



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
APRESENTADOS EM FAGOS PARA SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
scFv LIGANTE A PROTEÍNAS INTESTINAIS DE *DIATRAEA SACCHARALIS***

Aluno: Rafael Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA - MG
2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
APRESENTADOS EM FAGOS PARA SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
scFv LIGANTE A PROTEÍNAS INTESTINAIS DE *DIATRAEA SACCHARALIS***

Aluno: Rafael Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA - MG
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

N244c Nascimento, Rafael, 1983-

Construção de uma biblioteca de anticorpos monoclonais apresentados em fagos para seleção e caracterização de scFv ligante a proteínas intestinais de *Diatraea saccharalis* / Rafael Nascimento. - 2009.

97 f. : il.

Orientador: Warwick Estevam Kerr.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. I. Kerr, Warwick Estevam, 1922- II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
APRESENTADOS EM FAGOS PARA SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
scFv LIGANTE A PROTEÍNAS INTESTINAIS DE *DIATRAEA SACCHARALIS***

Aluno: Rafael Nascimento

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Warwick Estevam Kerr

Examinadores: Dra. Janethe Deolina de Oliveira Pena (UFU);
Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo (UFMG).

Data da Defesa: 29 de Julho de 2009.

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas.

Dr. Warwick Estevam Kerr

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Solange e Nilson, e às minhas irmãs, Mariana e Emília, pelo amor incondicional e pelo grande apoio. Agradeço ao meu eterno amigo Marco Lara, que não mede esforços por mim. A essas pessoas, toda forma de agradecimento é pequena.

Agradeço aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU, em especial aos meus amigos Ana Carolina, Ana Paula, Angela, Carlos, Carolina, Fabiana, Fausto, Juliana, Patrícia, Paula Cristina, Paula Sousa, Rone, Thaíse, Washington, William e Yara pela imensa ajuda e pelos importantes conselhos e esclarecimentos.

Agradeço ao meu amigo do peito, José Geraldo, pelo companheirismo e por compartilhar de tantos momentos de descontração e alegria durante essa jornada.

Agradeço ao Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais da UFU, em especial em nome das estudantes Renata e Miriam pela boa vontade.

Agradeço aos professores Dra. Clélia Ferreira (USP), Dr. Walter Terra (USP) e Dr. José P. Parra (ESALQ) pela colaboração e por apoiarem o meu trabalho.

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Kerr e Dr. Luiz Ricardo, pela oportunidade de realizar essa pesquisa e por todo o conhecimento a mim transmitido.

Por último, mas não menos importante, agradeço imensamente a Deus.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
APRESENTAÇÃO.....	9
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
1. A broca da cana-de-açúcar.....	
2. Imunoglobulinas.....	14
3. Fragmentos de Anticorpos.....	16
4. Apresentação de fragmentos de anticorpos scFv por <i>Phage Display</i>	17
5. Biblioteca de anticorpos a partir de repertório imune e não-imune.....	22
6. Variabilidade e rearranjo dos genes de anticorpos em galinha.....	23
7. Referências Bibliográficas.....	26
 CAPÍTULO ÚNICO: Construção de uma biblioteca de anticorpos monoclonais apresentados em fagos para seleção e caracterização de scFv ligante a proteínas intestinais de <i>Diatraea saccharalis</i>.....	 35
RESUMO E ABSTRACT.....	36
 1. INTRODUÇÃO.....	 37
 2. OBJETIVOS.....	 39
2.1. Objetivo Geral.....	39
2.2. Objetivos Específicos.....	39
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 40
3.1. Linhagens Bacterianas.....	40
3.2. Vetor Fagomídeo.....	40

3.3. Bacteriófago Auxiliar.....	41
3.4. Construção da Biblioteca de Anticorpos.....	42
3.4.1. Extração das Proteínas Intestinais de <i>Diatraea Saccharalis</i>	42
3.4.2. Preparação das Frações Solúveis e de Membrana do Epitélio do Ventrículo.....	42
3.4.3. Análise de Proteínas em Gel SDS-PAGE.....	43
3.4.4. Imunização de Aves <i>Gallus gallus domesticus</i>	43
3.4.5. Titulação dos Anticorpos IgY por ELISA.....	44
3.4.6. Extração do RNA Total do Baço da Galinha Imunizada.....	45
3.4.7. Purificação do RNAm a Partir do RNA Total.....	45
3.4.8. Síntese da Primeira Fita de cDNA a partir do RNA Total e RNAm Purificado.....	46
3.4.9. Amplificação dos Fragmentos de Cadeia Pesada (VH) e Cadeia Leve (VL).....	47
3.4.10. Amplificação dos Fragmentos scFv.....	48
3.4.11. Restrição dos Fragmentos scFv e do Vetor pComb3XSS com a Enzima <i>Sfi</i> I.....	49
3.4.12. Ligação dos Fragmentos scFv com o Vetor pComb3XSS.....	49
3.5. Preparação de Células Eletrocompetentes.....	50
3.6. Preparação do Fago Auxiliar VCSM13.....	51
3.6.1. Obtenção de Placas de Lise.....	51
3.6.2. Amplificação do Fago Auxiliar.....	52
3.6.3. Determinação do Título da Preparação de Fagos Auxiliares.....	52
3.7 Transformação de Bactérias Eletrocompetentes com a Biblioteca de scFv por Eletroporação.....	53
3.8. Preparação de DNA Plasmidial em Placas de Microtitulação.....	54
3.9. Reamplificação da Biblioteca.....	56
3.10. Seleção de Partículas Virais Fusonadas a Anticorpos scFv Ligantes às Proteínas Intestinais de <i>Diatraea saccharalis</i> Imobilizadas em Placas de Microtitulação.....	57
3.11. Transformação de Bactérias Eletrocompetentes com a Biblioteca de scFv Seleccionada.....	58
3.12. Expressão de Proteínas Heterólogas em Placas do Tipo <i>Deep Well</i>	59
3.13. <i>Dot blot</i> para Análise da Expressão Heteróloga de Proteínas.....	60
3.14. Ensaio Imunoenzimático ELISA para Seleção dos Fragmentos de Anticorpos scFv com Maior Afinidade às Proteínas Intestinais de <i>D. saccharalis</i>	60
3.15. Sequenciamento de DNA e Bioinformática.....	61
3.16. Purificação de scF por Cromatografia de Afinidade em HPLC.....	62
3.17. Ensaios de <i>Western Blotting</i>	63
3.18. Imunohistoquímica.....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1. Análise de Proteínas por Eletroforese em Gel SDS-PAGE.....	66

4.2. Imunização de Aves <i>Gallus gallus domesticus</i>	67
4.3. Amplificação dos Fragmentos de Cadeia Pesada (VH) e Cadeia Leve (VL).....	68
4.4. Amplificação dos Fragmentos scFv.....	69
4.5. <i>Dot blot</i> para Análise da Expressão Heteróloga de Proteínas.....	70
4.6. Ensaio Imunoenzimático ELISA para Seleção dos Fragmentos de Anticorpos scFv com Maior Afinidade às Proteínas Intestinais de <i>D. saccharalis</i>	71
4.7. Sequenciamento e Bioinformática dos Clones Seleccionados.....	72
4.8. Purificação de scFv por Cromatografia de Afinidade em HPLC.....	74
4.9. Ensaio de <i>Western Blotting</i>	74
4.10. Imunohistoquímica.....	76
4.11. Viabilidade do Uso de Fragmentos de Anticorpos como Biopesticidas.....	78
5. CONCLUSÕES.....	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
7. ANEXO I.....	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ciclo de vida de *Diatraea saccharalis*.
- Figura 2: Estrutura básica de um anticorpo IgG.
- Figura 3: Representação esquemática do fragmento scFv.
- Figura 4: Estrutura básica de um bacteriófago filamentosos.
- Figura 5: Ciclos de seleção de proteínas ligantes a partir de uma biblioteca de *Phage Display*.
- Figura 6: Organização dos loci de imunoglobulina de galinha.
- Figura 7: Vetor fagomídeo pComb3X usado na construção de bibliotecas combinatoriais de anticorpos.
- Figura 8: Gel SDS-PAGE para análise das proteínas intestinais extraídas de larvas de *Diatraea saccharalis*.
- Figura 9: Título de anticorpos em soros de animais após a quarta imunização.
- Figura 10: Análise do produto da amplificação das regiões variáveis de cadeia pesada (VH) e cadeia leve (VL).
- Figura 11: Análise do produto da amplificação das regiões variáveis de cadeia pesada (VH) e cadeia leve (VL) após a purificação das bandas do gel de agarose.
- Figura 12: Análise do produto da amplificação dos fragmentos de anticorpos scFv.
- Figura 13: *Dot blot* para análise da expressão dos fragmentos de anticorpos em cultura induzida com IPTG.
- Figura 14: ELISA para análise da reatividade dos scFvs selecionados.
- Figura 15: Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos sete clones selecionados.
- Figura 16: *Dot blot* para análise das frações eluídas pela cromatografia de afinidade em HPLC.
- Figura 17: Ensaios de *western blotting* com o scFv E01 e as proteínas intestinais de *D. saccharalis*.
- Figura 18: Análise imunohistoquímica do tecido intestinal de larvas de *D. saccharalis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrometro
µM	Micromolar
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	Soro-albumina bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
O.D.	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
g	Grama
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y (Yolk)
INGEB	Instituto de Genética e Bioquímica
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosideo
kDa	Quilodalton
L	Litro
M	Molar
M13KE	Bacteriófago filamentoso
mA	Miliampere
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NBT	Cloreto nitroblue tetrazolium
ng	Nanogramas
Ni	Níquel
Rpm	Rotações por minuto

RNA	Ácido ribonucléico
pmol	Picomol
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato
pComb3XSS	Vetor de clonagem
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial de Hidrogênio
p/v	Peso por volume
scFv	<i>single-chain Fv fragment</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Taq	Enzima Taq DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tampão tris-base salino
U	Unidade de enzima
ufc	Unidades formadoras de colônias
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

APRESENTAÇÃO

A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), destaca-se como a praga que mais causa danos ao cultivo da cana-de-açúcar no Brasil e outras localidades do continente americano, sendo responsável pela diminuição dos rendimentos agroindustriais associados à cultura. A cana-de-açúcar é de grande importância para a economia nacional porque fornece a matéria-prima para a produção do açúcar e do álcool combustível, além dos seus subprodutos como o bagaço utilizado na produção de papel, ração animal e geração de energia elétrica.

Devido aos extensos danos causados pela praga na cultura da cana-de-açúcar e ao seu difícil controle pelos inseticidas convencionais, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias de controle desse inseto visando-se a diminuição do uso de agentes químicos prejudiciais ao ser humano e ao meio ambiente.

Diversas proteínas e peptídeos têm sido avaliados quanto à capacidade de atuarem como bioinseticidas, o que permitiria o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas resistentes a diversos insetos-praga.

Com o intuito de gerar novas moléculas com atividade bioinseticida contra a broca-da-cana, o presente trabalho teve por objetivo a construção de uma biblioteca imune de fragmentos de anticorpos scFv por meio da tecnologia de *Phage Display* para seleção e caracterização de moléculas ligantes às proteínas intestinais da larva de *D. saccharalis*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. A BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR

A produtividade de lavouras de cana-de-açúcar é grandemente diminuída por diferentes estresses bióticos e abióticos. A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis*, é a praga mais importante desta cultura, ocorrendo em todas as regiões canavieiras do Brasil e em outras localidades no continente americano (Vendramim et al., 1989; Carvalho et al., 2002).

D. saccharalis é considerada uma espécie polífaga, ocorrendo naturalmente em diversas gramíneas. Elias (1970), apud Peairs e Saunders (1979), relatou sua ocorrência em 65 espécies de plantas. Dentre as espécies de importância econômica, arroz, aveia, cana-de-açúcar, milho, milheto, sorgo e trigo são hospedeiros da broca (Costa-Lima, 1945, 1968; Santa Cruz et al., 1973).

A broca da cana-de-açúcar é uma praga de difícil controle devido ao seu hábito críptico. As fêmeas depositam seus ovos na face abaxial das folhas e as lagartas, logo após a eclosão dos ovos, alimentam-se do parênquima, convergem então para a bainha das folhas, penetram nas gemas laterais e abrem galerias dentro do colmo, onde completam seu desenvolvimento larval (Vendramim et al., 1991).

Os prejuízos diretos são causados pela abertura de galerias, que ocasionam a perda de peso da cana, a redução do fluxo de seiva e a morte das gemas. Nas canas novas, a broca leva ao secamento dos ponteiros, evento conhecido como “coração morto”. Na cana adulta, as larvas levam à formação de brotações laterais, enraizamento aéreo, atrofiamento dos entrenós e tombamento, reduzindo a produtividade agrícola e industrial (Mendonça, 1996). Os danos indiretos são causados por microorganismos, geralmente fungos (*Fusarium moniliforme* Sheldon e *Colletotrichum falcatum* Went) que, invadindo o entrenó através do orifício aberto pela lagarta, causam a podridão vermelha. Os fungos provocam a inversão da sacarose, levando a perdas pelo consumo de energia no metabolismo de inversão e pelo fato dos açúcares, resultantes desse desdobramento, não se cristalizarem no processo industrial. A inversão da sacarose diminui a pureza do caldo e os microorganismos contaminantes competem com as leveduras no processo de fermentação alcoólica, reduzindo o rendimento industrial no processamento da cana (Botelho & Macedo, 2002;

Gallo et al., 2002). Além da penetração dos microorganismos oportunistas, há também a ação secundária de coleobrocas como *Metamasius hemipterus*, *Xyleborus* spp. e *Sphenophorus* spp., que contribuem para aumentar o dano (Contreras Durán, J. V, 1980).

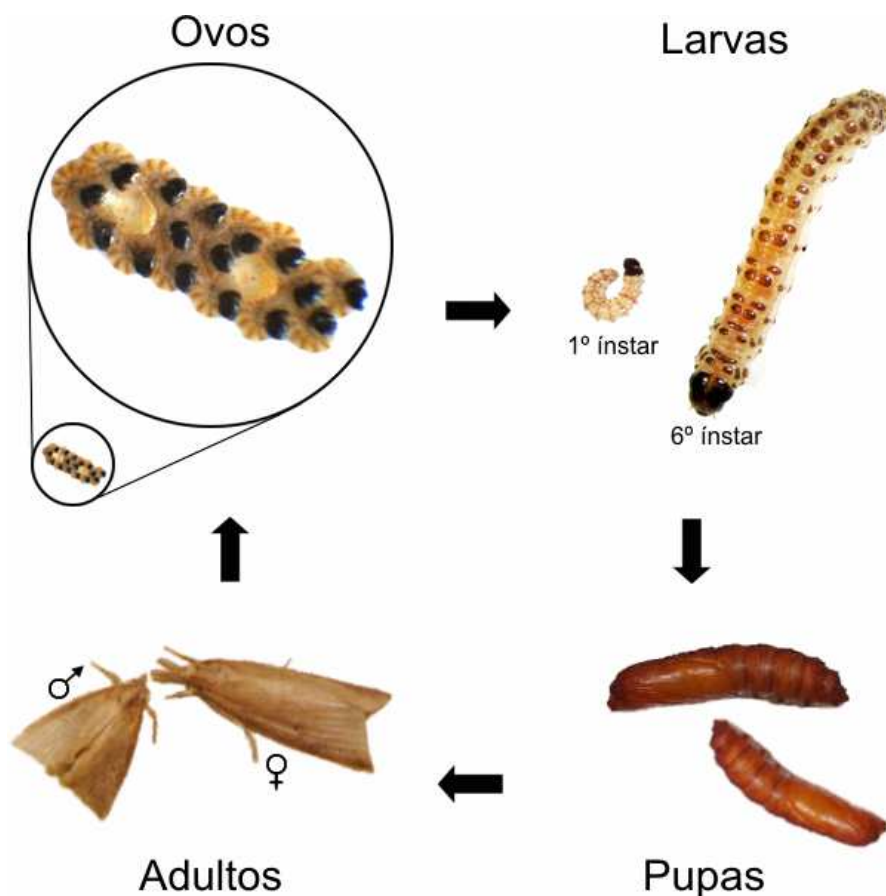


Figura 1: Ciclo de vida da *Diatraea saccharalis*.

Em lavouras do estado de São Paulo, um nível de ataque da broca de 10% representa uma perda de produção no valor de US\$ 100 milhões por ano, devido somente aos danos indiretos causados pelo complexo de fungos da podridão vermelha (Cruz, I. et al., 2005).

Embora a broca da cana-de-açúcar possa ser eficientemente controlada por controle biológico usando-se seu inimigo natural *Cotesia flavipes*, existe um dano residual de aproximadamente 10% que justifica a busca por variedades de cana resistentes ao inseto (Botelho & Macedo, 2002). Métodos de melhoramento convencional têm se mostrado insatisfatórios e nenhuma

variedade de cana-de-açúcar altamente resistente à *D. saccharalis* foi ainda identificada.

2. IMUNOGLOBULINAS

As imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas de massa molecular elevada, em torno de 150 kDa, encontradas em abundância no soro de animais vertebrados (Figura 2). Essas moléculas são de natureza tetramérica, compostas por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, unidas por uma extensiva rede de interações não-covalentes, estabilizadas por pontes dissulfeto. Tanto as cadeias leves quanto as pesadas contêm uma série de unidades homólogas repetidas, cada uma com cerca de 110 resíduos de aminoácidos que se enovelam independentemente em um motivo globular classificado como Domínio Imune (Padlan, E. A., 1994).

A cadeia leve é composta por uma porção variável (VL) e uma porção constante (CL), e a cadeia pesada é composta de uma porção variável (VH) e três ou quatro porções constantes, dependendo da classe de imunoglobulina, chamadas de CH1, CH2, CH3 e CH4. A região constante da cadeia leve pode apresentar dois tipos de domínios segundo suas seqüências de aminoácidos: capa (κ) ou lambda (λ). Já as regiões constantes das cadeias pesadas são constituídas de três ou quatro domínios agrupando-se em cinco padrões diferentes de seqüências de aminoácidos designadas pelas letras do alfabeto grego α , δ , ϵ , γ e μ . Esse último é o critério determinante da classe ou isotipo ao qual o anticorpo pertence, podendo este ser uma IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM, correspondendo, respectivamente, aos cinco tipos de regiões constantes. Esses cinco isotipos apresentam capacidades de multimerização distintas e funções efectoras próprias (Paul, 2003).

A molécula de anticorpo pode ser subdividida em porções Fc e Fab, onde Fc é constituída pelos domínios constantes e Fab constituída pelos domínios VH-CH1 e VL-CL, responsáveis pela ligação aos antígenos e, portanto, denominado sítio combinatorial para o antígeno. As três áreas altamente divergentes dentro das regiões V são chamadas também de regiões hipervariáveis e são mantidas no local por regiões estruturais, mais

conservadas. Em uma imunoglobulina, as três regiões hipervariáveis de uma cadeia leve e as três regiões hipervariáveis de uma cadeia pesada ocupam conjuntamente um espaço tridimensional para formar uma superfície de ligação para o antígeno. Como estas seqüências formam uma superfície complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado, as regiões hipervariáveis são também chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) (Ferreira &Teixeira, 2005).

As CDRs 1, 2 e 3 formam juntas os sítios de ligação ao antígeno, o parátopo. Este corresponde a uma superfície complementar ao epitopo (região que é reconhecida no antígeno) e define sua especificidade. As três CDRs de cada cadeia são definidas como CDR1, CDR2 ou CDR3, ou então, H1, H2, H3 e L1, L2, L3, explicitando a cadeia a qual pertencem, pesada ou leve, respectivamente. As regiões que intercalam as CDRs são conhecidas como arcabouço (*Framework – FW*) dos domínios variáveis (Abbas et al., 2000).

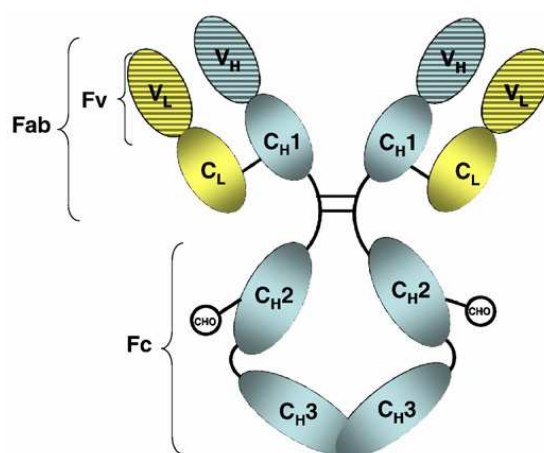


Figura 2: Estrutura básica de um anticorpo IgG. Cadeias pesadas (azul); cadeias leves (amarelo); domínios variáveis (VH e VL). A molécula de IgG possui um carboidrato na região N-terminal ligado ao aminoácido Asn297 do domínio CH2. A ligação funcional do antígeno é mediada pela porção Fab, sendo a especificidade ao antígeno determinada pela porção Fv. As funções biológicas efetoras são mediadas pela região Fc da molécula (Adaptado de Weisser, N. e Hall, J. C., 2009).

3. FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

Os fragmentos de anticorpos scFv (*single-chain variable fragment*) são moléculas de 26 a 28 kDa, compostas pelas cadeias VH e VL unidas por um peptídeo conector flexível (Maynard e Georgiou, 2000) (Figura 3). Os primeiros scFvs foram desenvolvidos independentemente por Huston et al. (1988) e Bird et al. (1988) e foram originalmente derivados de genes isolados de linhagens celulares de hibridomas. Os peptídeos conectores que ligam as cadeias VH e VL são usualmente compostos por 10 a 25 aminoácidos, sendo o decapeptídeo $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ o mais comum deles. As regiões variáveis podem ser conectadas no sentido VH-conector-VL ou VL-conector-VH e a orientação das cadeias no scFv pode afetar a eficiência da expressão (Merk et al., 1999), a estabilidade e a capacidade de ligação do mesmo ao antígeno (Desplancq et al., 1994).

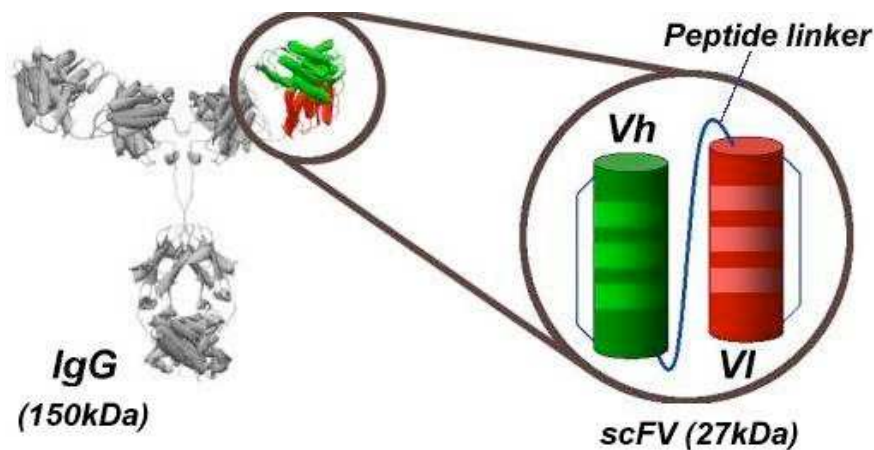


Figura 3: Representação esquemática do fragmento scFv. Os domínios VH e VL presentes na molécula scFv aparecem nas cores verde e vermelho, respectivamente. O polipeptídeo (*peptide linker*) estabilizador dos domínios está indicado em azul.

4. APRESENTAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS scFv POR PHAGE DISPLAY

Diversas metodologias de apresentação de moléculas na superfície de vírus e células têm sido descritas, incluindo as técnicas de *Phage-Display* (Ph.D.) (McCafferty et al., 1990), *Ribosome Display* (Hanes e Pluckthun, 1997; He e Taussig, 1997) e *Cell-Surface Display* (Francisco et al., 1993), através das quais anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser selecionados pela maturação da reatividade a antígenos de interesse. As bibliotecas para apresentação de moléculas são criadas pela obtenção e clonagem de diversos genes de anticorpos, como, por exemplo, genes oriundos de linfócitos B de animais imunizados (Hoogenboom, 2005). Tais bibliotecas são utilizadas para selecionar moléculas com alta afinidade de ligação a antígenos de interesse, sendo as mesmas enriquecidas após cada ciclo de amplificação e seleção. Após alguns ciclos de seleção, os clones oriundos do processo de enriquecimento são selecionados de acordo com a reatividade ao antígeno alvo (Figura 5).

A tecnologia *Phage Display* (Ph.D.) de apresentação de polipeptídeos na superfície de bacteriófagos filamentosos foi introduzida pela primeira vez por G. Smith em 1985 (Smith, 1985). Ph.D. é a mais antiga e mais utilizada técnica de apresentação de moléculas e é utilizada para apresentar, enriquecer e amadurecer a afinidade de um vasto número de proteínas e peptídeos a partir de uma grande biblioteca com mais de 10^{10} variantes. A vantagem crucial desta tecnologia é sua capacidade de conectar o fenótipo experimental (a molécula apresentada) com o seu genótipo encapsulado (o DNA codificante da molécula apresentada) (Scott e Smith, 1990).

Tipicamente, utilizam-se bacteriófagos da família Inoviridae (M13, fd, f1) (Sidhu, 2001), vírus bacteriófagos filamentosos que parasitam bactérias gram-negativas que possuem o pílus F. O vírus aproveita a maquinaria de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir. O bacteriófago M13 não provoca lise na célula hospedeira, mas induz um estado no qual a célula infectada origina e libera partículas virais, causando uma queda na taxa de reprodução bacteriana (Azzazy e Highsmith, 2002).

A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 4). Destas cinco proteínas, existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago (Phizicky e Fields, 1995).

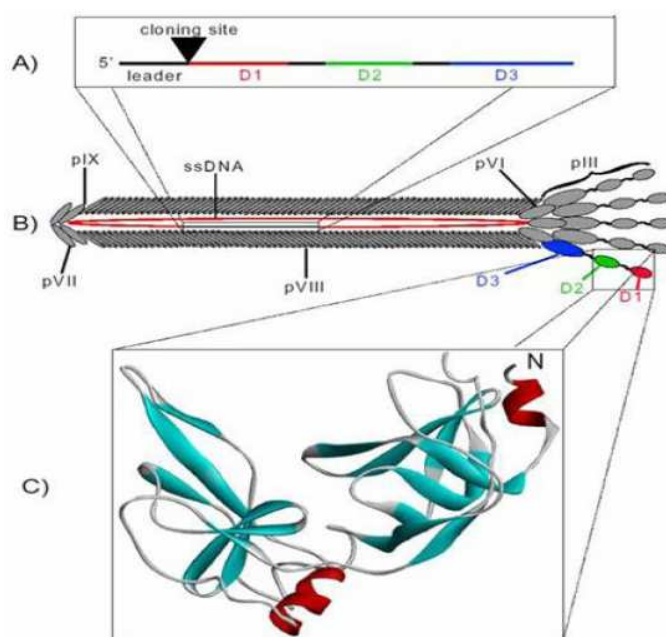


Figura 4: Estrutura básica de um bacteriófago filamentosso. A - Sítio de clonagem no fagomídeo junto à sequência da proteína pIII. B - Estrutura do capsídeo viral, mostrando as proteínas de superfície pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. C - Sub-unidades D1 e D2 da proteína pIII, mostrando a extremidade N-terminal da proteína (Holliger e Williams, 1999).

Em 1990, foram obtidos os primeiros fragmentos de anticorpos expressos em fagos (McCafferty et al., 1990). Normalmente, bibliotecas combinatórias de anticorpos são sintetizadas a partir da construção de genes dos fragmentos de anticorpos recombinantes na forma de scFv ou Fab e, em seguida, estes genes são introduzidos por manipulação genética em

plasmídeos fusionados ao gene codificador de uma proteína capsídica. No caso de bibliotecas, são utilizados genes codificantes para milhões de fragmentos distintos.

Os fagomídeos representam uma alternativa prática ao uso e manipulação do DNA viral para expressão de anticorpos recombinantes. Fagomídeos são plasmídeos que possuem origem de replicação bacteriana, origem de replicação viral, gene de fusão (*pIII* ou *pVIII*), sítio de inserção do fragmento codificante do anticorpo ou qualquer outra proteína de interesse e genes de resistência a antibióticos para seleção em meio apropriado. Como os fagomídeos não possuem todas as proteínas necessárias para a encapsidamento da partícula viral, fagos auxiliares (*helper*) contendo todos os genes dos bacteriófagos filamentosos são utilizados nas culturas de células transformadas com o fagomídeo, permitindo o resgate da partícula viral. Durante a infecção viral, o DNA proveniente dos fagomídeos é preferencialmente revestido pelas proteínas estruturais, pois os fagos *helper* possuem mutações na origem de replicação, dificultando sua reprodução e empacotamento de seu próprio material genético (Barbas et al., 2001).

A descoberta de que sítios funcionais de anticorpos, como os scFvs, podem ser apresentados na superfície de bacteriófagos permitiu a seleção de anticorpos contra antígenos de interesse sem a necessidade de utilização da tecnologia do hibridoma (McCafferty et al., 1990). Bibliotecas de scFv apresentadas em fagos consistem de diversos domínios de cadeias leves e pesadas fusionados à proteína pIII do fago e apresentados externamente como um scFv (Vaughan et al., 1996). Os fragmentos de anticorpos podem ser expressos em bactérias rapidamente, em grandes quantidades e a baixos custos, se comparados à expressão de anticorpos completos em cultura de células animais. O DNA codificante para uma biblioteca de scFv pode ser clonado no genoma de um fago ou em um vetor fagomídeo para produzir uma fusão scFv-pIII. Em vetores, o DNA codificante da biblioteca pode ser clonado no genoma de fagos filamentosos (Scott e Smith, 1990) ou pode ser inserido como um cassete gênico que codifique a sequência completa da fusão scFv-pIII dentro do genoma do fago. Ambos os tipos de vetores possuem sequências codificantes para todas as proteínas necessárias para a replicação e montagem do fago (McLafferty et al., 1993).

A terceira forma de apresentação de proteínas em fagos é conhecida como *hybrid display* porque tanto a proteína recombinante pIII fusionada ao scFv quanto a proteína pIII selvagem são expressas. Vetores fagomídeos (plasmídeos com origens de replicação derivados de fagos e de bactérias *E. coli*) produzem as proteínas de superfície do fago fusionadas ao fragmento de anticorpo e possuem um maior nível de eficiência de transformação quando comparados aos vetores de fagos. A origem de replicação derivada do fago contém uma seqüência do tipo *hairpin* de sinalização que promove o empacotamento do genoma de ssDNA dentro de uma partícula viral (Russel e Model, 1989).

Seguindo a transformação de células de *E. coli* pelo fagomídeo, um fago auxiliar do tipo *helper* ou selvagem é usado para infectar a bactéria contendo o fagomídeo, provendo os produtos gênicos essenciais para a produção de novas partículas virais. Durante a montagem do fago, a proteína pIII selvagem do fago compete com a proteína scFv-pIII pela incorporação na partícula viral (Scott e Smith, 1990).

O método mais comum de Ph.D. para bibliotecas de anticorpos é realizado com vetores fagomídeos, uma vez que esse sistema utiliza uma estratégia de clonagem mais fácil e apresenta uma estabilidade genética maior quando comparados aos demais vetores, além de permitir a ligação mais eficiente do scFv ao alvo. Fagomídeos têm sido desenvolvidos para aumentar a eficiência da expressão (Pavoni et al., 2007) e fagos auxiliares têm sido remodelados para reduzir sua influência negativa (*'bald phage' background*) nos processos de seleção dos fagos ligantes (Kristensen e Winter, 1998).

A seleção dos fragmentos de anticorpos das bibliotecas de scFv expressas em fagos é um procedimento relativamente padronizado que envolve a exposição dos fagos ao antígeno alvo, permitindo a ligação e enriquecimento daqueles que expressam moléculas antígeno-específicas em um processo conhecido como *panning* (Figura 5). No processo de seleção, a biblioteca de fagos apresentando os fragmentos de anticorpos é incubada com o antígeno alvo que está imobilizado em um suporte sólido, como uma placa de microtitulação (Schofield et al., 2007), ou ligada a antígenos biotinilados em solução (Parmley e Smith, 1988). Os fagos não ligantes são removidos por sucessivas lavagens e os fagos ligantes são eluídos pela incubação dos

mesmos em soluções com valores de pH extremamente altos ou baixos (MacKenzie e To, 1998; Pincus et al., 1988), por clivagem proteolítica (Goletz et al., 2002) ou pela incubação com antígenos livres (Meulemans et al., 1994).

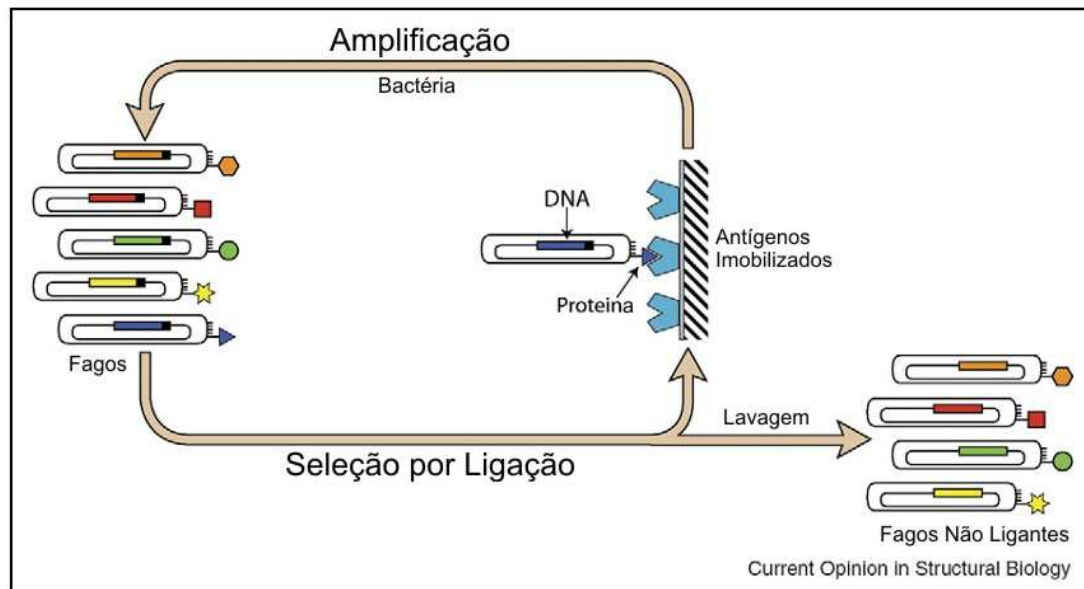


Figura 5: Ciclos de seleção de proteínas ligantes a partir de uma biblioteca de *Phage Display*. Bibliotecas de proteínas (coloridas) são apresentadas em partículas de fagos fusionadas às proteínas de superfície (preto). Bibliotecas altamente diversas (10^{10}) podem ser apresentadas em fagos e clones com especificidade a determinados antígenos podem ser selecionados pela ligação aos antígenos imobilizados, seguido pela lavagem e remoção dos fagos não ligados. Os fagos ligantes podem ser amplificados pela infecção em bactérias e utilizados em outros ciclos de seleção para enriquecimento dos fagos ligantes ao antígeno de interesse. O DNA de cada clone selecionado pode ser seqüenciado e revelar a seqüência da proteína apresentada que possua afinidade com o antígeno (Adaptado de Sidhu e Koide, 2007).

Em função da ligação de fagos não específicos, principalmente quando se faz uso dos suportes sólidos (Levitan, 1998), são necessários sucessivos ciclos de seleção com o aumento da estringência para que os clones com alta afinidade ao alvo sejam enriquecidos. A estringência pode ser aumentada pela diminuição da concentração do antígeno ou pelo aumento do número de lavagens em cada ciclo de seleção. Diversas bibliotecas de scFv expressas em fagos têm sido desenvolvidas (Azriel-Rosenfeld et al., 2004; Krebs et al., 2001; Vaughan et al., 1996), algumas delas com finalidades específicas, como para otimizar a expressão de anticorpos no citoplasma celular (biblioteca de

anticorpos internos) (Philibert et al., 2007), ou para aumentar o reconhecimento de antígenos como proteínas (Sheets et al., 1998) ou carboidratos (Ravn et al., 2004). Embora diversas formas de anticorpos estejam sendo desenvolvidas para Ph.D., os scFvs mantêm-se ainda como os mais utilizados.

5. BIBLIOTECA DE ANTICORPOS A PARTIR DE REPERTÓRIO IMUNE E NÃO-IMUNE

As bibliotecas de anticorpos podem ser construídas usando-se genes de imunoglobulinas de linfócitos isolados de animais (Clackson et al., 1991) ou humanos imunizados ou naturalmente infectados (Burton et al., 1991; Jacobin et al., 2002). Exemplos de animais imunizados que têm sido utilizados para construir bibliotecas de anticorpos incluem os camundongos (Mah et al., 2003; Tout et al., 2001), galinhas (Hof et al., 2008), ovinos (Shaw et al., 2008) e macacos (*Macaca fascicularis*) (Pelat et al., 2007). Tais bibliotecas têm sido utilizadas para isolar fragmentos de anticorpos que se ligam a uma variedade de antígenos como toxinas (Mah et al., 2003), glicoproteínas (Paus et al., 2003), carboidratos (Ravn et al., 2004) e esporos bacterianos (Mechaly et al., 2008).

A produção de fragmentos de anticorpos scFv usando-se a tecnologia de *Phage Display* (McCafferty et al., 1990; Winter et al., 1994; Marks e Marks, 1996) apresenta diversas vantagens em relação à tecnologia tradicional do hibridoma (Kohler e Milstein, 1975). Primeiro, o número de anticorpos fusionados aos fagos que podem ser produzidos é muito maior que o número de hibridomas produzidos num mesmo período de tempo ou a partir do mesmo número de animais imunizados (Carmen e Jermutus, 2002). Segundo, um grande número de anticorpos pode ser selecionado rapidamente. Terceiro, durante a construção da biblioteca de anticorpos, as regiões pesadas (VH) e leves (VL) de células B individuais são randomicamente rearranjadas para criar seqüências únicas de anticorpos que não estão presentes no repertório imune do animal doador. Dessa forma, a tecnologia de Ph.D. permite a produção de anticorpos específicos para epítomos que sejam incapazes de induzir a

produção de anticorpos monoclonais devido à tolerância imunológica bem como anticorpos contra antígenos que sejam tóxicos como imunógenos.

Os anticorpos do tipo scFv são usualmente produzidos usando-se duas estratégias gerais. A primeira envolve a seleção de anticorpos de bibliotecas não-imunes, que são bibliotecas tipicamente mais complexas (10^9 a 10^{11} clones) que consistem de scFvs gerados a partir de fragmentos VH e VL de um grande número de doadores humanos ou animais não imunizados (Sheets et al., 1998; Huie et al., 2001; Amersdorfer et al., 2002; Carmen e Jermutus, 2002). A principal vantagem dessa estratégia é o fato de que uma única e complexa biblioteca pode ser usada para selecionar anticorpos contra diferentes alvos. A desvantagem é que a frequência de scFvs específicos a um dado antígeno é baixa, necessitando de um grande processo de seleção, além do fato de que a afinidade dos anticorpos selecionados é, frequentemente, apenas moderada, fazendo-se necessário a maturação da afinidade por mutagênese para aumentar a afinidade dos anticorpos ao alvo (Kontermann and Dubel, 2001; Amersdorfer et al., 2002).

A segunda estratégia é baseada na seleção de anticorpos a partir de bibliotecas imunes, que são geradas a partir de células B provenientes de animais imunizados ou humanos naturalmente infectados. Bibliotecas imunes são tipicamente menores (10^5 a 10^6 clones), mas contêm anticorpos com alta afinidade ao alvo em frequências muito superiores às encontradas nas bibliotecas nativas. A desvantagem dessa estratégia é o fato de que uma nova biblioteca deve ser construída para cada antígeno alvo a ser testado, envolvendo a imunização serial de animais ou diversas amostras de pacientes, além do esforço despendido, por si só, na construção da biblioteca de anticorpos.

6. VARIABILIDADE E REARRANJO DOS GENES DE ANTICORPOS EM GALINHA

A galinha (*Gallus gallus domesticus*) tem uma maneira própria de gerar diversidade nas cadeias leve e pesada de imunoglobulina, onde o locus da cadeia leve tem somente uma região variável funcional (VL1) que é expressa.

Durante o desenvolvimento da célula B, o gene *VL1* é diversificado por conversão gênica, usando vários pseudogenes como doadores de segmentos de DNA. Uma estratégia similar é usada para o repertório da cadeia pesada (Mansikka, A. et al., 1990).

Em todos os casos, o rearranjo gênico resulta em justaposição de segmentos de DNA, codificando os genes para as imunoglobulinas (Ratcliff & Jacobsen, 1994).

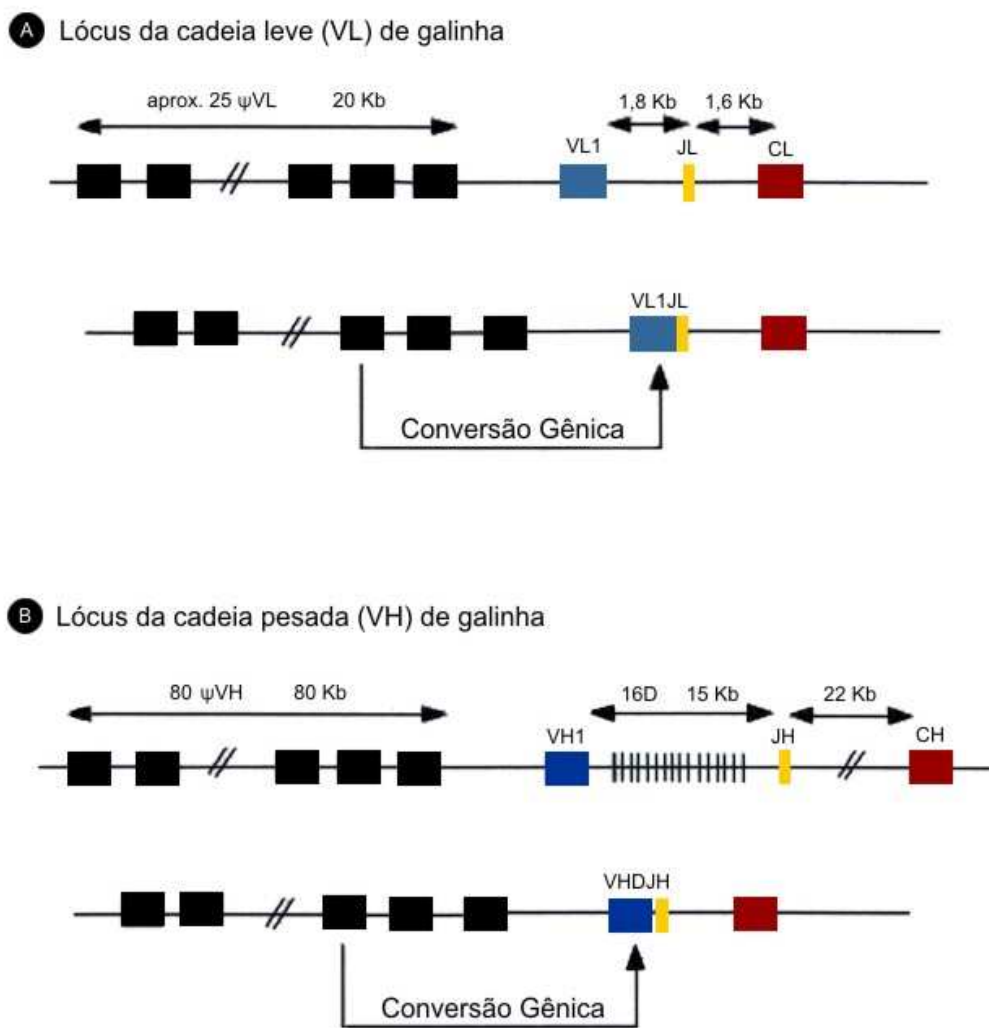


Figura 6: Organização dos loci de imunoglobulina de galinha. A - Lócus da cadeia leve mostrando cerca de 25 pseudogenes (quadrados pretos); VL (azul): único segmento funcional; JL (amarelo): um segmento de junção; CL (vermelho): segmento da cadeia constante. B - Lócus da cadeia pesada mostrando cerca de 80 pseudogenes (quadrados pretos); VH (azul): único segmento funcional; D: exclusivos da cadeia pesada; JH (amarelo); CH (vermelho): segmento da cadeia constante (Adaptado de Maranhão, 2001).

No locus da cadeia leve são encontrados cerca de 25 pseudogenes distribuídos em 20 Kb. Cerca de 1,8 Kb após o segmento VL1 encontra-se um único segmento JL e 1,6 Kb após encontra-se o domínio constante lambda C. Para a cadeia pesada encontram-se cerca de 80 pseudogenes distribuídos em aproximadamente 80 Kb antes do segmento funcional VH1. Encontram-se na região 3' após o segmento funcional, cerca de 16 segmentos D, distribuídos em aproximadamente 15 Kb e posteriormente aos mesmos, o único segmento JH do locus da cadeia pesada. O segmento constante (CH) localiza-se aproximadamente 22 Kb após o segmento JH (Reynaud *et al.*, 1989) (Figura 6).

A denominação pseudogene é devido a não funcionalidade, pois não codificam nenhuma proteína. São seqüências homólogas aos segmentos V, truncadas na porção 5' e/ou 3' ou apresentam alterações na fase de leitura (Reynaud, C. A. et al., 1987).

O mecanismo da conversão gênica não está completamente elucidado. O processo inclui duplicação de seqüências de um pseudogene doador e recolocação da seqüência homóloga no gene funcional receptor mantendo a seqüência original do pseudogene doador (Ratcliffe et al., 1994). Vale ressaltar que a conversão gênica ocorre também no baço e linfonodo (Arakawa, et al., 1996).

Em galinhas, como nos mamíferos, genes rearranjados e posteriormente convertidos sofrem também o processo de hipermutação somática. É comum a observação de mutações ao longo dos CDRs e *frameworks* inclusive nas regiões constantes (Arakawa, et al., 1996).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.; Lichtman, A.; Pober, J. Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders Company, 4 ed., 2000.

Amersdorfer, P.; Wong, C.; Smith, T.; Chen, S.; Deshpande, S.; Sheridan, R.; Marks, J.D. Genetic and immunological comparison of anti-botulinum type A antibodies from immune and non-immune human phage libraries. *Vaccine*; 20:1640-8, 2002.

Arakawa, H.; Furusawa, S.; Ekiro, S.; Yamagishi, H. Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal center. *Embo. J.*; 15(10): 2540-2546, 1996.

Azriel-Rosenfeld, R.; Valensi, M.; Benhar, I. A human synthetic combinatorial library of arrayable single-chain antibodies based on shuffling in vivo formed CDRs into general framework regions. *J. Mol. Biol.*; 335:177-92, 2004.

Azzazy Hassan, M. E.; Highsmith, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Bioch.*; 35(6):425-45, 2002.

Barbas, C. F.; Dennis, R. B.; Scott, J. K.; Silverman, G. J. Phage Display, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1 ed. NY, 2001.

Bird, R. E.; Hardman, K. D.; Jacobsen, J. W.; Johnson, S.; Kaufman, B. M.; Lee, S. M.; et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*; 242:426-32, 1988.

Botelho, P.S.M.; Macedo, N. Cotesia flavipes para o controle de Diatraea saccharalis, in: J.R.P. Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira, J.M.S. Bento (Eds.), *Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores*, 609 p., Editora Manole Ltda.; São Paulo, 2002.

Burton, D. R.; Barbas, C. F. 3rd.; Persson, M. A.; Koenig, S.; Chanock, R. M.; Lerner, R. A. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 88:10134-7, 1991.

Carmen, S.; Jermutus, L. Concepts in antibody phage display. *Brief. Funct. Genomic Proteomic.*; 1:189-203, 2002.

Carvalho, S. S. A.; Amorin, S. C. R.; Lima, I. S. Comportamento reprodutivo da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Crambidae). In: Congresso Brasileiro de Entomologia, Manaus, 2002. *Resumos: Sociedade Entomológica do Brasil*, Piracicaba; p. 18, 2002.

Clackso, T.; Hoogenboom, H. R.; Griffiths, A. D.; Winter, G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*; 352:624-8, 1991.

Contreras Durán, J. V. Efeito da radiação gama no comportamento da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae), *Dissertação de Mestrado em Entomologia*, ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 70 p. 1980.

Costa-Lima, A. M. Insetos do Brasil: Lepidópteros. Rio de Janeiro, *Escola Nacional de Agronomia*; v.1, p. 60-76, 1945.

Costa-Lima, A. M. Insetos hospedeiros e inimigos naturais. In: *Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil*, Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, pt. 2, t. 1, 622 p., 1968.

Cruz, I.; Viana, P. A.; Waquil, J. M. *Pragas. Sistemas de Produção*. Embrapa Milho e Sorgo, 2005.

Desplancq, D.; King, D. J.; Lawson, A. D. G.; Mountain, A. Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3. *Protein. Eng.*; 7:1027-33, 1994.

Ferreira, A.P.; Teixeira, H.C. Tópicos de imunologia básica. Juiz de Fora, 1 ed., 83 p., 2005.

Francisco, J.; Campbell, R.; Iverson, B.; Georgiou, G. Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 90:10444-8, 1993.

Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R. P. L.; Baptista, G. C.; Berto Filho, E.; Parra J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B.; Vendramim, J. D.; Marchini, L. C.; Lopes, J. R. S.; Omoto, C. *Entomologia Agrícola*, 3 ed., Piracicaba: FEALQ, 680p., 2002.

Goletz, S.; Christensen, P. A.; Kristensen, P.; Blohm, D.; Tomlinson, I.; Winter, G.; et al. Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J. Mol. Biol.*; 315:1087-97, 2002.

Hanes, J.; Pluckthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 94:4937-42, 1997.

He, M.; Taussig, M. J. Antibody–ribosome–mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic. Acids. Res.*; 25:5132-4, 1997.

Hof, D.; Hoeke, M. O.; Raats, J. M. Multiple-antigen immunization of chickens facilitates the generation of recombinant antibodies to autoantigens. *Clin. Exp. Immunol.*; 151:367-77, 2008.

Holliger, P.; Williams, R. L. Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: evidence for conformational lability. *Journal of Molecular Biology*; 288:649-657, 1999.

Hoogenboom, H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.*; 23:1105-16, 2005.

Huie, M. A.; Cheung, M. C.; Muench, M. O.; Becerril, B.; Kan, Y. W.; Marks, J. D. Antibodies to human fetal erythroid cells from a nonimmune phage antibody library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 98:2682-7, 2001.

Huston, J. S.; Levinson, D.; Mudgett-Hunter, M.; Tai, M. S.; Novotny, J.; Margolies, M. N.; et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 85:5879-83, 1988.

Jacobin, M. J.; Laroche-Traineau, J.; Little, M.; Keller, A.; Peter, K.; Welschof, M.; Nurden, A.; Clofent-Sanchez, G. Human IgG monoclonal anti-alpha(IIb)beta(3)-binding fragments derived from immunized donors using phage display. *J. Immunol.*; 168:2035-45, 2002.

Jeffers, L. A., Roe, R. M. The movement of proteins across the insect and tick digestive system. *Journal of Insect Physiology*; 54:319-332, 2008.

Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*; 256:495-7, 1975.

Krebs, B.; Rauchenberger, R.; Reiffert, S.; Rothe, C.; Tesar, M.; Thomassen, E.; et al. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J. Immunol. Methods*; 254:67-84, 2001.

Kristensen, P.; Winter, G. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold. Des.*; 3:321-8, 1998.

Levitan, B. Stochastic modeling and optimization of phage display. *J. Mol. Biol.*; 277:893-916, 1998.

MacKenzie, R.; To, R. The role of valency in the selection of anti-carbohydrate single-chain Fvs from phage display libraries. *J. Immunol. Methods*; 220:39-49, 1998.

Mah, D. C.; Hu, W. G.; Pon, J. K.; Masri, S. A.; Fulton, R. E.; Monette, P.L.; Nagata, L. P. Recombinant anti-botulinum neurotoxin A single-chain variable fragment antibody generated using a phage display system. *Hybrid Hybridomics*; 22:277-83, 2003.

Mansikka, A.; Sandberg, M.; Lassila, O.; Toivanen, P. Rearrangement of immunoglobulin light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of fabricius. *Immunology*; 87:9416-9420, 1990.

Maranhão, A. Q. Utilização de bibliotecas apresentadas em fagos para seleção de anticorpos ligantes a ácidos nucléicos. *Tese de Doutorado, UnB*; Brasília - DF, 167p, 2001.

Marks, C.; Marks, J. D. Phage libraries-a new route to clinically useful antibodies. *N. Engl. J. Med.*; 335:730-3, 1996.

Maynard, J.; Georgiou, G. Antibody Engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*; 2: 339-76, 2000.

McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G.; Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*; 348(6301):552-554, 1990.

McLafferty, M. A.; Kent, R. B.; Ladner, R. C.; Markland, W. M13 bacteriophage displaying disulfide-constrained microproteins. *Gene*;128:29-36, 1993.

Mechaly, A.; Zahavy, E.; Fisher, M. Development and implementation of a single-chain Fv antibody for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*; 74:818-22, 2008.

Mendonça, A. F. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p.3-48. *Insetos & Cia*, 239 p., Maceió, 1996.

Merk, H.; Stiege, W.; Tsumoto, K.; Kumagai, I.; Erdmann, V. A. Cell-free expression of two single-chain monoclonal antibodies against lysozyme: effect of domain arrangement on the expression. *J. Biochem.*; 125:328-33, 1999.

Meulemans, E. V.; Slobbe, R.; Wasterval, P.; Ramaekers, F. C. S.; van Eys, G. J. J. M. Selection of phagedisplayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody. *J. Mol. Biol.*; 244:353-60, 1994.

Nogge, G., Giannetti, M. Midgut absorption of undigested albumin and other proteins by tsetse, *Glossina m. morsitans* (Diptera: Glossinidae). *Journal of Medical Entomology*; 16, 263, 1979.

Padlan, E. A. Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology*, v.31, p.169-217. 1994.

Parmley, S.; Smith, G. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*; 73:305-18, 1988.

Paul, W. E. Fundamental Immunology. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 5 ed., 2003.

Paus, E.; Almåsbak, H.; Børmer, O. P.; Warren, D.J. A single-chain-Fv-based immunofluorometric assay specific for the CEA variant NCA-2. *J. Immunol. Methods*; 283:125-39, 2003.

Pavoni, E.; Monteriù, G.; Cianfriglia, M.; Minenkova, O. Newdisplay vector reduces biological bias for expression of antibodies in *E. coli*. *Gene*; 391:120-9, 2007.

Peairs, F. B.; Saunders, J. L. Single-larva infestations with *Diatraea saccharalis* (F.) in two tropical maize populations in Mexico. *Turrialba*, 4:243-246, 1979.

Pelat, T.; Hust, M.; Laffly, E.; Condemine, F.; Bottex, C.; Vidal, D.; Lefranc, M. P.; Dübel, S.; Thullier, P. High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis* by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 51:2758-64, 2007.

Philibert, P.; Stoessel, A.; Wang, W.; Sibler, A.; Bec, N.; Larroque, C.; et al. A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol.*; 7:81, 2007.

Phizicky, E. M.; Fields, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.*; 59:94-123, 1995.

Pincus, S. H.; Shigeoka, A. O.; Moe, A. A.; Ewing, L. P.; Hill, H. R. Protective efficacy of IgM monoclonal antibodies in experimental group B streptococcal infection is a function of antibody avidity. *J. Immunol.*; 140:2779-85, 1988.

Ratcliffe, M. J. H. & Jacobsen, K. A. Rearrangement of immunoglobulin genes in chicken B cell development. *Seminars in Immunology*; 175-184, 1994.

Ravn, P.; Danielczyk A.; Bak Jensen, K.; Kristensen, P.; Astrup Christensen, P.; Larsen, M.; et al. Multivalent scFv display of phagemid repertoires for the selection of carbohydratespecific antibodies and its application to the Thomsen-Friedenreich antigen. *J. Mol. Biol.*; 343:985-96, 2004.

Reynaud, C. A.; Anquez, V.; Grimal, H.; Weil, J. C. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell*; 48: 379-388, 1987.

Reynaud, C. A.; Dahan, A.; Anquez, V.; Weil, J. C. Somatic hiperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell*; 5:171-183, 1989.

Russel, M.; Model, P. Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it. *J. Virol.*; 63:3284-95, 1989.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.

Santa Cruz, J. M. S.; Moss, C. S.; Reynaud, G. G.; Montalvo, C. G. Cria ertifical de *Diatraea saccharalis* Fab. (Lepidoptera: Pyralidae) y su aplicacion en la evaluacion de resistencia en maiz. *Agrociência*, Chapingo, 10:3-13, 1973.

Schofield, D.; Pope, A.; Clementel, V.; Buckell, J.; Chapple, S.; Clarke, K.; et al. Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. *Genome Biol.*; 8:254, 2007.

Scott, J.; Smith, G. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*; 249:386-90, 1990.

Shaw, I.; O'Reilly, A.; Charleton, M.; Kane, M. Development of a high-affinity anti-domoic acid sheep scFv and its use in detection of the toxin in shellfish. *Anal. Chem.*; 80:3205-12, 2008.

Sheets, M. D.; Amersdorfer, P.; Finnern, R.; Sargent, P.; Lindqvist, E.; Schier, R.; et al. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: The production of highaffinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 95:6157-62, 1998.

Sidhu, S. S.; Koide, S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. *Current Opinion in Structural Biology*; 17:481-487, 2007.

Smith G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*; 228:1315-7, 1985.

Sidhu, S. S. Engineering M13 for phage display. *Biomol. Eng.*; v.18, n.2, p.57-63, 2001.

Sidhu, S. S., Koide, S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. *Current Opinion in Structural Biology*; 17:481-487, 2007.

Tout, N. L.; Yau, K. Y.; Trevors, J. T.; Lee, H.; Hall, J. C. Synthesis of ligand-specific phage-display scFv against the herbicide picloram by direct cloning from hyperimmunized mouse. *J. Agric. Food Chem.*; 49:3628-37, 2001.

Weisser, N. E.; Hall, J. C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances*; 27:502-520, 2009.

Winter, G.; Griffiths, A. D.; Hawkins, R. E.; Hoogenboom, H. R. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.*; 12:433-55, 1994.

Wigglesworth, V. B. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences*; 131:313-339, 1943.

Vaughan, T. J.; Williams, A. J.; Pritchard, K.; Osbourn, J. K.; Pope, A. R.; Earnshaw, J. C.; et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol.*; 14:309-14, 1996.

Vendramim, J. D.; Silva, F. C. D.; César, M. A. A.; Camargo, A. P. D. Intensity of damage - a new index for evaluation of the borer-rot complex on sugarcane cultivars. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v. 20, p. 319-332, 1991.

CAPÍTULO ÚNICO

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
APRESENTADOS EM FAGOS PARA SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
scFv LIGANTE A PROTEÍNAS INTESTINAIS DE *DIATRAEA SACCHARALIS***

RESUMO

A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), destaca-se como a praga que mais causa danos ao cultivo da cana-de-açúcar no Brasil e outras localidades do continente americano, sendo responsável pela diminuição dos rendimentos agroindustriais associados à cultura. Devido aos extensos danos causados pela praga na cultura da cana-de-açúcar e ao seu difícil controle pelos inseticidas convencionais, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias de controle desse inseto visando-se a diminuição do uso de agentes químicos prejudiciais ao ser humano e ao meio ambiente. Com o intuito de gerar novas moléculas com atividade bioinseticida contra a broca-da-cana, o presente trabalho teve por objetivo a construção de uma biblioteca imune de fragmentos de anticorpos scFv por meio da tecnologia de *Phage Display* para seleção e caracterização de moléculas ligantes às proteínas intestinais da larva de *D. saccharalis*. A tecnologia utilizada na construção da biblioteca imune de fragmentos de anticorpos scFv contra as proteínas intestinais de *Diatraea saccharalis* mostrou-se eficiente, permitindo a seleção de um fragmento de anticorpo scFv imunorreativo ao epitélio intestinal do inseto e com potencial atividade bioinseticida.

Palavras-chave: scFv, *Phage Display*, *Diatraea saccharalis*.

ABSTRACT

The sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), is the most important insect pest of sugarcane grown in Brazil and others localities in the Americas, causing stalk damage to sugarcane plants which results in loss of efficiency in both sugar and alcohol production. The extensive damage caused by this pest in the sugarcane cultivation and its difficult control by conventional insecticides justify the search for new strategies that can help to reduce the use of harmful chemicals to humans and the environment. In order to generate new molecules with insecticidal activity against the sugarcane borer, the present work aimed to build a scFv antibody fragment library through *Phage Display* technology for selection and characterization of molecules with binding properties against *D. saccharalis* larval midgut proteins. The methodology used was efficient, allowing the selection of a scFv with immunoreactivity for the insect intestinal epithelium and with potential insecticidal activity.

Key-words: scFv, *Phage Display*, *Diatraea saccharalis*.

1. INTRODUÇÃO

A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) é a praga mais importante no cultivo da cana-de-açúcar, ocorrendo também na cultura do milho, sorgo, aveia, arroz, entre outras gramíneas. Os danos causados pela broca incluem as doenças conhecidas como “podridão vermelha” e “coração morto” da cana-de-açúcar, além dos danos indiretos causados pela abertura de galerias que levam à infestação por fungos, resultando na inversão da sacarose e diminuição da produtividade industrial (Vendramim et al., 1989; Carvalho et al., 2002; Santa Cruz et al., 1973).

O controle da broca-da-cana é dificultado pelo hábito críptico do inseto, que abre galerias no interior do colmo da planta, tornando-se inacessível aos inseticidas convencionais. Embora o controle biológico do inseto tenha sido eficientemente implantado pelo uso da vespa parasitóide *Cotesia flavipes*, danos residuais justificam a busca por novas formas de controle, incluindo o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas resistentes ao ataque da broca (Vendramim et al., 1991; Mendonça, 1996; Botelho & Macedo, 2002).

O desenvolvimento de moléculas com atividade bioinseticida que levem à diminuição do uso de agentes químicos no controle de insetos é um dos principais esforços científicos na área. Uma das tecnologias que tem contribuído com esse objetivo é a técnica de *Phage Display* (Ph.D.), que tem sido amplamente utilizada na busca de peptídeos e proteínas com atividades biológicas diversas, incluindo atividade biopesticida.

A tecnologia *Phage Display* de apresentação de polipeptídeos na superfície de bacteriófagos filamentosos é a mais antiga e mais utilizada técnica de apresentação de moléculas e é utilizada para apresentar, enriquecer e amadurecer a afinidade de um vasto número de proteínas e peptídeos a partir de uma grande biblioteca (Smith, 1985). Diversas metodologias de apresentação de moléculas na superfície de bacteriófagos têm sido descritas, sendo a apresentação de bibliotecas de anticorpos uma das mais utilizadas (Azriel-Rosenfeld et al., 2004; Krebs et al., 2001; Vaughan et al., 1996). A descoberta de que sítios funcionais de anticorpos, como os scFvs, podem ser apresentados na superfície de bacteriófagos permitiu a seleção de anticorpos

contra antígenos de interesse, sem a necessidade da tecnologia do hibridoma (Kohler and Milstein, 1975).

Embora não existam relatos do uso de fragmentos de anticorpos scFv no controle de insetos, uma série de peptídeos e proteínas têm sido utilizadas na produção de biopesticidas, sendo tais compostos derivados de diversas fontes (Gershburg et al., 1998; Beard et al., 2001; Brunelle et al., 2005; Altstein, 2001, 2004). O uso de fragmentos de anticorpos scFv justifica-se por suas características moleculares, que teoricamente permitem sua passagem pela membrana peritrófica presente no epitélio intestinal do inseto (Martin e Barbehenn, 1997; Barbehenn, 2001) e por sua capacidade de bloquear uma determinada atividade biológica, caso a ligação ocorra em um sítio essencial da molécula alvo.

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma biblioteca de anticorpos contra as proteínas intestinais de *Diatraea saccharalis* e a seleção de fragmentos scFv com potencial atividade inseticida, o que pode levar ao desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas resistentes ao ataque da broca.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho consistiu na construção de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos scFv expressa em fagos para seleção e caracterização de anticorpos reativos a proteínas intestinais de *Diatraea saccharalis*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Construção de uma biblioteca de anticorpos apresentadas em fagos (*Phage Display*) a partir do repertório imune de galinhas imunizadas com proteínas intestinais de *Diatraea saccharalis*.
- II. Avaliação da qualidade da biblioteca pela análise da diversidade de seqüências dos fragmentos de anticorpos clonados.
- III. Seleção de moléculas scFv reativas às proteínas intestinais de *D. saccharalis*.
- IV. Caracterização dos fragmentos de anticorpos scFv selecionados.
- V. Análise da reatividade de um scFv às proteínas intestinais e ao tecido intestinal de larvas de *D. saccharalis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As soluções utilizadas estão descritas no Anexo I.

3.1. LINHAGENS BACTERIANAS

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas durante a realização deste trabalho foram:

- **XL1-Blue** (Stratagene): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' ProAB lacI^q lacIqZ M15Tn10(Tet^R)]*. (SAMBROOK et al., 1989).

Essa linhagem foi utilizada na produção de partículas virais, transformação e amplificação de fagomídeos.

- **Top 10** (Invitrogen): F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 galU galK Δ(ara-leu)7697 rpsL (Str^R) endA1 nupG*.

Essa linhagem foi empregada na expressão de scFv em solução.

3.2. VETOR FAGOMÍDEO

pComb3XSS f(-): 4,5 kb, promotores *plac*, *ori* ColE1, *ori* f1, *Amp^R*. Possui a sequência codificadora para parte da proteína III de bacteriófagos filamentosos (aminoácidos 230 a 406). Apresenta ainda um códon de parada âmbar (TAG), não reconhecido eficientemente por linhagens supressoras (Sup E49) como a XL1-Blue ou ER2537, mas reconhecido por cepas de bactérias não supressoras como a TOP 10. Isto possibilita tanto a expressão de proteínas fusionadas à proteína PIII do fago, quanto proteínas de fusão livre da proteína III. Possui uma região com seis histidinas (H6), logo após o sítio de clonagem do gene, para purificação em coluna de níquel e uma região

codificadora de resíduos que constituem o epítipo de uma hemaglutinina (HA) que possibilita a detecção do scFv com utilização de um anticorpo anti-HA (Scott & Barbas, 2001).

pComb3X

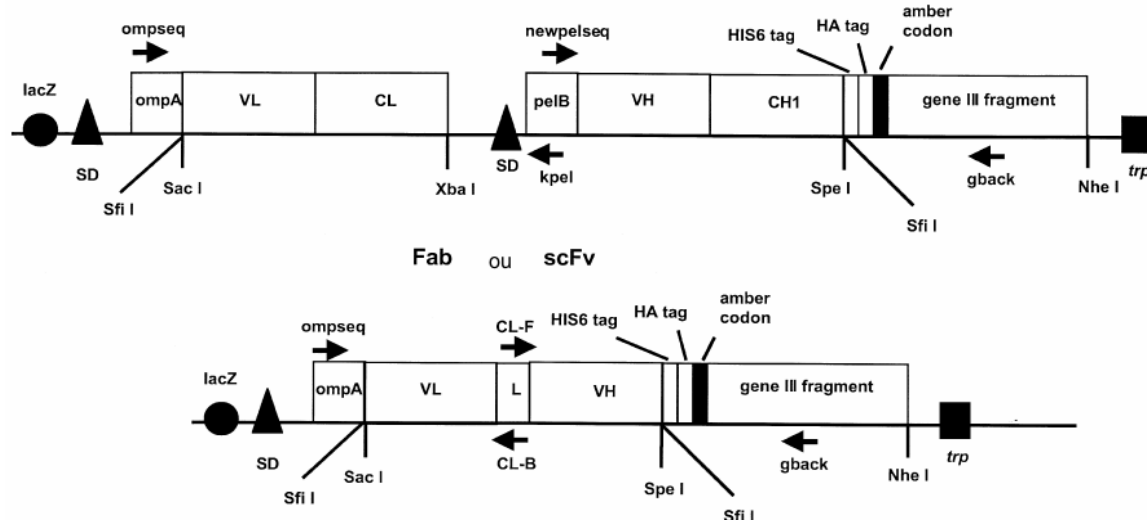


Figura 7: Vetor fagomídeo pComb3X usado na construção de bibliotecas combinatoriais de anticorpos. O vetor foi desenhado para expressar fragmentos de anticorpos na superfície de fagos filamentosos ou como proteínas solúveis. Os fragmentos de anticorpos (scFv ou Fab) são fusionados ao domínio C-terminal da proteína III (*coat protein III*) e são expostos na superfície das partículas de fagos. O códon âmbar foi inserido entre o sítio de restrição da enzima SfiI (posição 39) e a porção terminal (posição 59) do gene III. Isto permite a expressão da proteína em solução por bactérias não supressoras sem a excisão do gene III. A cauda de histidina (HIS) (posição 63) foi inserida na porção C-terminal do fragmento Fd para purificação universal de proteínas. O decapeptídeo hemaglutinina (HA) foi inserido na posição 39 terminal da cauda de histidina para detecção usando-se anticorpos anti-HA. (Adaptado de Andris-Widhopf et al., 2000).

3.3. BACTRIÓFAGO AUXILIAR

VCSM13: Derivado do bacteriófago M13 com o gene II mutado; origem de duplicação plasmidial derivada do p15 e gene de resistência à kanamicina (Stratagene).

MÉTODOS

3.4. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS

3.4.1. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS INTESTINAIS DE *DIATRAEA SACCHARALIS*

As larvas de *Diatraea saccharalis* utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. J. R. P. Parra do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz” (Piracicaba - SP, Brasil).

As larvas de *Diatraea saccharalis* foram criadas em dieta artificial à base de gérmen de trigo, farelo de soja, sacarose, sais de Wesson, Nipargin, ácido ascórbico, cloreto de colina, formol 37%, tetraciclina, solução vitamínica, ágar e água destilada (Parra & Mihsfeldt, 1992). Foram utilizados 60 insetos no penúltimo estágio larval (5º instar) que apresentavam o tubo digestivo repleto de alimento.

3.4.2. PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E DE MEMBRANA DO EPITÉLIO DO VENTRÍCULO

As larvas de *Diatraea saccharalis* foram imobilizadas em gelo e dissecadas em solução de NaCl 125 mM. O epitélio do ventrículo das larvas, após remoção da membrana peritrófica com o conteúdo, foi extensivamente lavado com salina e então homogeneizado com água bidestilada em Potter-Elvehjem (10 movimentos por pistilo). O homogeneizado foi então congelado e descongelado três vezes, sendo que, no último congelamento, o homogeneizado permaneceu congelado por 24 horas. Após tal procedimento, o homogeneizado foi centrifugado a 20.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, enquanto o precipitado foi novamente homogeneizado em água bidestilada.

As soluções contendo o sobrenadante e o precipitado foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e armazenadas a -20°C.

3.4.3. ANÁLISE DE PROTEÍNAS EM GEL SDS-PAGE

As proteínas intestinais purificadas de *Diatraea saccharalis* foram separadas em gel SDS-PAGE para análise da qualidade e da eficiência do procedimento de extração. O gel SDS-PAGE 16% e a separação eletroforética foram realizados conforme descrito por Sambrook et al., 1989.

3.4.4. IMUNIZAÇÃO DE AVES *GALLUS GALLUS DOMESTICUS*

Uma galinha e um galo foram utilizados na imunização, ambos da raça Cobb Vantress, com idade de 12 semanas e que foram gentilmente doados pela Granja Planalto (Uberlândia - MG, Brasil). As aves foram mantidas por dois meses em gaiolas, sob temperatura amena e alimentadas com ração de crescimento e água, ambas repostas diariamente.

O protocolo de imunização utilizado foi o mesmo descrito por Barbas et al. (2001). Antes da primeira imunização, o sangue das aves foi coletado para extração do soro pré-imune. Na primeira etapa de imunização, a galinha foi imunizada pela via intramuscular com 200 µg (138 µl da amostra a 1,45 µg/µl) de proteínas intestinais de *Diatraea saccharalis* diluídas em 300 µl de Adjuvante Freund Completo (Sigma-Aldrich), sendo o galo controle imunizado com 138 µl de água ultra-pura diluídos em 300 µl do mesmo adjuvante. Duas semanas após a primeira imunização, as aves foram novamente imunizadas seguindo-se o mesmo protocolo descrito para a primeira imunização, porém utilizando-se o Adjuvante Freund Incompleto (Sigma-Aldrich), sendo que, uma semana após cada imunização, o sangue das aves foi coletado para extração do soro pós-imune. O protocolo descrito para a segunda imunização foi então repetido mais duas vezes, totalizando quatro imunizações durante os dois meses de duração do experimento.

Uma semana após a quarta imunização, 20 ml de sangue da galinha foi coletado para extração do soro positivo e purificação de anticorpos IgY, sendo o sangue do galo coletado para extração do soro utilizado como controle negativo nos ensaios imunoenzimáticos. A galinha foi sacrificada para extração do baço, que foi então dividido em três partes e imediatamente imerso em nitrogênio líquido, transportado para o laboratório e estocado em ultra-freezer a -80°C.

3.4.5. TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS IgY POR ELISA

A titulação dos anticorpos nos soros coletados 7 dias após a quarta imunização foi determinado pelo ensaio imunoenzimático ELISA. Poços de uma placa de microtitulação de alta afinidade (Nunc) foram sensibilizadas com 2,5 µg de proteínas intestinais de *Diatraea saccharalis* diluídas em 50 µL de tampão PBS (pH 7,4), que foram então incubados por 14 horas a 4°C.

A solução de sensibilização foi substituída por 100 µL/poço de solução de bloqueio composta por PBS e BSA 3%, sendo a placa incubada a 37°C por 2 horas.

Após o bloqueio, cada poço foi lavado 3 vezes com 350 µL de PBST 0,05 (PBS e Tween 20 a 0,05%).

Após a retirada da solução de lavagem, 16 poços (8 duplicatas) foram sensibilizados com o soro da galinha imunizada com as proteínas intestinais de *D. saccharalis* e 16 poços (8 duplicatas) foram sensibilizados com o soro do galo não imunizado (controle negativo), ambos diluídos em 50 µL de PBS e BSA 3% nas proporções de 1:100 a 1:218.700.

A placa foi então lavada 3 vezes com PBST 0,05% e então incubada a 37°C por 1 hora com 50 µL/poço de anticorpos Anti-Chicken IgY marcado com Peroxidase (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS, BSA 3% e Tween 0,01% na proporção de 1:5000.

Após a retirada dos anticorpos secundários, a placa foi revelada utilizando-se SigmaFastTM OPD (Sigma-Aldrich). A reação foi parada utilizando-se 20 µL/poço de ácido sulfúrico 4M e a placa lida a 492 nm em leitor de microplaca (ThermoPlate).

3.4.6. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DO BAÇO DA GALINHA IMUNIZADA

Para extrair o RNA total, 1,1 g do baço da galinha imunizada foi imerso em nitrogênio líquido e macerado em cadinho, sendo imediatamente transferido para um tubo Falcon contendo 11 mL de TRIzol (Invitrogen).

A solução foi armazenada por 5 minutos, homogeneizada em vortex e centrifugada a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi transferido para 11 microtubos contendo 1 mL da solução, seguido pela adição de 200 µL de clorofórmio.

As soluções foram agitadas por 15 segundos, armazenadas por 3 minutos e centrifugadas a 12.000 x *g* por 15 minutos a 20°C.

A fase aquosa (superior) de cada microtubo foi então transferida para microtubos novos, seguida pela adição de 500 µL de isopropanol e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente.

Os microtubos foram centrifugados a 12.000 x *g* por 10 minutos a 20°C, seguido pela remoção dos sobrenadantes, adição de 1 mL de etanol 75% e centrifugação a 7.500 x *g* por 5 minutos a 20°C.

Os sobrenadantes foram removidos, os *pellets* de RNA foram secados por 5 minutos a temperatura ambiente e diluídos em 50 µL de água DEPC.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e armazenadas em ultra-freezer a -80°C.

3.4.7. PURIFICAÇÃO DO RNAm A PARTIR DO RNA TOTAL

A purificação do RNAm foi realizada utilizando-se 1 mg de RNA total por meio do Kit FastTrack[®] 2.0 (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. O produto purificado foi então quantificado em espectrofotômetro e armazenado em ultra-freezer a -80°C.

3.4.8. SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA A PARTIR DO RNA TOTAL E RNAm PURIFICADO

Quatro reações de RT-PCR foram realizadas utilizando diferentes combinações de *primers* e amostras de RNA, conforme o esquema abaixo:

	Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 4
RNA	RNA Total	RNA Total	RNAm	RNAm
Primer	Hexâmeros	Oligo-dT ₁₂₋₁₈	Hexâmeros	Oligo-dT ₁₂₋₁₈

Para cada reação, com volume final de 20 μL , foi utilizado 1 μg (5 μL) de RNA total ou RNAm acrescido dos reagentes listados abaixo:

Tampão RT 5x	4,0 μL
dNTPs	0,4 μL
DTT 1M	0,5 μL
RNAse Out (40 U/ μL)	0,25 μL
Primer	1,0 μL
Enzima M-MLV (200 U/ μL)	0,2 μL
Água tratada com DEPC	8,65 μL

O primer “Hexâmeros Randômicos” (Invitrogen) foi utilizado na concentração de 126 pmoles/ μL , enquanto o primer Oligo-dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) foi utilizado na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

As reações foram conduzidas a 37°C por 1 hora em termociclador, seguidas por desnaturação a 70°C por 5 minutos.

3.4.9. AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE CADEIA PESADA (VH) E CADEIA LEVE (VL)

Para amplificar os fragmentos de cadeia pesada (VH) foram realizadas 20 reações de amplificação utilizando-se os primers CSCVHo-F e CSCG-B.

Para amplificar os fragmentos de cadeia leve (VL) foram realizadas 15 reações de amplificação utilizando os primers CSC-VK e CKJo-B. Cada reação foi produzida em um volume final de 100 μ L e continha os seguintes componentes:

Primer 5' (10 pmoles/ μ L)	6,0 μ L
Primer 3' (10 pmoles/ μ L)	6,0 μ L
PCR Buffer 10X	10,0 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	5,0 μ L
dNTPs (2 mM)	10,0 μ L
Taq DNA Polimerase (0,5 U/ μ L)	0,5 μ L
cDNA	10,0 μ L
Água Bidestilada q.s.p.	100,0 μ L

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições:

- 1) 94°C por 5 minutos;
- 2) 37 ciclos de: 94°C por 1 minuto;
56°C por 1 minuto;
72°C por 1,5 minuto.
- 3) 72°C por 10 minutos.

As reações foram aplicadas em gel de agarose 1% para análise e separação dos fragmentos amplificados. As bandas de VH e VL de aproximadamente 400 pb e 350 pb, respectivamente, foram purificadas do gel utilizando-se o Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) seguindo-se as recomendações do fabricante.

Após a purificação, os fragmentos VH e VL foram quantificados em espectrofotômetro e utilizados no segundo ciclo de PCR para amplificação dos fragmentos scFv.

3.4.10. AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS scFv

Para a amplificação dos fragmentos de anticorpos scFv, os produtos da amplificação das cadeias VH e VL foram reunidos em quantidades iguais para gerar um produto final de sobreposição (*overlap*). Os primers utilizados no primeiro ciclo de PCR criaram seqüências idênticas entre os fragmentos VH e VL amplificados, que serviram para a sobreposição das mesmas e amplificação de um produto de extensão final correspondente ao scFv completo.

Foram realizadas 20 reações de *overlap* utilizando-se os primers CSC-B e CSC-F, ambos a 10 pmoles/ μ L. Cada reação foi produzida em um volume final de 100 μ L e continha os seguintes componentes:

Fragmentos amplificados (VH)	200,0 ng
Fragmentos amplificados (VL)	200,0 ng
Primer CSC-B (10 pmoles/ μ L)	6,0 μ L
Primer CSC-F (10 pmoles/ μ L)	6,0 μ L
PCR Buffer 10X	10,0 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	5,0 μ L
dNTPs (2 mM)	10,0 μ L
Taq DNA Polimerase (0,5 U/ μ L)	0,5 μ L
Água Bidestilada q.s.p.	100,0 μ L

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições:

- 1) 94°C por 5 minutos;
- 2) 27 ciclos de: 94°C por 1 minuto;
56°C por 1 minuto;
72°C por 1,5 minuto.
- 3) 72°C por 10 minutos.

As reações foram aplicadas em gel de agarose 1% para análise e separação dos fragmentos amplificados. As bandas de aproximadamente 800 pb correspondentes aos fragmentos scFv amplificados foram purificadas do gel utilizando-se o Kit QIAquickTM Gel Extraction (Qiagen) seguindo-se as recomendações do fabricante. Após a purificação, os fragmentos scFv foram quantificados em espectrofotômetro.

3.4.11. RESTRIÇÃO DOS FRAGMENTOS scFv E DO VETOR pComb3XSS COM A ENZIMA *Sfi*I

Os fragmentos scFv bem como o vetor pComb3XSS foram digeridos com a enzima *Sfi*I (Fermentas) de acordo com as reações descritas abaixo:

Digestão do scFv:

scFv purificado	10,0 µg
Buffer <i>Sfi</i> I 10x	20,0 µL
Enzima <i>Sfi</i> I (10U/µL)	36,0 µL
Água Bidestilada q.s.p.	200,0 µL

Digestão do pComb3XSS:

pComb3XSS	20,0 µg
Buffer <i>Sfi</i> I 10x	20,0 µL
Enzima <i>Sfi</i> I (10U/µL)	20,0 µL
Água Bidestilada q.s.p.	200,0 µL

Ambas as digestões foram conduzidas a 50°C por 16 horas. Após a digestão, os produtos foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio 4% e purificados da reação de digestão utilizando-se o Kit GenElute™ PCR Clean-up (Sigma-Aldrich), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram quantificados em espectrofotômetro e utilizados na reação de ligação.

3.4.12. LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS scFv COM O VETOR pComb3XSS

Os fragmentos de anticorpos scFv e o vetor pComb3XSS, ambos digeridos pela enzima *Sfi*I, foram utilizados na reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Promega) nas proporções descritas abaixo:

pComb3XSS digerido	1400 ng
scFv digerido	700 ng

T4 DNA Ligase (3U/ μ L)	3,3 μ L
Buffer Ligase 10x	20 μ L
Água Bidestillada q.s.p.	200 μ L

Para determinar-se a eficiência da reação de ligação, foi realizada uma reação de auto-ligação do vetor pComb3XSS digerido, de acordo com as proporções descritas abaixo:

pComb3XSS digerido	140 ng
T4 DNA Ligase (3U/ μ L)	0,33 μ L
Buffer Ligase 10x	2 μ L
Água Bidestillada q.s.p.	20 μ L

Ambas as reações de ligação foram conduzidas em termociclador a 15°C por 18 horas.

Após a ligação, as reações foram purificadas utilizando-se o Kit GeneElute™ PCR Clean-up (Sigma-Aldrich), seguindo-se as recomendações do fabricante. As reações de ligação da biblioteca e de auto-ligação foram eluídas em um volume final de 25 μ L e 10 μ L, respectivamente.

3.5. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES

Uma colônia da bactéria XL1-Blue (Invitrogen) foi inoculada em 15 mL de meio SB contendo tetraciclina (20 mg/mL) e incubada a 37°C sob agitação de 270 rpm por 16 horas.

Cinco mililitros (5 mL) do pré-inóculo foram diluídos em 1 L de meio SB acrescido de 20 mL de glicose 20% (p/v) e 10 mL de MgCl₂ 1M e então distribuídos em quatro frascos Erlenmeyers de 1L. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação de 270 rpm até atingirem uma densidade ótica (O.D.) a 600 nm igual a 0,7.

Tendo atingido a densidade ótica desejada, as culturas foram resfriadas no gelo por 15 minutos. A partir de então, as células foram mantidas no gelo,

ou centrifugadas a 4°C. Os frascos utilizados nas etapas de centrifugação, as pipetas e o glicerol foram resfriados previamente.

As culturas foram centrifugadas a 3.000 x *g* por 20 minutos a 4°C e após o descarte dos sobrenadantes, os *pellets* de bactérias foram ressuspensos em 25 mL de glicerol 10% (v/v) gelado. O conteúdo das garrafas foi agrupado de dois a dois e o volume de glicerol ajustado para o volume final de 200 mL. Em seguida, as células foram centrifugadas nas mesmas condições e o procedimento repetido.

Após o descarte do sobrenadante, os sedimentos foram ressuspensos em 25 mL de glicerol 10% (v/v) gelado, transferidos para tubos de centrífuga de 50 mL e sedimentados a 2500 x *g* por 15 minutos a 4°C. Enquanto isso, tubos de microcentrífuga estéreis com tampa de rosca foram rotulados e mantidos no gelo.

Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas no volume residual de glicerol e distribuídas em alíquotas de 300 µL nos microtubos. Os tubos contendo as células foram transferidos para um banho de álcool e gelo seco para congelamento rápido das células.

As alíquotas foram estocadas a -80°C e utilizadas tanto para eletroporação quanto como pré-inóculo nos experimentos de seleção.

3.6. PREPARAÇÃO DO FAGO AUXILIAR VCSM13

3.6.1. OBTENÇÃO DE PLACAS DE LISE

Foram inoculados 2 µL de bactérias *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes em 2 mL de meio SB contendo tetraciclina a uma concentração final de 20 µg/mL e incubados a 37°C por 12 horas sob agitação de 270 rpm.

Diluições do fago *helper* VCSM13 da ordem de 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸ foram preparadas, sendo utilizado 1 µL de cada diluição na inoculação de 200 µL da cultura de bactérias. Após a incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, 50 µL da cultura foi plaqueada em meio LB agar. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Após esse período, foram observadas colônias de bactérias com retardo no crescimento devido à infecção pelo fago VCSM13.

3.6.2. AMPLIFICAÇÃO DO FAGO AUXILIAR

Em um tubo tipo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio SB acrescido de tetraciclina (20 µg/mL), foram inoculados 10 µL de bactérias XL1-Blue eletrocompetentes. A cultura foi mantida por 1 hora a 37°C e sob agitação de 270 rpm. Com o auxílio de um palito estéril, uma colônia de bactéria infectada com o fago auxiliar, obtida no procedimento descrito anteriormente, foi transferida para a cultura de XL1-Blue, seguido de incubação nas mesmas condições por 2 horas. Após esse período, a cultura infectada foi inoculada em 500 mL de meio SB contendo 20 µg/mL de tetraciclina e 70 µg/mL de kanamicina, seguida pela incubação por 14 horas a 37°C e 270 rpm.

A cultura foi então transferida para dez tubos de polipropileno e centrifugada a 2500 x *g* por 15 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e incubados a 70°C por 20 minutos, com o objetivo de eliminar células de bactérias remanescentes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente a 2500 x *g* por 15 minutos, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e estocados a 4°C.

3.6.3. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DA PREPARAÇÃO DE FAGOS AUXILIARES

Para determinar o título da preparação dos fagos auxiliares foram inoculados 2 mL de meio SB, contendo 10 µg/mL de tetraciclina, com 2 µL de células XL1-Blue competentes. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 270 rpm até atingir uma densidade ótica (O.D.) a 600 nm igual a 0,7.

Foram aliquotadas 50 µL da cultura de bactérias em microtubos, seguido pela adição de 1µL de fagos auxiliares previamente diluídos em meio SB nas proporções de 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . As alíquotas foram incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Após a incubação, cada alíquota de células infectadas foi transferida e misturada a 3 mL de meio LB top ágar a 45°C, e então espalhadas em placas contendo meio LB ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite e avaliadas no dia seguinte quanto à

formação das placas de lise, que foram contadas e o título de fagos determinado em unidades formadoras de placas (pfu/mL) de fagos.

3.7. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES COM A BIBLIOTECA DE scFv POR ELETROPORAÇÃO

Foram conduzidos dois procedimentos de transformação de bactérias XL1-Blue utilizando-se o produto purificado da reação de ligação da biblioteca bem como o produto da reação de auto-ligação.

As reações de ligação, bem como duas cubetas de eletroporação de 0,2 cm foram mantidos no gelo por 10 minutos antes do procedimento de transformação.

Alíquotas de 300 µL de bactérias XL1-Blue eletrocompetentes foram descongeladas, misturadas aos 25 µL da reação de ligação da biblioteca e transferidas para a cubeta previamente resfriada. O mesmo foi realizado para a reação de auto-ligação com volume de 10 µL.

Após 1 minuto de incubação, as células foram submetidas à eletroporação em eletroporador (Bio-Rad) sob as seguintes condições: voltagem de 2,5 KV, 25 µF de capacitância e 200 Ω de resistência, gerando pulsos de 4 a 5 milisegundos de duração.

Imediatamente após a eletroporação, adicionou-se 1 mL de meio SOC à cubeta, seguido pela lavagem da mesma com mais 2 mL de meio SOC e transferência da solução para um tubo tipo Falcon de 50 mL, que foi então incubado a 37°C e sob agitação de 270 rpm por 1 hora.

Após a incubação, foram adicionados 10 mL de meio SB contendo 3 µL de carbenicilina a 100 mg/mL e 15 µL de tetraciclina a 10 mg/mL. Os 15 mL de cultura foram incubados por 1 hora a 37°C e 270 rpm, seguidos pela adição de mais 4,5 µL de carbenicilina a 100 mg/mL e incubação sob as mesmas condições por mais 1 hora.

A cultura foi transferida para um frasco do tipo Erlenmeyer de 1 L e a ela acrescentados 2 mL de fago auxiliar VCSM13 (10^{12} a 10^{13} pfu/mL) e 183 mL de meio SB contendo 92,5 µL de carbenicilina a 100 mg/mL e 185 µL de

tetraciclina a 10 mg/mL. A cultura foi então incubada a 37°C sob agitação de 270 rpm por 2 horas.

À cultura foram adicionados 140 µL de Kanamicina a 100 mg/mL, sendo a mesma mantida sob agitação durante a noite (por aproximadamente 14 horas) nas mesmas condições descritas no passo anterior.

A cultura crescida durante a noite foi centrifugada a 3.000 x *g* por 15 minutos a 4°C e o sedimento de bactérias descartado. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e centrifugados novamente sob as mesmas condições.

Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos e aos mesmos foram adicionados 8 g, isto é, 4% de polietilenoglicol (PEG 8.000) e 6 g, ou seja, 3% (p/v) de NaCl. A fase sólida foi dissolvida incubando-se as soluções a 37°C sob agitação de 270 rpm por 10 minutos.

Os fagos foram coletados por centrifugação a 15.000 x *g* por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os tubos contendo os sedimentos de fagos foram deixados invertidos sobre papel toalha por 10 minutos para secagem.

Os sedimentos de fagos foram ressuspensos em 2 mL de TBS-BSA 1% (p/v) e transferidos para microtubos, que foram então centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Em seguida, os sobrenadantes contendo as partículas virais foram transferidos para novos microtubos contendo azida sódica a uma concentração final de 0,02% e estocados a 4°C.

3.8. PREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PLACAS DE MICROTITULAÇÃO

Após a transformação de bactérias XL1-Blue com a biblioteca original, 50 µL do produto foi plaqueado em meio LB agar acrescido de 100 µg/mL de carbenicilina e incubado por 16 horas a 37°C.

Clones isolados foram retirados das placas e inoculados em 1 mL de meio SB contendo 100 µg/mL de carbenicilina em placa do tipo *deep well*.

A placa foi selada com selo perfurado para permitir a aeração e então incubada por 20 horas a 37°C sob agitação de 300 rpm.

Após a incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm por 10 minutos a 20°C, os sobrenadantes foram retirados e os sedimentos de bactérias ressuspensos em 240 µL de GET. A placa foi selada e agitada por 2 minutos em vortex para ressuspensão das células. Em seguida, a placa foi recentrifugada a 3700 rpm por 10 minutos a 20°C.

Os sobrenadantes foram descartados e a placa invertida em papel toalha por 5 minutos. As bactérias foram ressuspensas novamente em 80 µL de GET.

Foram adicionados 2,5 µL de RNase A (10 mg/mL) a cada poço de uma placa de microtitulação de fundo redondo para onde foram transferidos 60 µL da suspensão de células.

A cada poço foram adicionados 60 µL de uma solução recém preparada de NaOH 0,2 N e SDS 1%. Em seguida a placa foi fortemente selada com um adesivo novo e cuidadosamente invertida por 20 vezes, incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada rapidamente.

Em seguida foram adicionados 60 µL de Acetato de Potássio 3M a cada poço, sendo a placa selada e agitada 20 vezes por inversão, seguida de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e rápida centrifugação.

O adesivo foi removido e a placa incubada em estufa a 90°C por 25 minutos, sendo posteriormente selada e incubada no gelo por 10 minutos. A placa foi então centrifugada por 10 minutos a 3700 rpm e 20°C.

Os sobrenadantes foram transferidos para uma placa com filtro (Millipore) fixada com adesivo no topo de uma microplaca de fundo em “V” e, em seguida, centrifugados por 6 minutos a 3700 rpm a 20°C.

Ao filtrado foram adicionados 100 µL de isopropanol, que foi levemente homogeneizado e centrifugado a 3700 rpm e 20°C por 45 minutos.

Após o descarte do sobrenadante, o DNA foi lavado com 200 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 3700 rpm e 20°C por 5 minutos.

Os sobrenadantes foram retirados e a placa, invertida em papel toalha, foi centrifugada até atingir a rotação de 900 rpm. A placa foi deixada à temperatura ambiente por 60 minutos para evaporação do etanol residual.

O DNA foi ressuspensão em 60 µL de água bidestilada, analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 4% e então estocado a -20°C.

3.9. REAMPLIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA

Foram inoculados 50 µL de células XL1-Blue em 50 mL de meio SB contendo 10 µg/mL de tetraciclina. A cultura foi incubada a 37°C e 270 rpm por 1,5 a 2,5 horas até atingir uma $OD_{600nm}=1,0$.

À cultura foram adicionados 45 µL de fagos, seguido pela incubação a temperatura ambiente por 15 minutos.

Em seguida foram adicionados 10 µL de carbenicilina a 100 mg/mL e 2% (v/v) de glicose 2M, seguido pela incubação a 37°C e 270 rpm por 1 hora. Após esse período, foram adicionados à cultura 15 µL de carbenicilina a 100 mg/mL, seguido pela incubação por 1 hora nas mesmas condições.

A cultura foi então centrifugada a 3000 x *g* por 10 minutos e ressuspensa em 200 mL de meio SB contendo 100 µL de carbenicilina a 100 mg/mL e 100 µL de tetraciclina a 20 mg/mL.

Em seguida foram adicionados 2 mL de fago auxiliar VCSM13, a cultura foi então incubada a 37°C e 270 rpm por 2 horas, seguida da adição de 140 µL de kanamicina a 100 mg/mL e incubação nas mesmas condições durante 14 horas.

A cultura foi centrifugada a 3000 x *g* por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado, transferido para novo frasco e recentrifugado nas mesmas condições. Dois mililitros (2 mL) do sobrenadante foram estocados para futuras análises de atividade ligante das partículas virais aí presentes.

Ao sobrenadante foram adicionados 8 g [4% (p/v)] de polietilenoglicol (PEG 8.000) e 6 g [3% (p/v)] de cloreto de sódio (NaCl). A fase sólida foi dissolvida por agitação a 37°C e 270 rpm por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi incubado no gelo por 30 minutos.

A solução foi centrifugada a 15000 x *g* e 4°C por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O frasco contendo os fagos sedimentados foi então invertido em papel toalha estéril por 10 minutos para secagem do sedimento.

O sedimento de fagos foi ressuspendido em 2 mL de TBS e BSA 1% (p/v), transferido para um microtubo e centrifugado a 14000 rpm a 4°C por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante contendo as partículas virais foi transferido para um microtubo novo, adicionado azida sódica a uma concentração final de 0,02% e estocado a 4°C.

3.10. SELEÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS FUSIONADAS A ANTICORPOS scFv LIGANTES ÀS PROTEÍNAS INTESTINAIS DE *DIATRAEA SACCHARALIS* IMOBILIZADAS EM PLACAS DE MICROTITULAÇÃO

Uma vez construída a biblioteca de anticorpos recombinantes expressa em fagos, procedeu-se a seleção contra as proteínas intestinais da larva de *Diatraea saccharalis*. Foram conduzidos dois ciclos de seleção, sendo cada um deles antecedido pela reamplificação da biblioteca de scFv, como descrito no item anterior.

Para a seleção das partículas virais apresentando fragmentos de anticorpos scFv com maior afinidade ao alvo, 5 µg de proteínas intestinais de *D. saccharalis* diluídas em 50 µL de tampão TBS foram imobilizadas em cada poço (*well*) de uma placa de microtitulação MaxiSorp (Nunc), sendo utilizados dois poços em cada ciclo de seleção. A placa foi selada e incubada a 37°C por 1,5 horas.

As soluções contendo as proteínas foram retiradas e substituídas por 350 µL de solução de bloqueio, composta por TBS e BSA 3% (p/v). A placa foi selada e incubada a 37°C por 1,5 horas.

As soluções de bloqueio foram retiradas e substituídas por 50 µL da biblioteca expressa em fagos recém amplificada. A placa foi selada e incubada a 37°C por 2 horas.

Enquanto isso, 5 µL de bactérias XL1-Blue eletrocompetentes foram inoculadas em 2 mL de meio SB contendo 1 µL de tetraciclina a 20 mg/mL. A cultura foi incubada a 37°C e 270 rpm por 1,5 a 2,5 horas até atingir a densidade ótica a 600 nm igual a 1,0.

Após incubação por 2 horas com a biblioteca, os fagos foram retirados e lavados com 150 µL de TBST 0,1% [TBS e 0,1% (v/v) de Tween 20]. A solução

de lavagem foi pipetada (*up and down*) cinco vezes, incubada por 5 minutos e retirada. O procedimento de lavagem foi então repetido 5 vezes no primeiro ciclo de seleção e 10 vezes no segundo.

Após a lavagem dos fagos não ligantes, os fagos ligantes foram incubados com 50 μ L de Glicina-HCl (pH 2,2) por 10 minutos e eluídos pela pipetagem (*up and down*) da solução por 10 vezes. Os 100 μ L de solução contendo os fagos eluídos foram neutralizados pela adição de 6 μ L de Tris 2M.

Os fagos eluídos de cada ciclo de seleção foram estocados a 4°C com azida sódica a uma concentração final de 0,02%.

3.11. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES COM A BIBLIOTECA DE scFv SELECIONADA

Após a seleção dos fragmentos de anticorpos scFv ligantes às proteínas intestinais de *D. saccharalis*, os mesmos foram expressos em sobrenadante de cultura por bactérias TOP10 (Invitrogen) em placas do tipo *deep well*.

Para que a expressão em bactérias TOP10 fosse realizada, os fagos oriundos do segundo ciclo de seleção foram amplificados em bactérias XL1-Blue, o DNA plasmidial das mesmas foi então extraído e utilizado para transformar bactérias TOP10 eletrocompetentes.

Para tanto, bactérias XL1-Blue foram amplificadas em 50 mL de meio SB contendo 10 μ g/mL de tetraciclina até atingir uma $OD_{600nm}=0,5$. À cultura foram adicionados 90 μ L de fagos eluídos no segundo ciclo de seleção, seguido por incubação a temperatura ambiente por 15 minutos e acréscimo de 2% (v/v) de glicose 2M e carbenicilina a uma concentração final de 50 μ g/mL. A cultura foi incubada por 14 horas a 37°C e 270 rpm.

O DNA plasmidial das bactérias amplificadas foi extraído utilizando-se o kit GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich), seguindo-se as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® e utilizado para transformar bactérias TOP10 eletrocompetentes. O protocolo utilizado para transformação foi o mesmo descrito para a transformação de bactérias XL1-Blue com a biblioteca de anticorpos, com poucas modificações. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio

LB ágar acrescido de 2% (v/v) de glicose 2M e carbenicilina a 50 µg/mL e incubadas a 37°C por 16 horas.

3.12. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM PLACAS DO TIPO *DEEP WELL*

Em duas placas do tipo *deep well* de 96 poços foi adicionado, a cada poço, 1 mL de meio SB contendo carbenicilina a 50 µg/mL e 2% (v/v) de glicose 2M, seguido pela inoculação de uma colônia de bactérias TOP10 transformadas com a biblioteca de scFv selecionada. Em um poço de cada placa, foram amplificadas bactérias TOP10 utilizadas como controle da expressão e que foram transformadas apenas com o plasmídeo pComb3XSS, sem a inserção de sequências codificadoras para fragmentos de anticorpos scFv. As placas foram seladas com filme plástico, sendo o mesmo perfurado para permitir a aeração, seguido pela incubação por 14 horas a 37°C e 300 rpm.

Dez microlitros (10 µL) do sobrenadante de cultura proveniente das placas amplificadas foram transferidos para outras duas placas contendo, em cada poço, 1 mL de meio SB acrescido de carbenicilina a 50 µg/mL e 2% (v/v) de glicose 2M. As placas foram seladas, perfuradas e incubadas por 4 horas a 37°C e 300 rpm.

Após incubação por 4 horas, as placas foram centrifugadas a 3.700 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Cada *pellet* de bactérias foi então ressuscitado em 1 mL de meio SB contendo 50 µg/mL de carbenicilina e IPTG a uma concentração final de 2,5 mM. As placas foram incubadas por 18 horas a 30°C e 300 rpm.

Após a incubação, as placas foram submetidas à centrifugação a 3.700 rpm durante 15 minutos a 4°C, o pellet foi estocado com glicerol 25% a -20°C e o sobrenadante contendo as proteínas heterólogas solúveis foi transferido para outra placa e armazenado a 4°C por até uma semana.

3.13. DOT BLOT PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS

Para analisar a expressão heteróloga de proteínas foi realizado um ensaio de *dot blot*. Para tanto, 5 µL do sobrenadante de cultura de cada clone expresso foram aplicados em uma membrana de nitrocelulose Hybond™ ECL de 0,2 µm (Amersham Biosciences) e deixados secar por 15 minutos a 37°C. Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução de PBS e BSA 3% por 1 hora a 37°C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 2 vezes com PBST 0,05% e então incubada em uma solução de PBS contendo o anticorpo anti-HA marcado com peroxidase (Roche Applied Science) em diluição de 1:2500 por 1,5 hora a 37°C. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com PBST 0,05% e revelada com SigmaFast™ 3,3'-Diaminobenzidina (Sigma-Aldrich). Para parar a reação, a membrana foi lavada com água e deixada secar a temperatura ambiente.

3.14. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA SELEÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS scFv COM MAIOR AFINIDADE ÀS PROTEÍNAS INTESTINAIS DE *D. SACCHARALIS*

Após a análise da expressão dos fragmentos de anticorpos em sobrenadante de cultura por *dot blot*, os clones com marcação positiva foram testados em um ensaio imunoenzimático ELISA para seleção daqueles com maior afinidade às proteínas intestinais de *D. saccharalis*.

Poços de duas placas de microtitulação de alta afinidade (Nunc) foram sensibilizadas com 1 µg de proteínas intestinais de *Diatraea saccharalis* diluídas 50 µL de tampão carbonato (bicarbonato de sódio 0,1M, pH 8,6), que foram então incubados por 14 horas a 4°C.

As placas foram lavadas 3 vezes com 350 µL/poço de PBST 0,05% (PBS e Tween 20 a 0,05%) e bloqueadas com 350 µL/poço de PBSM 5% (PBS e leite em pó a 5%), sendo então incubadas a 37°C por 1 hora.

Após o bloqueio, cada poço foi lavado 3 vezes com 350 μ L de PBST 0,05% e incubado por 2 horas a 25°C com 50 μ L de sobrenadante de cultura de bactérias contendo os fragmentos de anticorpos scFv expressos.

As placas foram lavadas 3 vezes com 350 μ L/poço de PBST 0,05% e incubadas por 1 hora a 37°C em uma solução de PBSM 5% contendo o anticorpo anti-HA marcado com peroxidase (Roche Applied Science) em diluição de 1:1000.

Após a incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com 350 μ L/poço de PBST 0,05% e reveladas com SigmaFast™ OPD (Sigma-Aldrich). A reação foi parada utilizando-se 20 μ L/poço de ácido sulfúrico 4M e as placas lidas a 492 nm em leitor de microplaca (ThermoPlate).

3.15. SEQUENCIAMENTO DE DNA E BIOINFORMÁTICA

O sequenciamento das cadeias leve e pesada da biblioteca de anticorpos e dos clones selecionados após o *biopanning* foi realizado utilizando o kit *DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* e o seqüenciador automático capilar MegaBace™ 1000 (GE Healthcare). O DNA dos clones selecionados foram extraídos de bactérias TOP10 utilizando-se o kit GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich), seguindo-se as recomendações do fabricante.

As amostras foram preparadas em placas de 96 poços contendo aproximadamente 500 ng de DNA plasmidial e 2,5 picomoles do oligonucleotídeo MMB4 (senso) ou 2,5 picomoles do oligonucleotídeo MMB5 (reverso) em um volume final de 10 μ L.

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições:

- 1) 95°C por 20 segundos;
- 2) 50°C por 15 segundos;
- 3) 60°C por 1 minuto.

As reações foram precipitadas conforme recomendações do fabricante do kit de sequenciamento e as placas foram injetadas imediatamente no seqüenciador automático.

3.16. PURIFICAÇÃO DE scFv POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM HPLC

A cromatografia líquida de alta afinidade para purificação de proteínas é fundamentada na capacidade de alguns aminoácidos doadores de elétrons tais como a histidina (his), o triptofano (trp) e a fenilalanina (phe) de se ligarem de maneira reversível a íons metálicos (como o níquel) imobilizados em uma matriz. O Kit HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences) utilizado neste passo foi desenvolvido para uma rápida e reproduzível purificação de proteínas recombinantes expressas com calda de histidina (HisTag). A purificação foi realizada seguindo-se as recomendações do fabricante.

O sobrenadante de cultura de 200 mL resultante da expressão dos fragmentos de anticorpos scFv por bactérias TOP10 (produzido como descrito no item 3.12, resguardada as devidas proporções), foi dividido em quatro alíquotas de 50 mL, centrifugado a 10.000 rpm por 60 minutos a 4°C e então filtrado em filtro de 0,45 µm (Millipore). Para preparar a amostra, 25 mL de tampão fosfato 8X e 1 mL de imidazol 2M foram adicionados a 174 mL do sobrenadante de cultura filtrado. O pH da solução foi então ajustado para 7,4.

A coluna HisTrap de 1 mL foi umidificada pela injeção de 5 mL de água destilada e conectada ao aparelho HPLC. Em seguida, a coluna foi equilibrada com 10 mL de tampão de ligação (Fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 20 mM, pH 7,4).

A amostra foi aplicada à coluna sob fluxo de 2 mL/min até o volume final de 50 mL por purificação.

Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão de ligação para lavagem das moléculas não ligantes.

Após a lavagem, os fragmentos de anticorpos foram eluídos com 5 mL de tampão de eluição (Fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 500 mM, pH 7,4), que foram coletados em alíquotas de 0,5 mL. As alíquotas foram armazenadas a 4°C e analisadas por *dot blot* para detecção dos anticorpos scFv, seguindo-se o mesmo protocolo descrito anteriormente.

As frações que apresentaram maiores concentrações de anticorpos foram reunidas e diluídas em água destilada em um volume final de 180 mL. A solução foi então filtrada sob pressão em membrana de ultrafiltração Amicon

(NMWL: 3.000) (Millipore) para dessanilização até atingir um volume final de 15 mL. A amostra resultante foi congelada a -80°C por 1 hora, liofilizada por 24 horas e ressuspensa em 1 mL de água bidestilada. A amostra foi então quantificada em espectrofotômetro NanoDrop® e estocada a -20°C.

3.17. ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING

Foram realizados dois ensaios de *western blot*, o primeiro para detectar a presença do scFv E01 na amostra produzida pela purificação cromatográfica e o segundo para avaliar a reatividade do scFv às proteínas intestinais.

Para o primeiro experimento, 50 µg do scFv purificado foram separadas eletroforéticamente em um gel SDS-PAGE 16% e, em seguida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™-ECL de 0,2 µm; Amersham-Biosciences) utilizando-se o sistema de transferência *Mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). A transferência foi realizada por 2 horas sob as condições elétricas de 300 V e 290 mA.

Após a confirmação da transferência pela visualização do marcador na membrana, a mesma foi incubada sob agitação com PBSM 5% (PBS e Leite Desnatado 5%) a temperatura ambiente por 1 hora para bloqueio de sítios inespecíficos. A membrana foi então lavada três vezes com tampão PBST 0,05%.

Após o bloqueio, a membrana foi incubada sob leve agitação, a 37°C e por 1 hora com PBSM 5% contendo o anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Roche) na proporção de 1:3000. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBST 0,05% e revelada com SigmaFast™ 3,3'-Diaminobenzidina (Sigma-Aldrich). Para parar a reação, a membrana foi lavada com água e deixada secar a temperatura ambiente.

Para o segundo experimento, 15 µg de proteínas intestinais de *D. saccharalis* foram separadas eletroforéticamente em um gel SDS-PAGE 16% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose como descrito anteriormente.

Após a transferência, a membrana foi corada por 15 minutos com Ponceau S e lavada com água destilada para permitir a visualização das bandas de proteínas.

Após a confirmação da transferência, a membrana foi incubada sob agitação com PBS-BSA 3% a 37°C e por 1 hora para bloqueio de sítios inespecíficos. A membrana foi então lavada três vezes com tampão PBST 0,05%.

Em seguida, a membrana foi incubada sob agitação por 2 horas a 37°C com 1,5 mL de PBS-BSA 3% contendo 350 µg do scFv E01 purificado. A membrana foi então lavada três vezes com tampão PBST 0,05%.

Após a lavagem dos fragmentos de anticorpos scFv não ligantes, a membrana foi incubada sob leve agitação, a 37°C e por 1 hora com PBS-BSA 3% contendo o anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Roche) na proporção de 1:3000. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBST 0,05% e revelada com SigmaFast™ 3,3'-Diaminobenzidina (Sigma-Aldrich). Para parar a reação, a membrana foi lavada com água e deixada secar a temperatura ambiente.

3.18. IMUNOHISTOQUÍMICA

Após seleção e purificação do scFv E01, sua afinidade de ligação ao intestino das larvas de *D. saccharalis* foi verificada por imunohistoquímica. Amostras do intestino da larva foram inicialmente submetidas ao processamento histológico, de acordo com as seguintes etapas: lavagem em PBS, fixação com formol 4% por 12 horas, desidratação em série etanólica crescente e diafanização em xilol por 1 hora. Os fragmentos foram incluídos em parafina e os cortes de 5 µm foram confeccionados em micrótomo (Richert-Jung).

Para a reação de imunohistoquímica, as secções foram submetidas à recuperação antigênica com tampão citrato de sódio por 1 hora a 90°C. Em seguida, as secções foram incubadas com peróxido de hidrogênio 3% em metanol por 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena e com PBS-BSA 10% a temperatura ambiente para bloqueio dos sítios inespecíficos. Os cortes foram lavados com PBS e o scFv E01, bem como o scFv Tir específico a um antígeno tumoral de tireóide, foram adicionados às secções, seguido por incubação *overnight* a 4°C. A ligação dos fragmentos de anticorpos ao antígeno

intestinal foi verificada pela incubação dos cortes com o anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído em PBS na proporção de 1:300. Os cortes utilizados como controles negativos da reação foram incubados somente com PBS. As lâminas foram reveladas com DAB a 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich), contra-coradas com hematoxilina de Harris e examinadas ao microscópio de luz Olympus BX 40. As fotomicrografias foram obtidas pelo *software* HLImage.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE

O processo de extração das proteínas intestinais mostrou-se eficiente, como pode ser observado pelo padrão de bandas formadas no gel SDS-PAGE (Figura 8). O evidenciamento das bandas é um indicativo da integridade das proteínas e da eficiência do processo de extração que, neste caso, resultou na extração predominantemente de proteínas com peso molecular inferior a 110 kDa.

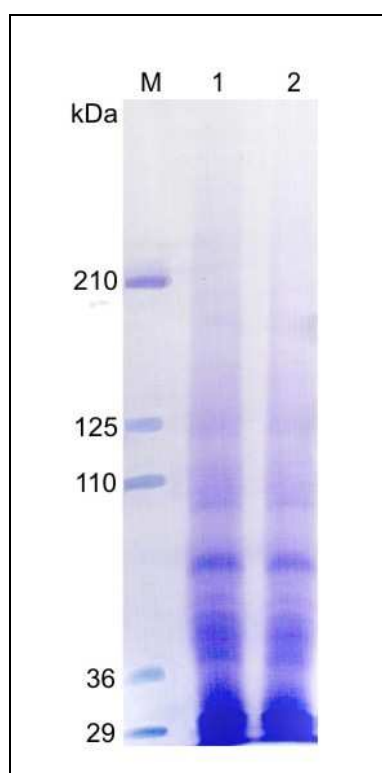


Figura 8: Gel SDS-PAGE para análise das proteínas intestinais extraídas de larvas de *Diatraea saccharalis*. Coluna M: Marcador de peso molecular *Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range* (Bio-rad). Colunas 1 e 2: 15 microgramas de proteínas intestinais de *D. saccharalis*.

4.2. IMUNIZAÇÃO DE AVES *GALLUS GALLUS DOMESTICUS*

O procedimento de imunização utilizado mostrou-se eficiente na indução de resposta imune nos animais. A galinha imunizada com as proteínas intestinais de *D. saccharalis* produziu anticorpos reativos aos antígenos presentes no imunógeno. O título de anticorpos reativos às proteínas intestinais após o quarto ciclo de imunização foi consideravelmente maior, cerca de quatro vezes, na galinha imunizada com as proteínas do que no galo imunizado apenas com o adjuvante Freund, como mostrado na Figura 9.

O título dos anticorpos reativos às proteínas intestinais mostrou-se maior no soro da galinha imunizada mesmo na diluição de 1:24300, indicando que o animal já poderia ser sacrificado, uma vez que títulos acima de 1:1000 são suficientes para a construção da biblioteca de anticorpos (Barbas et al., 2001).

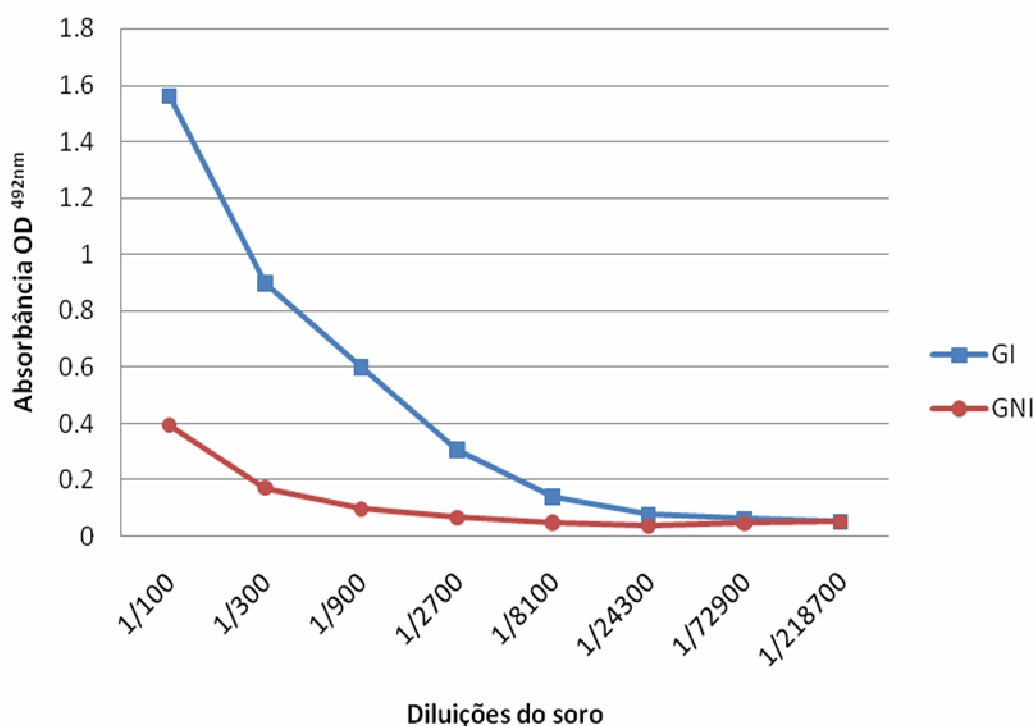


Figura 9: Título de anticorpos em soros de animais após a quarta imunização. GI: Galinha imunizada com proteínas intestinais de *D. saccharalis*. GNI: Galo imunizado apenas com o adjuvante Freund.

4.3. AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE CADEIA PESADA (VH) E CADEIA LEVE (VL)

As reações de síntese do cDNA utilizando RNA total e RNAm produziram fragmentos de cadeias leve e pesada com o mesmo rendimento. Dessa forma, foi escolhido o uso do RNA total por ser uma estratégia de menor custo e maior rapidez.

Os tamanhos observados dos fragmentos gênicos correspondentes às cadeias leve (cerca de 350 pb) e pesada (cerca de 400 pb) corresponderam ao esperado (Figura 10).

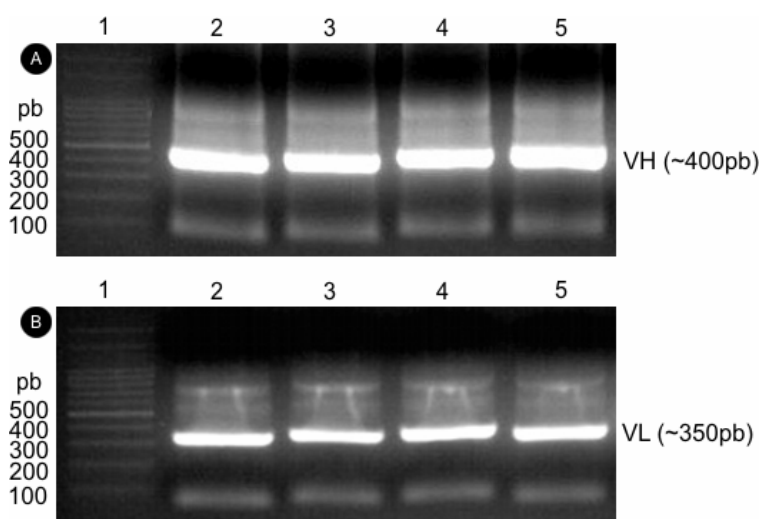


Figura 10: Análise do produto da amplificação das regiões variáveis de cadeia pesada (VH) e cadeia leve (VL). A - Colunas 1 a 4: Fragmentos VH (~400pb). B - Colunas 1 a 4: Fragmentos VL (~350pb). Tanto em A quanto em B - Coluna M: Marcador de massa molecular Ladder 100pb (Ludwig Biotec). Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Após a amplificação dos fragmentos VH e VL, os mesmos foram separados em gel de agarose e purificados. A Figura 11 mostra o produto da purificação das bandas correspondentes aos fragmentos VH e VL. Como pode ser observado, o processo de purificação mostrou-se eficiente, pois não foram visualizadas outras bandas além daquelas esperadas.

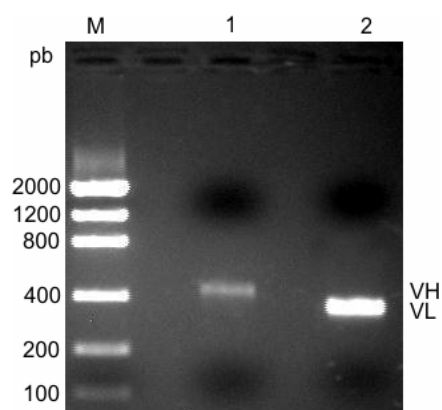


Figura 11: Análise do produto da amplificação das regiões variáveis de cadeia pesada (VH) e cadeia leve (VL) após a purificação das bandas do gel de agarose. Coluna 1: Fragmentos VH (~400pb). Coluna 2: Fragmentos VL (~350pb). Coluna M: Marcador de massa molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen). Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

4.4. AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS scFv

Os fragmentos VH e VL produzidos e purificados foram utilizados como molde para a reação de sobreposição (*overlap*) promovida por uma sequência nucleotídica codificadora de um peptídeo ligante (*short linker*) presente nos oligonucleotídeos CkJo-B (VL) e CSCVHo-F (VH). Os oligos CSC-F (senso) e CSC-B (reverso) externos ao fragmento foram utilizados para amplificar as sequências correspondentes aos fragmentos de anticorpos scFv de aproximadamente 800 pb, como pode ser visualizado na Figura 12. As reações de amplificação mostraram-se eficientes, produzindo 18 µg de scFv após a purificação dos mesmos do gel de agarose.

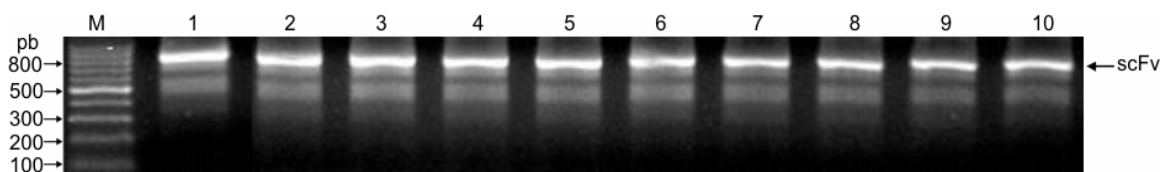


Figura 12: Análise do produto da amplificação dos fragmentos de anticorpos scFv. Colunas 1 a 10: Produtos das reações de amplificação dos fragmentos scFv. Coluna M: marcador de massa molecular Ladder 100pb (Ludwig Biotec). Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

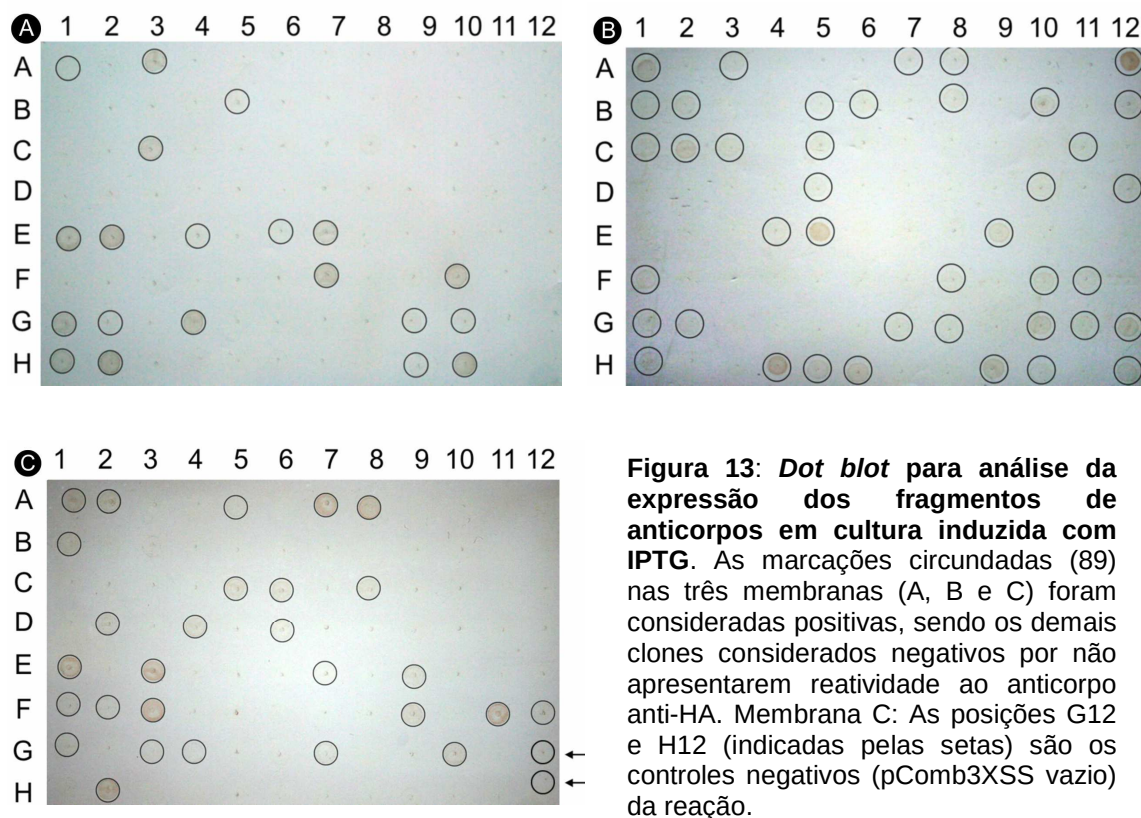
4.5. DOT BLOT PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS

Fagos eluídos no segundo ciclo de seleção foram amplificados em XL1-Blue e, em seguida, o DNA plasmidial das mesmas foi extraído e utilizado para transformar bactérias TOP10 não supressoras capazes de expressar moléculas scFv em solução, livres da proteína pIII viral. Depois de induzidos com IPTG, os clones isolados de bactérias TOP10 transformadas foram avaliados por *dot blot* quanto à expressão dos scFvs no sobrenadante de cultura, como mostrado na Figura 13.

O ensaio de *dot blot* foi realizado para analisar a expressão dos fragmentos scFv indiretamente pela observação da expressão do epítipo da hemaglutinina (HA) fusionada ao anticorpo clonado no vetor pComb3XSS. O reconhecimento do epítipo HA pelo anticorpo monoclonal anti-HA reflete a expressão correta deste epítipo e, conseqüentemente, pela sua proximidade ao fragmento scFv, pode-se inferir a integridade de todo o sistema de expressão.

Dentre os 280 fragmentos de anticorpos expressos em placas *deep well*, 89 expressaram o epítipo da hemaglutinina e foram reconhecidos pelo anticorpo anti-HA no *dot blot* (Figura 13). Os clones positivos foram utilizados no ensaio imunoenzimático ELISA para seleção dos fragmentos de anticorpos scFv com maior afinidade às proteínas intestinais de *D. saccharalis*.

Como controle negativo, foi utilizado o sobrenadante de cultura de bactérias TOP10 transformadas com o vetor pComb3XSS vazio e que foram induzidas nas mesmas condições descritas para as bactérias que expressaram os fragmentos de anticorpos. Os controles negativos não exibiram marcação no teste de *dot blot*.



4.6. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA SELEÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS scFv COM MAIOR AFINIDADE ÀS PROTEÍNAS INTESTINAIS DE *D. SACCHARALIS*

O ensaio imunoenzimático ELISA possibilitou a seleção de sete fragmentos de anticorpos com maior afinidade às proteínas intestinais de *D. saccharalis*. Os resultados foram analisados quanto à absorbância absoluta e quanto à razão entre as reatividades dos clones às proteínas intestinais e ao BSA 5%.

Os fragmentos de anticorpos E01, F03 e F11 mostraram maior reatividade absoluta, provavelmente devido à maior produtividade dos mesmos no sobrenadante de cultura. Entretanto, quando analisados quanto à razão entre as reatividades às proteínas intestinais e ao BSA 5%, os clones A02, D02, E01 e F03 mostraram as maiores diferenças (Figura 14).

O sobrenadante de cultura de bactérias expressando o pComb3XSS vazio (pCombØ da Figura 14), sem a inserção de um fragmento scFv, foi analisado quanto à reatividade às proteínas intestinais de *D. saccharalis* e ao

BSA 5% e, em ambos os casos, foi pouco reativo, mostrando que a reatividade dos clones às proteínas intestinais deve-se aos fragmentos de anticorpos scFv e não a outras proteínas presentes na solução.

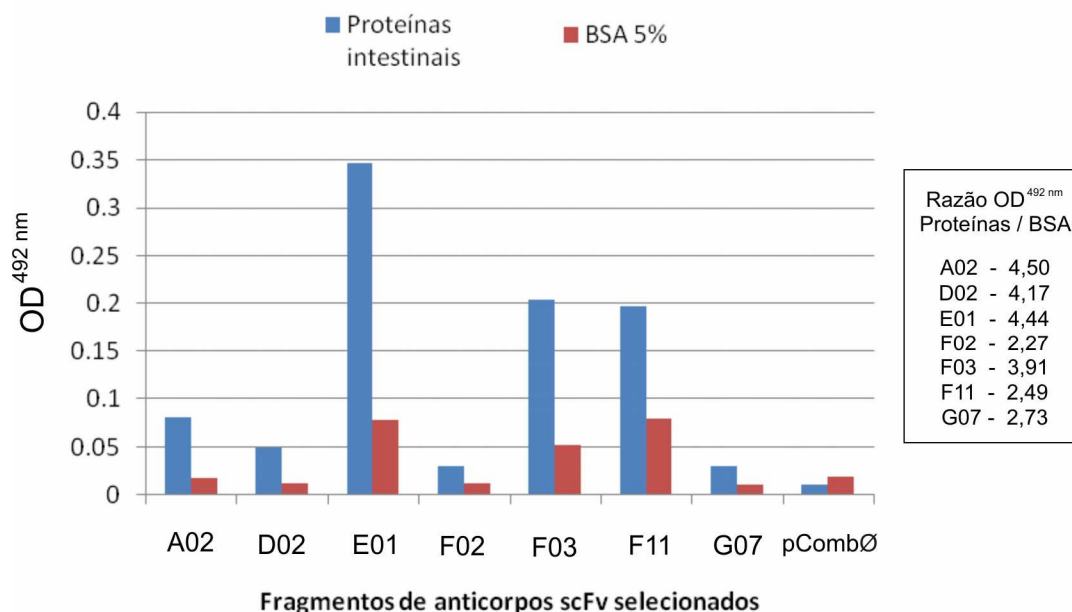


Figura 14: ELISA para análise da reatividade dos scFvs selecionados. Em azul: reatividade dos clones às proteínas intestinais de *D. saccharalis*. Em vermelho: reatividade dos clones ao BSA. pCombØ: fagomídeo pComb3XSS vazio, sem scFv. Razão OD^{492nm} Proteínas / BSA: razão entre a reatividade às proteínas intestinais e ao BSA 5% de cada clone analisado.

4.7. SEQUENCIAMENTO E BIOINFORMÁTICA DOS CLONES SELECIONADOS

A análise das sequências dos clones selecionados (Figura 15) mostrou que as regiões hiper-variáveis (CDRs) possuem grande similaridade entre si. Como as CDRs formam o sítio de ligação ao antígeno e determinam a especificidade do anticorpo (Abbas et al., 2000), foi feita a escolha apenas do clone E01 como sendo representativo daqueles que apresentaram maior reatividade às proteínas intestinais de *D. saccharalis*, além do fato de que o clone E01 mostrou-se mais reativo que os demais e altamente específico.

```

-----FWR1-----      -CDR1-      -----FWR2-----      -----CDR2-----      -----FWR3-----
E01  ----ESGGGLQTPGGALSLVCKASGFT I  SSYQMN  WIRQAPGKGLEFVA  AINRFGNSTGHGAAVKG  RVTISRDDGQSTVRLQLSNLRAEDTAXTTVPK
F03  ----ESGGGLQTPGGTSLVCKASGFTF  SSYQMN  WIRQAPGKGLEFVA  AINRFGNRTGHGAAVKG  RV IISRDDGQSTVRLQLSNLRAEDTGTYYCTK
D02  ----ESGGGLQTPGGTSLVCKGSGFTF  SSYQMN  WIRQAPGKGLEFVA  AINRFGNSTGHGAAVKG  RVTISRDDGQSTVRPQLSNLRGGHRHLLHQA-
G07  -QLDESGGGLQTPGGGLSLVCKGSGFTF  SSYQMN  WIRQAPGKGLEFVA  AINRFGNSTGYGAAVKG  RATISRDNQSTVRLQLNNSGAEDNQAPTTAP
F02  VTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFSI  SSYQMF  WVRQAPGKGLEFVA  SINRFGNSTAYGAAVKG  RATISRDNQSTVRLQLNLRGGHRQPTTAP-
F11  -TLDESGGGLQTPGRLSLVCKASGFTF  SSYGMF  WVRQEPGKLEYVA  AISSDGSYTNYGAAVKG  RATISRDNQNTVRLQLNLRGGRRHLLLRQ-
A02  ----ESGGGLQTPGGVLSLVCKASGFI F  SSYAME  WVRQAPGKGLEWVA  GIDAAGSYTGYGAAVKG  RATISRGNQSTAEAAAEQRQVGHRHLLLRQ-
          *****  *****.****:  *** *  *.** *****.*  .*. *.* * :*****  *.***.***.*.. .:

```

Figura 15: Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos sete clones selecionados. As siglas em destaque (vermelho) correspondem aos aminoácidos com frequência inferior a 30% para a posição em que se encontram, ou seja, são os aminoácidos mais variáveis em relação aos demais presentes na mesma posição. As seqüências de DNA foram analisadas usando-se o programa Ig-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>) e o alinhamento gerado pelo programa ClustalW2.

4.8. PURIFICAÇÃO DE scFv POR CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE EM HPLC

Após a expressão do scFv E01 em sobrenadante de cultura, o mesmo foi purificado em sistema HPLC. As frações eluídas do processo de purificação foram analisadas em um ensaio de *dot blot*, o qual possibilitou a identificação daquelas que apresentaram maior reatividade ao anticorpo anti-HA, evidenciando as frações com maiores concentrações de scFv (Figura 16).

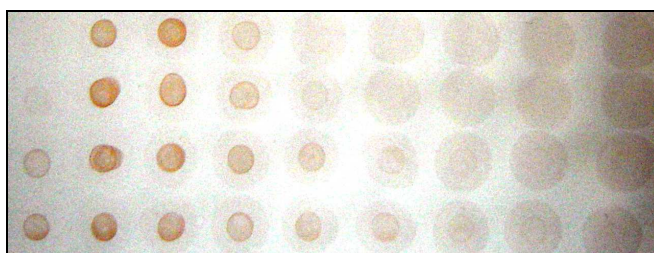


Figura 16: Análise de *dot blot* das frações eluídas pela cromatografia de afinidade em HPLC. As marcações na membrana indicam as frações com maiores concentrações do scFv E01.

4.9. ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING

Após a purificação do scFv em cromatografia de afinidade em HPLC, a amostra produzida foi separada eletroforeticamente em um gel SDS-PAGE 16% para análise da pureza e integridade do produto purificado. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana, onde o teste de reconhecimento do scFv pelo anticorpo anti-HA (marcado com peroxidase) foi conduzido. Como mostrado na Figura 17 (posição A), a banda correspondente ao scFv E01 foi reconhecida pelo anticorpo anti-HA na posição de 29 kDa, indicando a presença do mesmo na amostra purificada, além de sua pureza, uma vez que não foram constatadas outras bandas de proteínas na membrana (corada previamente com Ponceau S).

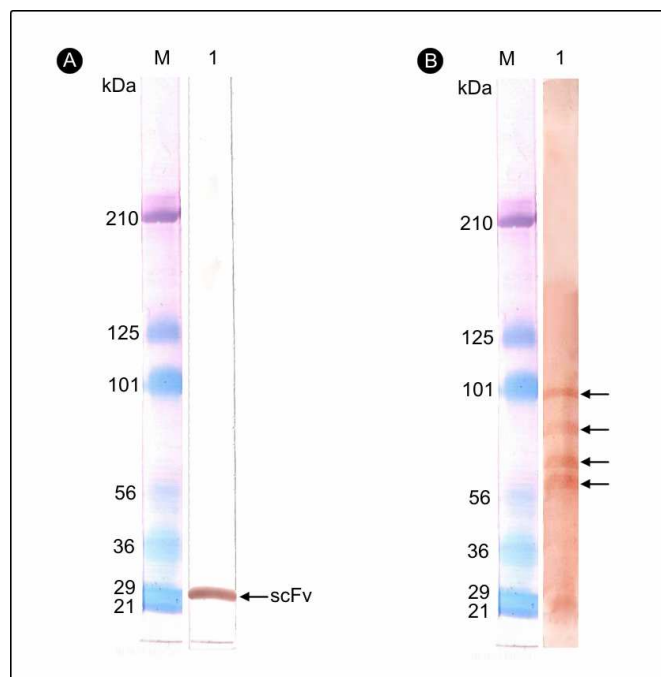


Figura 17: Ensaios de *western blotting* com o scFv E01 e as proteínas intestinais de *D. saccharalis*. A: 1 - scFv E01 purificado por cromatografia sendo reconhecido pelo anticorpo anti-HA (marcado com peroxidase) na posição de aproximadamente 29 kDa. B: 1 - Quatro bandas (56 a 101 kDa) de proteínas intestinais (indicadas pelas setas) sendo reconhecidas pelo scFv E01. Tanto em A quanto em B: M - Marcador de peso molecular *Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range* (Bio-rad).

Após a constatação da integridade e pureza do scFv E01, o mesmo foi avaliado quanto à capacidade de reconhecer proteínas intestinais em um ensaio de *western blot*. As proteínas foram separadas eletroforéticamente em um gel SDS-PAGE 16%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com o clone E01 para permitir a ligação do anticorpo às proteínas alvo. Após a revelação, quatro bandas de proteínas (Figura 17, posição B) foram reconhecidas pelo scFv E01 nas posições entre 56 e 101 kDa, indicando que o clone selecionado possui afinidade às proteínas intestinais. A baixa intensidade das bandas reconhecidas deveu-se, talvez, à baixa concentração do scFv na etapa de sensibilização ou devido ao alto *background* produzido pela ineficiência do bloqueio da membrana pelo BSA. Embora a intensidade das bandas tenha sido baixa, o controle negativo da reação (reatividade do anti-HA às proteínas sem a presença do scFv) não mostrou reatividade (dados não mostrados).

4.10. IMUNOHISTOQUÍMICA

Após a confirmação da reatividade do scFv E01 às proteínas intestinais de *D. saccharalis* por *western blot*, foi realizado a análise imunohistoquímica, visando verificar a reatividade e a localização do clone E01 no tecido intestinal (Figura 18).

O intestino de *D. saccharalis* é composto por células epiteliais classificadas como colunares, caliciformes e regenerativas em toda a extensão do intestino (Pinheiro et al., 2003). A imunoreatividade do scFv E01 foi observada preferencialmente na região basal do epitélio, onde estão localizadas as células regenerativas e o pólo basal das células caliciformes e colunares (Figuras 18, painéis B e E). Além disso, uma marcação menos intensa foi observada na borda estriada das células colunares, constituída pelas microvilosidades associadas à membrana peritrófica (Figura 18, painel H). Em adição, uma estrutura associada à membrana basal do epitélio similar a um nervo periférico foi observada fortemente reativa (Figura 18, painel L).

Como controle negativo, foi utilizado um scFv irrelevante com afinidade para tumor de tireóide, mostrando ausência de reatividade ao intestino da larva de *D. saccharalis* (Figura 18, painéis C, F e I). Da mesma forma, o controle da reação no qual foi suprimida a incubação com o scFv E01 também não apresentou imunomarcacão (Figura 18, painéis A, D, G e J).

Estatisticamente, a quantificação da densitometria óptica da imunomarcacão foi mais intensa nas secções intestinais incubadas com scFv E01, apresentando $p < 0,01$ (Figura 18).

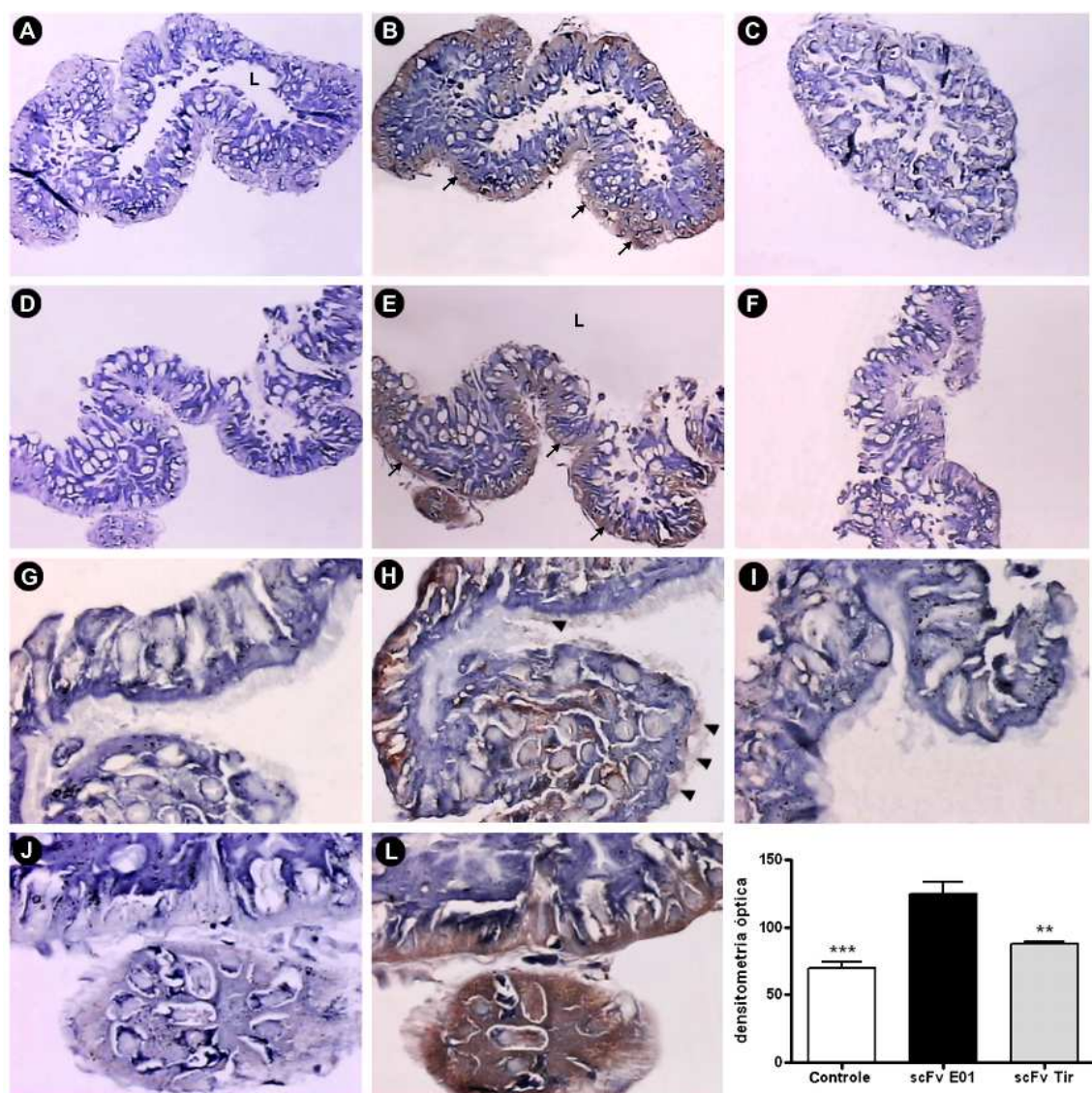


Figura 18: Análise imunohistoquímica do tecido intestinal de larvas de *D. saccharalis*. **A-C, D-F** (10x): cortes oblíquos e longitudinais do intestino, mostrando imunoafinidade do scFv E01 em B e E na região basal do epitélio (setas), distal ao lúmen intestinal (L). **G-I** (40x): Borda estriada (cabeças-de-setas) apresentando marcação para o scFv E01 em H. **J-L** (40x): Estrutura similar a um nervo periférico associada ao epitélio, mostrando intensa reatividade com o scFv selecionado em L. Controles negativos mostraram ausência de reatividade (A, D, G, J – scFv suprimido; C, F, I – scFv Tir). Contra-coloração: Hematoxilina. **M**: Densitometria óptica da intensidade da marcação para scFv E01 com peroxidase. * $p < 0,01$.

4.11. VIABILIDADE DO USO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS COMO BIOPESTICIDAS

O desenvolvimento de novas estratégias que visem reduzir o uso de agentes químicos no controle de insetos-praga pelo uso de biopesticidas é o foco principal dos esforços científicos na área. Os biopesticidas compreendem uma série de técnicas utilizadas no controle de insetos que incluem a aplicação de microorganismos, nematóides entomofágicos, pesticidas derivados de plantas, metabólicos secundários derivados de microorganismos, feromônios de insetos e genes usados para o aumento da resistência de plantas aos danos causados por insetos, fungos, vírus e herbicidas (Copping e Menn, 2000).

Diversos fragmentos de anticorpos têm sido desenvolvidos por meio da tecnologia de *Phage Display* visando-se diferentes objetivos, contudo, não foi encontrada na literatura nenhuma referência ao uso de fragmentos de anticorpos scFv ou Fab como biopesticidas.

Embora não existam relatos do uso de moléculas scFv no controle de insetos, a escolha dessa molécula como potencial bioinseticida justifica-se por duas razões principais, sendo elas: a possibilidade da produção de fragmentos de anticorpos scFv em plantas, o que já foi amplamente comprovado (Schoutena et al., 1997; Makvandi-Nejad et al., 2005), e sua capacidade teórica de atravessar a membrana peritrófica (PM) presente no intestino de insetos, que funciona como uma barreira de filtragem das moléculas presentes no lúmen intestinal.

Uma série de peptídeos e proteínas tem sido utilizada na produção de biopesticidas, sendo tais compostos derivados de diversas fontes, incluindo venenos de animais (Gershburg et al., 1998; Volynski et al., 1999), bactérias simbiotes de nematóides entomopatogênicos (Beard et al., 2001), lectinas e inibidores de proteases (Brunelle et al., 2005), proteínas inativadoras do ribossomo (Sharma et al., 2004), neuropeptídeos (Borovsky et al., 1990; Altstein, 2001; 2004), proteínas ligantes de biotina (Burgess et al., 2002), quitinases (Kramer e Muthukrishnan, 1997), enzimas da síntese de aldeídos aromáticos (O'Callaghan et al., 2005), defensinas e hormônios vegetais (Lay e Anderson, 2005; Dinan, 2001).

Uma das principais preocupações no desenvolvimento de moléculas com atividade inseticida é a maneira como as mesmas serão administradas aos insetos alvo. Diversas técnicas têm sido empregadas na aplicação dos biopesticidas, sendo elas divididas basicamente em duas rotas de administração, seja pela ingestão direta da toxina contida no alimento ou pelo uso de vetores como micróbios e simbiossiontes de insetos. Atualmente, a rota primária da administração dos biopesticidas tem sido a ingestão direta de toxinas pelos insetos-praga, seja pela aplicação tópica na superfície de plantas ou outras fontes de alimentos ou, mais comumente, como constituintes de plantas geneticamente modificadas.

Considerando-se que a forma mais comumente utilizada na administração dos biopesticidas seja a ingestão direta pelos insetos-praga, faz-se necessário o conhecimento de como os fragmentos de anticorpos se comportem no micro-ambiente intestinal, levando-se em conta as limitadas informações disponíveis a respeito da permeabilidade do epitélio intestinal, que contém, dentre outras particularidades, a membrana peritrófica (PM). A PM é uma estrutura única que separa o trato intestinal de invertebrados e que é responsável por diversas funções básicas essenciais à sobrevivência dos insetos (Lehane, 1997; Binnington et al., 1998). Ela representa a primeira barreira que todas as moléculas ingeridas necessitam ultrapassar para alcançar as células epiteliais contidas no espaço endoperitrófico. A PM é formada por uma rede de fibras quitinosas associadas a diferentes classes de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos (Lehane, 1997; Tellam et al., 1999; Wang e Granados, 2001) e possui a função de filtração, uma vez que é composta por canais aquosos que atravessam o gel de proteoglicanos. A passagem de moléculas pelos poros da PM ocorre principalmente por forças hidrostáticas (Lehane, 1997) e um limitado número de estudos tem sido conduzido para definir a dimensão dos poros presentes nas PMs dos diferentes grupos de insetos, seja pela medição do fluxo de moléculas com diferentes tamanhos através da membrana isolada, ou pela determinação do tamanho do poro por análises de microscopia eletrônica (Adang e Spence, 1983; Santos e Terra, 1986; Wolfersberger et al., 1986).

Estudos conduzidos *in vivo* em quatro diferentes espécies de Lepidópteros definiram o diâmetro dos poros como sendo de 21 a 29 nm

(Barbehenn e Martin, 1995; Barbehenn, 2001), o que permitiria a passagem de proteínas de até 90 kDa e, conseqüentemente, dos fragmentos de anticorpos scFv e Fab, que possuem cerca de 28 a 30 kDa.

Uma vez atravessada a membrana peritrófica, as moléculas presentes no espaço ectoperitrófico precisam passar pela segunda barreira, formada pela camada de células epiteliais, para alcançar o compartimento hemocélico. Estudos recentes conduzidos *in vitro* mostraram que proteínas atravessam o epitélio intestinal de larvas de *Bombyx mori* por transcitose, embora não existam dados disponíveis a respeito do caminho percorrido por pequenos peptídeos (Casartelli et al., 2005; 2007). Em princípio, peptídeos compostos por poucos resíduos de aminoácidos devam alcançar a hemocèle através do espaço paracelular, revestido pelas junções SJ (*smooth septate junction*). Os recursos funcionais da rota paracelular são extensivamente estudados em intestinos de mamíferos em função do seu papel crucial na administração de drogas (Pade e Stavchansky, 1997; Gonzalez-Mariscal et al., 2005; Salama et al., 2006), mas ainda são pouco conhecidos nos tecidos intestinais de insetos. Poucas informações estão disponíveis acerca da permeabilidade das junções SJ em insetos (Skaer et al., 1987; Zhu et al., 2001) e de sua habilidade de agir como uma barreira controladora, como ocorre em mamíferos.

Wigglesworth (1943) foi um dos primeiros pesquisadores a demonstrar a passagem de proteínas intactas através do sistema digestivo de insetos. Segundo seu estudo, uma pequena quantidade de hemoglobinas ingeridas foi observada na hemolinfa de *Rhodnius prolixus*. Desde então, várias proteínas intactas foram encontradas na hemolinfa após sua ingestão por insetos, incluindo diversas espécies de Lepidópteros (Jeffers e Roe, 2008). Em moscas, Nogge e Giannetti (1979) demonstraram que albumina humana intacta e fragmentos de imunoglobulinas apareceram na hemolinfa de *Glossina morsitans* depois de serem alimentadas com sangue humano. Embora nenhuma IgG intacta tenha sido detectada na hemolinfa, fragmentos Fab e albumina foram.

Tendo em vista a relevância da cultura da cana-de-açúcar para a economia nacional e os enormes prejuízos provocados pela broca, todo esforço no sentido de melhorar o entendimento acerca desta praga e buscar novos e mais eficazes meios de combatê-la sem o uso de agentes químicos,

seria de grande importância para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil e para o cenário agroindustrial como um todo.

No presente estudo, foi selecionado e caracterizado, pela primeira vez, um fragmento de anticorpo scFv com o potencial uso como biopesticida. Diante dos resultados, propomos a possível utilização dessas moléculas na geração de linhagens geneticamente modificadas de plantas resistentes à broca-da-cana. Contudo, estudos subseqüentes fazem-se necessários para uma caracterização mais detalhada das proteínas-alvo do clone selecionado, além da avaliação da existência de atividade inseticida apresentada pelo scFv quando ingerido pela larva de *D. saccharalis*.

5. CONCLUSÃO

A tecnologia de *Phage Display* utilizada na construção da biblioteca imune de fragmentos de anticorpos scFv contra as proteínas intestinais de *Diatraea saccharalis* mostrou-se eficiente, permitindo a seleção de um fragmento de anticorpo scFv imunorreativo ao epitélio intestinal do inseto e com potencial atividade bioinseticida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.; Lichtman, A.; Pober, J. Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders Company, 4 ed., 2000.

Adang, M. J.; Spence, K. A. Permeability of the peritrophic membrane of the Douglas fir tussock moth (*Orygia pseudotsugata*). *Comparative Biochemistry and Physiology*; 75:233-238, 1983.

Altstein, M. Insect neuropeptide antagonists. *Biopolymers*; 60:460-73, 2001.

Altstein, M. Novel insect control agents based on neuropeptide antagonists: The PK/PBAN family as a case study. *J. Mol. Neuroscience*; 22:147-57, 2004.

Andris-Widhopf, J.; Rader, C.; Steinberger, P.; Fuller, R.; Barbas III, C. F. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *Journal of Immunological Methods*; 242:159-181, 2000.

Azriel-Rosenfeld, R.; Valensi, M.; Benhar I. A human synthetic combinatorial library of arrayable single-chain antibodies based on shuffling in vivo formed CDRs into general framework regions. *J. Mol. Biol.*; 335:177-92, 2004.

Barbas, C. F.; Dennis, R. B.; Scott, J. K.; Silverman, G. J. Phage Display, A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 1 ed. NY, 2001.

Barbehenn, R. V.; Martin, M. M. Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. *Journal of Insect Physiology*; 41:303-311, 1995.

Barbehenn, R. V. Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*; 47:86-99, 2001.

Beard, C. E.; Ranasinghe, C.; Akhurst, R. J. Screening for novel cry genes by hybridization. *Lett. Appl. Microbiol.*; 33:241-5, 2001.

Borovsky, D.; Carlson, D. A.; Griffin, P.R.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. Mosquito oostatic factor: a novel decapeptide modulating trypsin-like enzyme biosynthesis in the midgut. *Faseb J.*; 4(12):3015-3020, 1990.

Botelho, P.S.M.; Macedo, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, in: J.R.P. Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira, J.M.S. Bento (Eds.), *Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores*, 609 p., Editora Manole Ltda., São Paulo, 2002.

Binnington, K. C.; Lehane, M. J.; Beaton, C. D. The peritrophic membrane. *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (11):747-758, 1998.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*; 72:248-254, 1976.

Brunelle, F.; Girard, C.; Cloutier, C.; Michaud, D. A hybrid, broad-spectrum inhibitor of Colorado potato beetle aspartate and cysteine digestive proteinases. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*; 60:20-31, 2005.

Burgess, E. P. J.; Malone, L. A.; Christeller, J. T.; Lester, M. T.; Murray, C.; Philip, B. A.; Phung, M. M.; Tregidga, E. L. Avidin expressed in transgenic tobacco leaves confers resistance to two noctuid pests, *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Transgenic Res.*; 11(2):185-198.

Carvalho, S. S. A.; Amorin, S. C. R.; Lima, I. S. Comportamento reprodutivo da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Crambidae). In: Congresso Brasileiro de Entomologia, Manaus, 2002. *Resumos: Sociedade Entomológica do Brasil*, Piracicaba; p. 18, 2002.

Casartelli, M.; Corti, P.; Leonardi, M. G.; Fiandra, L.; Burlini, N.; Pennacchio, F.; Giordana, B. Absorption of albumin by the midgut of a lepidopteran larva. *Journal of Insect Physiology*; 51:933-940, 2005.

Casartelli, M.; Corti, P.; Cermenati, G.; Grimaldi, A.; Fiandra, L.; Santo, N.; Pennacchio, F.; Giordana, B. Absorption of horseradish peroxidase in *Bombyx mori* larval midgut. *Journal of Insect Physiology*; 53:517-525, 2007.

Copping, L. G.; Menn, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*. 56(8):651-676, 2000.

Dinan, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry*; 57(3):325-339, 2001.

Gershburg, E.; Stockholm, D.; Froy, O.; Rashi, S.; Gurevitz, M.; Chejanovsky, N. Baculovirus-mediated expression of a scorpion depressant toxin improves the insecticidal efficacy achieved with excitatory toxins. *FEBS Lett.*; 422:132-6, 1998.

Gonzalez-Mariscal, L.; Nava, P.; Hernandez, S. Critical role of tight junctions in drug delivery across epithelial and endothelial cell layers. *The Journal of Membrane Biology*; 207:55-68, 2005.

Jeffers, L. A., Roe, R. M. The movement of proteins across the insect and tick digestive system. *Journal of Insect Physiology*; 54:319-332, 2008.

Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*; 256:495-7, 1975.

Kramer, K.J., Muthukrishnan, S., 1997. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*; 27(11):887-900.

Krebs, B.; Rauchenberger, R.; Reiffert, S.; Rothe, C.; Tesar, M.; Thomassen, E.; et al. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J. Immunol. Methods*; 254:67-84, 2001.

Lay, F. T.; Anderson, M. A. Defensins - components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.*; 6(1):85-101, 2005.

Lehane, M. L. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*; 42:525–550, 1997.

Makvandi-Nejad, S.; McLean, M.; Hiram, T.; Almquist, K.; MacKenzie, C; Hall, J. *Transgenic Research*; 14(5)785-792, 2005.

Martin, M.M.; Barbehenn, R.V. Permeability of the Peritrophic Envelopes of Herbivorous Insects to Dextran Sulfate: a Test of the Polyanion Exclusion Hypothesis. *J. Insect Physiol.*; 43:243-249, 1997.

Mendonça, A. F. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p.3-48. *Insetos & Cia*, 239 p., Maceió, 1996.

Nogge, G., Giannetti, M. Midgut absorption of undigested albumin and other proteins by tsetse, *Glossina m. morsitans* (Diptera: Glossinidae). *Journal of Medical Entomology*; 16, 263, 1979.

O'Callaghan, M.; Glare, T. R.; Burgess, E. P. J.; Malone, L. A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annu. Rev. Entomol.*; 50(1)271-292, 2005.

Pade, V.; Stavchansky, S. Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture Model. *Pharmaceutical Research*; 14:1210-1215, 1997.

Parra, J.R.P. & L.H. Mihsfeldt. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. p.195-209. *Advances in insect rearing for Research & Pest Management. San Francisco: Westview Press*, 519 p., 1992.

Salama, N. N.; Eddington, N. D.; Fasano, A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 58:15-28, 2006.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.

Santa Cruz, J. M. S.; Moss, C. S.; Reynaud, G. G.; Montalvo, C. G. Cria ertifical de *Diatraea saccharalis* Fab. (Lepidoptera: Pyralidae) y su aplicacion en la evaluacion de resistencia en maiz. *Agrociência*, Chapingo, 10:3-13, 1973.

Santos, C. D.; Terra, W. Distribution and characterisation of oligomeric digestive enzymes from *Erinnys ello* larvae and inferences concernine secretory mechanisms and the permeability of the peritrophic membrane. *Insect Biochemistry*; 16:691-700, 1986.

Schoutena, A.; Roosiena, J.; Boer, J. M.; Wilmink, A.; Rossoc, M.; Boschb, D.; Stiekemab, W. J.; Gommersa, F. J.; Bakker, J.; Schotsalmpoving, A. Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol. *Febs Letters*; 415(2):235-241, 1997.

Sharma, H. C.; Sharma, K.; Crouch, J. Genetic transformation of crops for insect resistance: Potential and limitations. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23(1):47-72.

Skaer, H.; Le, B.; Maddrell, S. H. P.; Harrison, J. B. The permeability properties of septate junction in Malpighian tubules of *Rhodnius*. *Journal of Cell Science*; 88:251-267, 1987.

Smith G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*; 228:1315-7, 1985.

Tellam, R. L.; Wijffels, G.; Willadsen, P. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 29:87-101, 1999.

Wang, P.; Granados, R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*; 47:110-118, 2001.

Vaughan, T. J.; Williams, A. J.; Pritchard, K.; Osbourn, J. K.; Pope, A. R.; Earnshaw J. C.; et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol.*; 14:309-14, 1996.

Vendramim, J. D., Silva, F. C., Camargo, A. P. Avaliação das dimensões da região danificada pelo complexo broca-podridões em seis cultivares de cana-de-açúcar. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina; 18:105-119, 1989.

Vendramim, J. D.; Silva, F. C. D.; César, M. A. A.; Camargo, A. P. D. Intensity of damage - a new index for evaluation of the borer-rot complex on sugarcane cultivars. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina; v. 20, p. 319-332, 1991.

Volynski, K. E.; Nosyreva, E. D.; Ushkaryov, Y. A.; Grishin, E. V. Functional expression of alpha-latrotoxin in baculovirus system. *FEBS Lett.*; 442:25-8, 1999.

Wigglesworth, V. B. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences*; 131:313-339, 1943.

Wolfersberger, M. G.; Spaeth, D. D.; Dow, J. A. T. Permeability of the peritrophic membrane of tobacco hornworm larval midgut. *American Zoologist*; 26:74A, 1986.

Zhu, W.; Vandingenem, A.; Huybrechts, R.; Vercammen, T.; Baggerman, G.; De Loof, A.; Poulos, C.P.; Valentza, A.; Breuer, M. Proteolytic breakdown of the Neb-trypsin modulating oostatic factor (Neb-TMOF) in the haemolymph of different insects and its gut epithelial transport. *Journal of Insect Physiology*; 47:1235-1242, 2001.

7. ANEXO I

MEIOS DE CULTURA

- **Meio LB (*Luria Bertani*), pH 7,0**

Peptona de caseína	1,0% (p/v);
Extrato de levedura	0,5% (p/v);
NaCl	1,0% (p/v).

- **Meio LB ágar**

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 1,4% (p/v).

- **Meio LB top ágar**

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 0,7% (p/v).

- **Meio SB (*Super Broth*), pH 7,0**

Peptona de caseína	3,0% (p/v);
Extrato de levedura	2,0% (p/v);
MOPS	1,0% (p/v).

- **Meio SOB, pH 7,0**

Peptona de caseína	2,0% (p/v);
Extrato de levedura	0,5% (p/v);
NaCl	0,05% (p/v);
KCl	0,00186% (p/v).

- **Meio SOC**

Meio SOB	97 mL;
Glicose 2M (filtrada)	1 mL;
MgCl ₂ 1M (autoclavado)	1 mL;
MgSO ₄ (autoclavado)	1 mL.

Todos os meios foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos e conservados a temperatura ambiente até a utilização.

ANTIBIÓTICOS

- Ampicilina a 100 mg/mL; Carbenicilina a 100 mg/mL; Kanamicina a 50 mg/mL. As soluções estoque foram preparadas em água bidestilada, esterilizadas por filtração em filtro Millipore de 0,2 µm e estocadas a -20°C.
- Tetraciclina (Sigma) a 20 mg/mL. A solução estoque foi preparada em etanol, esterilizada por filtração em filtro Millipore de 0,2 µm e estocadas a -20°C.

SOLUÇÕES DE USO GERAL

- **Glicose 20%:**

Glicose anidra 20 g;
Água bidestilada q.s.p. 100 mL.

Solução esterilizada por filtração em filtro Millipore de 0,2 µm.

- **Glicerol 50%:**

Glicerol 50 mL;
Água bidestilada q.s.p. 100 mL.

Solução esterilizada por autoclavagem.

- **Solução de MgCl₂, 1M:**

MgCl₂.6H₂O 101,65 g;
Água bidestilada q.s.p. 500 mL.

Solução esterilizada por autoclavagem.

- **IPTG (isopropil- β -D-thiogalactopyranoside), 1M:**

IPTG (Sigma-aldrich) 0,238 g

Água bidestilada 1 mL

A solução foi esterilizada por filtração em filtro Millipore de 0,2 μ m e estocada a -20°C.

SOLUÇÕES UTILIZADAS NA SELEÇÃO DA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS

Todas as soluções utilizadas neste passo foram esterilizadas por filtração com membranas Millipore de 0,22 μ m.

- **TBS 10X (estoque), pH 7,4:**

Tris-Base 0,5 M;

NaCl 1,5 M.

- **TBS/BSA 1%**

TBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 1% (p/v).

- **PBS 10X (estoque), pH 7.4:**

Na₂HPO₄ 1,2 M;

KH₂PO₄ 1,2 M;

NaCl 1,37 M;

KCl 2,7g;

Água bidestilada 1 L.

- **PBST, pH 7,4:**

PBS 1X adicionado de Tween 20 a 0,05% (v/v).

- **PBS/BSA 3%:**

PBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 3% (p/v).

SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E DE POLIACRILAMIDA

- **Tampão de corrida para gel de Agarose (TBE) 10x, pH 8,0**

Tris-Base	0,89 M;
Ácido Bórico	0,89 M;
EDTA	0,002 M;
Água bidestilada q.s.p.	1 L.

- **Tampão de amostra para Gel de Agarose 10x**

Azul de Bromofenol	0,1% (p/v);
Xileno cianol	0,1% (p/v);
Água bidestilada	4,0 mL.

- **Tampão de corrida para SDS-PAGE 5x, pH 9,2**

Tris-Base	125 mM;
Glicina	125 mM;
SDS	0,5%.

- **Tampão de amostra para SDS-PAGE 2x**

Tris-HCl (pH 6,8)	100 mM;
SDS	4% (p/v);
Glicerol	20% (v/v);
B-mercaptoetanol	5%;
Azul de bromofenol	0,2% (p/v).

- **Acrilamida 49% / Bis-acrilamida 0.5%**

Acrilamida	98 g;
Bis-acrilamida	1 g;
Água bidestilada q.s.p.	200 mL;

A solução foi estocada a 4°C, ao abrigo da luz.

- **Tris-HCl 3 M, pH 8,3**

Tris-HCl	72,68 g;
----------	----------

Água Bidestilada q.s.p. 200 mL.

▪ **Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8**

Tris-HCl 12,11 g;

Água bidestilada q.s.p. 200 mL.

▪ **SDS 10%**

SDS 10 g;

Água bidestilada q.s.p. 100 mL.

▪ **PSA 10%**

Persulfato de amônio 100 mg;

Água bidestilada q.s.p. 1 mL.

▪ **Gel de empilhamento SDS-PAGE**

Tris-HCl (pH 8,3) 3,75 mL;

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida 1,50 mL;

PSA 10% 140 µL;

TEMED 10 µL;

Água bidestilada 10,41mL.

▪ **Gel de separação SDS-PAGE**

Tris-HCl (pH 8,3) 13,35 mL;

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida 13,25 mL;

Glicerol 7,48 mL;

PSA 10% 140 µL;

TEMED 7 µL;

Água bidestilada 5,90 mL.

▪ **Solução corante para Gel SDS-PAGE**

Metanol 40% (v/v);

Ácido acético 10% (v/v);

Coomassie Brilliant Blue (R-250) 1% (p/v).

▪ **Solução descorante para Gel SDS-PAGE**

Metanol	40% (v/v);
Ácido acético	10% (v/v).

SOLUÇÕES PARA ELISA, DOT BLOT E WESTERN BLOT

▪ **Corante Ponceau 10x**

Ponceau S	2 g;
Ácido tricloracético	30 g;
Ácido sulfosalicílico	30 g;
Água bidestilada q.s.p.	100 mL.

▪ **Tampão de transferência**

Tris-Base	48 mM;
Glicina	39 mM;
Metanol	20% (v/v);
SDS	0,037% (p/v).

SOLUÇÕES PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA EM HPLC

▪ **Tampão Fosfato 8x, pH 7,4**

NaHPO ₂ .2H ₂ O	1.42 g;
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.1 g;
NaCl	23,38 g;
Água bidestilada q.s.p.	100 mL.

A solução foi filtrada com filtro Millipore de 0,22 µm.

▪ **Tampão Imidazol 2M, pH 7,4**

Imidazol	13,63 g;
Água bidestilada q.s.p.	100 mL.

A solução foi filtrada com filtro Millipore de 0,22 µm.

- **Tampão de ligação**

Tampão Fosfato 8x	30 mL (20 mM);
Tampão Imidazol 2M	1,2 mL (10 mM);
Água bidestilada q.s.p.	240 mL.

- **Tampão de eluição**

Tampão Fosfato 8x	10 mL (20 mM);
Tampão Imidazol 2M	20 mL (500 mM);
Água bidestilada q.s.p.	80 mL.

SOLUÇÕES PARA PREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

- **GET**

Glicose 20%	0,92% (p/v);
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	10 mM;
Tris-HCl 1M	26 mM.

- **Acetato de potássio 3M**

Ácido acético glacial	60 mL;
KOAc 5M (filtrado)	11,5 mL;
Água bidestilada	28,5 mL.

LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

CSVCHo-F (sense)

5' GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG 3'

CSCG-B (antisense)

5' CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CC 3'

CSCVK (sense)

5' GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC 3'

CKJo-B (antisense)

5' GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G 3'

CSC-F (sense)

5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG 3'

CSC-B (antisense)

5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GG 3'

Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das cadeias leve (VL) e pesada (VH) e nas reações de síntese do scFv (Adaptado de Andris-Widhopf, J. et al., 2000).