA	AUA	AUU	GAU	AUU	LCA	UGC	AAC	GAU	ACA	CUA	ACU	ACU	GAU	ACA	AUU	ACU	UAC	SAA	GAA	GUU	GCA	ACA	ACU
HA4	3	ACC	GAA	GCA	GCA	ACA	SAA	AUA	AUU	GAU	AUU	GCA	UGC	AAC	GAU	ACA	CUA	ACU	ACU	GAU	ACA	AAC	ACC	UAC	SAA	GAA	GUU	GCA	ACA	ACU
V450	3	ACU	GAA	GCA	GCA	ACA	SAA	AUA	AUU	GAU	AUU	LCA	UGC	AAC	GAU	ACA	CUA	ACU	ACU	GAU	ACA	AUU	ACU	UAC	SAA	GAA	GUU	GCA	ACA	ACU
V191	3	ACU	GAA	GCA	GCA	ACA	SAA	AUA	AUU	GAU	AUU	LCA	UGC	AAC	GAU	ACA	CUA	ACU	ACU	GAU	ACA	AUU	ACU	UAC	SAA	GAA	GUU	GCA	ACA	ACU
V52	3	ACU	GAA	GCA	GCA	ACA	SAA	AUA	AUU	GAU	AUU	LCA	UGC	AAC	GAU	ACA	CUA	ACU	ACU	GAU	ACA	AUU	ACU	UAC	SAA	GAA	GUU	GCA	ACA	ACU
V96	3	ACU	GAA	GCA	GCA	ACA	SAA	AUA	AUU	GAU	AUU	LCA	UGC	AAC	GAU	ACA	CUA	ACU	ACU	GAU	ACA	AUU	ACU	UAC	SAA	GAA	GUU	GCA	ACA	ACU
913	4	SER	GLU	ALA	PRO	THR	GLR	ILE	SER	ASP	THR	GLU	TRP	LYS	ASP	THR	GLR	THR	THR	ASN	THR	PHR	GLU	THR	VAL	ALA	ASP	SER	THR	
HA11	4	UCU	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AAU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGU
HA74	4	UCA	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AAU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGU
HA5	4	UCU	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AAU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGU
HA7P	4	UCU	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AAU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGU
VA70	4	UCU	GAG	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	AAC	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AAU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGU
HA98	4	UCU	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AAU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGU
301P	4	UCA	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AAU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGU
5083	4	UCA	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AAU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGU
HO5D	4	UCA	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AAU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGU
HOCH	4	UCA	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AAU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGU

Figura 12 - Definição do sorotipo de rotavírus através de resíduos de aminoácidos presentes nas regiões variáveis compreendidas entre os aminoácidos 87-101 e 208-221. Estes resíduos de aminoácidos são altamente conservados entre cepas do mesmo sorotipo, porém divergentes quando analisados entre cepas de diferentes sorotipos.
Fonte: Green et al., 1988

Tabela 2 - Nucleotídeos e aminoácidos idênticos da VP7 de oito diferentes sorotipos de rotavírus

	Sorotipo	D	DS-1	P	ST3	W161	F45	69M	OSU	NCDV
D	1	—	74/73.5*	82.8/75/3	76.6/76.0	80.0/74.4	79.4/74.1	75.7/71.2	78.2/75.6	80.9/72.4
DS-1	2		—	74.8/73.9	71.7/70.3	76.9/73.5	76.3/73.2	75.4/73.0	73.9/71.8	74.8/71.7
P	3			—	76.0/74.8	85.5/79.1	85.2/78.7	83.4/75.2	84.9/77.6	83.4/76.2
ST3	4				—	79.7/76.0	79.1/75.3	74.5/70.9	75.4/75.3	76.6/73.6
W161	9					—	98.4/98.9	82.5/74.9	82.2/77.9	82.8/75.7
F45	9						—	81.2/74.9	81.5/77.9	82.2/75.7
69M	8							—	81.2/74.5	81.9/74.5
OSU	5								—	81.2/74.7
NCDV	6									—

* Porcentagem de aminoácidos de idênticos/porcentagem de nucleotídeos idênticos de VP7 (nucleotídeos 49-1026)

Fonte: Adaptado de Green et al., 1989

1.1.8 Breve histórico de vacinas para rotavírus e a inserção do Brasil e do Instituto Butantan nesse contexto

O desenvolvimento de vacinas para rotavírus começou no final da década de 70 com os primeiros testes de vacinas realizadas no início da década de 80 (BLOOM e LAMBERT, 2002; VESIKARI et al., 1983). A primeira candidata à vacina foi a RIT, produzida uma cepa derivada de rotavírus bovino, RIT 4237. Embora não tenham tido êxito, os resultados obtidos por eles mostraram quatro princípios básicos da vacinação, por via oral, com rotavírus vivo atenuado, que possibilitaram um grande avanço nas pesquisas desta área: as vacinas com vírus vivo atenuado podem ser altamente eficientes na proteção contra diarreias severas provocadas por rotavírus; a proteção com este tipo de vacina é maior para cepas mais severas do que para cepas moderadas; imunizações com cepas animais podem proteger indivíduos contra infecções com cepas humanas e respostas imunológicas pobres não foram eficientes na proteção contra esta doença em crianças. Como os ensaios clínicos realizados com esta vacina não apresentaram resultados consistentes, os trabalhos com o seu desenvolvimento não foram adiante (GLASS et al., 2006).

A partir daí foram desenvolvidas vacinas utilizando-se cepas de rotavírus humano rearranjadas com cepas de rotavírus animal, chamadas cepas *reassortants*. A cepa bovina WC3, é a primeira representante dessa nova tecnologia, porém, tal como a RIT4237, apresentou resultados inconsistentes nos testes realizados (BLOOM e LAMBERT, 2002; MIDTHUN e KAPIKIAN, 1996).

Somente em 1998, após 15 anos de estudos, surgiu a primeira vacina de rotavírus a ser comercializada. A Rotashield (Wyeth-Lederle, Pearl River, NY, EUA - A *Tetravalent Rhesus*

Rotavirus Vaccine), é uma vacina tetravalente produzida com cepas rearranjadas de rotavírus humano e de macaco *Rhesus*, desenvolvida pelo Dr. Kapikian e sua equipe no *National Institutes of Health (NIH)* nos EUA e aprovada pelo *Food and Drug Administration (FDA)*. Essa vacina foi testada nos EUA, na Finlândia e Venezuela, mostrando-se, inicialmente, segura e conferindo excelente proteção em crianças. Em junho de 1999, foram reportados casos de intussuscepção intestinal em crianças, nas primeiras duas semanas após a administração dessa vacina. Em função disso, a Rotashield foi retirada do mercado, embora o processo de intussuscepção associado à utilização desta vacina ainda não tenha sido muito bem elucidado (GLASS et al., 2006).

Atualmente existem no mercado as seguintes vacinas para rotavírus: a Rotarix (Produzida pelo GlaxoSmithkline), a *Lanzhou lamb vaccine* (produzida no Lanzhou Institute for Biological Products in China) e a Rota Teq (Produzida pelo laboratório Merk). A Rotarix é uma vacina monovalente composta de uma cepa atenuada de vírus humano (89-12PIA[8] G1), foi licenciada, inicialmente, em 2004 no México e República Dominicana, em 2006 nos EUA, União Européia e em mais de trinta países, inclusive no Brasil. Esta vacina é aplicada por via oral em um esquema de duas doses (a primeira entre 6 e 14 semanas de idade e a segunda quatro semanas depois). A Rota Teq é uma vacina pentavalente, licenciada nos EUA, produzida a partir de cepas rearranjadas de rotavírus humano e bovino (WC3 P7[5], G6) de baixa multiplicação intestinal, sendo administrada em três doses orais (a primeira entre 6 e 12 semanas de idade e a segunda e terceira com intervalos de 4 a 10 semanas). É a única vacina para rotavírus recomendada nos EUA. A *Lanzhou lamb vaccine* é uma vacina monovalente desenvolvida pelo Lanzhou Institute of Biological na China a partir de uma cepa de rotavírus (P[12], G10) de cordeiro e licenciada na China em 2001 (GLASS et al., 2006).

Atualmente existem algumas vacinas para rotavírus que estão em desenvolvimento ou em ensaios clínicos. Dentre estas podemos citar a RV3, uma vacina monovalente que utiliza uma cepa neonatal de rotavírus (P2A[6], G3), que está sendo desenvolvida na Universidade de Melbourne na Austrália (BLOOM e LAMBERT, 2002; GLASS et al., 2006; KAPIKIAM et al., 2005) e as vacinas pentavalentes e hexavalentes que utilizam cepas originárias de rearranjo genético entre rotavírus bovino e humano, a “*UK-reassortant strain* (P7A[5], G6)”, que foram desenvolvidas ou estão em desenvolvimento no Brasil, Índia e China e (CDC, 2008).

No Brasil, no Laboratório Experimental de Rotavirus do Instituto Butantan, foi desenvolvida uma vacina pentavalente para rotavírus. Esta vacina é composta por cepas

desenvolvidas por pesquisadores do *National Institutes Health (NIH)* – EUA através de um rearranjo genético entre a cepa de rotavírus Bovino *UK* e as cepas de rotavírus humano *D*, *DS-1*, *P*, *ST-3* e *AU32*, estas cepas são respectivamente denominadas *G1*, *G2*, *G3*, *G4* e *G9*. Esta vacina foi submetida a ensaios clínicos de fase I e os resultados encontrados demonstram que este produto é imunogênico, inócuo e não produz excreção viral.

A produção dessa vacina no Instituto Butantan demandará uma estrutura de controle de qualidade com testes e provas de eficiência, em fases do processo de produção e no produto acabado. Dentre esses testes, destacam-se os testes usados para determinar a potência da vacina, que para serem realizados, demandam anticorpos específicos.

1.2 Anticorpos monoclonais

Desenvolvida há mais de três décadas, a tecnologia do hibridoma tem como princípio a fusão células com alta capacidade secretora de anticorpos (linfócitos) com as células de mieloma para a obtenção do hibridoma ou célula híbrida (KOHLENER e MILSTEIN, 1975)

Desta maneira, o hibridoma é uma célula capaz de produzir anticorpos específicos e se multiplicar infinitamente, os chamados anticorpos monoclonais. Estes anticorpos são denominados monoclonais e são dirigidos contra um único epítipo da molécula do antígeno, daí a sua alta especificidade (ABBAS; LINCHTMAN; POBER, 2005).

Para sua produção inocula-se uma espécie animal com um antígeno de interesse e depois de decorrido o tempo necessário para estimular a resposta imune, coleta-se as células do baço deste animal e promove-se a sua fusão com células tumorais de mieloma. Esses hibridomas são cultivados e os sobrenadantes desta cultura são testados para se detectar a presença do anticorpo para o antígeno inoculado. Ao fundir uma célula com poder de multiplicação (mieloma) com uma célula com capacidade secretora de anticorpos específicos (Linfócito B) tem-se um híbrido capaz de secretar altas concentrações de anticorpos específicos (ABBAS; LINCHTMAN; POBER, 2005).

Embora seres humanos sejam capazes de produzir uma gama extremamente diversa de moléculas de anticorpos, cada linfócito B produz anticorpos específicos contra um único antígeno. Isto significa que os anticorpos presentes no soro são heterogêneos ou policlonais e desta forma dirigidos contra uma variável gama de antígenos e muitas vezes em concentrações e especificidade (antígeno-anticorpo) inferiores àquela necessária para terapias, testes diagnósticos seguros, dentre outras finalidades. Isto significa que mesmo preparações antigênicas com altíssimo grau de purificação, estimulam vários clones de linfócitos B a

produzirem anticorpos contra diferentes epítomos de um mesmo antígeno, ou seja, anticorpos policlonais (ABBAS; LINCHTMAN; POBER, 2005).

Até o momento são conhecidas as classes ou isotipos de anticorpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cada uma delas com suas características e funcionalidades específicas. Em humanos essas moléculas de imunoglobulinas possuem cinco tipos de cadeias pesadas denominadas α (IgA subclasses 1 e 2), γ (IgG subclasses de 1 a 4), μ (IgM), δ (IgD) e ϵ (IgE) e dois tipos de cadeias leves λ (lambda) e κ (Kappa). Ambos os tipos de cadeias possuem regiões constantes e variáveis (ABBAS; LINCHTMAN; POBER, 2005; MAYNARD e GEORGIU, 2000).

A IgM é conhecida há mais de um século, porém estudos recentes têm demonstrado a participação desta imunoglobulina em funções até então desconhecidas. Estudos com camundongos deficientes para secreção de IgM têm demonstrado a sua participação na prevenção de doenças auto-imunes, sobrevivência de células B e proteção contra diversas infecções (EHRENSTEIN e NOTLEY, 2010). É a classe de imunoglobulina mais encontrada no meio intravascular e na superfície dos receptores de antígenos dos linfócitos B. São os primeiros anticorpos a serem produzidos, ou seja, são produzidas no início da fase aguda das doenças que desencadeiam resposta humoral, estão na faixa de 10% do conjunto de imunoglobulinas e não atravessam a placenta. A IgM é mais encontrada na forma de um pentâmero, com cadeias pesadas individuais de aproximadamente 65.000 daltons de peso molecular e a molécula completa tem peso de 970.000 daltons. Possui 5 cadeias ligadas entre si por pontes dissulfeto e por uma cadeia polipeptídica inferior chamada de peça J. A literatura descreve duas subclasses de IgM que não são distintas por métodos sorológicos e somente por mapeamento de seus peptídeos (ABBAS; LINCHTMAN; POBER, 2005). É considerada como sendo a primeira imunoglobulina a aparecer na evolução dos vertebrados (SAINI e KAUSHINK, 2001).

A IgA é a imunoglobulina predominante em secreções corporais, e corresponde a 15-20% das imunoglobulinas do soro humano. Na espécie humana, mais de 80% da IgA está na forma monomérica. Nas secreções das mucosas a IgA se liga a um componente secretor (70.000 daltons), e forma a IgA secretora, sendo esta composta por 2 unidades (dimérica) ligadas a uma cadeia J unida na sua porção Fc ao componente secretor. Este componente tem a função de proteger a molécula das enzimas hidrolíticas (destrutivas). O principal papel da IgA é proteger o organismo da invasão viral ou bacteriana através das mucosas (CERUTTI, 2008). Desta forma, é de grande importância nos processos infecciosos por rotavírus, bem

como nos processos de imunização, uma vez que as vacinas para rotavírus são aplicadas por via oral (ABBAS; LINCHTMAN; POBER, 2005).

A IgG é a principal imunoglobulina envolvida em respostas secundárias. Possui uma estrutura monomérica com um peso molecular de cerca de 150.000 daltons e é a única imunoglobulina capaz de atravessar a placenta, evento este relacionado a características químicas dos fragmentos Fc e não ao peso molecular. Representa 80% das imunoglobulinas do organismo e normalmente é distribuída homoganeamente nos compartimentos extracelulares.

A região Fc realiza ativação de complemento (quando unida ao antígeno) exercendo quimiotaxia sobre neutrófilos, aumento da resposta inflamatória e auxilia a fagocitose por se ligar a macrófagos. A classe IgG compreende as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4, cuja proporção e ocorrência são controlada por fatores genéticos e espécie animal (ABBAS; LINCHTMAN; POBER, 2005; RABBANI et al., 1997). Dentre estas, a IgG3 tem um papel de destaque por estar envolvida em doenças auto-imunes, pois ao ativar o complemento, há geração de quimiotaxia de neutrófilos, aumento da permeabilidade vascular e amplificação da resposta inflamatória. Relatos recentes têm demonstrado a participação da IgG1 em reações alérgicas e anafiláticas por atuar na ativação de basófilos (BORDON, 2011)

A IgD foi descrita pela primeira vez no soro de pacientes com mieloma, e até recentemente nada ou pouco se sabia sobre suas funções como anticorpo. Porém, alguns trabalhos têm relacionado seu papel contra nucleoproteínas e insulina de indivíduos normais e diabéticos. É normalmente encontrada na superfície de muitos linfócitos, assim como a IgM, atuando como receptor para antígeno. É expressa em baixos níveis na superfície de células B1 ativadas e em altos níveis na superfície de células B2 (BAUMGARTH, 2011). Normalmente está presente no soro em concentrações muito baixas.

A IgE tem importante atividade na imunidade ativa contra endoparasitas (helmintos), atraindo os eosinófilos (ALLEN e MAIZELS, 2011). É normalmente encontrada na membrana de superfície de basófilos e mastócitos de todos os indivíduos, apresenta-se no soro em baixas concentrações, e é associada aos diagnósticos de alergias, uma vez que aproximadamente 50% dos pacientes com doenças alérgicas têm altos níveis de IgE. A específica interação entre o antígeno e a IgE ligada ao mastócito leva à liberação de histamina, leucotrieno, proteases, fatores quimiotáxicos e citocinas. Esses mediadores podem produzir broncoespasmo, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração de músculo liso e quimitaxia de outras células inflamatórias (eosinófilos, por exemplo). Esta

interação quando leva a produções exacerbadas desses mediadores pode provocar condições anafiláticas (CALICH e VAZ, 1998; ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

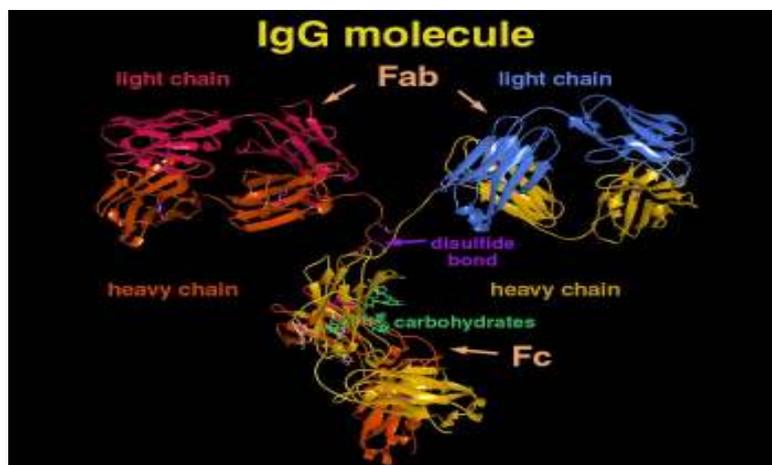


Figura 13 - Estrutura tridimensional da molécula de IgG.
Fonte: Eberly College Science, 2011.

1.2.1 Produção do antígeno viral

1.2.1.1 Multiplicação do antígeno viral em culturas de células

Diversas técnicas podem ser usadas na preparação de antígenos para a imunização de animais visando à produção de anticorpos. No caso de muitos tipos virais, inicialmente pode-se fazer uma multiplicação em cultura de células e em seguida a purificação deste antígeno. Várias linhagens celulares contínuas (Vero e BHK₂₁) ou primárias podem ser utilizadas para produção de antígenos virais, tais como o vírus da raiva, aftosa e poliomielite.

O estabelecimento da tecnologia do cultivo de células na década de 1950 possibilitou um grande avanço nos estudos de agentes virais, antes limitados pelo uso de espécies vivas. Desde então, enormes conquistas tecnológicas foram alcançadas no campo de produção de antígenos e vacinas virais, testes de detecção viral em diagnósticos utilizando-se células de origem animal. As culturas celulares foram estabelecidas em laboratório utilizando frascos com cultura estática a 37 °C (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

Nas últimas décadas, devido aos grandes avanços da engenharia de bioprocessos, as culturas celulares ganharam âmbito industrial e têm sido bastante empregadas para produção de diversos produtos virais em biorreatores e outras formas de cultivo que permitem trabalhar

com elevadas concentrações celulares (FRAZATTI-GALLINA et al., 1998, 2001; MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

Além disso, o avanço da engenharia genética nos últimos anos possibilitou a produção de uma série de produtos utilizando culturas celulares para expressão de genes exógenos virais, e tantos outros, tais como a produção para vacina de hepatite B, como a produção de fator VIII da Bayer em cultura de células BHK₂₁ modificadas geneticamente (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

Alguns aspectos da multiplicação dos rotavírus ainda não estão muito bem elucidados. O receptor celular para rotavírus permanece desconhecido (ESTES, 2001), embora algumas pesquisas apontem para participação do ácido siálico e de algumas integrinas no processo de entrada do vírus nas células (JAYARAM; ESTES; PRASSA, 2004).

Da mesma forma, o processo de internalização das partículas virais ainda é bastante discutido. A literatura cita duas vias principais para a entrada do vírus nas células. Segundo esta teoria, após a adsorção através das proteínas estruturais VP4 e VP7, as partículas virais entrariam nas células por endocitose ou por via direta (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002). A figura 14 ilustra as principais etapas de uma infecção viral em cultura de células.

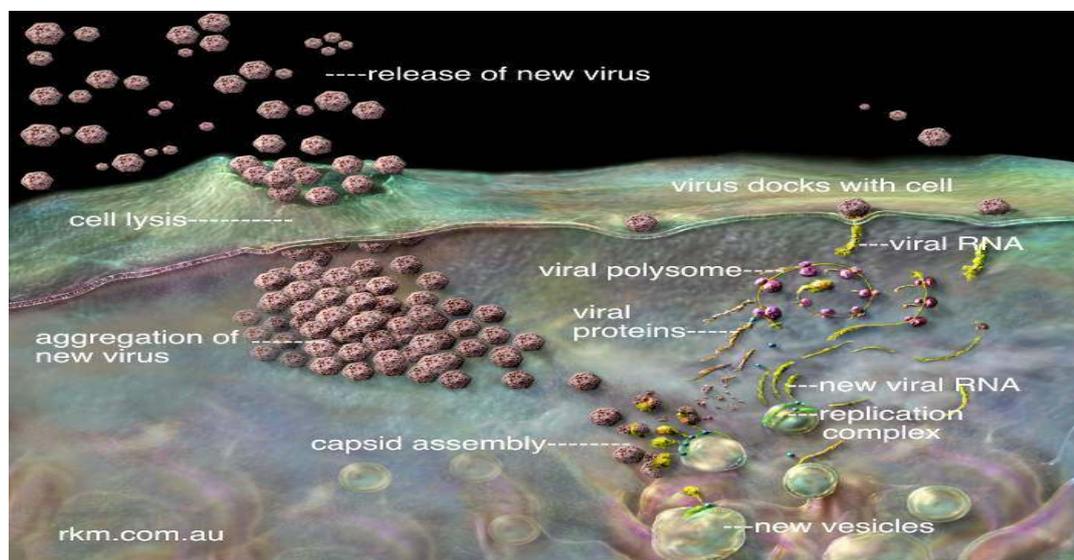


Figura 14 - Fases da replicação viral de um RNA vírus.

Fonte: Russell Kightley Media, 2010.

Na multiplicação de um rotavírus, a clivagem proteolítica da VP4 (88 kDa), pela ação da tripsina, resulta nos peptídeos VP5 (60 kDa) e VP8(28 kDa) que continuam associados ao

vírião e aumentam a infectividade viral, uma vez que o VP5 muito provavelmente possui sítios para adsorção do vírus à célula (KAPIKIAM e CHANOCK, 1996).

Dentre as proteínas não estruturais, a NSP4 merece destaque especial por participar como receptor intracelular para partículas virais na montagem do vírus (KATYAL; RANA; SINGH, 2000; MORI et al., 2002).

Para produção dos rotavírus *reassortant* dos sorotipos G1, G2, G3, G4 e G9 utilizam-se culturas de células Vero em diferentes sistemas de cultivo. A escolha do sistema de cultivo depende da quantidade de partículas virais que se deseja obter.

1.2.1.2 Purificação de antígeno

A elevada gama de produtos da indústria biotecnológica tais como ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, aminoácidos, peptídeos e proteínas, requer diferenciados processos de purificação. Desta forma, não existe um processo de purificação de aplicação geral, devendo cada processo ter um tipo de purificação específico e adequado que atenda as suas características físico-químicas. Dentre os vários métodos de purificação de proteínas, a cromatografia é o método mais utilizado devido à vasta aplicabilidade, baixo custo e facilidade de ampliação de escala. A técnica de cromatografia de troca iônica se baseia na adsorção de proteínas a grupos carregados de um suporte sólido, seguido de uma eluição, com posterior concentração em um tampão aquoso de elevada força iônica (SCHMIDELL et al., 2002).

Esta técnica de purificação tem elevada utilização, dado que as proteínas são eletricamente carregadas quando expostas a determinados valores de pH. Até mesmo proteínas com idênticos pontos isoelétricos podem ser separadas de uma mistura, pois o sítio de ligação de proteínas a matriz de troca iônica é determinado pela carga superficial da proteína e a sua proximidade de outras cargas e não pela carga global (HARRISON, 1994).

A cromatografia por troca iônica, utilizando DEAE celulose, reconhecidamente uma base fraca com valor de pK igual 10, vem sendo utilizada para purificação de antígenos virais multiplicados em culturas de células. Um trabalho realizado por pesquisadores do Instituto Butantan com vacina de raiva, utiliza, com sucesso, a DEAE-celulose para purificação de vírus rábico multiplicado em cultura de células Vero (FRAZATTI-GALLINA et al., 2004).

1.2.2 Imunização dos animais

Na produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais para um determinado antígeno é bastante importante a escolha da espécie animal e o esquema de imunização a ser utilizado. Atualmente, várias espécies animais estão sendo usadas na produção de anticorpos monoclonais, dependendo é claro, de uma série de fatores tais como sistema de produção, finalidade dos anticorpos monoclonais, dentre outros. Tradicionalmente os camundongos BALB/c têm sido bastante usados em função do seu porte, facilidade de manejo e por duas características extremamente interessantes, que são a compatibilidade com as células de mieloma e por produção de altos títulos de anticorpos (HENDRIKSEN, 2005; LITTLE et al., 2000; NRC, 1999).

Os diversos protocolos de imunização disponíveis atualmente estão embasados nas experiências e estudos da resposta humoral *in vivo*. Vários estudos mostram que na primeira imunização, observa-se uma fase de crescimento logarítmico dos níveis de anticorpos, seguido de um platô e por último, o declínio dos níveis de anticorpos após três semanas. As imunoglobulinas secretadas são em sua maioria da classe IgM. Diante de uma segunda imunização com o mesmo antígeno, observa-se uma resposta imunológica de natureza humoral bastante rápida, porém maior e mais longa quando comparada com a resposta primária, e, além disso, as imunoglobulinas secretadas são em sua maioria da classe IgG. Em geral, são realizadas três imunizações e um reforço 3 a 4 dias antes da remoção de órgãos linfóides. O esquema de imunização a ser adotado depende da resposta imune do animal utilizado, do antígeno a ser administrado e da via de inoculação (SCHUNK e MACALLUM, 2005).

Os adjuvantes são empregados na formulação dos antígenos, visando potencializar a resposta imune. Em trabalho feito por Fernandes e sua equipe do laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, o Marcol/Montanide foi utilizado como adjuvante na formulação do antígeno BaP1 para a imunização dos camundongos BALB/c, para obtenção de anticorpos monoclonais visando estudar suas características imunoquímica e biológica frente a BaP1, uma metaloprotease do veneno de *Bothrops asper* (FERNANDES et al., 2010)

Alguns estudos com protocolos e vias de imunização com cepas e proteínas de rotavírus estão descritos na literatura. Dentre eles, um estudo feito no *Infectious Disease and Immunology Research (IDIR)* – Abbott Laboratories em Illinois – EUA, onde pesquisadores obtiveram resposta imunológica satisfatória, e posteriormente hibridomas secretores de anticorpos. Nesse estudo, diferentes grupos de fêmeas BALB/c foram inoculadas com 0,2 mL

das cepas SA-11, Wa e S2 com 50 µg de rotavírus purificado, em esquema de três doses com intervalos de vinte e um dias, sendo que a última dose foi administrada por via intravenosa (HORNG; SPIEZIA; MUSHAHWAR, 1989). Outras vias de imunização muito utilizadas em estudos de proteção contra cepas vacinais de rotavírus são a via intranasal e a oral. Consideráveis respostas imunológicas foram observadas quando camundongos com 7 dias de idade e adultos com mais de seis semanas foram imunizados por via intranasal com 4µg VP6/LT (R192G) e por via oral com 25 µL de RRV, D x RRV ou EDIM em estudos imunopatológicos feitos com candidatos a vacinas na *Divisions of Infectious Diseases and biostatistics of Cincinnati Children's Hospital Medical Center in Cincinnati, Ohio and Tulane University Medical Center, New Orleans, Louisiana* (MCNEAL et al., 2004, 2006; VANCOTT et al., 2006).

1.2.3 Produção dos clones secretores de anticorpos

Após a imunização, os órgãos linfóides dos animais, como baço ou linfonodos, são removidos para fusão com células de mieloma. Existe uma gama de células de mieloma disponíveis para o processo de fusão, muitas delas originadas de camundongos, ratos e coelhos. Atualmente estão disponíveis os tipos celulares P3x63Ag8. 653, SP2/O-Ag14, NS-1, NS-O, que são sensíveis ao meio HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina) (LITTLE et al., 2000; SHULMAN; WILDE; KOHLER, 1978).

Para a fusão de células esplênicas com as de mieloma SP2/O utiliza-se o agente polietilenoglicol (PEG). Em geral podem ocorrer três tipos de fusão, células de mieloma fundidas com células de mieloma, células esplênicas fundidas com células esplênicas e por último o tipo de fusão que interessa que são as células de mieloma fundida com células esplênicas. O primeiro tipo de fusão deve ser eliminado do cultivo para não comprometer o cultivo de híbridos de interesse. Células esplênicas morrem entre 1 e 2 semanas após fusão (HARLOW e LANE, 1988; PONTECORVO, 1976).

O sucesso da técnica está intimamente ligado à utilização de linhagens de mieloma nas quais foram induzidos defeitos na via de síntese de nucleotídeos, o que faz com que cresçam em meio de cultura normal, mas não cresçam em meio seletivo. Da fusão destas células deficientes com células normais sobreviverão apenas células híbridas imortais (ABBAS; LINCHTMAN; POBER, 2005).

Para a geração dessas linhagens os plasmocitomas foram selecionados em cultivo, na presença de drogas análogas a 8- azaguanina ou 6- tioguanina, baseado no fato de que as

células esplênicas têm um crescimento restrito em cultivos *in vitro* enquanto as células de mieloma têm uma proliferação ilimitada.

O meio seletivo empregado é o HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). A ação deste meio baseia-se na deficiência da célula de mieloma para uma enzima denominada hipoxantina-guanina fosforibosil tranferase (HGPRTase), que é utilizada pela via de recuperação quando a síntese de ácidos nucleicos pela via “de novo” é bloqueada através da aminopterina presente no meio HAT (ABBAS et al., 2005; LITTLE et al., 2000). Quando células normais são fusionadas com células deficientes para a enzima HGPRTase, os híbridos resultantes sobrevivem e se multiplicam em meio HAT, pois conseguem sintetizar ácidos nucleicos pela via de recuperação, através da enzima HGPRTase que é fornecida pela linfócito B. Este é o fundamento da técnica para produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (HARLOW e LANE, 1988; MORALES, 1993).

Após a fusão, os híbridos são colocados no meio HAT e selecionados para a produção de anticorpos através de testes imunológicos, como ELISA, por exemplo, e em seguida são clonados e multiplicados em meios de cultura ou em cavidade peritoneal de camundongos (LEENAARS e HENDRIKSEN, 2005; MORALES, 1993).

Em geral para o processo de fusão celular, as células esplênicas dos animais apresentando maiores níveis de anticorpos são misturadas as células de mieloma (TIZARD, 2002). Em seguida acrescenta-se polietilenoglicol para induzir a fusão celular. Léo et al. (2000) descrevem uma metodologia de fusão celular na produção de anticorpo monoclonal anti-TNP. Neste trabalho, três dias após a imunização dos camundongos células esplênicas foram assepticamente coletadas e fundidas com células mieloma SP2/0Ag-14 na proporção de 4:1 misturando com polietilenoglicol (PEG 50%) e dimetilsulfóxido (DMSO 10%). Após a fusão, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (suplementado com 10% SFB, 2 g/L de bicarbonato de sódio e 2 g/L de HEPES, 2 µL/L de 2-mercaptoetanol, 10^{-4} M hipoxantina, 4×10^{-2} M aminopterina, $1,6 \times 10^{-5}$ M timidina) e 0,5 mL por alíquota foram depositados em cada orifício contendo macrófagos adjuvantes. A figura 5 mostra um esquema simplificado de produção de hibridomas.

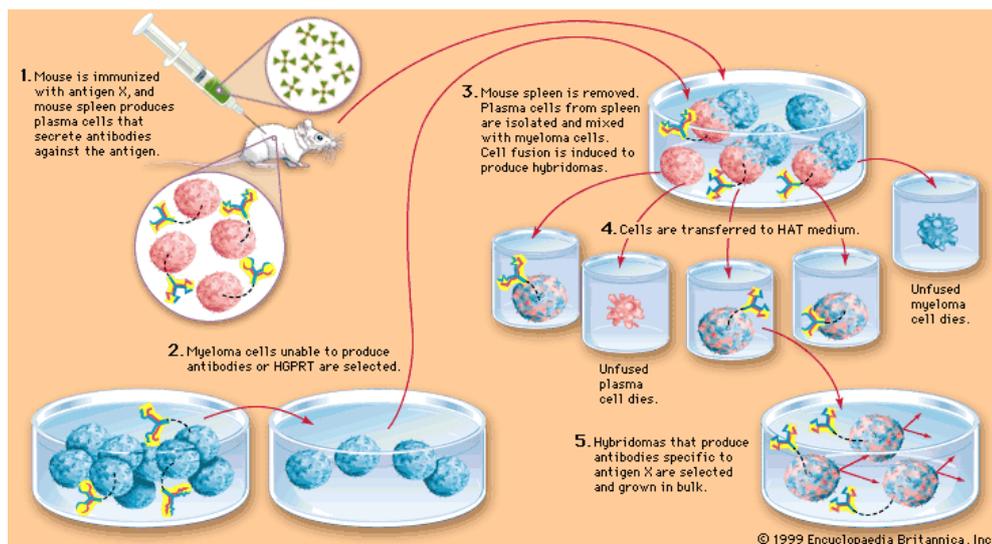


Figura 15 - Esquema de produção de hibridomas.
 Fonte: Encyclopaedia Britannica, 2011.

A seleção e clonagem dos hibridomas pode ser feita por vários ensaios disponíveis para detecção dos anticorpos secretados pelos hibridomas, tais como ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA, radioimunoensaio, imunofluorescência, *Dot* e *Western Blotting*. Após a seleção dos clones secretores de anticorpos, inicia-se a clonagem, que pode ser conseguida por diluição limitante (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

Embora não seja objeto deste estudo, outras metodologias podem ser utilizadas na produção de anticorpos uma vez que os anticorpos monoclonais produzidos utilizando-se células de origem animal são inviáveis para aplicação terapêutica em humanos, pois o sistema imune humano reconhece essas proteínas como estranhas. Isto limita a utilização de anticorpos monoclonais em uso repetitivo em seres humanos. Ao produzir anticorpos contra os anticorpos monoclonais através da conhecida resposta HAMA (do inglês *human anti-murine antibodies*), o sistema imune do paciente neutraliza o anticorpo monoclonal, desenvolvendo, desta maneira, uma resistência natural contra o fármaco, o que pode trazer conseqüências desastrosas em uma segunda aplicação. Neste caso uma alternativa para eliminar ou reduzir a níveis normais essa resposta imune humana, seria a produção de anticorpos monoclonais a partir de seres humanos, porém isto tem alguns inconvenientes. Este modelo é operacional, metodologicamente, e inclusive eticamente, mais complexo, quando comparado com a produção em camundongos (MCCANN e BOYD, 1992).

Na década de 90, com os avanços da engenharia genética, tornou-se possível a síntese de anticorpos por meio de recombinação gênica *in vitro*, o que permitiu a modificação

desejada das características imunoquímicas dos anticorpos. A manipulação de genes codificadores das cadeias do anticorpo possibilitou provocar alterações na estrutura, função, e, inclusive, incluir um caráter humano no anticorpo monoclonal murino (WINTER e MILSTEIN, 1991).

Anticorpos humanizados de camundongos podem ser distinguidos de anticorpos humanos produzidos em células humanas pelo processo de glicosilação, particularmente pelo seu respectivo resíduo, contra os quais o soro humano contém títulos de IgG acima de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Isso comprova o fato de que anticorpos que contêm tais resíduos não podem sobreviver por longo período na circulação humana. Contudo, resultados promissores têm sido obtidos em processos iniciais com muitos camundongos quiméricos e anticorpos humanos produzidos em hibridomas derivados de linhagens de células murinas ou de outros roedores (LITTLE et al., 2000).

Outra tecnologia que vem sendo muito utilizada para a produção de anticorpos monoclonais é a *Phage Display Thecnology*. Esta tecnologia molecular consiste na expressão de peptídeos, proteínas e anticorpos de interesse na superfície de fagos, que posteriormente podem ser usados no estudo de interações de proteínas, estudos de afinidade e em processos de purificação. A grande vantagem desta técnica reside na ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado (AZZARY; EDWARD HIGHSMITH JR., 2002).

Os mais recentes avanços da engenharia genética têm possibilitado a produção de anticorpos monoclonais utilizando plantas. Nesta nova tecnologia, vetores virais são usados para expressão transiente de proteínas heterólogas em plantas. As grandes vantagens dessa técnica são a inocuidade do produto e as altas quantidades produzidas a baixo custo.

Atualmente os anticorpos monoclonais têm uma série de aplicações biotecnológicas, tais como, o diagnóstico de doenças humanas, animais e vegetais, em pesquisas nos diversos campos do conhecimento e na terapia de uma série de doenças (GLEBA; KLIMYUK; MARILLONNET, 2007).

2 OBJETIVOS

- Produzir clones secretores de anticorpos monoclonais para a cepa IB-BRV-4-G-4 de rotavírus, presente na vacina pentavalente para rotavírus do Instituto Butantan.

- Caracterização dos anticorpos monoclonais produzidos.

- Avaliar dois protocolos de imunização para rotavírus com vista à obtenção de anticorpos monoclonais para os outros sorotipos de rotavírus presentes na vacina pentavalente de rotavírus do Instituto Butantan.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 Preparo dos antígenos de rotavírus e do antígeno controle

O preparo do antígeno sorotipo G4 de rotavirus foi realizado no Laboratório Experimental de Rotavirus segundo normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e conforme descrito a seguir.

3.1.1 Produção do antígeno de rotavírus

Suspensões de rotavírus do sorotipo G4 foram obtidas a partir de células Vero (ATCC-CCL81.4) cultivadas em frascos de cultura, infectadas com a cepa *reassortant* BRS-4-G4 proveniente do *NIH* (*National Institute of Health* - EUA). Esta cepa é resultante de um rearranjo genético de uma cepa de rotavirus bovino (UK) e cepa G4 de rotavirus humano (BLOOM e LAMBERT, 2002; MIDTHUN e KAPIKIAN, 1996). As suspensões virais produzidas foram submetidas a testes de esterilidade e titulação viral em células (PFA - *Plaque Forming Assay*). Os resultados da titulação foram expressos em PFU/mL (Unidades Formadoras de Placa/mL).

3.1.2 Purificação da suspensão viral de rotavírus

A suspensão de rotavirus foi purificada com a resina de troca iônica DEAE-CELLULOSE (Sigma Aldrich S.A., Saint Louis, Missouri, EUA). Um volume de 185 mL de suspensão viral do sorotipo G4 de rotavirus foi adicionado à resina hidratada com uma solução salina tamponada com Fosfatos (PBS). Foi utilizada uma quantidade de resina correspondente a 20% do volume de suspensão viral a ser purificado. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo com agitação manual a cada três minutos pelo tempo total de 15 minutos. Após este período, a suspensão foi deixada em repouso para que toda a resina e impurezas se depositassem e as partículas virais ficassem no sobrenadante. Cuidadosamente o sobrenadante foi transferido para um frasco de polipropileno, ao qual foi acoplado um suporte de filtração de 47 mm de diâmetro com uma membrana de 45 µm (Millipore S.A., Billerica, M.A., EUA). Em seguida a suspensão viral foi submetida a uma filtração clarificante utilizando pressão positiva.

Após o término da filtração foram coletadas amostras para titulação, determinação de DNA residual, SDS-PAGE, dosagem de proteína e prova de esterilidade.

Com o objetivo de aumentar o grau de pureza do antígeno, a suspensão de rotavírus foi novamente purificada utilizando o mesmo protocolo anteriormente citado.

3.1.3 Preparo do antígeno controle

Com objetivo de padronizar o teste de ELISA para dosagem dos anticorpos no sobrenadante de culturas de hibridomas e garantir que os anticorpos testados são contra o antígeno e não contra proteínas do cultivo celular, foi produzido um controle do antígeno usando células Vero, a mesma linhagem celular utilizada na multiplicação do antígeno viral. Assim, foram realizados cultivos celulares seguindo o mesmo protocolo e em condições de cultivo idênticas as que foram utilizadas na produção do antígeno viral. Em seguida, o sobrenadante das culturas celulares foi submetido ao mesmo processo de purificação utilizado no antígeno viral.

Todas as operações realizadas durante o preparo dos antígenos de rotavírus e controle foram executadas em cabine em cabine de fluxo laminar (Veco S.A, Campinas, S.P., Brasil).

3.1.4 Testes controle de qualidade

3.1.4.1 *Teste de Esterilidade Fúngica e Bacteriana*

O teste foi realizado com 14 tubos de ensaio contendo meios de cultura, sete com Tioglicolato (Merck, Rio de Janeiro, R.J., Brasil) e o restante com Trypticaseína– soja (Merck, Rio de Janeiro, R.J., Brasil), ambos provenientes da Seção de Meios de Cultura do Instituto Butantan. Um volume de 0,5 mL da amostra foi inoculado em cada um dos seis tubos de ensaio contendo meio Tioglicolato e a seis tubos com Trypticaseína-soja. Após a inoculação da amostra, os tubos contendo Tioglicolato foram incubados a 37 °C em estufa bacteriológica (Thermo scientific, Asheville, N.C., EUA) e os tubos com Trypticaseína-soja foram incubados a 22 °C. Um tubo de cada meio foi utilizado como controle negativo do teste. Diariamente, os tubos foram observados para verificação de turvação ou quaisquer outras alterações sugestivas de contaminação. Todas as operações foram realizadas em cabine de fluxo laminar.

3.1.4.2 Titulação em células– PFA (Plaque Forming Assay)

Inicialmente as amostras a serem tituladas foram ativadas com 5 μ L de tripsina tipo IX (Sigma Aldrich S.A., Saint Louis, Missouri, EUA) em meio L15 (Cultilab, Campinas, S.P. Brasil) em banho-maria (Sheldon, Cornnelive, O.R., EUA) a 37 °C durante 30 minutos. Após a ativação, as amostras virais foram submetidas a 6 diluições seriadas (10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}) em meio L15. Em seguida, as placas de cultura de seis orifícios (Corning Corporation, New York, N.Y., EUA) de MA-104 (Célula de rim de embrião de macaco africano, proveniente do BOHIC (Laboratório de Imunologia, Citogenética e Biologia Celular de Bolonha na Itália), utilizadas no teste, foram lavadas duas vezes com 2 mL de meio de cultura L15.

Em cada orifício das placas foram adicionados 500 μ L das amostras contidas nos tubos de 15 mL (dependendo do título da amostra viral a diluição de 10^{-1} não é transferida para a placa) começando pela maior diluição até chegar ao tubo mais concentrado. Em um dos orifícios da placa foi colocado o vírus controle (controle Positivo). Cada amostra é testada em duplicata. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, as placas foram lavadas duas vezes com 2 mL de meio L15 e foi colocado em cada orifício 2 mL de agarose (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y., EUA), contendo tripsina e meio de cultura EMEM o que correspondeu ao denominado de primeiro *Overlay*. Após a solidificação da agarose, as placas foram invertidas e incubadas em estufa 37 °C durante 4 dias. Após quatro dias de incubação, acrescentou-se em cada orifício da placa 2 mL de Agarose, tripsina, com EMEM e vermelho neutro (segundo *Overlay*) e novamente elas foram incubadas em estufa 37 °C durante 24 horas. Depois das 24 horas foi realizada a visualização das placas utilizando um negatoscópio (Nikon Corporation, Melville, N.Y., EUA), e contando em cada orifício da microplaca o número de placas formadas pela de lise das células durante a replicação viral. Foram feitas duas observações em intervalo de 24 horas.

A titulação da amostra viral foi obtida correlacionando o número de placas formadas com a diluição em que eles ocorreram e desta forma calculou-se o título viral das amostras. Para o cálculo foi escolhida a maior diluição em que se obteve um número de placas compreendido na faixa menor do que 80 e maior do que 8. A média obtida nas duas observações foi multiplicada pelo valor da diluição na qual foram observados os referidos números de placas. Em seguida esse valor foi dividido 0.5 (quantidade de amostra viral inoculada em cada orifício) e multiplicado por 2 (foram feitas duas placas para cada amostra).

3.1.4.3 Dosagem de proteína – Método BCA

A dosagem de proteína foi realizada com o *kit* Pierce, Rockford, I.L., EUA. A curva padrão foi estabelecida com diluições seriada do padrão albumina sérica bovina (BSA) em PBS. As amostras foram diluídas em PBS na diluição 1:10. Um volume de 25 µL de cada diluição do padrão e das amostras foram transferidos para orifícios da placa (Nunc). Em seguida, foi adicionado a todos os poços da placa (curva e amostras) 200 µL do reagente BCA (misturado na proporção de 50 partes do reagente A para 1 parte do reagente B). Após leve agitação, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37 °C em estufa. Decorrido o tempo de incubação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation, Marietta, Ohio, EUA) na absorbância 562 nm. Os dados foram lançados no programa para obtenção da quantidade de proteína presente nas amostras.

3.1.4.4 SDS-PAGE

O teste de foi realizado com o Kit da BIORAD (BIORAD S.A, Hercules, C.A, EUA). O preparo do gel de resolução, da amostra viral, do padrão, das soluções de empacotamento, acetato e de revelação foram feitos conforme especificação do fabricante.

O gel foi adicionado à placa e incubado 37 °C para facilitar a polimerização. Após a polimerização foi aplicado o gel de empilhamento. Após a polimerização, as placas com gel foram fixadas na placa de corrida e conjunto transferido para uma cuba contendo tampão de corrida. A seguir, as amostras virais do sorotipo G4 de rotavirus e controle do antígeno, previamente fervidas a 99 °C em presença de tampão de amostras foram aplicadas no gel.

A corrida foi feita a 110 volts, 55 mA durante uma hora e quarenta minutos. Após o término da corrida o gel foi lavado duas vezes durante 10 minutos em agitação.

O método de coloração escolhido foi o de coloração pela prata. O gel foi imerso na *fixative enhancer solution* (Reagente grade metanol – 200 mL 50%v/v, reagente grade ácido acético – 40 mL 10%v/v, *Fixative enhancer concentrate* - 40 mL 10%v/v, água deionizada - 120 mL 10%v/v) por 20 minutos em agitação e lavado duas vezes com água *MiliQ* por 10 minutos em agitação e secado.

Após a secagem o gel foi imerso na solução de revelação (35 mL de água deionizada, 5 mL de *silver complex solution*, 5 mL de *reduction moderator solution*, 5 mL de *image development reagent*, 50 mL *development accelerator solution*) e agitado por 20 minutos. Decorridos os 20 minutos o gel foi retirado da solução de revelação, lavado com água

deionizada. Após a lavagem o gel foi imerso em uma solução de ácido acético 5% durante 15 minutos, novamente lavado com água deionizada, em agitação, e secado.

3.1.4.5 DNA residual

A dosagem de DNA residual foi realizada pelo Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan. Para detecção de DNA celular no purificado viral foi utilizada a técnica de hibridização *Slot/Blot*, cuja sensibilidade detecta quantidades inferiores a 15 pg de DNA. O teste foi realizado utilizando o kit *Amersham gene image alkphos direct labeling and detection sistem/Amersham CPD-star detection* reagent (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, England). O preparo da membrana, da solução de hibridização e da solução de revelação foram feitos seguindo o protocolo do fabricante. Após a hibridização a membrana foi exposta a um filme de raio X, revelada e escaneada no programa *lab scann* (GE Healthcare, LittleChalfont Buckinghamshire, Inglaterra) para quantificação.

3.1.4.6 Teste de micoplasma

Amostras de células foram coletadas durante todo o processo de produção dos hibridomas e submetidas a exames de detecção de micoplasma por PCR e por cultivos seletivos. Os testes foram realizados no laboratório do Dr. Jorge Timenestsky da Universidade de São Paulo especializado na detecção de micoplasmas.

3.2 Imunização dos animais

3.2.1 Teste de excreção viral

Antes da imunização dos animais, foram coletadas amostras de fezes para exame de excreção viral. O teste foi realizado com o *Kit Slidex Rota-kit 2* BioMérieux (BioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile, France) no laboratório de vírus entéricos do Instituto Adolfo Lutz pela equipe da Dra. Maria do Carmo Timenestsky. Neste teste as amostras de fezes dos animais são diluídas em tubos, e em seguida uma alíquota de 100 µL de cada amostra foi transferida para os poços de uma placa de ELISA previamente sensibilizada com anticorpos anti-rotavírus. Após uma hora de incubação as placas foram lavadas e foi adicionado o conjugado imunoenzimático. Novamente, após uma hora de incubação as placas foram lavadas para a

adição do substrato, e na seqüência foi colocado o cromógeno para revelação. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm.

3.2.2 Inoculação intraperitoneal do antígeno viral

Neste trabalho foram utilizados dois diferentes esquemas de imunização para a obtenção de clones secretores de anticorpos monoclonais para rotavírus.

No primeiro esquema de imunização (Esquema 1), um grupo camundongos Balb/c entre 4 e 5 semanas de idade, peso de 18 a 22 g foi imunizado com a cepa de rotavírus IB-BRV-4- G4 2^a passagem/purificado, com título de $5,8 \times 10^5$ PFU/ mL e 315µg/mL de proteína viral. Antes de iniciar a imunização os animais foram avaliados quanto a um possível contato prévio com cepas humanas de rotavírus pelos testes de excreção viral e titulação do soro.

Cada animal foi inoculado, por via intraperitoneal, com 0,26 mL do antígeno, o que correspondeu a 81,9 µg de proteína viral. O esquema de imunização adotado foi de três doses (nos dias 0, 28 e 49) com um reforço a 4 dias da coleta de órgãos linfóides para a fusão.

No segundo esquema de imunização (Esquema 2), um grupo camundongos Balb/c com as mesmas características do esquema1, foram imunizados com 3 doses (nos dias 0, 21 e 42) da mesma suspensão de rotavírus do sorotipo G4 utilizada no esquema1, porém com duas doses formuladas com o adjuvante Marcol/Montanide (1^a e 3^a doses). Cada animal foi inoculado, por via intraperitoneal, com 0,26 mL do antígeno ou 0,26 mL do antígeno e 0,24 mL Marcol/Montanide, que correspondeu a 81,9 µg de proteína viral. Os animais receberam um reforço com antígeno e adjuvante a 5 dias da coleta de órgãos linfóides para a fusão.

Todos os procedimentos foram realizados dentro das normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), protocolo 784/10.

3.2.3 Coleta e processamento de sangue

Sete dias após a administração da 1^a e 3^a doses, amostras de sangue dos animais imunizados foram coletadas por via retro orbital para a titulação de anticorpos.

O sangue coletado foi incubado a 37 °C por 40 minutos e em seguida a temperatura de 20 °C por uma hora. Após o período de incubação o sangue dos animais foi centrifugado duas vezes a 2000 RPM durante cinco minutos (Centrífuga Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O soro obtido foi estocado em freezer -20 °C (Bosch, Campinas, S.P., Brasil).

3.2.4 Titulação de anticorpos por ELISA no soro de animais imunizados com sorotipo G4 rotavirus

A titulação de anticorpos no soro de animais imunizados foi realizada por ELISA conforme descrito por THEAKSTON et al., 1977, com algumas modificações.

Inicialmente placas de microtitulação de 96 poços (Nunc, Roskilde, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com 100 µL de antígeno viral (10 µg/mL) e incubadas *overnight* (18 horas) em câmara úmida a 4 °C em geladeira (Bosch, Campinas, S.P., Brasil). Após a incubação todos os poços das placas foram bloqueados com 200 µL de tampão de bloqueio. As placas foram novamente incubadas em estufa durante 90 minutos a 37 °C. Após o bloqueio, a solução presente nos orifícios foi desprezada e as placas lavadas 6 vezes com tampão de lavagem.

Após o bloqueio, 100 µL de diluições seriadas do soro de animais imunizados foram adicionados aos poços das placas, que foram incubadas a 37 °C por 90 minutos. A solução presente nos orifícios das placas foi desprezada, as placas foram lavadas 6 vezes com tampão de lavagem e a elas foram adicionados 100 µL de conjugado IgG de Coelho anti-IgG de mouse marcado com peroxidase (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluído a 1:1.000. As placas foram novamente incubadas por 60 minutos em estufa a 37 °C. Após este período placas foram novamente lavadas por 6 vezes e adicionado 100 µL de solução de substrato OPD 0,4 mg/mL (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) com 0,01% de H₂O₂ (Merck S.A, Rio de Janeiro, R.J., Brasil) em tampão Citrato-Fosfato. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos na ausência de luz e então foram adicionados 50 µL de solução de H₂SO₄ (Synth, Diadema, S.P., Brasil) para bloquear a reação. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Electron Corporation, Marietta, Ohio, EUA) a 492 nm. O título de anticorpos foi definido como o inverso da diluição máxima do soro capaz de produzir uma absorbância a 492nm maior que a observada com controle negativo.

3.3 Produção de hibridomas

3.3.1 Descongelamento de células de mieloma SP2/O

As células utilizadas no trabalho foram retiradas do Banco Mestre do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, adquiridas do *Laboratory of Experimental*

Immunology, Catholic University of Louvain, Brussels – Belgium. Após retirar o criotubo (Corning Corporation, New York, N.Y., EUA) contendo a suspensão de células do tambor de nitrogênio líquido (ABS Pecplan, Uberaba, M.G., Brasil), procedeu-se o descongelamento em banho-maria (Sheldon) a 37 °C.

Em cabine de fluxo laminar, 2 mL da suspensão celular SP2/0 presentes no criotubo foram transferidos para um tubo estéril (Corning Corporation, New York, N.Y., EUA) com 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y., EUA) que foi suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y., EUA), 2 mM de piruvato de sódio (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y., EUA) e 60 µg/mL de gentamicina (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA) agora denominado RPMI⁻. A seguir este meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA), sendo denominado RPMI⁺. As células foram centrifugadas duas vezes (cinco minutos a 500 g), ressuspensas em 10 mL de meio RPMI⁺ e transferidas para um frasco de cultura de células (Corning Corporation, New York, N.Y., EUA) de 25 cm² e a viabilidade avaliada em microscópio.

A cultura de células foi incubada em estufa a 37 °C com 5% CO₂ e o crescimento celular acompanhado diariamente através de microscópio invertido (Nikon Corporation, Melville, N.Y., EUA.). Quando o tapete celular apresentou uma cobertura de 90% da superfície de cultivo do frasco de cultura de células de 25 cm² as células foram ressuspensas e expandidas para frascos de cultura de 75 cm². A seguir, a cada subcultivo das células, foram realizados congelamentos das células SP2/O para o estabelecimento de um banco de células trabalho.

3.3.2 Coleta de células peritoneais de camundongo – *Feeder layer*

O animal selecionado foi sacrificado de acordo com as normas estabelecidas pela comissão de ética, fixado em uma placa dentro de uma cabine de fluxo laminar e completamente lavado com álcool 70% (Wirath Ltda, São Paulo, S.P., Brasil). Utilizando-se uma tesoura curva, a pele do abdômen do animal foi seccionada e separada da membrana que reveste o peritônio. Novamente o local foi lavado com álcool 70% (Wirath Ltda) para a inoculação de 5 mL de meio RPMI⁺ na cavidade abdominal. O abdômen do animal foi massageado, e em seguida o líquido inoculado foi recolhido, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Rapidamente, em cabine de fluxo laminar, o líquido recuperado da cavidade abdominal do animal foi misturado a 45 mL de meio RPMI⁺ e transferido para placas de

cultura celular de 96 poços (Corning Corporation, New York, N.Y., EUA), que a seguir, foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂.

3.3.3 Preparo da suspensão celular SP2/O

As células de mieloma SP2/O em processo de cultivo foram avaliadas em microscópio invertido quanto à viabilidade, morfologia celular e ausência de contaminantes. Foram também analisadas por PCR para detecção da presença de micoplasma.

Após a avaliação microscópica e em cabine de fluxo laminar o tapete celular foi descolado mecanicamente da superfície de cultivo do frasco e toda a cultura de células em suspensão foi lavada por 3 vezes e ressuspensa em 10 mL de meio RPMI⁻ com a retirada de uma alíquota da suspensão para contagem celular. A seguir concentração celular foi ajustada para preparo de quatro frascos de cultura de 75 cm² com concentração celular inicial de 5 x 10⁵ células/mL um dia antes da fusão.

3.3.4 Extração de células do Baço

O camundongo que apresentou o maior título de anticorpos frente à imunização com rotavírus foi selecionado para a extração do baço, fonte de células a serem fusionadas com células SP2/O.

O camundongo foi anestesiado, conforme normas da comissão de ética, e fixado em uma placa para a sangria, e na seqüência sacrificado conforme normas da Comissão de Ética e lavado com álcool 70% (Wirath Ltda). A pele da região abdominal do animal foi cortada para a remoção do baço. Após remoção, o baço foi imerso em meio RPMI⁻ (Gibco-Invitrogen) e levado para uma cabine de fluxo laminar. O baço foi colocado sobre uma peneira acoplada a um Becker, injetado com meio RPMI⁻ e em seguida, picotado e macerado. As células foram então lavadas e ressuspensas em 10 mL de meio RPMI⁻ para a contagem celular. Foram obtidas 29 x 10⁶ células totais. Após a avaliação microscópica, as melhores culturas de SP2/O foram selecionadas e lavadas três vezes com meio RPMI⁻.

3.3.5 Fusão

O processo de fusão foi conduzido seguindo o protocolo descrito por Köhler e Milstein (1975) com modificações. Em cabine de fluxo laminar, um total de 5,4 x 10⁶ células

de baço e $2,7 \times 10^6$ células SP2/O foram misturadas em um tubo de 50 mL e lavadas. Todo o processo de fusão foi realizado em um becker contendo água a 37 °C. Após descartar o sobrenadante, 1 mL de PEG esterilizado e preparado com 0,5 g de PEG, 0,7 mL de PBS e 50 µL de DMSO (Sigma Aldrich S.A., Saint Louis, Missouri, EUA), foi adicionado ao *pellet* por gotejamento em 60 segundos. A seguir, o tubo foi incubado a 37 °C por 90 segundos. O tubo foi recolocado em banho a 37 °C para adição de 1 mL meio RPMI⁻, em constante homogeneização, por 60 segundos, e em seguida e nas mesmas condições foram adicionados 20 mL de RPMI⁻ em 4 minutos. Após a adição de meio, o tubo foi deixado em repouso a 37 °C por 4 minutos. A suspensão celular presente no tubo foi novamente centrifugada por cinco minutos a 500 g e ressuspensa com volume de meio RPMI⁺ contendo meio HAT (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y., EUA), para ajustar a concentração celular para 1×10^6 células/mL. A seguir, a suspensão de células foi incubada em estufa 37 °C e 5% CO₂ durante 3 horas.

As placas de 96 poços preparadas com *feeder layer* foram levadas à cabine de fluxo laminar para a retirada do sobrenadante dos poços e adição de duas gotas por poço da mistura de suspensão celular. As culturas de células foram incubadas por 3 dias a 37 °C e 5% CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante dos hibridomas foi retirado com uma pipeta Pasteur com o auxílio de uma bomba de vácuo e imediatamente preenchidos com meio RPMI⁺ contendo meio HAT. Após uma semana do início da fusão, os hibridomas passaram a receber meio RPMI⁺ contendo meio HT (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y., EUA) e após 3 semanas, apenas meio RPMI⁺.

Quando os hibridomas estavam ocupando um terço da área de cultivo dos poços das placas de cultura, começaram as coletas dos sobrenadantes para testar a presença de anticorpos contra rotavírus.

3.3.6 Padronização do ELISA para dosagem de anticorpos anti-rotavirus

Inicialmente, metade dos poços das placas de microtitulação foi sensibilizada com 100 µL de antígeno viral (5 e 10 µg/mL) e a outra metade com antígeno controle. As placas foram incubadas *overnight* (18 horas) em câmara úmida a 4 °C. A seguir, foram bloqueadas, adicionando-se 200 µL de tampão de bloqueio e incubadas durante 90 minutos a 37 °C. Após o bloqueio, as placas foram lavadas 6 vezes com tampão de lavagem. Em seguida foram adicionados 100 µL de soro do animal imunizado diluído serialmente a partir de 1:100 até

1:51.200 nos poços das placas, que foram incubadas a 37 °C por 90 e posteriormente lavadas 6 vezes com tampão de lavagem. Em metade da placa foram adicionados 100 µL de conjugado de coelho anti-IgG de mouse marcado com peroxidase diluído 1: 1.000 e na outra metade diluído 1:5000 em tampão de diluição do conjugado. As placas de microtitulação foram incubadas por 60 minutos a 37 °C e lavadas novamente por 6 vezes. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de substrato OPD 0,4 mg/mL com 0,01% de H₂O₂. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos na ausência de luz. Após este período, foram adicionados 50 µL de solução de H₂SO₄ (Sigma Aldrich) para parar a reação e a leitura realizada em leitor de ELISA a 492 nm.

Considerado a possibilidade de ligações inespecíficas dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante a triagem foi realizado mais um teste controle. O teste de ELISA foi realizado com a mesma metodologia descrita anteriormente, porém os poços das placas de microtitulação não foram sensibilizados com antígeno viral e a estes foram adicionados sobrenadantes de cultura de hibridomas já testados e considerados positivos (secretores de anticorpos anti - rotavírus).

O sobrenadante das culturas de hibridomas começaram a ser testados por ELISA, utilizando placas sensibilizadas 10 µg/mL de antígeno viral e conjugado diluído a 1:1000, conforme metodologia descrita anteriormente.

3.3.7 Clonagem dos hibridomas

Após a seleção dos hibridomas secretores de anticorpos, os mesmos foram expandidos, parte deles congelados, chamados K₀. Três congelamentos foram realizados em dias distintos. Os hibridomas foram a seguir clonados por diluição limitante com concentração celular ajustada para 5 células/mL em RPMI⁺ e distribuídos em placas de 96 poços com 200 µL/poço. As culturas de hibridomas foram observadas ao microscópio invertido diariamente para identificação dos poços contendo apenas um clone de células. Quando a cultura de hibridomas estava ocupando um terço do poço foram novamente testados por ELISA e os clones selecionados foram expandidos, parte deles congelados (três congelamentos foram realizados em dias distintos) e denominados K₁ (submetidos a uma clonagem). A seguir, os hibridomas foram novamente clonados (K₂) por diluição limitante com concentração celular ajustada para 2 células/mL. Após crescimento os hibridomas foram novamente testados, e os clones positivos foram expandidos e congelados.

3.3.8 Congelamento de células SP2/O e hibridomas

Após lavagem das células, o *pellet* celular foi ressuspensão lentamente com meio de congelamento contendo 15% de DMSO (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) em RPMI⁺ (Gibco-Invitrogen) contendo 50 µL de DMSO/mL. Foram distribuídos 2 mL por criotubo (Corning Corporation). Os criotubos foram armazenados por um período de 24 horas em freezer a -80 °C (Nuair, Plymouth, M.N., U.S.A) e depois transferidas para o nitrogênio líquido, onde foram armazenadas.

3.3.9 Caracterização e análise da especificidade dos anticorpos monoclonais

3.3.9.1 Isotipagem

Na identificação do isótipo do anticorpo monoclonal anti-rotavírus as placas de microtitulação foram sensibilizadas com 100 µL de antígeno viral contendo 10 µg/mL diluído em tampão de diluição de antígeno. Estas placas foram incubadas *overnight* por 18 horas em câmara úmida a 4 °C. A seguir, todos os orifícios das placas foram bloqueados com 150 µL de tampão de bloqueio e a placa novamente incubada durante 90 minutos a 37 °C. Após o bloqueio, desprezou-se a solução presente nos orifícios, que foram lavados 6 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL do sobrenadante das culturas de hibridomas selecionados para isotipagem aos orifícios das placas (Nunc). Como controle positivo foi utilizado o soro animais imunizados com rotavírus e como controle negativo foi utilizado o sobrenadante de cultura de células SP2/O. As placas foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C, lavadas, e em seguida foram adicionados os anticorpos biotinizados anti-isotipos de camundongo (Southernbiotech Birmingham, Alabama, EUA): IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA diluídos 1:1000, IgM diluído 1:10.000 e IgE diluído 1:500.

A cada etapa, as placas foram cobertas com parafilme, lavadas e incubadas a 37 °C por 60 minutos. A seguir, adicionou-se Estrepto-avidina peroxidase diluída a 1:6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), sendo a reação antígeno-anticorpo revelada com a adição do substrato OPD 0,4 mg/mL contendo 0,01% de H₂O₂. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos na ausência de luz. Após este período foram adicionados 50 µL de solução de H₂SO₄ para interromper a reação e a leitura realizada em leitor de ELISA (492 nm).

3.3.9.2 Dot Blotting

Amostras virais de cinco sorotipos de rotavírus (G1, G2, G3, G4, G9) e amostra do controle do antígeno foram aplicadas diretamente em tiras de membrana de nitrocelulose na concentração de 0,5 µg/µL. Em seguida, estas tiras de membrana foram incubadas 37 °C por 5 minutos para fixar as amostras, e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com solução bloqueadora (solução de 5% de leite desnatado em tampão tris-salina). Após o bloqueio as tiras de membrana foram lavadas sob agitação por 5 minutos com tampão tris-salina, num total de 3 lavagens. Após a lavagem, as membranas foram incubadas por duas horas, sob agitação constante e temperatura ambiente, com preparações de anticorpos monoclonais contra rotavirus e soro policlonal de animal imunizado com sorotipo G4 rotavirus (rotavirus (Diluído a 1:100 em tampão tri-salina com 5% de leite desnatado e previamente titulado por ELISA). Como controle negativo foi utilizado soro de animal não imunizado e sobrenadante de cultura de SP2/O. Após o período de incubação, as membranas foram novamente lavadas em tampão tris-salina e incubadas por duas horas, sob agitação constante e temperatura ambiente, com um conjugado imunoenzimático anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase diluído a 1:5000 em tampão tris-salina com 5% de leite desnatado. As membranas foram lavadas novamente e a reação foi revelada com um substrato cromógeno (4-cloro-1-naftol 0,05% em metanol 15%, em presença de H₂O₂ 0,03%). Ao final, a reação foi interrompida com a adição de água de torneira.

3.3.9.3 Western Blotting

O gel de SDS-PAGE foi preparado conforme descrito para no item 3.1.4.4. A seguir, amostras virais de cinco sorotipos de rotavirus (G1, G2, G3, G4, G9) e a amostra controle, previamente fervidas a 99 °C por 5 minutos em presença do tampão de amostra foram aplicadas gel numa quantidade de 25 µg/amostra. Após a corrida, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e coradas com solução de Ponceau (0,05%) diluída em ácido acético a 1% para verificar a eficiência da transferência. O gel foi corado pela prata conforme descrito no item 3.1.4.4. Após a lavagem em tris-salina a parte da membrana de nitrocelulose contendo o padrão de peso foi removida e o restante incubada por 2 horas a temperatura ambiente com solução bloqueadora (solução de 5% de leite desnatado em tampão tris-salina). Após o bloqueio as membranas foram lavadas sob agitação por 5 minutos com tampão tris-salina, num total de 3 lavagens. Após a lavagem, as

membranas foram incubadas por duas horas, sob agitação constante e temperatura ambiente, com preparações de anticorpos monoclonais contra rotavirus e soro policlonal de animal imunizado com sorotipo G4 rotavirus (Diluído a 1:100 em tampão tri-salina com 5% de leite desnatado e previamente titulado por ELISA). Como controle negativo foi utilizado soro de animal não imunizado, sobrenadante de cultura de SP2/O. Após o período de incubação, as membranas foram novamente lavadas em tampão tris-salina e incubadas por duas horas, sob agitação constante e temperatura ambiente, com um conjugado imunoenzimático anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase diluído a 1:5.000 em tampão tris-salina com 5% de leite desnatado. As membranas foram lavadas novamente e a reação foi revelada com um substrato cromógeno (4-cloro-1-naftol 0,05% em metanol 15%, em presença de H₂O₂ 0,03%). Ao final, a reação foi interrompida com a adição de água de torneira. A técnica adotada foi a realizada por Towbin, Staehelin e Gordon 1979.

4 RESULTADOS

4.1 Produção do antígeno

Foram produzidos 149,0 ml de antígeno de rotavírus do sorotipo G4 purificado. Durante todo o processo de produção do antígeno viral foram feitos testes de controle de qualidade do produto (esterilidade, titulação viral, identidade genética, pesquisa de micoplasma e dosagem de DNA celular residual) para assegurar a integridade, atividade das partículas virais e garantir um antígeno livre de quaisquer contaminantes. Os resultados estão demonstrados na (Tabela 3 e Figura 16).

Tabela 3 - Resultados dos testes de Controle de Qualidade realizados durante o preparo do antígeno purificado.

Amostras Testadas	Resultados dos Testes de Controle de Qualidade				
	Esterilidade	Titulação (PFU/mL)	Pesquisa de Micoplasma	DNA residual	Proteína (µg/mL)
IB-BRV-4 G4-2^a p	ND	4,7 x 10 ⁶	ND	-	390,0
IB-BRV-4 G4-2^a p Purificado	ND	6,8 x 10 ⁵	ND	< 15pg	337,0
IB-BRV-4 G4-2^a p 2x Purificado	ND	5,8 x 10 ⁵	ND	< 15pg	315,0

Testes de esterilidade foram realizados em tubos de ensaio contendo meios de cultura Tripticaseína soja e tioglicolato.

Testes de titulação viral foram realizados em placas de titulação em substrato celular com células MA-104. Testes de detecção de micoplasma foram realizados por PCR e cultivo em meio PPLO.

IB-BRV-4 G4-2^a p: suspensão de rotavírus do sorotipo G4 (2^a passagem do vírus em células Vero).

IB-BRV-4 G4-2^a p purificado: suspensão de rotavírus do sorotipo G4 purificada (2^a passagem do vírus em células Vero).

IB-BRV-4 G4-2^a p 2x purificado: suspensão de rotavírus do sorotipo G4 duas vezes purificada (2^a passagem do vírus em células Vero).

PFU/mL: Unidades formadoras de placa por mL.

ND- nada detectado

Dosagem de DNA residual realizado pela técnica de hibridização Slot/Blot com o kit *Amersham gene image alkphos direct labeling and detection sistem/Amersham CPD-star detection* reagent. O valor de 15pg corresponde à sensibilidade do teste.

Dosagem de proteína realizada pelo método de BCA modificado com Kit da Pierce.

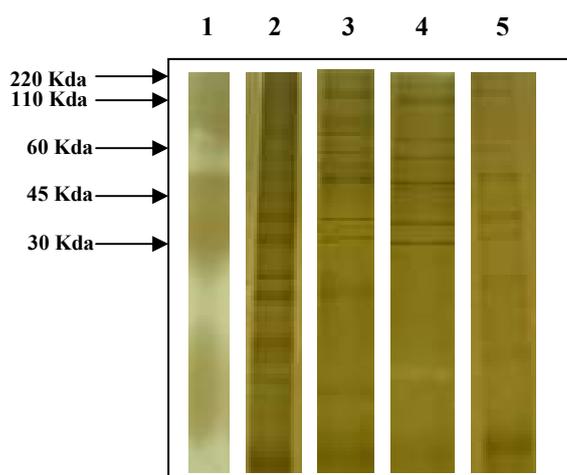


Figura 16 - SDS – PAGE após coloração pela prata. O gel foi corado com o Kit da BIORAD.

- 1- Padrão de peso
- 2- Controle de células Vero
- 3 - IB-BRV- 4 - G4 2^ap. 1x P – 337 µg/mL
- 4- IB-BRV- 4 – G4 2^ap. - 390 µg/mL
- 5- IB-BRV- 4 – G4 2^ap. 2x P - 315µg/ mL

As amostras dos antígenos de rotavírus purificados uma ou duas vezes apresentaram perfil eletroforético compatível com o encontrado nos rotavírus conforme demonstrado na figura 16.

A análise desta figura permite observar que as suspensões de vírus purificadas uma ou duas vezes não apresentam diferença no perfil eletroforético. O mesmo ocorre com a concentração de DNA celular residual (Tabela 3). Entretanto, pode-se verificar que o título viral e a concentração protéica diminuem após a segunda purificação, indicando assim, que uma segunda purificação é desnecessária.

4.2 Padronização do teste de ELISA para dosagem de anticorpos anti-rotavirus

Para a padronização do teste de ELISA foram testadas duas concentrações de antígeno para a sensibilização da placa (5 e 10 µg/mL) e duas diluições do conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG mouse marcado com peroxidase (1:1.000 e 1:5.000) e os resultados obtidos estão demonstrados na figura 17.

Para investigar a presença de anticorpos contra proteínas existentes na suspensão viral provenientes do substrato celular onde o vírus foi multiplicado, foi realizado um teste de ELISA com um controle de células Vero processado da mesma maneira que o antígeno viral. O resultado deste teste está demonstrado na figura 18.

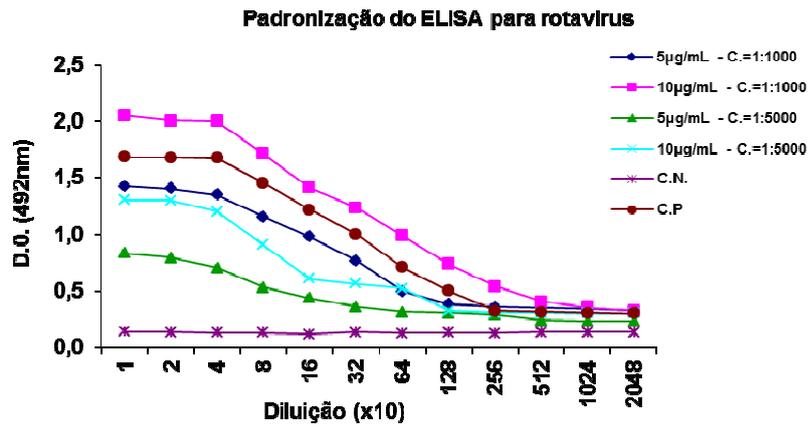


Figura 17 - Padronização do ELISA para detecção de anticorpos anti-rotavírus no sobrenadante de cultura de hibridomas. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com 5 e 10 µg/mL de rotavírus do sorotipo G4, após o bloqueio foram incubadas inicialmente com o soro de animal imunizado e um animal não imunizado (grupo controle) e depois com o conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG mouse marcado com peroxidase nas diluições de 1:1000 e 1:5000. A reação foi revelada pela adição de substrato e leitura de absorbância a 492 nm.

C.: Conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG mouse marcado com peroxidase.

D.O.: Densidade Ótica.

C.P.: Controle positivo, soro de animal imunizado com título de anticorpos anti-rotavírus determinado em testes de PRN (1/2560).

C.N.: Controle negativo, soro de animal não imunizado.

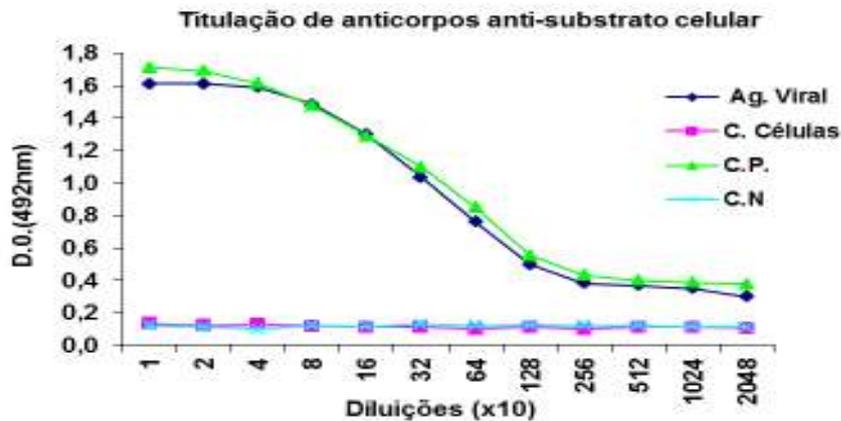


Figura 18- Pesquisa de anticorpos anti-substrato celular no soro de animais imunizados com o sorotipo G4 de rotavírus. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com 10 µg/mL de rotavírus sorotipo G4 e 10µg/mL de antígeno controle foram bloqueadas e incubadas com soro de animais imunizados. Em seguida, as placas foram novamente incubadas com conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1:1000. A reação foi revelada pela adição de substrato e leitura de absorbância a 492 nm .

Ag viral: Antígeno viral sorotipo G4 de rotavírus.

CC: Sobrenadante de cultura de células Vero produzido nas mesmas condições que o antígeno viral.

D.O. : Densidade Ótica.

C.P.: Controle positivo, soro de animal imunizado com título de anticorpos anti-rotavírus conhecido.

C.N.: Soro de animal não imunizado.

O resultado do teste de ELISA descrito na figura 18 mostra que nos poços sensibilizados com antígeno controle não houve reatividade com anticorpos presentes no soro do animal imunizado, conforme valores de absorvância observados. Ao contrário, nos poços sensibilizados com antígeno viral houve reatividade. O resultado sugere que os animais imunizados não responderam às proteínas do substrato celular utilizado na produção do vírus.

4.3 Experimento I

4.3.1 Imunização dos camundongos com sorotipo G4 de rotavírus (esquema de imunização 1, sem adjuvante)

Os resultados obtidos com o Kit *Slidex Rota-kit 2* - BioMérieux demonstraram que os animais a serem usados na imunização não estavam excretando rotavírus, pois todas as amostras de fezes coletadas dos animais apresentaram resultados negativos.

Para avaliação da resposta imunológica dos camundongos antes da imunização (D_0) e após administração de três doses de 81,9 μg de rotavírus do sorotipo G4, os soros desses animais foram submetidos a um teste de titulação por ELISA. Os títulos de anticorpos obtidos em amostras de soros de cinco animais antes e após a imunização com as três doses estão expressos nas figuras 19 e 20.

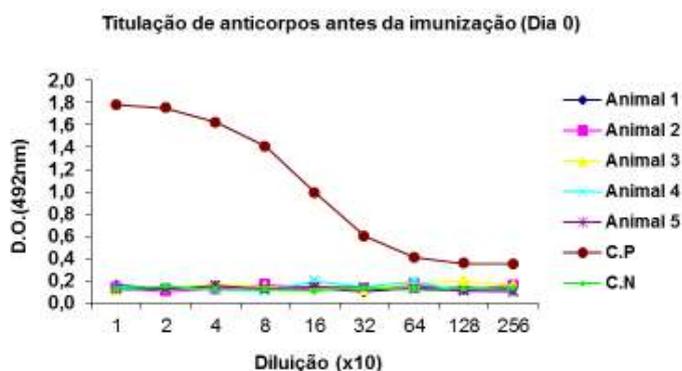


Figura 19 - Pesquisa de anticorpos nos soros dos camundongos antes da imunização com sorotipo G4 de rotavírus. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com rotavírus do sorotipo G4 e bloqueadas foram incubadas com amostras de soros dos animais antes da imunização. Como conjugado imunoenzimático foi utilizado IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase. A reação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição de substrato (OPD e H_2O_2) e absorvância lida a 492 nm. O título de anticorpos corresponde à recíproca da maior diluição do soro que resulta em uma absorvância maior que a do controle negativo.

D.O. : Densidade Ótica

C.P.: Soro de animal imunizado com título viral conhecido (1/2560 em testes de neutralização em células: *PRN*)

C.N.: Soro de animal não-imunizado

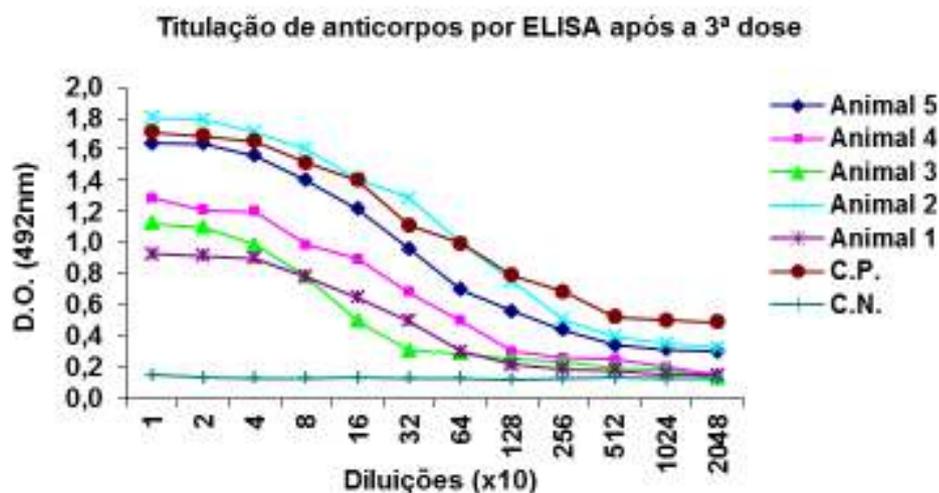


Figura 20 - Titulação de anticorpos nos soros dos camundongos imunizados com o sorotipo G4 de rotavírus. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com rotavírus do sorotipo G4 e bloqueadas foram incubadas com os soros dos animais imunizados coletados 4 dias após o último reforço. Como conjugado imunoenzimático foi utilizado a IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase. A reação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição de substrato (OPD e H₂O₂) e absorbância lida a 492 nm. O título de anticorpos foi definido como o inverso da diluição máxima do soro capaz de produzir uma absorbância a 492nm maior que a observada com controle negativo.

D.O. : Densidade Ótica

C.P.: Soro de animal imunizado com título viral conhecido (1/2560 em testes de neutralização em células: PRN)

C.N.: Soro de animal não-imunizado

Os níveis de anticorpos anti- rotavírus encontrados nas amostras dos soros dos animais imunizados variaram de 1/10.424 a 1/20.480 demonstrando que o esquema de imunização I induziu uma boa resposta imunológica em nível de anticorpos e que os órgãos linfóides destes animais podem usados em fusões para obtenção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais.

Nas amostras de soros dos animais antes da imunização não foram detectados anticorpos anti- rotavírus humano.

4.3.2 Geração de hibridomas

Os resultados dos testes de ELISA obtidos em amostras coletadas dos sobrenadantes das culturas de hibridomas quando estas estavam ocupando uma área entre um terço e a metade da área de cultivo dos poços das placas, estão demonstrados na figura 21. Estes testes foram realizados para a identificação de quais culturas estavam secretando anticorpos reativos ao sorotipo G4 de rotavírus.

Na observação microscópica das placas foram visualizados 320 poços com hibridomas. Dentre eles foram encontrados 21 reativos para o sorotipo G4 de rotavírus, sendo que oito hibridomas apresentaram D.O. de 0,8 a 1,0; onze com D.O. entre 1,0 e 1,5 e dois com D.O de 1,9 e 2,3 conforme demonstrado na figura 21.

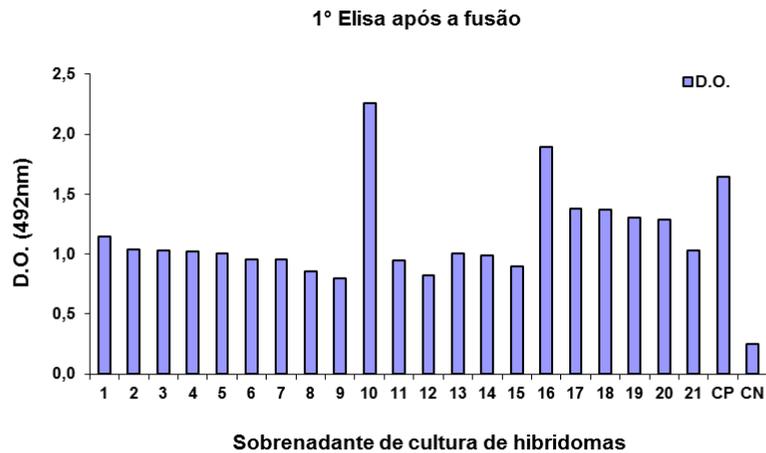


Figura 21 - Primeiro teste de ELISA após a fusão. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com 10 µg/mL de rotavírus sorotipo G4 e bloqueadas foram incubadas com os sobrenadantes de culturas de hibridomas e em seguida com o conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG camundongo marcado com peroxidase nas diluição de 1:1000. A reação foi revelada pela adição de substrato e leitura de absorbância a 492 nm.

D.O. : Densidade Ótica.

C.P.: Soro de animal imunizado com título viral conhecido (1/2560 em testes de neutralização em células: PRN)

C.N.: Sobrenadante de cultura de células SP2/O

Após a identificação dos clones positivos, os sobrenadantes das culturas de hibridomas foram coletados a cada 48 horas e testados por ELISA para acompanhar a secreção de anticorpos destas culturas e orientar na expansão destes clones. As fases iniciais de crescimento do hibridomas estão ilustradas nas figuras 22 e 23.

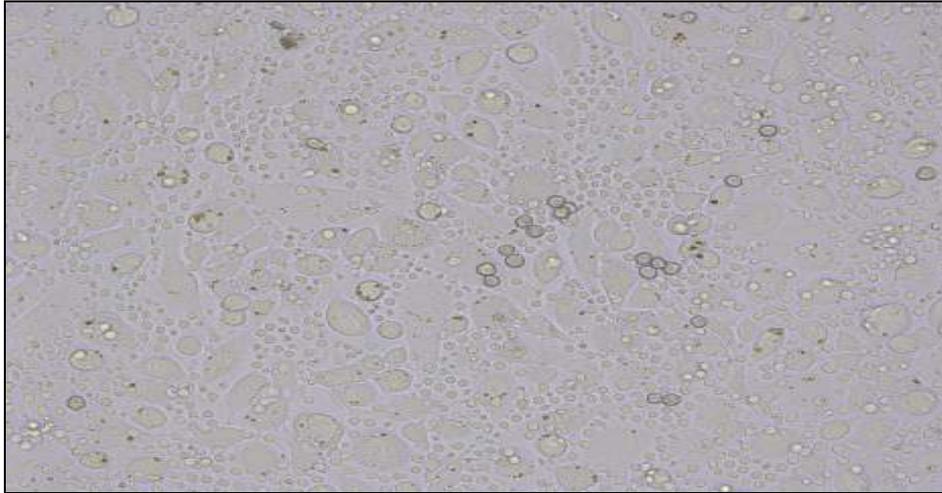


Figura 22 - Clones entre 24 e 48 horas após a fusão – microscopia ótica aumento de 20X.
Fonte: Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, 2010.

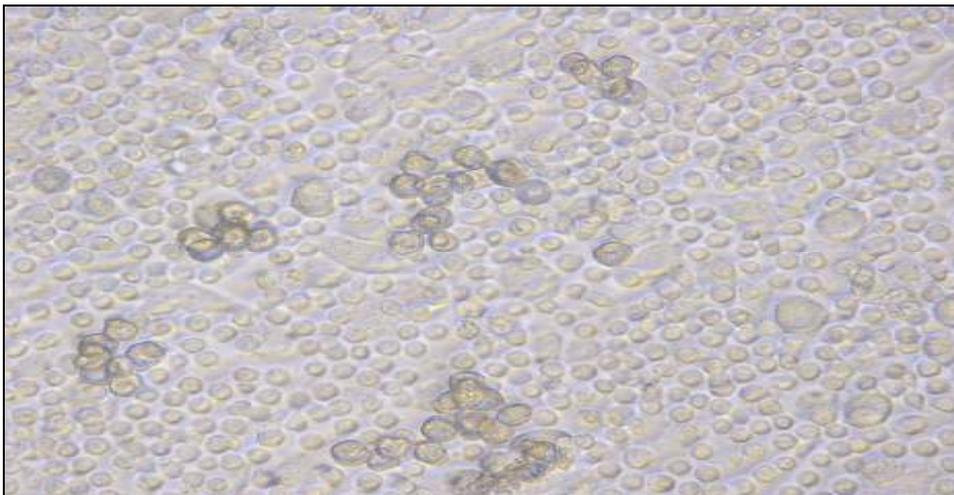


Figura 23 - Clones com 72 horas após a fusão – microscopia ótica aumento de 40X.
Fonte: Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, 2010.

Com o objetivo de testar a especificidade do anticorpo monoclonal produzido, foi realizado um ensaio no qual parte da placa de ELISA, não foi sensibilizada com antígeno viral, e os resultados encontrados estão demonstrados na figura 24.

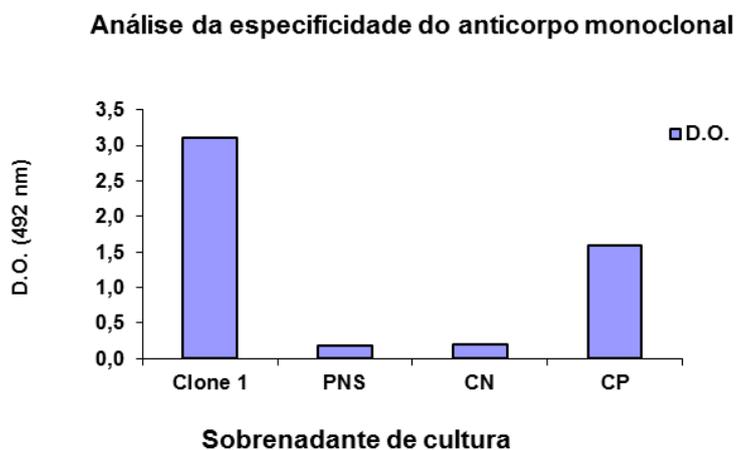


Figura 24 - Avaliação da especificidade do anticorpo monoclonal pela técnica de ELISA. Placas de microtitulação sem previa sensibilização (a exceção de 3 poços que foram sensibilizados com 10 µg/mL de rotavírus sorotipo G4) foram bloqueadas e incubadas com sobrenadantes de hibridomas secretando anticorpos anti-rotavírus. Em seguida, as placas foram novamente incubadas com conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1:1000. A reação foi revelada pela adição de substrato e leitura de absorvância a 492 nm.

CN: Controle negativo, sobrenadante de cultura de SP2/O.

CP: Controle positivo, sobrenadante de cultura de hibridoma positivo

PNS: Poços não sensibilizados e incubados com sobrenadante de cultura de hibridoma positivo.

Os resultados apresentados na figura 24 demonstram que o monoclonal produzido não se liga a nenhum componente da reação que não seja o sorotipo viral usado na sensibilização da placa.

Após a expansão dos 21 hibridomas inicialmente selecionados, apenas doze foram clonados e apenas seis foram subclonados. Na escolha dos hibridomas para clonagem e subclonagem foram utilizados os parâmetros de reatividade e padrão de crescimento. Dos 12 hibridomas clonados, 11 apresentaram maior reatividade em K_1 e dos seis hibridomas subclonados, cinco deles mantiveram ou aumentaram a reatividade e apenas um apresentou ligeira queda de reatividade. A figura 25 mostra a evolução da reatividade dos anticorpos secretados de cada clone selecionado em suas diferentes fases K_0 , K_1 , K_2 .

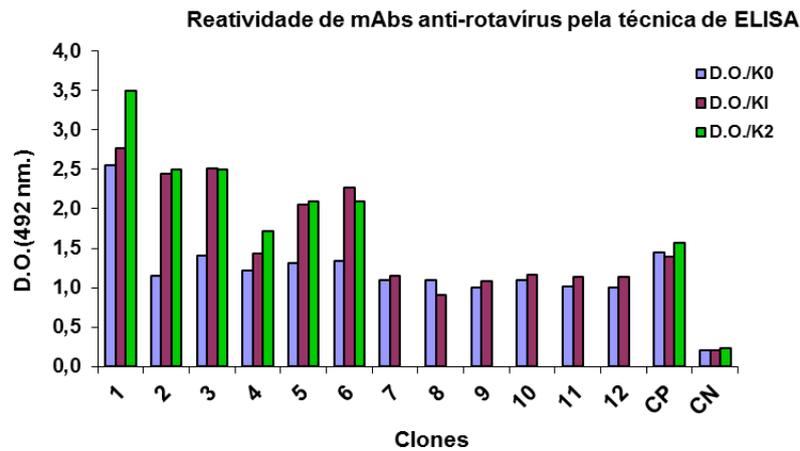


Figura 25 - Comparação entre valores de D.O. por ELISA de diferentes clones secretores de anticorpos para rotavírus em seus estágios K₀, K₁, K₂. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com 10 µg/mL de rotavírus sorotipo G4 e bloqueadas foram incubadas com sobrenadante de culturas de hibridomas e em seguida com o conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1:1000. A reação foi revelada pela adição de substrato e leitura de absorbância a 492 nm.

D.O. : Densidade Ótica.

C.P.: Soro de animal imunizado com título viral conhecido (1/2560 em testes de neutralização em células: PRN).

C.N.: Sobrenadante de cultura de células SP2/O.

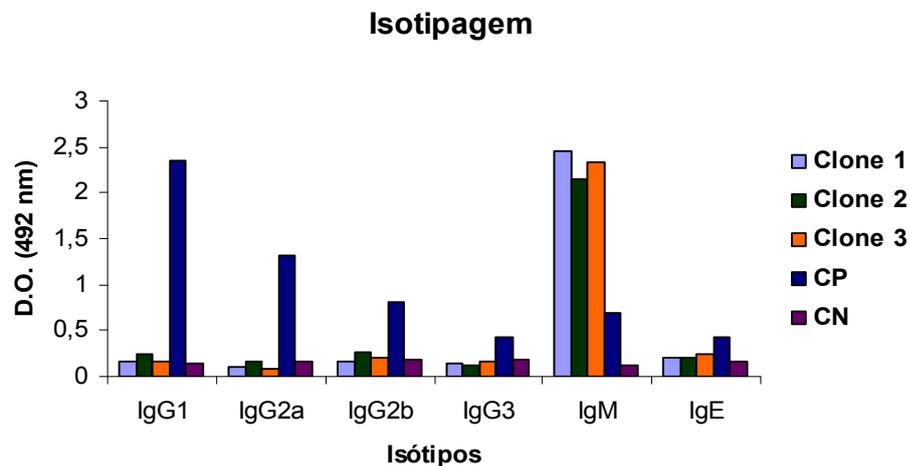


Figura 26 - Caracterização de anticorpos monoclonais anti-rotavírus. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com rotavírus sorotipo G4 e bloqueadas foram incubadas com os sobrenadantes de culturas de hibridomas. Em seguida, os isótipos biotinilados de cabra *anti-mouse* e estreptoavidina - peroxidase (sigma) foram empregados seqüencialmente. A reação foi revelada pela adição de substrato e leitura de absorbância a 492 nm.

C.P.: Soro de animal imunizado para rotavírus

C.N.: Sobrenadante de cultura de SP2/O

D.O.: Densidade óptica

Os anticorpos secretados pelos hibridomas foram testados frente às classes e subclasses de imunoglobulinas conforme demonstrado na figura 26.

Observando-se a figura 26 pode-se verificar que os anticorpos monoclonais secretados pelos três hibridomas testados são da classe IgM. Entretanto, o soro do animal imunizado utilizado na fusão apresenta em grande quantidade anticorpos classe das IgG reativos ao sorotipo G4 de rotavírus.

4.4 Experimento II

4.4.1 Imunização dos camundongos com sorotipo G4 de rotavírus (esquema de imunização 2, com o adjuvante Marcol/Montanide)

Os resultados obtidos nos testes de excreção viral (*Kit Slidex Rota-kit 2*) realizados em amostras de fezes dos animais a serem usados na imunização apresentaram resultados negativos.

Os títulos de anticorpos anti-rotavírus obtidos nos testes de ELISA realizados com amostras de soros dos animais imunizados com o esquema 2 (1ª e 3ª doses do antígeno com o adjuvante) coletado antes da imunização (D0) e após a 3ª dose estão demonstrados nas figuras 27 e 28.

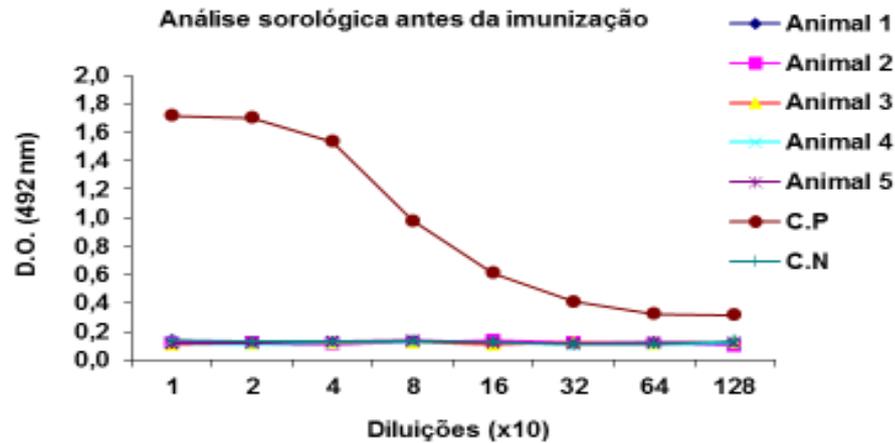


Figura 27 - Pesquisa de anticorpos nos soros dos camundongos antes da imunização com sorotipo G4 de rotavírus. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com rotavírus sorotipo G4 e bloqueadas foram incubadas com amostras de soro coletadas dos animais antes da 1ª dose de antígeno. Como conjugado imunoenzimático foi utilizado IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase. A reação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição de substrato (OPD e H₂O₂) e absorbância lida a 492 nm. O título de anticorpos corresponde a recíproca da maior diluição do soro que resulta em uma absorbância maior que a do controle negativo.

D.O.: Densidade Ótica

C.P.: Soro de animal imunizado com título viral conhecido (1/2560 em testes de neutralização em células: PRN)

C.N.: Soro de animal não-imunizado.

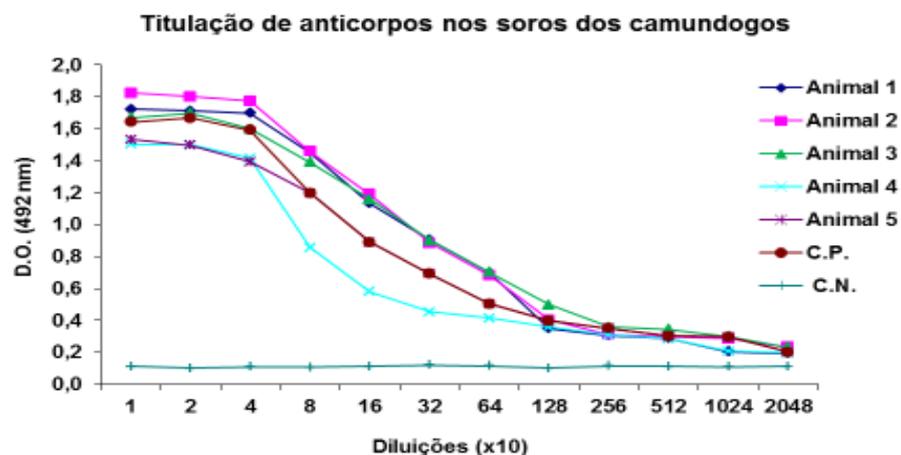


Figura 28 - Titulação anticorpos nos soros dos camundongos imunizados com o sorotipo G4 de rotavírus. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com rotavírus do sorotipo G4 e bloqueadas foram incubadas com soro de animais imunizados coletados 4 dias após o último reforço. Como conjugado imunoenzimático foi utilizado IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase. A reação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição de substrato (OPD e H₂O₂) e absorbância lida a 492 nm. O título de anticorpos foi definido como o inverso da diluição máxima do soro capaz de produzir uma absorbância a 492 nm maior que a observada com controle negativo.

D.O. : Densidade Ótica

C.P.: Soro de animal imunizado com título viral conhecido (1/2560 em testes de neutralização em células: PRN)

C.N.: Soro de animal não-imunizado

Os títulos de anticorpos anti- rotavírus encontrados nas amostras dos soros dos animais imunizados com o esquema 2 foram entre 1: 10.240 a 1:20.480, enquanto que não foram detectados anticorpos anti-cepas de rotavírus humano nas amostras de soros destes animais coletadas antes da administração da 1ª dose.

4.4.2 Geração de hibridomas

Quando as culturas de hibridomas estavam uma ocupando entre um terço e a metade da área de cultivo dos poços das placas, os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e submetidos a testes de ELISA para a identificação das culturas que estavam secretando anticorpos reativos ao sorotipo G4 de rotavírus. O resultado do teste de ELISA está demonstrado na figura 29.

Na observação microscópica das placas foram visualizados 53 poços com hibridomas. Dentre estes foram encontrados 8 clones reativos para o sorotipo G4 de rotavírus. Foram detectados oito hibridomas com D.O entre 0,682 a 1,311 conforme demonstrado na figura 29.

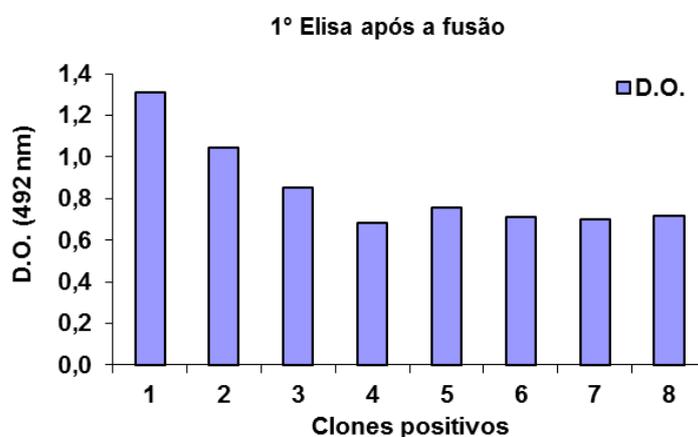


Figura 29 - Primeiro teste de ELISA após a fusão utilizando animais do experimento II. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com 10 µg/mL de rotavírus sorotipo G4 e bloqueadas foram incubadas com sobrenadante de culturas de hibridomas e em seguida com o conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG camundongo marcado com peroxidase nas diluição de 1:1000. A reação foi revelada pela adição de substrato e leitura de absorbância a 492 nm.

D.O.: Densidade Óptica.

C.P.: Soro de animal imunizado.

C.N.: Sobrenadante de cultura de hibridomas.

Após a expansão dos 8 hibridomas selecionados inicialmente, apenas 4 foram clonados subclonados. Na escolha dos hibridomas para clonagem e subclonagem utilizaram-se os parâmetros de reatividade e padrão de crescimento. Dentre os 4 hibridomas clonados, 2 apresentaram maior reatividade de K_1 para K_2 , um manteve a reatividade e outro apresentou um declínio da reatividade de K_1 para K_2 . A figura 30 mostra a evolução da reatividade dos anticorpos secretados de cada clone selecionado em suas diferentes fases K_0 , K_1 , K_2 .

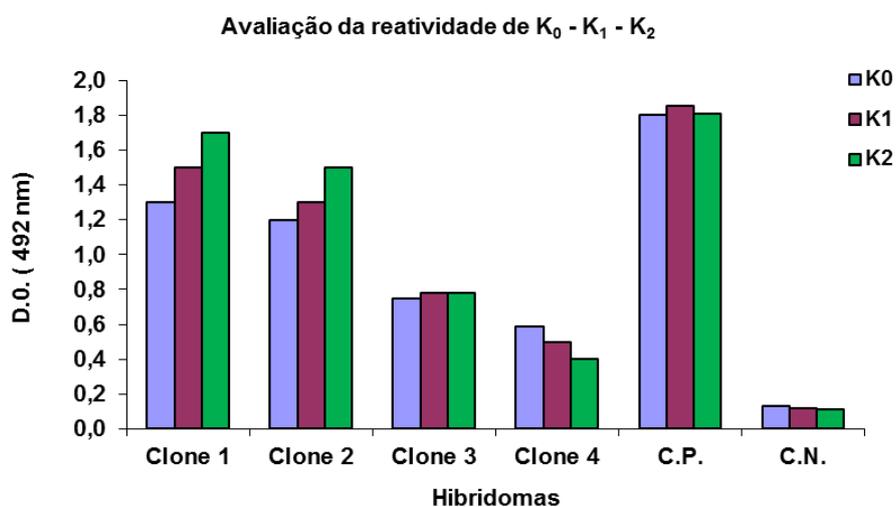


Figura 30 - Comparação entre valores de D.O. por ELISA de diferentes clones secretores de anticorpos para rotavírus em seus estágios K_0 , K_1 , K_2 . Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rotavírus sorotipo G4 e bloqueadas foram incubadas com sobrenadante de culturas de hibridomas e em seguida com o conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG camundongo marcado com peroxidase nas diluição de 1:1000. A reação foi revelada pela adição de substrato e leitura de absorbância a 492 nm.

D.O.: Densidade óptica

C.N.: Controle negativo, sobrenadante de cultura de SP2/O.

C.P.: Soro de animal imunizado

Os anticorpos secretados pelos hibridomas foram testados frente às classes e subclasses de imunoglobulinas conforme demonstrado na figura 31.

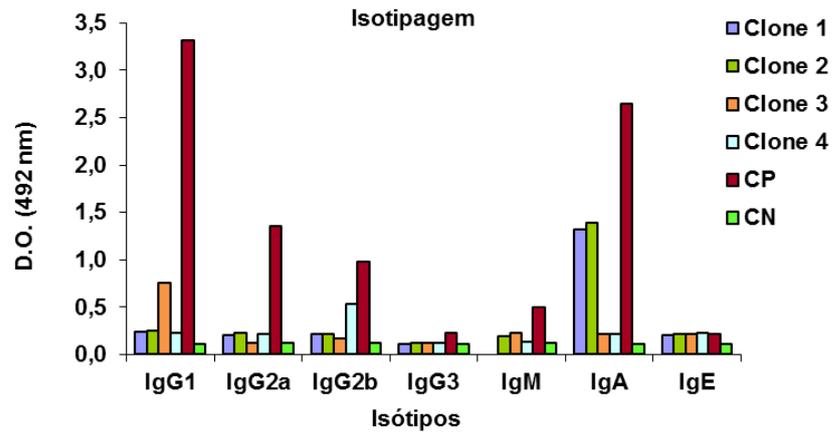


Figura 31 - Caracterização de anticorpos monoclonais anti-rotavírus. Placas de microtitulação previamente sensibilizadas com rotavírus sorotipo G4 e bloqueadas foram incubadas com sobrenadante de cultura de hibridomas. Em seguida, os isotipos biotinilados de cabra anti-mouse e estreptoavidina - peroxidase (sigma) foram empregados sequencialmente. A reação foi revelada pela adição de substrato e leitura de absorbância a 492 nm.
 C.P.: Soro de animal imunizado para rotavírus.
 C.N.: Sobrenadante de cultura de células SP2/O
 D.O.: Densidade Ótica

Observando-se a figura 31 pode-se verificar que os anticorpos monoclonais secretados pelos quatro hibridomas testados são das classes IgG1, IgG2b e IgA e que o soro do animal imunizado utilizado na fusão apresenta maior quantidade de anticorpos da classe IgG1 reativo ao sorotipo G4 de rotavírus.

Os anticorpos monoclonais produzidos pelos clones 1, 2 e 3 foram caracterizados quanto a sua especificidade por *Dot* e *Western Blotting*. Os resultados estão demonstrados nas figuras 32 e 33.

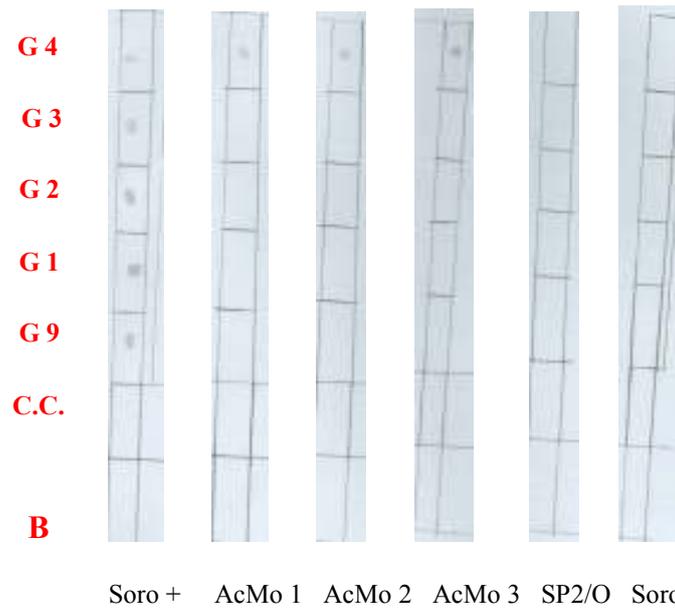


Figura 32 – Análise por *Dot Blotting* dos anticorpos monoclonais e do soro policlonal de camundongo anti-sorotipo G4 de rotavírus. A proteína viral (1,5µg/amostra) dos sorotipos G4, G3, G2, G1, G9 foram aplicadas diretamente na membrana de nitrocelulose, que em seguida foi incubada com AcMos ou soro policlonal 1:100 anti-rotavírus. Após 2 horas, esta membrana foi incubada com conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase. A reação foi revelada por substrato cromógeno e interrompida por água de torneira.

C.C.: Controle de células VERO B: Branco

G1, G2, G3, G4, G9: Respectivamente sorotipos 1, 2, 3, 4, 9 de rotavírus *reassortants*.

AcMo: Anticorpo Monoclonal

Soro +: Soro de animal imunizado com a cepa G4 de rotavírus.

S. SP2/O: Sobrenadante de cultura de SP2/O.

Soro -: Soro de animal negativo para rotavírus.

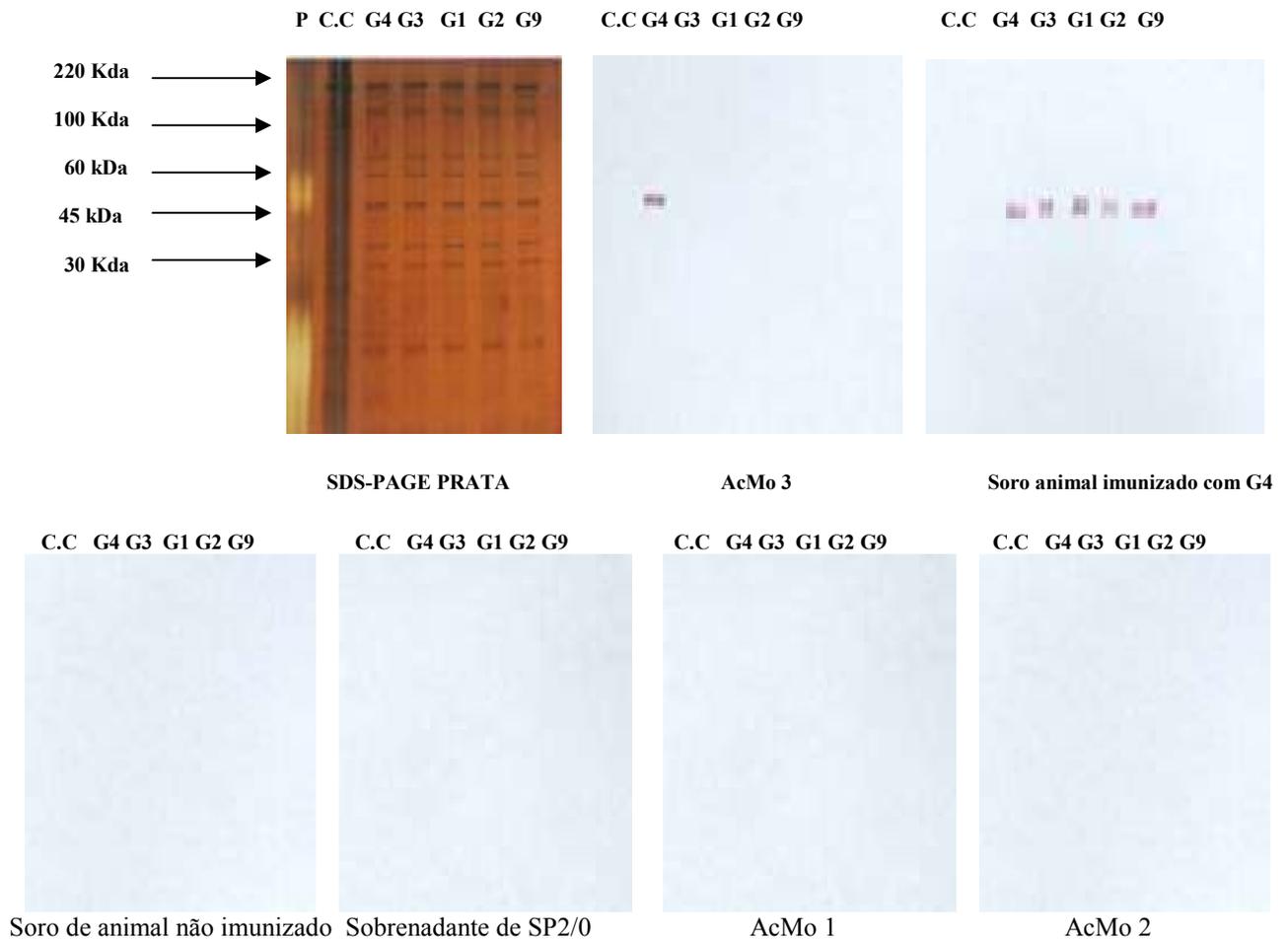


Figura 33 – Análise por *Western Blotting* dos anticorpos monoclonais e do soro policlonal de camundongos anti-sorotipo G4 de rotavírus. A proteína viral (25 µg de proteína viral/amostra/ gel) dos sorotipos G4, G3, G2, G1, G9 e da amostra controle de células foram separadas por SDS PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose, que foram incubadas com AcMo e soro policlonal 1:100 anti-rotavírus. Após 2 horas, esta membrana foi incubada com conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase. A reação foi revelada por substrato cromógeno e interrompida por água de torneira. O gel foi corado pela prata.

C.C.: Controle de células Vereo

P: Padrão de peso

G1, G2, G3, G4, G9: Respectivamente sorotipos 1, 2, 3, 4, 9 de rotavírus *reassortants*.

AcMo: Anticorpo Monoclonal.

Os resultados apresentados na figura 32 mostram que o soro policlonal reage com todas as cepas de rotavírus usadas no teste (G1, G2, G3, G4 e G9). Ao contrário, os anticorpos monoclonais 1, 2 e 3 reagem com apenas com a cepa do sorotipo G4. Os controles negativos, soro de animal não imunizado e o sobrenadante de cultura de SP2/O não reagem com nenhuma cepa de rotavírus.

Nos resultados apresentados na figura 33 percebe-se que o soro policlonal é reativo a todas as cepas de rotavírus usadas no teste (G1, G2, G3, G4 e G9), em uma região coincidente com perfil eletroforético das glicoproteínas VP7 e VP6. Diferentemente, o anticorpo monoclonal (AcMo 3) reage apenas com a cepa do sorotipo G4, em uma região eletroforética coincidente com a glicoproteína VP7. Os anticorpos monoclonais 1 e 2 não reagem por *Western blotting*, o que pode indicar que reconhecem apenas epitopos conformacionais. Os controles negativos, soro de animal não imunizado e o sobrenadante de cultura de SP2/O não reagem com nenhuma cepa de rotavírus.

5 DISCUSSÃO

Na busca por cepas vacinais de rotavírus que se multiplicassem com rendimento satisfatório em cultura de células, pesquisadores *National Institute of Health (NIH)* dos Estados Unidos desenvolveram cepas de rotavírus através de um rearranjo genético entre cepas de rotavírus humano e bovino. Cepas de rotavírus bovino possuem satisfatório crescimento em cultura de células e possibilitam a produção de suspensões virais em larga escala (GLASS et al., 2006). As cepas humanas usadas nestes experimentos foram escolhidas seguindo critérios de estudos epidemiológicos de prevalência e a distribuição geográfica mundial dos sorotipos de rotavírus. Assim, as cepas humanas de rotavírus do grupo A e sorotipo D, DS-1, P, ST-3, 1290 e AU32 foram rearranjadas geneticamente com a cepa de rotavírus bovino *UK*, dando origem respectivamente as cepas *reassortants* G1, G2, G3, G4, G8 e G9 (Figura 6). Estas cepas foram construídas tendo como alvo uma glicoproteína fortemente indutora de anticorpos neutralizantes, VP7 (MIDTHUN et al., 1985). Desta forma, dos 11 segmentos gênicos presentes nestas cepas de rotavírus, apenas o segmento gênico que codifica para glicoproteína VP7 é proveniente da cepa humana e outros dez são provenientes da cepa bovina. Assim, a única diferença estrutural entre essas cepas são as regiões variáveis ou determinantes antigênicos na cadeia de aminoácidos dessa glicoproteína.

As cepas *reassortants* G1, G2, G3, G4 e G9 foram transferidas para Brasil através de projetos internacionais de cooperação para produção de vacinas (*PATH - Advancing Rotavirus Vaccine Development*). Utilizando estas cepas, pesquisadores do Laboratório Experimental de Rotavírus do Instituto Butantan desenvolveram, em cultura de células Vero, uma vacina pentavalente para rotavírus, que no momento encontra-se em fase II de estudos clínicos.

A produção e avaliação desta vacina são monitoradas por testes de controle de qualidade dentre os quais podemos citar os testes *FFA (Focus Fluorescent Assay)* e *PRNA (Plaque reduction Neutralization Assay)*. O *FFA* é utilizado para determinação dos títulos virais durante o processo de produção da vacina e determinação da potência do produto final. O *PRNA* detecta os níveis de anticorpos neutralizantes para o rotavírus em amostras de soros de animais ou humanos. Este é imprescindível na avaliação da resposta imune de voluntários dos ensaios clínicos da vacina de rotavírus em humanos. Para realização destes testes são necessários anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo de rotavírus. Considerando-se a construção genética e estrutural dessas cepas de rotavírus já descritas anteriormente, esses anticorpos monoclonais devem possuir alta especificidade para um sorotipo e não reagir cruzadamente com os outros sorotipos.

No presente estudo, camundongos Balb/c foram imunizados com a cepa *reassortant* de rotavírus IB-BRV-4-G4 com o objetivo de se obter um anticorpo monoclonal específico para o sorotipo G4, mas que não tivesse reação cruzada com os outros sorotipos (G1, G2, G3, e G9) presentes na vacina pentavalente de rotavírus do Instituto Butantan.

A produção das suspensões de rotavírus do sorotipo G4 utilizado na imunização dos animais, assim como o método usado na purificação destas suspensões foram baseadas em metodologias já descritas para outros vírus (FRAZZATTI-GALLINA et al., 2004; HARRISSON, 1994; HORNG; SPIEZIA; MUSHAHWAR, 1989) e os resultados encontrados demonstraram que essas técnicas podem ser empregadas para os outros sorotipos de rotavírus.

Na figura 16 verifica-se que as amostras dos antígenos de rotavírus purificados uma ou duas vezes apresentaram perfil eletroforético compatível com o encontrado em outras cepas de rotavírus, identificando-se com outras amostras em relação ao peso molecular de proteínas estruturais e não estruturais já descritas por outros autores (ESTES, 2001; KAPIKIAN e CHANOCK, 1996).

A análise desta figura permite observar que as suspensões de vírus purificadas uma ou duas vezes não apresentam diferença no perfil eletroforético. O mesmo ocorre com a concentração de DNA celular residual (Tabela 3). Entretanto, pode-se verificar que o título viral e a concentração protéica diminuem após a segunda purificação, indicando assim, que uma segunda purificação é desnecessária pela perda de massa viral. Os testes para detecção de micoplasma, esterilidade, DNA residual e titulação viral apresentam resultados semelhantes quando comparados com estudos já realizados com outro vírus RNA (FRAZZATTI-GALLINA et al., 2004) na produção de antígenos em condições semelhantes.

Alguns autores já descreveram protocolos de imunização para rotavírus, com resultados satisfatórios, adotando as vias intraperitoneal, nasal e oral (HORNG; SPIEZIA; MUSHAHWAR, 1989; MCNEAL et al., 2004, 2006; VANCOTT et al., 2006). Entretanto, pelo fato de se estar usando um vírus *reassortant* específico, a escolha dos esquemas de imunização foi principalmente em função de informações relatadas pela Dra. Neuza responsável pelo Laboratório Experimental de Rotavírus, obtidas em reuniões realizadas anualmente pelo *PATH* com países que estão desenvolvendo a vacina de rotavírus com as cepas *reassortant* provenientes do *NIH*.

Em virtude de não se ter encontrado na literatura um esquema de imunização bem definido para resposta ao rotavírus *UK-reassortant*, optou-se inicialmente pelo uso de um esquema sem adjuvante e posteriormente outro utilizando o adjuvante Marcol/Montanide. Ao

analisar os títulos de anticorpos anti-rotavírus G4, pode-se observar que os títulos encontrados nos soros dos camundongos imunizados foram semelhantes nos dois esquemas (Figuras 20 e 28). Entretanto, o uso de adjuvante com a 1ª e 3ª doses de antígeno viral gerou um impacto bastante importante na geração de clones decorrentes da fusão de células do baço dos animais imunizados com as células de mieloma SP2/O. Os anticorpos monoclonais secretados por esses clones apresentaram diferentes classes e subclasses de imunoglobulinas (Figuras 26 e 31).

Ao se caracterizar os anticorpos secretados pelos clones provenientes dos dois esquemas de imunização encontramos clones provenientes do esquema I secretando anticorpos monoclonais da classe IgM e clones provenientes do esquema II secretando anticorpos monoclonais da subclasse IgG1, IgG2b e IgA. Esta diferença corrobora com um trabalho sobre a influência dos adjuvantes da natureza do Marcol/Montanide (KENNEY et al., 1989) na quantidade, afinidade, isótopos secretados e epítomos específicos de anticorpos murinos. De fato, pelas características físico-químicas do Marcol/Montanide, este proporciona uma liberação lenta e eficiente do antígeno, e assim, uma resposta mais elaborada, com uma secreção de classes e subclasse de imunoglobulinas mais variadas. As classes e subclasse de imunoglobulinas detectadas neste estudo já foram encontradas em experimentos similares ou em estudos de resposta imunológica para outros rotavírus. Por exemplo, a imunoglobulina da subclasse IgG2b encontrada neste estudo foi também observada em outro estudo similar (HORNG; SPIEZIA; MUSHAHWAR, 1989) com a cepa SA-11 de rotavirus. A IgG1, que tem sua secreção ligada ao desenvolvimento de resposta Th2 (Linfócito T auxiliar 2), foi também encontrada em estudo de resposta sistêmica a cepas de rotavírus em diferentes níveis de purificação (REIMERINK et al., 2007). De fato, alguns estudos com imunização com cepas e proteínas de rotavírus (MCNEAL; RAE; WARD, 1997; WARD, 2003) têm mostrado a efetiva participação de células T na resolução do processo infeccioso. Foram também encontrados dois clones secretando imunoglobulinas da classe IgA. Este achado está completamente dentro das expectativas, pois a IgA secretora é apontada em muitos estudos (KATYAL; RANA; SINGH, 2000; RUGERRI e GREENBERG, 1991; WARD, 2003) como sendo a principal imunoglobulina a atuar na resolução de processos infecciosos causados por rotavírus. Inclusive vale ressaltar, conforme demonstrado na figura 31, a presença do isótipo IgA no soro de um animal imunizado com a cepa IB-BRV-4-G4 de rotavírus.

Os anticorpos monoclonais produzidos neste estudo foram testados pelas técnicas de *Dot* e *Western Blotting*. Estes testes demonstraram que o soro policlonal dos animais

imunizados com o sorotipo G4 de rotavírus reagiu com todos os sorotipos de rotavírus (G1, G2, G3, G4 e G9), tanto em condição não desnaturante ou não reduzida (*Dot Blotting*) quanto na condição desnaturante (*Western Blotting*) (Figuras 32 e 33), isto é facilmente explicável, em função da construção genética já descrita para essa cepas (MIDTHUN et al., 1985). A estrutura comum quanto às regiões variáveis da glicoproteína VP7 destas cepas podem gerar reações cruzadas entre os sorotipos (HOSHINO et al., 1994; TANIGUCHI et al., 1988). Por *Western Blotting* estes anticorpos policlonais reagem dentro de uma região compreendida e correspondente a 37 e 45 Kda do padrão, que coincide com os pesos moleculares de VP7 e VP6. O fato de os anticorpos policlonais reconhecerem a glicoproteína VP7 vai de encontro ao fato de esta glicoproteína ser a maior indutora de anticorpos neutralizantes do capsídeo externo dos rotavírus (GREENBERG et al., 1983; KALICA et al., 1981). O anticorpos policlonais reconhecem a VP6 de todos os sorotipos, isto demonstra a estrutura genética comum dessas cepas (MIDTHUN et al., 1985) e ainda, por esta glicoproteína transportar determinantes antigênicos subgrupo-específicos, o que a coloca como antígeno de eleição na composição de *kits* reagentes na detecção de infecções por rotavírus humano (ERICSON et al., 1982).

Neste estudo foram produzidos 3 AcMo, todos eles foram reativos aos testes de *Dot* e *Western Blotting*. Os AcMo 1 e o AcMo 2 reagiram somente com a cepa IB-BRV-4-G4 no *dotblot*, ou seja, em condição não desnaturante, mas não reagiram em condição desnaturante. O que sugere que os mesmos reconheçam epitopos conformacionais. Isto pode ser explicado baseando-se em estudos sobre determinantes antigênicos presentes na estrutura da glicoproteína VP7. Um estudo sobre a potenciais epítomos de neutralização da glicoproteína VP7 (DYALL-SMITH et al., 1986) sugere que existe forte indicação de dobra tridimensional aproximando a primeira região variável (aminoácidos 87-96) com a terceira região variável (aminoácidos 211-223). Certamente os processos de preparo da amostra para realização do *Western Blotting* devem ter desestabilizado esta dobra, causando a falha de reconhecimento pelos anticorpos. O fato de se ligarem somente ao sorotipo G4 e não aos outros, mostra que estes anticorpos provavelmente estão se ligando a regiões soro - específicas da seqüência de aminoácidos da glicoproteína VP7, o que coincide com resultados relatados em estudos sobre as regiões variáveis desta glicoproteína, as quais determinam o sorotipo dos rotavírus (GLASS et al., 1985; GREEN et al., 1988). Diferentemente, o AcMo 3 reagiu em condições não desnaturante e desnaturante, o que sugere que este anticorpo seja reativo a uma das 9 regiões variáveis identificadas por Green et al. (1989), que não sofrem desestabilização nos

processos de preparo da amostra. Provavelmente, este anticorpo reconhece epítopo linear. O fato de este anticorpo se ligar somente ao sorotipo G4 tanto no *dot* quanto *Western Blotting* segue a mesma linha de raciocínio definida para os dois primeiro anticorpos. O sobrenadante de cultura de SP2/O, o soro de animal não imunizado usados como controle negativo não foram reativos a nenhuma cepa de rotavírus nos testes descritos.

6 CONCLUSÕES

- ▼ As metodologias utilizadas neste estudo, tanto para imunização dos animais, como fusão e seleção dos clones possibilitou a obtenção de 3 clones secretores de anticorpos monoclonais (AcMo 1, 2 e 3) sendo 2 da classe IgA e um da subclasse IgG1.
- ▼ Os anticorpos monoclonais 1 e 2 reagem com uma região variável antigênica conformacional da glicoproteína VP7, enquanto que o AcMo 3 reconhece um epítipo linear.
- ▼ A imunização dos animais com esquema que utilizou o antígeno formulado com Marcol/Montanide produziu uma resposta imunológica com maior variedade de classes e subclasses de imunoglobulinas quando comparada com a imunização sem o uso do adjuvante.
- ▼ Os resultados obtidos neste estudo indicam que a tecnologia utilizada para obtenção de monoclonais para o sorotipo G4 poderá ser aplicada para produção destes anticorpos para outros sorotipos de rotavírus *reassortants*.

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LINCHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science, 2002.
- ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 375-388, 2011.
- AZZARY, H. M. E.; EDWARD HIGHSMITH JR., W. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin. Biochem.**, v. 35, p. 425-445, 2002.
- BAUMGARTH, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 34-46, 2011.
- BLOOM, B. R.; LAMBERT, P. H. **The vaccine book**. Geórgia: Academic Press, 2002.
- BORDON, Y. Allergy: Shocking behaviour. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 302-303, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **MDDA**. 2004. Disponível em: <www.saude.gov.br> Acesso em: 09 maio 2008.
- BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R. E. WHO estimates of the cause of death in children. **Lancet**, v. 365, p. 1147-1152, 2005.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, S. J.; MORSE A. S. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- BURNS, J. W.; SIADAT-PAJOUH, M.; KRISHNANEY, A. A.; GREENBERG, H. B. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. **Science**, v. 272, p. 104-107, 1996.
- CALICH, V. L. G. Imunoglobulinas. In: CALICH, V. L. G.; VAZ, C.A.C. (Ed.). **Imunologia básica**. São Paulo: Artes Médicas, 1988. p. 65-103.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2010. **Rotavirus**. Disponível em: <www.cdc.gov> Acesso em: 28 May 2010.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2009. **Rotavirus surveillance Worldwide, 2001-2008**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5746a3.htm>. Acesso em: 27 Aug. 2011.
- CERUTTI, A. The regulation of IgA class switching. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 421-434, 2008.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

COULSON, B. S.; KIRKWOOD, C. D.; MASENDYCH, P. J.; BISHOP, R. F.; GERNA, G. Amino acids involved in distinguishing between monotypes of rotavirus G. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p. 239-245, 1966.

DAVIDSON, G. P.; HOGG, R. J.; KIRUBAKARON, C. P. Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. **Infect. Immun.**, v. 40, p. 447-452, 1983.

DYALL-SMITH, M. L.; LAZDINS, I.; TREGGAR, G. W.; HOLMES, I. H. Location of the major antigenic sites involved in rotavirusserotype-specific neutralization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 3465-3468, 1986.

EBERLLE COLLEGE SCINCE. **Biochemistry and molecular biology**. Disponível em: http://www.personal.psu.edu/sxt30/gallery_proteins.html. Acesso em: 28 Aug. 2011.

EHRENSTEIN, M. R.; NOTLEY, C. A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. **Nat. Rev. Immunol.**, v.10, p. 778-786, 2010.

ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. **Monoclonal antibody**. Disponível em: <www.britannica.com>. Acesso em: 25 July 2011.

ERICSON, B. L.; GRAHAM, D. Y.; MASON, B. B.; ESTES, M. K. Identification, synthesis and modifications of simian rotavirus SA-11 polypeptides in infected cells. **J. Virol.**, v. 42, 825-839, 1982.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. 4th ed. **Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1747-1785.

FERNANDES, I.; ASSUMPÇÃO, G. G.; SILVEIRA, C. R. F.; FAQUIM-MAURO, E. L.; TANJONI, I.; CARMONA, A. K.; ALVES, M. F. M.; TAKEHARA, H. A.; RUCAVADO, A.; RAMOS, O. H. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Immunochemical and biological characterization of monoclonal antibodies against BaP1, a metalloproteinase from Bothrops asper snake venom. **Toxicon**, v. 56, p. 1059-1065, 2010.

FRAZATTI-GALLINA, N. M.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; PAOLI, R. L.; SILVA, M. L. N.; MIYAKI, C.; VALENTINI, E. J. E.; RAW, I.; HIGSHI, H. G. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. **Vaccine**, v. 23, p. 511-517, 2004.

FRAZATTI-GALLINA, N. M.; PAOLI, R. L.; FRANCISCO, I. A.; CASTRO GARCIA, G. ; MOURÃO-FUCHES, R. M. Obtention of rabies antigen through BHK₂₁ cells adhered to microcarriers. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 40, n. 5, p. 291-294, 1998.

FRAZATTI-GALLINA, N. M.; PAOLI, R. L.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; JORGE, S. A. C.; PEREIRA, C. A. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures in microcarriers. **J. Biotechnol.**, v. 92, p. 67-72, 2001.

GLASS, R. I.; KEITH, J.; NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; ASKAA, J.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M.; FLORES, J. Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf diarrhea virus rotavirus: Comparison with homologous genes from four strains of human and animal rotaviruses. **Virology**, v. 141, p. 292-298, 1985.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U.; BRESEE, J. S.; TURCIOS, R.; FISCHER, K. T.; WIDDOWSON, M. A.; BAOMING, J.; GENTSCH, J. R. Rotavirus Vaccines: current prospects and future challenges. **Lancet**, v. 368, p. 323-332, 2006.

GLEBA, Y.; KLIMYUK, V.; MARILLONNET, S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 18, p. 134-141, 2007.

GREEN, K.Y.; GREENBERG, H. B.; WYATT, R. G.; FLORES, J.; SERENO, M. M.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotavirus that code for neutralization and subgroup antigens. **Virology**, v. 112, p. 385-390, 1981.

GREEN K. Y.; HOSHINO, Y.; IKEGAMI, N. Sequence analysis of the gene the serotype-specific glycoprotein(VP7) of two new human rotavirus serotypes. **Virology**, v. 168, p. 429-433, 1989.

GREEN K. Y.; MIDTHUN, K.; GORZIGLIA, M.; HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M.; FLORES, J. Comparison of the Amino acid sequence of the major neutralization protein of four human rotavirus serotypes. **Virology**, v. 161, p. 153-159, 1987.

GREEN, K. Y.; SEARS, J. F.; TANIGUCHI, K.; MIDTHUN, K.; HOSHINO, Y.; GORZIGLIA, M.; NISHIKAWA, K.; URASAWA, S.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M.; FLORES, J. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the vp7 protein gene. **J. Virol.**, v. 62, n. 5, p. 1819-1823, 1988.

GREENBERG, H. B.; FLORES, J.; KALINKA, A. R.; WYATT, R. G.; JONES, R. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the w and ds-1 strains of human rotavirus. **J. Gen. Virol.**, v. 64, p. 313-320, 1983.

GORZIGLIA, M.; AGUIRRE, Y.; HOSHINO, Y.; ESPARZA J.; BLUMENTALS, I.; ASKAA, J.; THOMPSON, M.; GLASS, R. I.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. VP7 serotype-specific glycoprotein of osu porcine rotavirus: Coding assignment and gene sequence. **J. Gen. Virol.**, v. 67, p. 2445-2454, 1986.

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

HARRISON, R. G. **Protein purification process**. New York: Marcel Dekker, 1994.

HENDRIKSEN, C. F. M. Laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities. **ILAR J.**, v. 46, n. 3, p. 227-229, 2005.

HOSHINO, Y.; JONES, R. W.; ROSS, J.; KAPIKIAN, A. Z. Construction and characterization of rhesus monkey rotavirus (MMU18006)- or bovine rotavirus (UK)-based serotype G5, G8, G9 or G10 single VP7 gene substitution reassortant candidate vaccines. **Vaccine**, v. 21, p. 3003–3010, 2003.

HOSHINO, Y.; NISHIKAWA, K.; BENFIELD, D. A.; GORZIGLIA, M. Mapping of antigenic sites involved in serotype-cross-reactive neutralization grupo A rotavirus outercapsid glycoprotein VP7. **Virology**, v. 199, p. 233-237, 1994.

HORNG, W. J.; SPIEZIA K. S.; MUSHAHWAR, K. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to rotavirus. **J. Virol. Methods**, v. 23, p. 241-252, 1989.

JAIMES, M. C.; ROJAS O. L.; GONZALEZ, A. M.; CAJIAO, I.; CHARPILLENNE, A.; POTHIER, P.; KOHLIE, E.; GREENBERG, H. B.; FRANCO, M. A.; ANGEL, J. Frequencies of virus-specific CD41 and CD81 T lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. **J. Virol.**, v. 76, p. 4741-4749, 2002.

JAYARAM, H.; ESTES, M. K.; PRASSA, B. V. V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genoma organization, transcription and replication. **Virus Res.**, v. 101, p. 67-81, 2004.

KALICA, A. R.; GREENBERG, H. B.; WYATT, R. G.; FLORES, J.; SERENO, M.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. **Virology**, v. 112, p. 385-390, 1981.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruse. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. 3rd ed. **Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1996. p. 1675-1708.

KAPIKIAN, A. Z.; SIMONSEN, L.; VESIKARI, T.; HOSHINO Y.; MORENS D. M.; CHANOCK, R. M.; L.A MONTAGNE, R. J.; MURPHY R.BRIAN. A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of Intussusception. **J. Infect. Dis.**, v. 192, p. 22–29, 2005.

KAPIKIAN, A. Z.; WYATT, R. G.; DOLIN, R.; THORNHILL, T. S; KALINCA, A. R; CHANOCK, R. M. Visualization by immune microscopy of 27 nm particle associated with acute infections no-bacterial gastroenteritis. **J. Virol.**, v. 10, p. 1075-1081, 1972.

KATYAL, R.; RANA, S. V.; SINGH, K. Rotavirus infections. **Acta Virol.**, v. 44, p. 283-288, 2000.

KENNEY, J. S.; HUGLES, B. W.; MASADA, M. P.; ALISSON, A. C. Influence of adjuvantes on the quantity, affinity, isotope and epitope specificity of murine antibodies. **J. Immunol. Methods**, v. 121, p. 157-166, 1989.

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

LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, F. M. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. **ILAR J.**, v. 46, n. 3, p. 269-279, 2005.

LÉO, P.; UCELLI, P.; AUGUSTO, E. F. P.; OLIVEIRA, M. S.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Anti-TNP monoclonal antibodies as reagents for enzyme Immunoassay (ELISA). **Hibridoma**, v. 19, n. 6, p. 473-479, 2000.

LITTLE M.; KIPRIYANOV, F.; LE GALL F.; MOLDENHAUER G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. **Immunol. Today**, v. 21, p. 364-370, 2000.

MAYNARD, J.; GEORGIOU, G. Antibody engineering. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 2, p. 339-376, 2000.

MASON, B. B.; DHER, S. K.; KSIAO, C.; ZANGLE, G.; KOSTEK, B.; ROSANOFF, E. L.; HUNG, P. O.; DAVIS, A. R. Sequence of the serotype-specific glycoprotein of the human rotavirus WA strain and comparison with other human rotavirus serotypes. **Virus. Res.**, v. 2, p. 291-229, 1985.

MCCANN, M. C.; BOYD, J. E. **Plasma and recombinant blood products in medical therapy**. New York: John Wiley & Sons, 1992.

MCNEAL, M. M.; BARONE, K. S.; RAE, M. N.; WARD, R. L. Effector functions of antibody and CD81 cells in resolution of rotavirus infection and protection against reinfection in mice. **Virology**, v. 214, p. 387-397, 1995.

MCNEAL, M. M.; BELLI, J.; BASU, M.; CHOI, A. H. C.; WARD, R. L. Discovery of a new strain of murine rotavirus that is consistently shed in large quantities after oral inoculation of adult mice. **Virology**, v. 320, p. 1-11, 2004.

MCNEAL, M. M.; RAE, M. N.; WARD, R. L. Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell-dependent activities. **J. Virol.**, v. 71, p. 8735-8742, 1997.

MCNEAL, M. M.; STONE, S. C.; BASU, M.; BEAN, J. A.; CLEMENTS, J. D.; HENDRICKSON, B. A.; CHOI, A. H. C.; WARD, R. L. Protection against rotavirus shedding after intranasal immunization of mice with a chimeric VP6 protein does not require intestinal IgA. **Virology**, v. 346, p. 338-347, 2006.

MIDTHUN, K.; GREENBERG, H. B.; HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z.; WYATT R. G.; CHANOCK, R. M. Reassortant Rotaviruses as Potential Live Rotavirus Vaccine Candidates. **J. Virol.**, v. 53, n. 3, p. 949-954, 1985.

MIDTHUN, K.; HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Single gene substitution rotavirus reassortants containing the major neutralization protein (vp7) of human rotavirus serotype 4. **J. Clin. Microbiol.**, v. 24, n. 5, p. 822-826, 1986.

MILDTHUN, K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus Vaccines: an overview. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 423-434, 1996.

MORALES, J. C. **Técnicas de diagnóstico en virologia**. Madrid: Díaz de Santos, 1993.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Rocca, 2008.

MORI, Y.; BORGAN, M. A.; ITO, N.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Diarrhea-inducing activity of avian rotavirus nps4 glycoproteins, which differ greatly from mammalian rotavirus nps4 glycoprotein in deduced amino acid sequence, in suckling mice. **J. Virol.**, v. 76, n. 11, p. 5829-5834, 2002.

MOSSEL, E.; ESTES, M.; RAMIG, F. **Coding assignments and virion locations of rotavirus proteins and 3D structure of the rotavirus particle**. Disponível em: <http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm>. Acesso em: 05 Sept. 2011.

NISHIKAWA, K.; HOSHINO, Y.; TANIGUCHI, K.; GREEN K.Y.; GREENBERG, H.B.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M.; GORZIGLIA, M. Rotavirus VP7 neutralization epitopes of serotype 3 strains. **Virology**, v. 171, p. 503-515, 1989.

OFFIT, P. A.; HOFFENBERG, E. J.; PHIA, E. S.; PANACKAL, P. A.; HILL, N. L. Rotavirus-specific helper T cell responses in newborns, infants, children, and adults. **J. Infect. Dis.**, v. 165, p. 1107–1111, 1992.

OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C. Rotavírus: aspectos clínicos e prevenção. **J. Pediatr.**, v. 75, p. 91-102, 1999.

PONTECORVO, G. Production of indefinitely multiplying mammalian somatic cell hybrids by polyethylene glycol (PEG) treatment. **Somatic Cell Genet.**, v. 1, p. 397-400, 1976.

RABBANI, H.; BROWN, W. R.; BUTLER, J. E.; HAMMARSTRÖM, L. Polymorphism of the IGHG3 gene in cattle. **Immunogenetics**, v. 46, p. 326-331, 1997.

REIMERINK, J. H. J.; BOSUIZEN, J. A.; EINERHAND, A. W. C.; DUIZER, E.; AMERONGEN, V. G.; SCHMIDT, N.; KOOPMANS, M. P. G. Systemic immune response after rotavirus inoculation of neonatal mice depends on source and level of purification of the virus: implications for the use of heterologous vaccine candidates. **J. Gen. Virol.**, v. 88, 604-612, 2007.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999.

RUGERRI, F. M.; GREENBERG, H. B. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavírus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. **J. Virol.**, v. 65, p. 2211-2219, 1991.

RUSSELL KIGHTLEY MEDIA. **Virus pictures & Viral life cycles**. Disponível em: <<http://kightleys.photoshelter.com/gallery/Virus-pictures-Viral-life-cycles/G0000O8RZEbjxjmU/1>>. Acesso em: 15 Feb. 2011.

SAINI, S. S.; KAUSHIK, A. Origin of bovine IgM structural variants. **Mol. Immunol.**, v. 38, p. 389-396, 2001.

SANTOS, N.; GOUVEIA, V. Rotavirus infection: an overview. **J. Bras. Patol.**, v. 33, n. 2, p. 94-102, 1997.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução a virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Rev. Med. Virol.**, v. 15, p. 29-56, 2005.

SCHUNK, M. K.; MACALLUM G. E. Applications and optimization of immunization procedures. **ILAR J.**, v. 46, n. 3, p. 241-257, 2005.

SHULMAN, M.; WILDE, C. D.; KOHLER, G. A better cell line for making hybridomas secreting antibodies. **Nature**, v. 276, p. 269-270, 1978.

TANIGUCHI, K.; HOSHINO, Y.; NISHIKAWA, K.; GREEN, K. Y.; MALOY W. L.; MORITA, Y.; URASAWA, S.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. and GORZIGLIA, M. Cross-Reactive and Serotype-Specific Neutralization Epitopes on VP7 of Human Rotavirus: Nucleotide Sequence Analysis of Antigenic Mutants Selected with Monoclonal Antibodies. **J. Virol.**, v. 62, n. 6, p. 1870 -1874, 1988.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from de polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo: Rocca, 2002.

VANCOTT, J. L.; PRADA, A. E.; MCNEAL, M. M.; STONE, S. C.; BASU, M. HUFFER, B. JR.; SMILEY, K. L.; SHAO, M.; BEAN, J. A.; CLEMENTS, J. D.; CHOI, A. H. C.; WARD, R. L. Mice Develop Effective but delayed protective immune responses when immunized as neonates either intranasally with nonliving VP6/LT (R192G) or orally with live rhesus rotavirus vaccine candidates. **J. Virol. Methods**, v. 80, n.10, p. 4949-4949, 2006.

VESIKARI, T.; ISOLAURI E.; DELEM, A.; HONDT, E. D; ANDRÉ, F. E.; ZISSIS, G. Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain RIT 4237 in adults and young children. **Lancet**, v. 2, p. 807-811, 1983.

WARD, R. L. Possible mechanisms of protection elicited by candidate rotavirus vaccines as determined with the adult mouse model. **Viral Immunol.**, v. 16. n. 1, p. 17-24, 2003.

WARD, R. L.; BERNSTEIN, D. I. Lack of correlation between serum rotavirus antibody titers and protection following vaccination with reassortant RRV vaccines. **Vaccine**, v. 13, p. 1226-1232, 1995.

WARD, R. L.; KNOWLTON, D. R.; ZITO, E. T.; DAVIDSON, B. L.; RAPPAPORT, R.; MACK, M. E. Serologic correlates of immunity in a tetravalent reassortant rotavirus vaccine trial. **J. Infect. Dis**, v. 176, p. 570-577, 1997.

WINTER, G.; MILSTEIN, C. Man-made antibodies. **Nature**, v. 349, p. 293-299, 1991.