

**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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Neuza M. Frazatti Gallina

Versão original

São Paulo  
2011

## 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.

# 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).

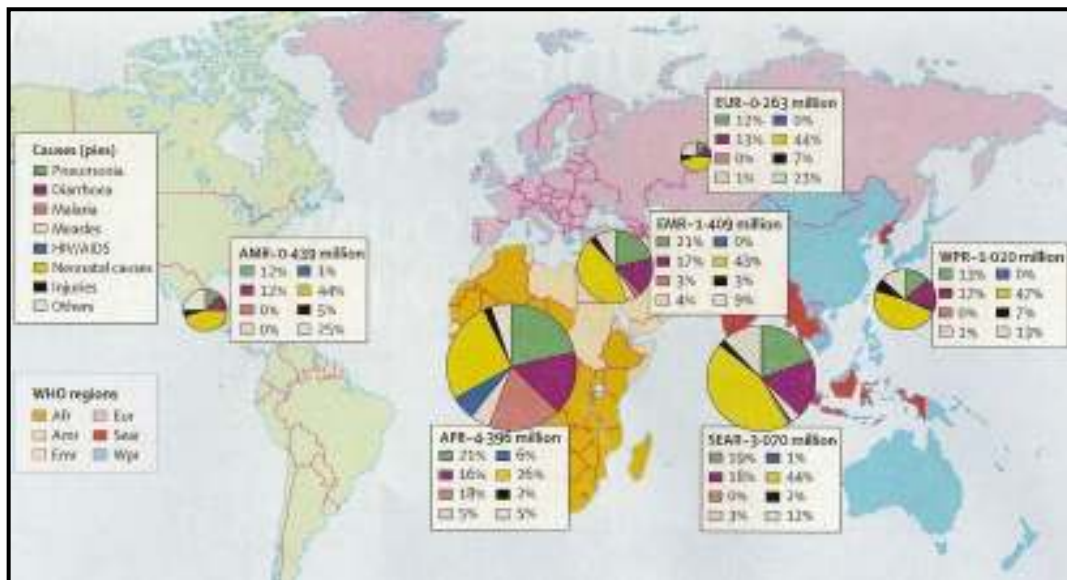
Um estudo publicado em 2009 pela Organização Mundial de Saúde mostra que entre 2001 e 2008 os rotavírus foram responsáveis por aproximadamente 40% das internações hospitalares causadas por diarreia em crianças menores que 5 anos em todo o mundo. Esse estudo ainda relata um total de 527.000 mortes/ano 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).

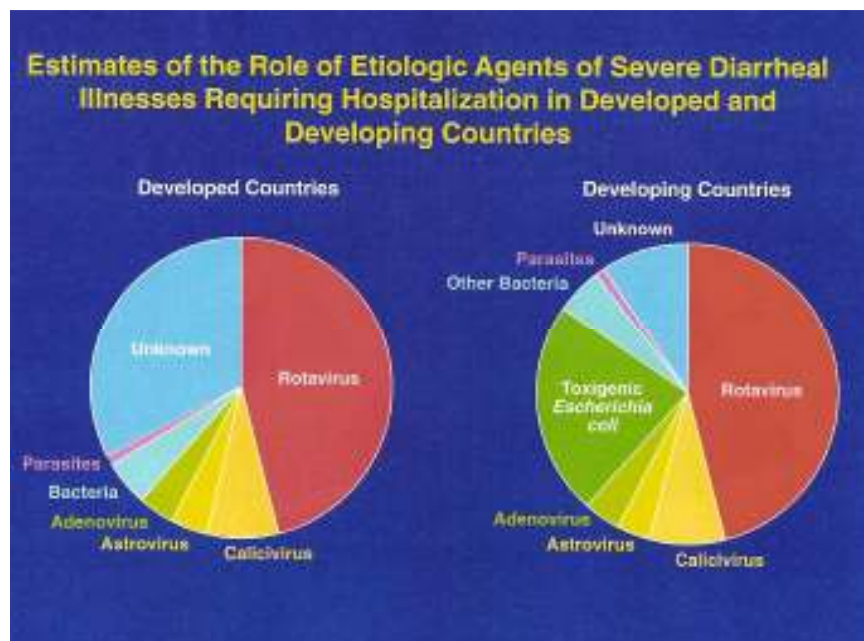
Um estudo realizado pela OMS entre 2000 e 2003, com dados estimativos da causa morte de crianças menores que cinco anos em todo o mundo, mostra a importância das doenças diarreicas, principalmente aquelas causadas por rotavírus, que está envolvido em 40% dessas gastroenterites em crianças menores de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

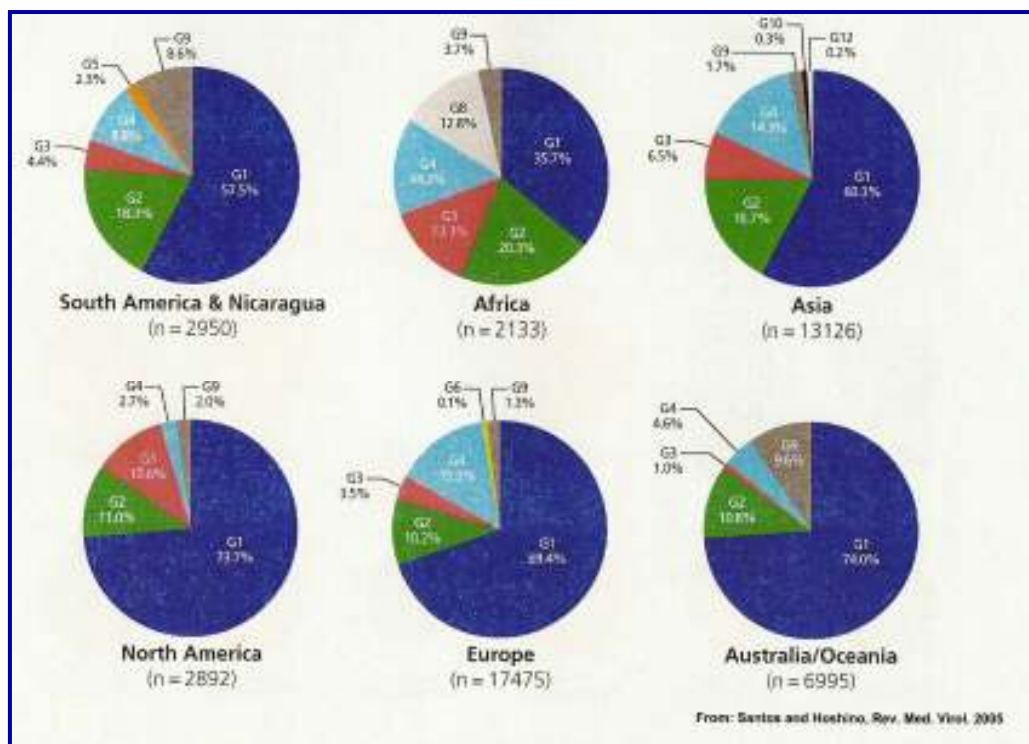
Fonte: Bryce et al., 2005.



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

### 1.1.2 Epidemiologia

As rotavíruses 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

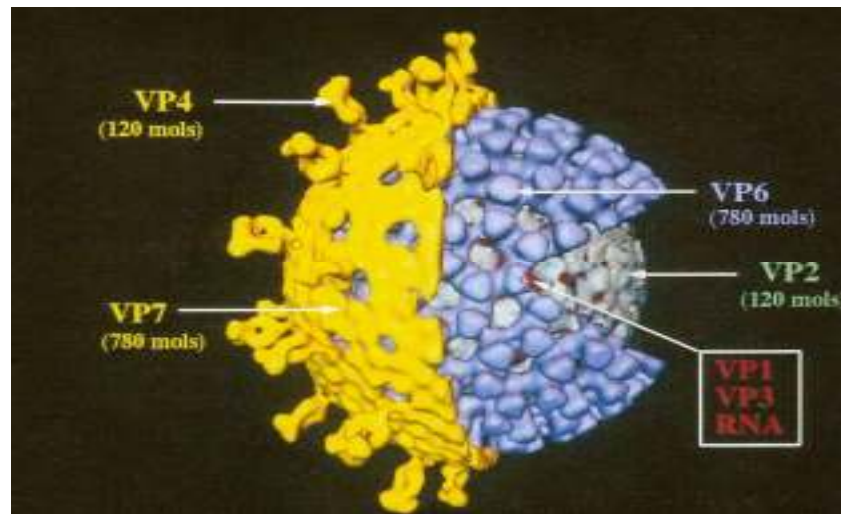
Membro da família *Reoviridae*, o gênero *Rotavirus* possui sete grupos (A-G) determinados por epítomos antigênicos presentes na proteína VP6. Dentre os sete grupos, o grupo A é o de maior importância por ser o principal agente causador de diarreia neonatal em seres humanos e em algumas espécies animais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

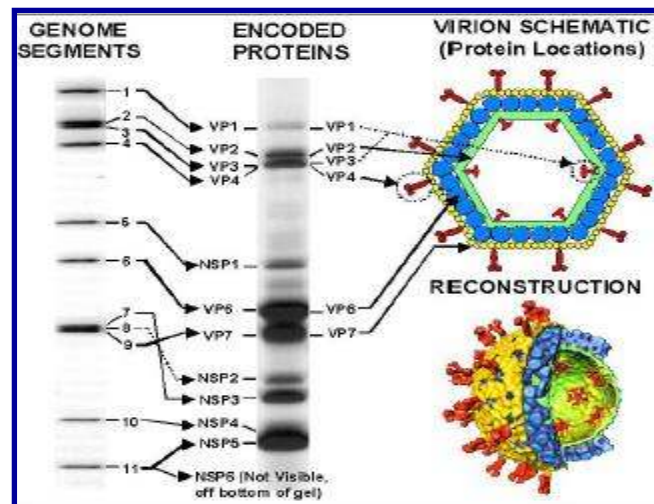
Dentre os sorotipos/genótipos G, destacam-se 10 deles (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8, G9, G10, G11 e G12) com grande importância epidemiológica para seres humanos, e dentre os sorotipos/genótipos P, destaca-se o genótipo P[4] e P[8] predominante em seres humanos. Os genótipos P[6] é responsável por um terço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

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

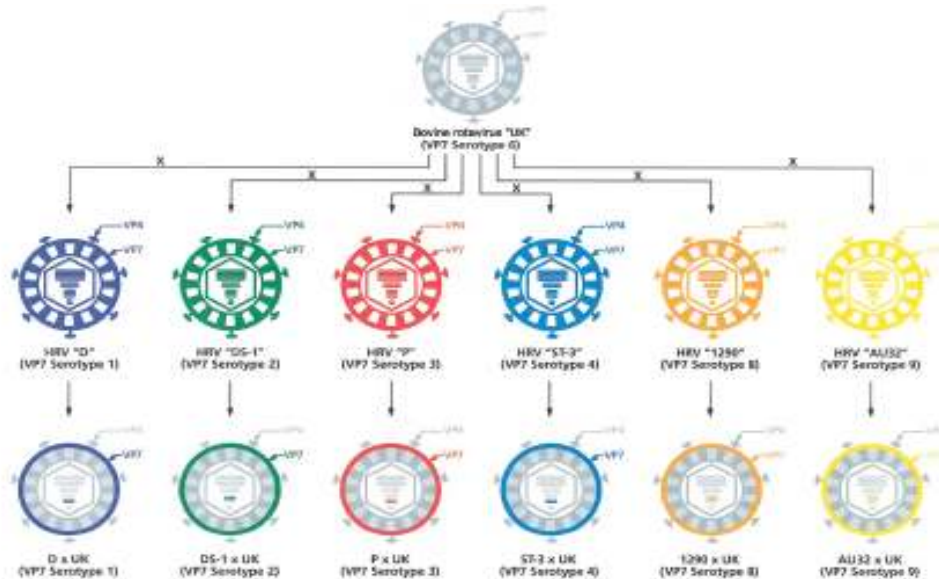
Assim, pesquisadores do *National Institutes of Health (NIH)* dos Estados Unidos, começaram a trabalhar no desenvolvimento de cepas vacinais de rotavírus utilizando a técnica de rearranjo genético (*reassortant*) entre cepas de rotavírus provenientes de humanos e animais tais como bovinos e macacos (MIDTHUN 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

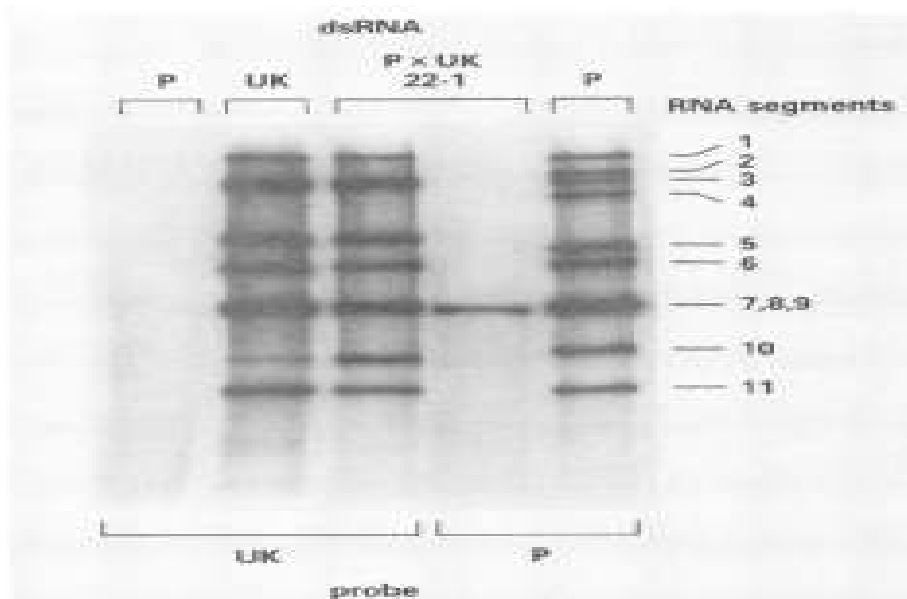
vacinas para rotavírus inclusive na produção da vacina pentavalente de rotavírus do Instituto Butantan.

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).

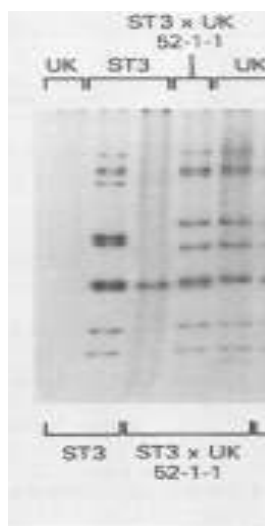
Segundo Hoshino, 2003 o grande objetivo de construir estas amostras *reassortant* é reunir a atenuação implícita nos genes da cepa animal, no caso, dez seguimentos gênicos, com o estímulo a produção de anticorpos neutralizantes provocados pela glicoproteína VP7 das cepas humanas. Assim estas cepas *reassortant* 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-bovina 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-bovina e 10 segmentos da cepa P x UK- Bovina. A sonda para cepa humana identifica os 11 segmentos gênicos da cepa P, porém apenas 1 segmento da cepa P x UK- Bovina.  
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	A		B		C		D		E		F	
	39	50	87	101	120	130	143	152	208	221	233	242
1	D	LITVALFALTRA	TEASTQIMGGQKDS	EYSSIVDFSVQ	KYDQSLQDM	QTTMVDSTFKIADN	INMKIMLTTT					
	MO	.....	.....	.....	.....	.....	.....					
	H37	.....	.....S-E	.....	.....	.....M	.....	R.....V	.....	.....	.....	.....
	MA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
2	DS1	-LIALISPFV-T	A--KNE-S-DE-ENT	D-ND-MT--N	R--NTS--A	K--D-MT--IV-SS	V----ISIN					
	HN126	-LIALISPFV-T	--KNE-S-DE-ENT	D-ND-MT--N	R--NTS--A	K--D-MT--IV-SS	V----ISIN					
	HUS	-LIALISPFV-T	A--KNE-S-DE-ENT	D-ND-MT--N	R--NTS--A	K--D-MT--IV-SS	V--N--ISIN					
	S2	-LIALISPFV-T	A--KNE-S-DE-ENT	D-ND-TT--NN	R--NTS--V	KI-D--Y--IV-SS	V----ISIS					
3	P	--I-I-SP-LN-	--A-E--MS--T	D-TD-AS---	--AT-Q--	L--DTMT--EV-TA	V--L-V--A					
	RRV	F-V-I-SP-LK-	--A-E--MS--T	--TD-AS---	--AT-Q--	L--DTAT--EV-TA	V--LDV--A					
	SAL1	F-I-I-SPFL--	--A-E--MS--T	--TN-AS---	--AT-Q--	L--DATT--EV-TA	V--LDV--A					
4	ST3	FVI-V-SV-SH-	S--P--S-TE--T	--MVL--I-	RFSGE--I	---TAT--TV-DS	V--L-I-S-					
	VA70	F-I-V-SV-SH-	S--P--S-ME--T	--MVL--I-	-FASGE--I	---AT--V-DS	V--LDV--S-					
5	OSU	-VI-V-AP-IK-	N--A-E-A-TX-TET	Q-AD-AS--E	--EM-Q--	S--DIN--TV-NA	V--LDV--S					
6	NGOV	--V-I-ATIIN-	V--NE-A-TE--T	--AD-AA--E	--STQ--	LI--P-T--TV-TM	V--L-V--A					
	RF	--V-I-ATIJK-	V--NE-A-TE--T	--AD-AA--E	--STQ--	LI--P-T--TV-TT	V--L-V--A					
	UK	--V-V-ATKIN-	V--NE-A-TE--T	--TD-AA--E	--STQ--	LI--P-T--TV-TT	V--L-V--A					

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

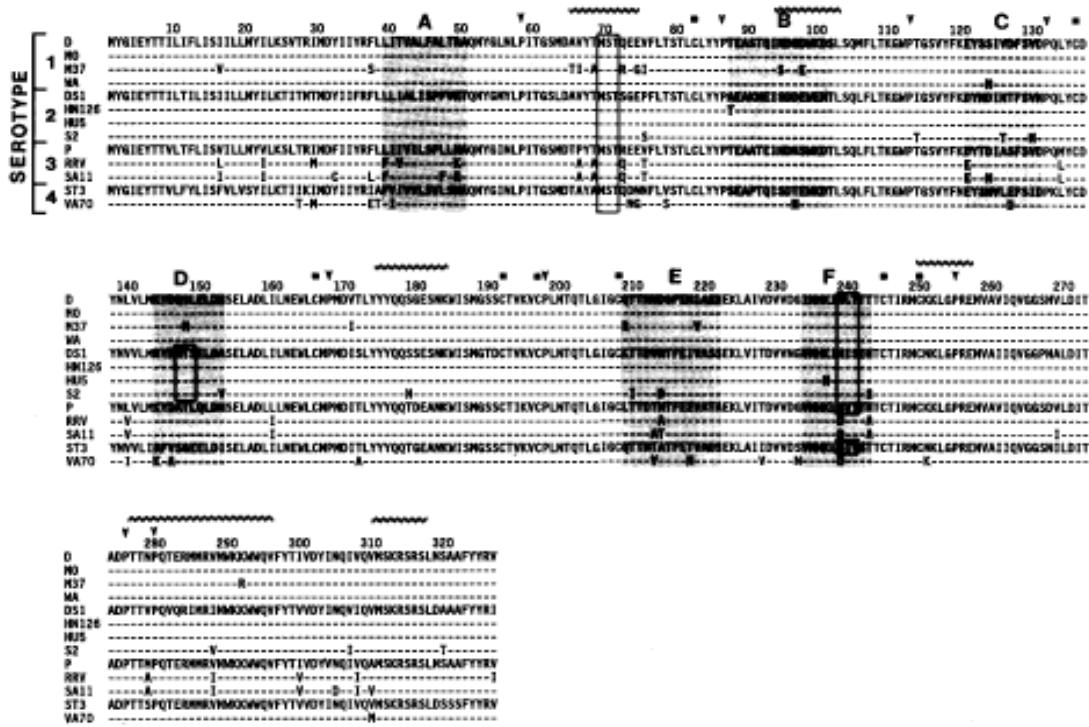
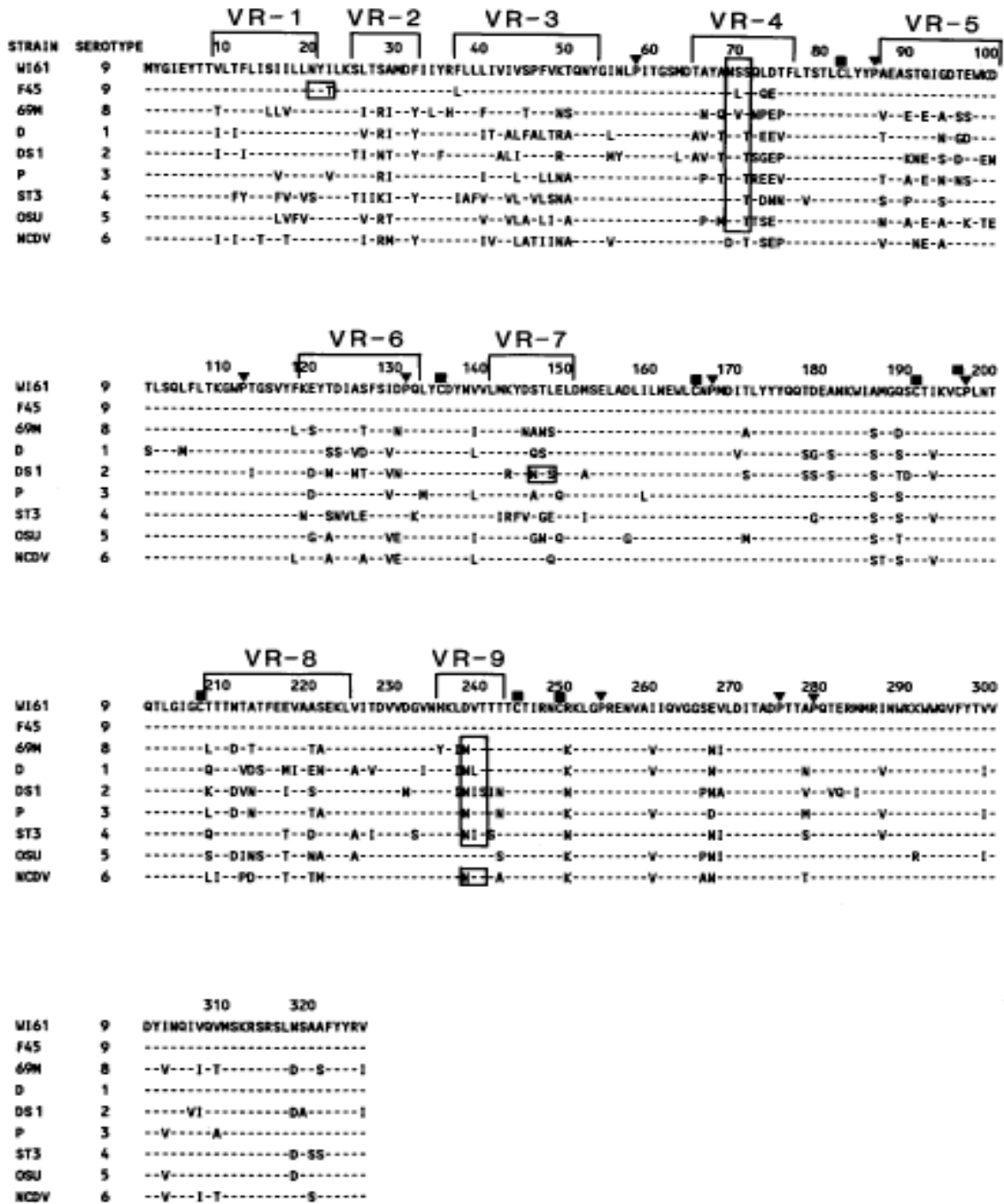


Figura 10 - Comparação entre as seqüências de aminoácidos de VP7 de 13 cepas de rotavírus dos sorotipos 1, 2, 3 e 4. A seqüência de aminoácidos de cada cepa foi comparada somente com cepas presentes no seu sorotipo. Cisteínas (▼), prolina (■) e regiões hidrofílicas (~) são conservadas em todas as cepas. 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	
HW209	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
HW256	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
HW507	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
HW7	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
B	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
C	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
P118	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
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
HW226	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AUU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AUU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
2743	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AUU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AUU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
2899	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AUU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AUU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
C	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AUU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AUU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
V197	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AUU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AUU	ACU	AAA	ACU	ACG	GUA	AAC	ACA	UUU	SAG	AUU	GUU	CGC	UGC	UCU	
V226	2	ACA	GAA	GCU	AAA	AUU	GAC	AUU	UCA	GAU	SAU	GAA	UGC	AAA	AUU	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	LTS	ASP	THR	LEU	THR	THR	ASP	THR	ASN	THR	PHR	GLU	GLU	VAL	ALA	THR	ALA
HW330	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
HW257	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
HW4	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	LTS	ASP	THR	GLR	THR	THR	ASN	THR	PHR	GLU	THR	VAL	ALA	ASP	SER	THR	
HW11	4	UCU	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AUU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGC
HW4	4	UCA	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AUU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGC
HW5	4	UCU	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AUU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGC
HW19	4	UCU	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AUU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGC
V470	4	UCU	GAG	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	AAC	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AUU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGC
HW98	4	UCU	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AUU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGC
3019	4	UCA	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AUU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGC
5083	4	UCA	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AUU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGC
HW59	4	UCA	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AUU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGC
HW61	4	UCA	GAA	GCU	CCA	ACU	CAA	AUU	AGU	SAC	ACU	GAA	UGC	AAA	GAU	ACA	CAA	ACG	ACA	AUU	NCA	CCU	ACU	UUU	GAA	ACA	GUU	CCU	GAU	AGC

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  $\alpha$  (IgA subclasses 1 e 2),  $\gamma$  (IgG subclasses de 1 a 4),  $\mu$  (IgM),  $\delta$  (IgD) e  $\epsilon$  (IgE) e dois tipos de cadeias leves  $\lambda$  (lambda) e  $\kappa$  (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.

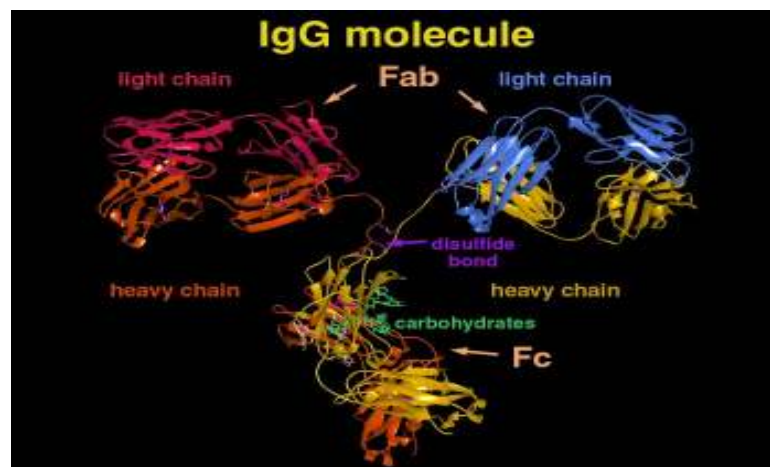
A região Fc realiza ativação de complemento (quando unida ao antígeno) exercendo quimiotaxia sobre neutrófilos, aumento da resposta inflamatória e auxilia a fagocitose por se ligar a macrófagos. A classe IgG compreende as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4, cuja proporção e ocorrência são controlada 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 BHK<sub>21</sub>) 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 BHK<sub>21</sub> 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.

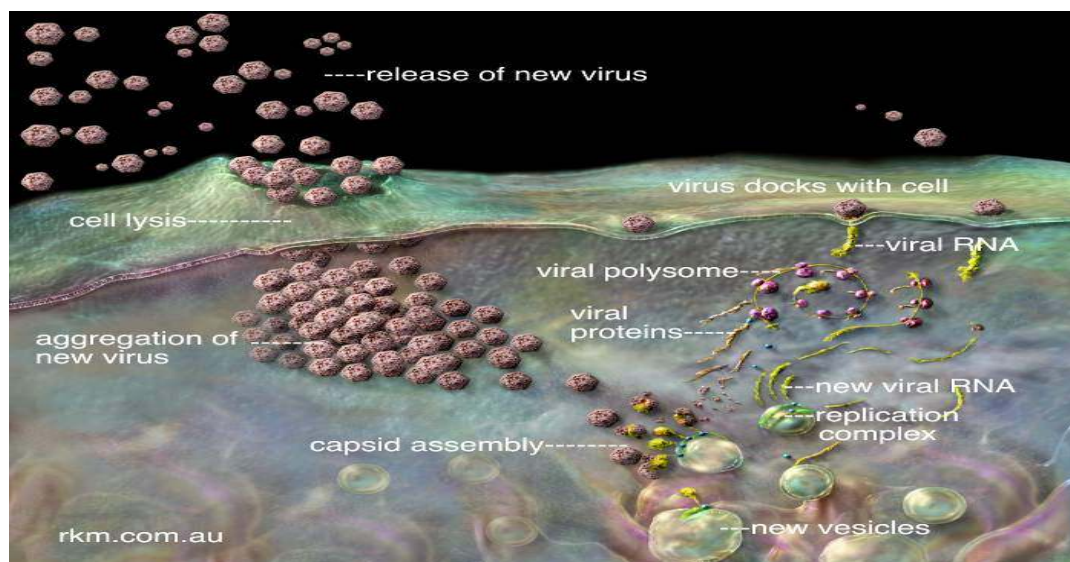


Figura 14 - Fases da replicação viral de um RNA vírus.

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).

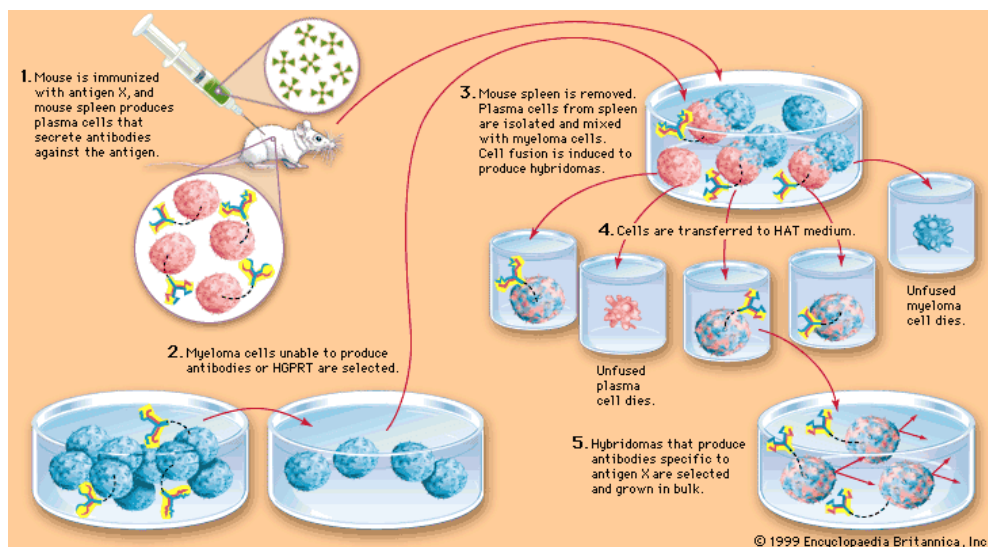
Para a geração dessas linhagens os plasmocitomas foram selecionados em cultivo, na presença de drogas análogas a 8- azaguanina ou 6- tioguanina, baseado no fato de que as

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,  $4 \times 10^{-2}$  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 murinos 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).



## 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*.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- 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.

---

<sup>1</sup> 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 SCIENCE. **Biochemistry and molecular biology**. Disponível em: [http://www.personal.psu.edu/sxt30/gallery\\_proteins.html](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](http://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.; ASSUMPTÃO, 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 BHK<sub>21</sub> 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](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 inadults 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.