



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - RONDÔNIA

SORAYA DOS SANTOS PEREIRA

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCORPOS DE CAMELÍDEOS CONTRA O  
ANTÍGENO RECOMBINANTE DO SEGMENTO-S DE HANTAVÍRUS, CEPA  
ARAUCÁRIA

PORTO VELHO- RO  
2013

SORAYA DOS SANTOS PEREIRA

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCORPOS DE CAMELÍDEOS CONTRA O  
ANTÍGENO RECOMBINANTE DO SEGMENTO-S DE HANTAVÍRUS, CEPA  
ARAUCÁRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental PGBIOEXP da Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof.Dr. Rodrigo Guerino Stábeli  
Co-orientador(a): Profa.Dra. Carla Freire  
Celedonio Fernandes

PORTO VELHO-RO  
2013

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

P4361s

Pereira, Soraya dos Santos

Seleção e caracterização de nanacópos de camelídeos contra recombinante do segmento-s de hantavírus, cepa araucária / Soraya dos Santos Pereira. Porto Velho 2014.

96 f.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Guerino Stábeli

Co-Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Celedonio Fernandes

Tese (Doutorado em Biologia Experimental) Fundação Universidade Federal de Rondônia

1. Nanacópo 2. VHH 3. Phage display 4. Hantavírus I. Stábeli, Rodrigo Guerino; Fernandes, Carla Celedonio II. Título

CDU: 578.5

Bibliotecária Responsável: Ozelina Saldanha CRB11/947

SORAYA DOS SANTOS PEREIRA

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCORPOS DE CAMELÍDEOS CONTRA O  
ANTÍGENO RECOMBINANTE DO SEGMENTO-S DE HANTAVÍRUS, CEPA  
ARAUCÁRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental PGBIOEXP da  
Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

---

**Dra Carla Freire Celedônio Fernandes**

(Presidente: Centro de Pesquisa em Medicina Tropical- CEPEM e Fundação Oswaldo Cruz –  
Fiocruz Rondônia)

---

**Dr. Andreimar Martins Soares**

(Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz Rondônia)

---

**Dr. Leonardo de Azevedo Calderon**

(Universidade Federal de Rondônia- UNIR)

---

**Dra. Luciana Gatto Brito**

(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Rondônia)



---

**Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos**

(Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz Paraná)

Defesa de tese foi realizada dia 13/11/2013.

RESULTADO: **APROVADO**

## AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos direcionando-os primeiramente a Deus, que me abençoou e me proporcionou a força, a coragem e a saúde necessária para que pudesse concretizar esse projeto e chegar até o fim desse grande desafio.

Agradeço também a meus amados pais que, apesar de toda humildade, sempre me incentivaram e me nortearam dando o seu melhor para o meu crescimento, depositando todas as suas forças para a minha evolução diária, nunca deixando de acreditar em mim.

Não poderia deixar de expressar aqui minha gratidão ao professor Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva, um cientista incansável que, através de suas visitas diárias, contribuiu de modo louvável com suas ricas opiniões acerca deste projeto e sempre acreditou na plataforma de Engenharia de Anticorpos (*Phage Display*).

Agradeço especialmente ao meu orientador, Dr. Rodrigo Guerino Stábili, pela oportunidade ofertada. Seu apoio me propiciou desenvolvimento científico e continuidade na pesquisa. Em todos os momentos demonstrou ser um grande pesquisador e uma fonte inspiradora.

Expresso meu profundo respeito e admiração à minha co-orientadora, Dra Carla Freire Celedonio Fernandes, ser humano raro. Obrigada pelo apoio, estímulo, amizade e dedicação dispensados ao desenvolvimento desse trabalho. Eis minha gratidão também pelas discussões dos dados e perspectivas e por todo incentivo que me concedera para a finalização desse projeto.

Às minhas amigas Elis Paula Batista (“pretinha”) e Lilian Dias de Carvalho, agradeço pela amizade, dedicação e companheirismo, mesmo nos picos de estresse, sempre estavam dispostas a me escutar. Aos amigos Aline Schimitz Borges, Giovani Amaral e Rosemeire Motta, pelas conversas nos corredores, os churrascos e cervejadas, meu sentimento de gratidão.

Agradeço às minhas queridas Michelle Suelen e a Nidiane Dantas Reis Prado pelas gargalhadas, bagunças, amizade, dedicação e auxílio nas atividades laboratoriais, pessoas especiais que sempre se dispuseram a me ajudar no que fosse preciso e me ensinaram a não levar tudo tão a sério.

À minha comadre e amiga Deusilene Souza Vieira expresso meu carinho e gratidão por todas as orientações e pela atenção que contribuiu para minha evolução, ajudando na

minha formação pessoal e profissional desde os tempos de iniciação científica. Também me sinto grata pela contribuição dos meus queridos amigos Juan Miguel Salcedo e Joana D'Arq Neves ao me proporcionarem boas conversas, são pessoas que sempre me trataram com carinho e atenção.

Minha gratidão se direciona de igual maneira aos demais colegas do laboratório de Engenharia de Anticorpos e Genética, Michele Pereira da Silva, Marcos Barros Luis, Gabriela Luz, Andrelisse Arruda, Guilherme Silvério, Maisa da Silva Araujo, Lilian Cantanhede, Iasmin Pimentel, Wanne Soares. Ao laboratório de Imunologia Celular, à Dra. Juliana Zuliani, Sulamita e Adriana. Ao laboratório CeBio, ao professor Dr. Andreimar Soares e toda equipe, em especial à Leandro Moreira Dill, um brilhante jovem pesquisador, pelas discussões e desenvolvimento dos experimentos que foram de suma importância para a finalização desse trabalho. Ao professor Dr. Fernando Berton Zanchi pela realização da modelagem do VHH. Ao professor Dr. Luiz Shozo Ozaki pelas discussões e instruções em biologia molecular. Ao laboratório de Virologia do ICC/Fiocruz Paraná: a Dra. Claudia Nunes, Vanessa Stela, Marina e Giovanni Mazzarotto pelos insumos e produtos para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu Kleber Aguiar, que se mostrou sempre atento as minhas teorias, muitas vezes absurdas, paciente na minha ausência, me pedindo “calma” quando atravessava os momentos mais difíceis, meus mais sinceros agradecimentos.

Por fim, Sou grata ao CNPq, a Secretaria de Planejamento e Orçamento do Governo do Estado de Rondônia e à Fundação Oswaldo Cruz Rondônia, pelo apoio financeiro para a execução deste projeto.

*“A felicidade aparece para aqueles que choram.  
Para aqueles que se machucam.  
Para aqueles que buscam e tentam sempre.”*

*Clarice Lispector*

## RESUMO

As hantavirose são doenças emergentes de notificação compulsória transmitidas por roedores. Nas Américas são responsáveis por ocasionar a Síndrome Cardiopulmonar causada por Hantavírus (SCPH) com letalidade de até 50% nos casos confirmados. O diagnóstico precoce da infecção proporciona cuidados e atenção ao paciente reduzindo a elevada taxa de mortalidade e evolução da doença. Dada a importância do desenvolvimento de kits para diagnóstico mais sensíveis e específicos para a patologia, este estudo apresenta nanocorpos ou VHHs de camelídeos contra a proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus (rN<sub>Δ85</sub>) cepa Araucária, circulante no Brasil. Os nanocorpos apresentam características físico-químicas peculiares que os tornam excelentes protótipos para aplicações em diagnóstico e terapêutica, tais como tamanho reduzido, alta solubilidade, além de apresentarem uma notável resistência às variações de pH e ação proteolítica. Para o isolamento dos nanocorpos utilizou-se a tecnologia *Phage Display*. Assim, foram realizadas sucessivas imunizações de camelídeo *Lama glama* com a proteína rN<sub>Δ85</sub> e a resposta imune monitorada por ELISA. A região codante do VHH foi isolada por RT-PCR a partir de linfócitos periféricos, utilizando oligonucleotídeos específicos. Uma biblioteca imune primária com título de 3x10<sup>7</sup> clones foi construída utilizando o vetor fagomídeo pHEN1. Subsequentemente, os segmentos codantes dos VHHs foram fusionados ao gene da proteína III do capsídeo do fago filamentososo M13K07, constituindo uma biblioteca fágica com um título de 1,7x10<sup>11</sup> cfu/mL. Após duas rodadas de seleção foram selecionados 80 clones, dos quais 11 foram caracterizados por sequenciamento gênico. As sequências foram separadas em quatro grupos de acordo com a variabilidade apresentada nas regiões determinantes de complementaridade (CDR). Após testes prévios de interação por ressonância plasmônica de superfície (SPR) e imunodeteção por ELISA, o clone VHH KC329708, que demonstrou expressiva capacidade de reconhecimento à proteína N<sub>Δ85</sub>, foi selecionado, subclonado em vetor fagomídeo pHEN-6xHistag e submetido a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni<sup>+2</sup>. Após purificação, a cinética de interação dos clones e a proteína recombinante foi determinada por SPR e a especificidade por *western blotting*, utilizando o anticorpo monoclonal anti-rN<sub>Δ85</sub> como referência. Nos testes em *sensorchip* verificou-se que o VHH, clone KC329708, apresentou um KD=5,52x10<sup>-6</sup>(M) e cerca de 10RU, em comparação com o anticorpo monoclonal que apresentou um KD=3,38x10<sup>-6</sup>(M) e 3,5RU, indicando que o VHH KC329708 apresenta uma afinidade significativamente maior à rN<sub>Δ85</sub> comparado ao anticorpo monoclonal anti-rN<sub>Δ85</sub> de murinos. Os resultados obtidos neste estudo suportam a ideia do uso deste VHH como insumo para diagnóstico de infecções por hantavírus devido à sua afinidade à rN<sub>Δ85</sub>. Adicionalmente, devido às características apresentadas pelos nanocorpos, especulamos o seu uso como *intrabodies* para rastreamento e inibição da proteína N do hantavírus durante a infecção e replicação viral.

Palavras-chave: Nanocorpo, VHH, *Phage Display*, hantavírus, cepa Araucária.



## ABSTRACT

The hantaviruses are emergent diseases of compulsory notification transmitted by rodent. In the Americas are responsible for causing the hantavirus pulmonary syndrome (HPS) with a mortality rate exceeding up to 50%. Early diagnosis provides care and attention to the patient reducing the high mortality rate and disease progression. Given the importance of development more sensitive and specific diagnostics kits to the pathology, this study presents nanobody or camelid VHH against recombinant protein of the hantavirus nucleocapsid (rN $\Delta_{85}$ ) strain Araucaria, circulating in Brazil. The nanobodies have physicochemical characteristics that make them excellent prototypes for diagnostic and therapeutic applications, such as small size, high solubility, besides presenting a remarkable resistance to changes in pH and proteolytic activity. For the isolation of the nanobodies, the Phage Display technique was used. Therefore, successive immunizations with rN $\Delta_{85}$  in camelid *Lama glama* were performed and the immune response were monitored by ELISA. The VHH coding region was isolated by RT-PCR from peripheral lymphocytes, using specific oligonucleotides. A primary immune library with the title of  $3 \times 10^7$  clones was built using the phagemid vector pHEN1. Subsequently, the VHH coding segments were fused to the protein III gene of the filamentous phage capsid M13K07, constituting a phage library with a title of  $1,7 \times 10^{11}$  cfu/mL. After two rounds of selection 80 clones were selected, of which 11 were characterized by gene sequencing. The sequences were divided into four groups according to the variation shown in the complementarity-determining region (CDR). After the previous tests of interaction by surface plasmon resonance (SPR) and immunodetection by ELISA, the clone VHH KC329708, which demonstrated significant ability to recognize the rN $\Delta_{85}$ , was selected, subcloned into phagemid vector pHEN-6xHistag and purified by affinity chromatography on Ni<sup>+2</sup> a column. After purification, the interaction kinetics of the clones and the recombinant protein was determined by SPR and the specificity by western blotting, using the anti rN $\Delta_{85}$  monoclonal antibody as reference. On the sensorchip tests was observed that VHH, KC329708 clone, presented a  $KD=5,52 \times 10^{-6}$ (M) and about 10RU, compared with the monoclonal antibody which showed a  $KD=3,38 \times 10^{-6}$ (M) and 3,5RU, demonstrating that VHH KC329708 presents a significant increased affinity to rN $\Delta_{85}$ , compared to the anti-rN $\Delta_{85}$  murine monoclonal antibody. The results of this study support the idea of using this VHH as input for diagnosis of Hantavirus infections due to its affinity to rN $\Delta_{85}$ . Also, due to the features displayed by nanobodies, it's suggested their use as intrabodies for tracking and inhibition of hantavirus N proteins during infection and viral replication.

Keywords: Nanobody, VHH, *Phage Display*, Hantavirus, Araucaria strain.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Partícula viral.....	18
Figura 2.	Replicação viral.....	21
Figura 3.	Estrutura de fago filamentos.....	28
Figura 4.	Estrutura dos anticorpos convencionais e de cadeia pesada dos camelídeos.....	32
Figura 5.	Vetor fagomídeo.....	41
Figura 6.	Etapas de seleção por <i>Biopanning</i> .....	46
Figura 7.	Monitoramento da resposta imune dos camelídeos.....	57
Figura 8.	Amplificação do segmento do VH e VHH dos anticorpos de camelídeo.....	58
Figura 9.	Amplificação das regiões codantes do VHH das IgG2 e 3 de camelídeos e Purificação.....	59
Figura 10.	PCR de colônia para confirmação de recombinação gênica.....	60
Figura 11.	Capacidade de reconhecimento dos VHHs clones selecionados após primeiro <i>biopanning</i> por ELISA.....	60
Figura 12.	PCR de colônia para confirmação da presença do VHH em clones selecionados a partir do segundo <i>Biopanning</i> .....	61
Figura 13.	Especificidade de reconhecimento dos clones após segundo <i>biopanning</i> selecionados por ELISA.....	62
Figura 14.	Especificidade de reconhecimento dos clones após segundo <i>biopanning</i> selecionados por ELISA.....	62
Figura 15.	Análise de especificidade dos clones selecionados por ELISA após <i>biopanning</i> contra o vírus vacinal da febre amarela 17DD.....	63
Figura 16.	Alinhamento e modelagem.....	64
Figura 17.	Eletroforese em gel desnaturante de produto VHH após purificação.....	66
Figura 18.	Teste de especificidade por Imunoensaios.....	67
Figura 19.	Análise da especificidade de reconhecimento do mAbs a proteína rAN <sub>85</sub> por RPS.....	68
Figura 20.	Análise da especificidade de reconhecimento do VHH a proteína rAN <sub>85</sub> por RPS.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP - Antibiótico ampicilina  
BSA – Albumina bovina sérica  
CDR - Região determinante de complementaridade  
CH – Região constante da cadeia pesada do anticorpo  
CIAP - Fosfatase alcalina do intestino de vitelo  
CL – Região constante da cadeia leve do anticorpo  
DEPC - Dietilpirocarbonato  
DOBV - vírus Dobrava  
DTT – Ditioneitol  
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção de Ligação Enzimática  
F(ab')<sub>2</sub> - Fração de ligação ao antígeno ligados por pontes dissulfeto  
Fab - Fração de ligação ao antígeno  
FHSR - Febre hemorrágica com síndrome renal  
Fv - Fração variável do anticorpo  
GLU – Glicose  
HCAs – Anticorpos de cadeia pesada  
HPS - Síndrome pulmonar causada por hantavírus  
HTNV- Hantaan vírus  
IPTG - Isopropil-β-D-thiogalactopiranosídeo  
KANA - Antibiótico kanamicina  
KHF - Febre hemorrágica da Coreia  
M13KO7 – Fago auxiliar  
PBS - Tampão fosfato-salino  
PBST - Tampão fosfato-salino – tween 20  
PEG – Polietilenoglicol  
pHEN1– Vetor fagomídeo  
PUUV - Puumalavírus  
rN<sub>85</sub> – Proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus  
RNP - Complexos ribonucleoproteicos  
SB - Solução de bloqueio

scFv - Fração variável de cadeia única da imunoglobulina G

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SNV - Vírus SinNombre

SPCH - Síndrome cardiopulmonar causada por hantavírus

TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

VH - Domínio variável da cadeia pesada

VHH - Domínio variável único de cadeia pesada

VL - Domínio variável da cadeia leve

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 Hantavirose: histórico e agente etiológico.....	15
1.2 Hospedeiro e transmissão .....	16
1.3 Estrutura viral e genoma.....	17
1.4 Replicação viral .....	19
1.5 A Síndrome Cardiopulmonar causada por Hantavírus .....	21
1.6 Epidemiologia.....	23
1.7 Diagnóstico.....	24
1.8 Tratamento.....	26
1.9 Tecnologia <i>Phage Display</i> e sua aplicabilidade .....	27
1.10 Nanocorpos de camelídeos .....	30
<b>1.10.1 Nanocorpos: estrutura e aplicabilidade</b> .....	<b>30</b>
<b>2. OBJETIVOS:</b> .....	<b>35</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>3. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 Imunização dos animais e titulação dos anticorpos por ELISA .....	36
3.2 Construção da biblioteca primária de VHH .....	37
<b>3.2.1 Isolamento de linfócitos periféricos</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2.2 Extração de RNA total</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2.3 Síntese do cDNA</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.4 Reação em cadeia da polimerase para amplificação da região variável da cadeia pesada (VHH)</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.5 Tratamento com endonucleases de restrição e síntese do DNA recombinante</b> ....	<b>40</b>
<b>3.2.6 Transformação em <i>E.coli</i> TG1 para confecção da biblioteca primária de VHH</b> <b>41</b>	<b>41</b>
3.3 Mutagênese para inserção de 6XHistag em vetor fagomídeo pHEN1 .....	42
3.4 Expressão dos VHHs na superfície de bacteriófagos .....	43
3.5 Purificação e titulação da biblioteca de fagos .....	44
3.6 Seleção de VHHs anti proteína rN $\Delta_{85}$ pela metodologia de <i>biopanning</i> .....	45
3.7 Verificação da especificidade dos clones anti-rN $\Delta_{85}$ .....	47
3.8 Extração plasmidial dos clones selecionados por ELISA .....	48
3.9 Sequenciamento e modelagem .....	48
3.10 Análise da interação entre a proteína rN $\Delta_{85}$ com produtos de expressão do VHH por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).....	49
<b>3.10.1 Para a imobilização</b> .....	<b>50</b>
<b>3.10.2 Testes preliminares para análise da interação</b> .....	<b>50</b>
3.11 Verificação do reconhecimento do clone VHH a proteína rN $\Delta_{85}$ .....	51
3.13 Purificação do VHH por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel.....	52
3.14 Ensaios de imunodeteção para verificação da capacidade de reconhecimento do VHH purificado anti proteína rN $\Delta_{85}$ por ELISA e <i>western blotting</i> .....	53
3.15 Cinética de interação por Ressonância Plasmônica de Superfície (SRP).....	55
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
4.1 Titulação de anticorpos induzida por imunização por ensaio imuno enzimático (ELISA) .....	57

4.2 Transcriptase reversa e Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação da região variável da cadeia pesada (VHH) .....	58
4.3 Verificação da capacidade de reconhecimento dos clones VHHs a proteína rN $\Delta_{85}$ .....	59
4.4 Sequenciamento e análise das amostras .....	63
4.5 Expressão e purificação do VHH clone KC329708 por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.....	65
4.6 Verificação de afinidade do VHH purificado anti proteína rN $\Delta_{85}$ por ELISA e <i>western blotting</i> .....	66
4.7 Verificação da afinidade do VHH por Ressonância Plasmônica de Superfície .....	67
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>77</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>
<b>9. ANEXO.....</b>	<b>96</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Hantavirose: histórico e agente etiológico

As síndromes febris hemorrágicas associadas aos hantavírus foram descritas inicialmente em meados dos anos 50 durante a Guerra da Coreia. A doença caracterizava-se pelo acometimento hemorrágico renal e foi responsável pela morte de milhares de soldados americanos (LEE et al., 1989). Apesar de estudos prévios buscando identificar o agente causador da doença, somente em 1976 a etiologia viral desta patologia foi confirmada. Com o isolamento do vírus a partir de tecido pulmonar do roedor silvestre, *Apodemus agrarius*, encontrado às margens do rio Han, na Coreia do Sul, o agente protótipo foi denominado de vírus Hantaan (HTNV) (LEE HW et al., 1978; LEE et al., 2004). A identificação da etiologia da doença contribuiu significativamente para os estudos relacionados à transmissão e identificação dos reservatórios relacionados às febres hemorrágicas com síndromes renais (FHSR) no Velho Mundo.

O agente etiológico pertence à família Bunyaviridae, do gênero Hantavírus. Os membros desta família são sorologicamente e filogeneticamente relacionados e, dependendo das manifestações clínicas, distribuição epidemiológica e diversidade genética, podem ser subdivididos em genótipos cuja linhagem correspondeem geral aos locais onde foram isolados (FERREIRA, 2000; SCHMALJOHN; HJELLE, 1997).

Nas Américas, as infecções com acometimento pulmonar relacionadas aos hantavírus foram registradas em 1993, na região de *Four Corners*, sudeste dos Estados Unidos. De acordo com os quadros clínicos e epidemiológicos em humanos ou em roedores, bem como a virologia do agente infeccioso concluiu-se que a patologia se tratava de uma nova febre hemorrágica viral americana, denominada Síndrome Pulmonar causada por Hantavírus (HPS) (HJELLE et al., 1994). Devido ao acometimento vascular pelo vírus, HPS foi substituído por Síndrome Cardiopulmonar causada por Hantavírus (SCPH) (HALLIN et al., 1996; PETERS et al., 1999).

Após a identificação da SCPH, quadros clínicos relacionados às infecções por hantavírus foram identificados na América do Norte, Central e Sul (JOHNSON et al., 1999; NICHOL et al., 1993).

As hantavirose apresentam-se como infecções agudas sobre as formas de Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) classificada como do Velho Mundo, responsáveis

por causar infecções na Europa e Ásia, com uma taxa de letalidade de até 15% (MAES et al., 2004; VAPALAHTI et al., 2003) e Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SCPH), considerada como infecções do Novo Mundo, sendo reconhecida como entidade clínica desde 1993, representando o protótipo das doenças emergentes distribuída em diversos países do continente americano, inclusive o Brasil, com uma taxa de letalidade e até 60% (FERREIRA, 2003; JONSSON et al., 2010).

## 1.2 Hospedeiro e transmissão

Nas Américas, os hospedeiros reservatórios naturais de Hantavírus pertencem à ordem Rodentia, família Muridae e subfamília Sigmodontinae, classificados como ratos do novo mundo (SCHMALJOHN; HJELLE, 1997; ZHAO; HAY, 1997).

Além dos roedores, a identificação de possíveis hospedeiros do hantavírus foi ampliada pela descoberta de que morcegos insetívoros, da ordem *Chiroptera*, também são reservatórios do vírus (SUMIBRAY et al., 2012; WEISS et al., 2012).

A relação entre a densidade populacional e a prevalência dos hantavírus na população de roedores está diretamente relacionada ao número de casos de hantavírus em humanos em todo o mundo (TERSAGO et al., 2011). De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (CITV), cada hantavírus está predominantemente associado a uma determinada espécie de reservatórios primários ou subespécies (HEPOJOKI et al., 2012; KING et al., 2011).

Na natureza, em contraste com as infecções causadas aos seres humanos, os hantavírus causam infecções assintomáticas e persistentes em roedores, presumivelmente ao longo de sua vida, permanecendo cronicamente infectados e secretando o vírus (MEYER; SCHMALJOHN, 2000; HARDESTAM et al., 2008).

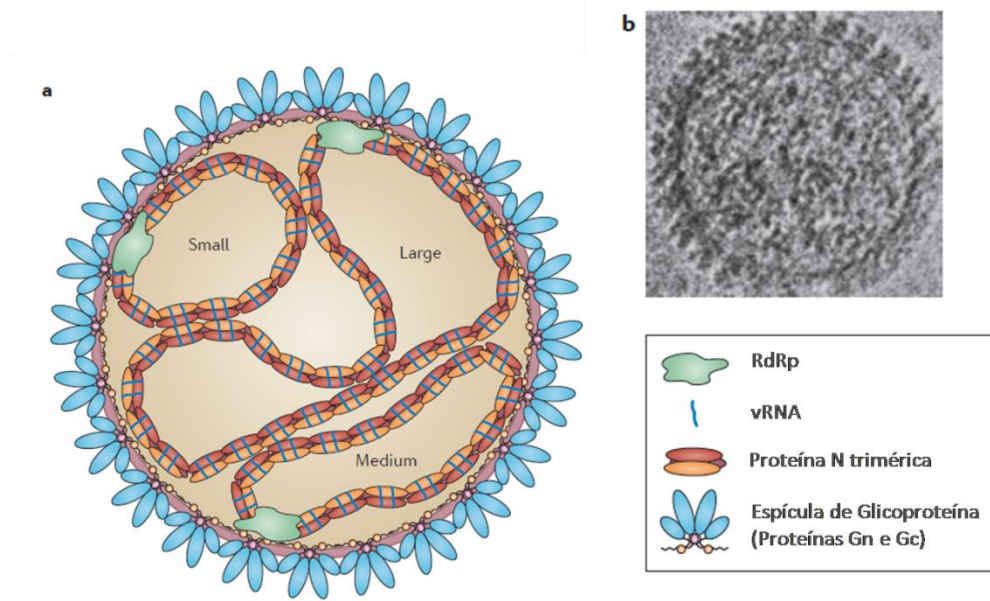
A transmissão aos humanos acontece por meio de inalação de aerossóis, a partir de urina, fezes e saliva destes animais, ou por contato direto do vírus em pele lesada, escoriações ou mordedura de ratos (HARDESTAM et al., 2008; JONSSON et al., 2010). Os seres humanos são considerados os hospedeiros finais do hantavírus (VAHERI et al., 2011; WELL et al., 1997). No entanto, existem relatos descrevendo a transmissão do hantavírus inter-humanos na Argentina e no Chile (PADULA et al., 1998; WELLS et al., 1996; TORO et al., 1998).



### 1.3 Estrutura viral e genoma

Os hantavírus são vírus envelopados com cerca de 80-120nm de diâmetro, apresentam um genoma de RNA fita simples, polaridade negativa, constituído por três segmentos: *Small* (S), *Medium* (M) e *Large* (L) (SCHMALJOHN;DALRYMPLE, 1983) (Fig.1). O tamanho total dos genomas de RNA variam de 11.845 nucleotídeos para cepa Hantan (HTNV) a 12.317 nucleotídeos para cepa Sin Nombre Vírus (SNV), hantavírus do Velho e Novo mundo, respectivamente (HOOPER; SCHMALJOHN, 2001; JONSSON et al., 2010; SCHMALJOHN et al., 1985).

O segmento L, varia entre 6,5 a 6,6 kb e codifica a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (~250kDa). O RNA fita negativa serve como molde para síntese da fita sentido positivo complementar de RNA (cRNA) e RNA mensageiro (mRNA). O segmento M, apresenta peso molecular que varia de 3,7 a 5,6 kb, que codifica a proteína precursora glicoproteína(GPC),o qual é clivado para produzir duas glicoproteínas de superfície, Gn(~70kDa) e Gc (~50kDa) (ELLIOTT,1996), anteriormente conhecidas como G1 e G2 apresentando por volta de 1700 a 1430 pb, respectivamente (SCHMALJOHN et al., 1987). O segmento S varia entre 1,7 a 2,1kb e codifica a proteína do nucleocapsídeo N (~50kDa), responsável por formar o nucleocapsídeo viral (HART; BENNETT, 1999; SCHMALJOHN; PATTERSON, 1991).O RNA viral trisegmentado é revestido como proteína N formando três complexos ribonucleoproteicos helicoidais (RNP). A RdRp viral fica associada a este nucleocapsídeo (DAHLBERG et al., 1977 apud HUSSEIN et al., 2011; HEPOJOKI et al., 2012).



**Figura 1.** Partícula viral: **a.** Representação esquemática do vírion. O genoma dos hantavírus é constituído por três segmentos (S, M e L) de RNA, revestido com espículas de glicoproteínas; **b.** Partícula viral visualizada por microscopia crioeletrônica. Adaptado: VAHERI et al., 2013.

### 1.3.1 Proteína do nucleocapsídeo (N)

A proteína N é o componente viral mais abundante e a proteína mais conservada entre as espécies de hantavírus, é considerada uma molécula multifuncional envolvida nas etapas relacionadas à replicação, encapsidação do RNA e montagem viral (KAUKINEN et al., 2005). É uma proteína não glicosilada expressa no citoplasma que contém cerca de 429 a 433 resíduos de aminoácidos (HUSSEIN et al., 2011). O domínio de ligação ao RNA inclui os aminoácidos de 175 a 217 localizados na região central da molécula, sendo altamente conservado (SEVERSON et al., 2005; XU et al., 2002).

A formação da ribonucleoproteína (RNP) depende da associação do RNA viral com múltiplas cópias da proteína N, de modo que o RNA viral se torna encapsidado em todo o seu comprimento, uma atividade que depende das interações homotípicas entre monômeros adjacentes da proteína N (MOHL; BARR, 2009). Tanto o domínio C-terminal quanto o N-terminal da proteína N contribuem para a oligomerização (ALFADHLI et al., 2001; KAUKINEN et al., 2004; MIR; PANGANIBAN, 2004).

Uma das principais funções relacionadas à proteína N é a manutenção da uniformidade estrutural do genoma do RNA, no entanto, apresentam algumas funções adicionais, que são igualmente importantes para o ciclo de vida do vírus, incluindo a interação

das glicoproteínas de membrana com as RdRp virais que permite o acesso ao RNP durante a síntese de RNA (HEPOJOKI et al., 2010; OVERBY et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009). Além de apresentar, uma atividade intrínseca de RNA chaperona, o que é importante para a encapsidação e a replicação do genoma viral (MIR; PANGANIBAN, 2006).

Nas células infectadas com o hantavírus, a proteína N é expressa em excesso, formando agregados e estruturas filamentosas no citoplasma (RAVKOV et al., 1998; VAPALAHTI et al., 1995). Devido a sua característica imunogênica, a sua apresentação na forma recombinante vem sendo utilizada como antígeno para o diagnóstico específico das infecções por hantavírus, podendo induzir uma forte resposta imune protetora em modelos animais (GELDMACHER et al., 2004; MAES et al., 2006; MEISEL et al., 2006; SCHMALJOHN et al., 1990). Seus epítomos antigênicos estão distribuídos por toda a molécula, sendo que os principais estão localizados na região N-terminal da proteína (LUNDKVIST et al., 1996; VAPALAHTI et al., 1996). O uso dessa proteína é favorecido por suas características estruturais, além de sua disponibilidade, como relatado por Meisel e colaboradores (2006) que destacaram a possível detecção dos anticorpos específicos contra a proteína N logo no início da infecção por hantavírus em humanos e, ainda, a continuidade dessa possibilidade por um longo período, até mesmo ao longo da vida. A sua eficiente expressão em bactérias, leveduras e células de insetos as tornam excelentes candidatas para o desenvolvimento de testes de imunodeteção (MEISEL et al., 2006).

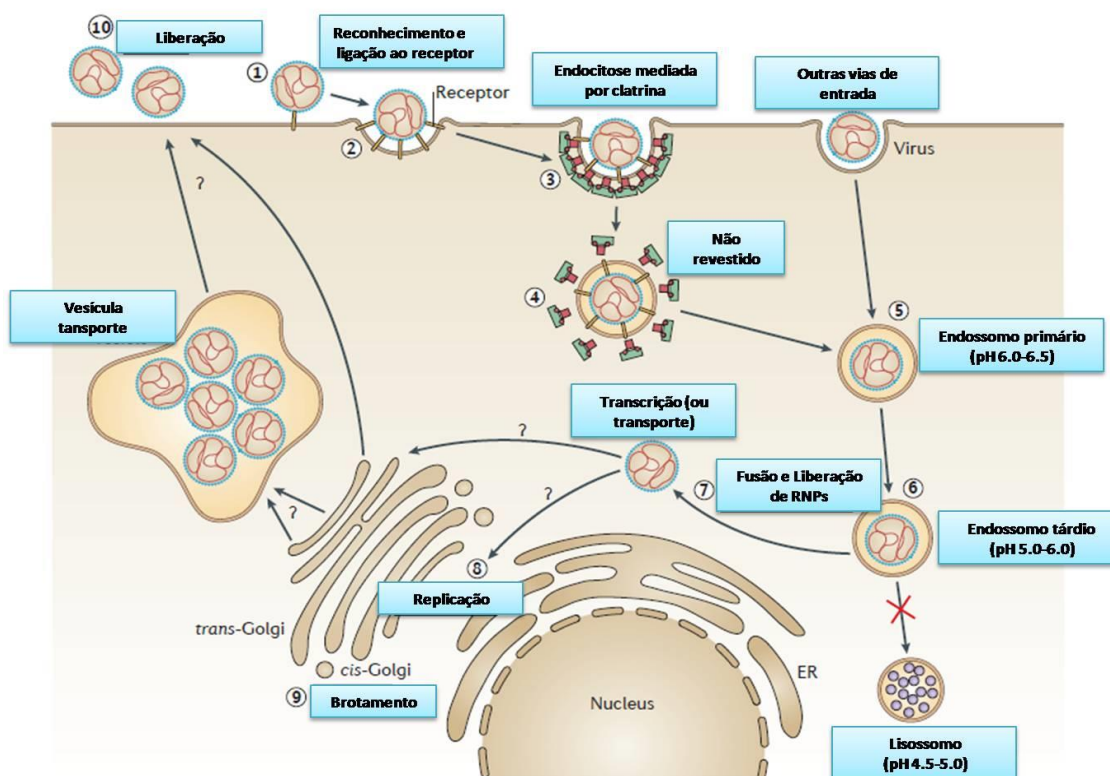
#### 1.4 Replicação viral

Os hantavírus infectam diferentes linhagens celulares, incluindo células endoteliais, macrófagos, células dendríticas e linfócitos. O ciclo de replicação se inicia com a adesão dos hantavírus às células-alvo a partir das glicoproteínas virais com receptores de integrinas, como demonstrado primeiramente por Gavrilovskaya e colaboradores (1998). O tipo de receptor está associado com as diferenças na patogenicidade, ou seja, hantavírus patogênicos ligam-se às  $\beta 3$  integrinas, enquanto  $\beta 1$  integrina é utilizado como receptor de hantavírus não patogênico. O uso diferencial destes receptores pode ter implicações na patogênese da SCPH. Como  $\beta 3$  integrinas estão presentes nas plaquetas e células endoteliais, a interação com estas proteínas pode estar relacionada com a regulação da permeabilidade vascular, e ativação de adesão plaquetária (GAVRILOVSKAYA et al., 2010; MACKOW; GAVRILOVSKAYA, 2001).

Nos hantavírus do Velho Mundo, como o vírus protótipo HTNV, a endocitose é mediada por clatrininas (JIN et al., 2002). Em contraste, hantavírus do Novo Mundo, apresentam evidências de que utilizam mais de uma via para penetração intracelular, de forma semelhante a outros *Bunyavirus* (LOZACH et al., 2009).

A descapsidação viral acontece após fusão da membrana viral à membrana endossomal, dependente da acidificação intravesicular, resultando na liberação dos nucleocapsídeos virais no citoplasma da célula, dando início ao processo de transcrição primária dos genes virais (CIFUENTES-MUNOZ et al., 2011; TISCHLER et al., 2005).

A RNA polimerase dependente de RNA é ativada e transcreve os três segmentos do RNA viral (vRNA) enquanto ainda estão associados com seus nucleocapsídeos. O processo de tradução dos segmentos L e S ocorre nos ribossomos livres e dos RNAm do segmento M em ribossomos ligados à membrana. A glicoproteína precursora é clivada intrinsecamente, gerando duas glicoproteínas, G<sub>n</sub>G<sub>c</sub>, respectivamente (LOBERET et al., 2000; RUUSALA et al., 1992). Após rodadas iniciais de transcrição, os RNAs virais genômicos são convertidos em moldes pelas RdRp, que são encapsidados pela proteína N viral para formar três nucleocapsídeos. No entanto, os mecanismos moleculares que regem o reconhecimento específico e encapsidação do genoma viral pela proteína N, transporte dos nucleocapsídeos do Golgi, e brotação de vírions nascentes dentro e fora do complexo de Golgi ainda são desconhecidos. Acredita-se que as glicoproteínas do vírus são responsáveis por determinar o local da montagem do vírus e brotamento. As glicoproteínas G<sub>n</sub> e G<sub>c</sub> dos hantavírus do Novo Mundo acumulam-se no Golgi, mas, eventualmente, podem também ser detectadas na superfície da célula (OGINO et al., 2004; SPIROPOULOU et al., 2003). Devido a essas observações, acredita-se que os hantavírus podem ter como locais de maturação o Golgi e a superfície da célula (GOLDSMITH et al., 1995; RAVKOV et al., 1997; SPIROPOULOU, 2001). Logo após a clivagem das glicoproteínas G<sub>c</sub> e G<sub>n</sub> no retículo endoplasmático rugoso e o seu acúmulo nas membranas do complexo de Golgi, onde acontece a glicosilação terminal e a associação com os nucleocapsídeos, por não possuírem proteína matriz, é provável que ocorra interação direta entre os nucleocapsídeos e as proteínas do envelope viral localizados no lúmen das vesículas (HUTCHINSON et al., 1996). Os vírions brotam das cisternas do Golgi e são transportados em vesículas que se fundem com a superfície basolateral da membrana citoplasmática, liberando as partículas virais por exocitose (HART; BENNETT, 1999; SCHMALJOHN; PATTERSON, 1991) (Fig.2).



**Figura 2: Replicação viral.** 1. Reconhecimento do epítipo de ligação na superfície da célula; 2. Sinalização para iniciar endocitose; 3. O vírion entra na célula em vesícula revestida por clatrina. Outras vias de entrada também podem ser observadas em alguns hantavírus; 4. Nas infecções por endocitose mediada por clatrina, o revestimento de clatrina da vesícula é desfeito; 5. A vesícula do vírion penetra no endossomo primário do hospedeiro; 6. Amadurecimento em um endossomo tardio; 7. A fusão entre as membranas viral e do endossomo é induzida por mudanças conformacionais após a acidificação endossomal, resultando na libertação das ribonucleoproteínas virais (RNPs) (passo 7). A transcrição inicial pode acontecer no local de libertação, ou alternativamente, as RNPs podem ser transportadas para o compartimento intermédio ER-Golgi (ERGIC) para a transcrição. É possível também, que os vírus sejam transportados diretamente para o complexo de Golgi; 8. A replicação viral, pode ocorrer em locais de síntese, localizados no ERGIC ou o cis-Golgi; 9. Acredita-se que o brotamento se dá no cis-Golgi, a partir de onde são transportados para a membrana plasmática para a liberação, presumivelmente através da reciclagem de endossomos; 10. A saída dos vírions ocorre na membrana plasmática. Adaptado: VAHERI et al., 2013.

### 1.5 A Síndrome Cardiopulmonar causada por Hantavírus

A SCPH é uma doença emergente com descrição crescente de casos no Brasil nos últimos anos. O primeiro caso foi registrado em 1993 na região do Vale do Ribeira em Juitituba, no estado de São Paulo (DA SILVA et al.; 1997; VASCONCELOS et al., 1997). A cepa identificada foi denominada de vírus Juitituba (JUQV), usando como referência a cidade onde ocorreu o primeiro caso. Três novos casos de SCPH foram confirmados entre os anos de 1995 e 1996, por ensaio imunoenzimático (ELISA). Sendo o caso proveniente do Vilarajo no Estado do Mato Grosso foi identificado Castelo dos Sonhos (CASV) (JOHNSON et al., 1999). Os outros dois casos registrados ocorreram no sudeste do Estado de São Paulo em

1996, nas cidades de Araraquara e Franca. Após o isolamento e análise filogenética dessas amostras, ficou evidenciado que se tratava de uma nova cepa circulante de hantavírus, denominado de Araraquara (ARAV) (JOHNSON et al., 1999; SUZUKI et al., 2004). A partir da análise de tecido de roedores silvestres capturados na região norte do Brasil durante o ano de 2003 foi possível identificar as cepas Anajatuba (ANAJV) e Rio Mamoré (RIOMV) (ROSA et al., 2005). Uma nova cepa circulante no Estado do Paraná, denominada de Araucária, foi identificada por Raboni e colaboradores (2005). A cepa foi isolada a partir do soro de pacientes e a caracterização genômica da nucleoproteína do hantavírus permitiu a identificação (RABONI et al., 2005).

As infecções por SCPH apresentam um período de incubação que pode durar até 5 semanas e infecções subclínicas ou oligossintomáticas são comuns (BHARADWAJ et al., 2000; YOUNG et al., 2000). O tempo de incubação antes do aparecimento dos sintomas é tipicamente de 2-3 semanas, no entanto, períodos de tempo variando entre 1-6 semanas foram relatados (KRÜGER et al., 2011). O paciente desenvolve um quadro semelhante à influenza, apresentando febre e complicações pulmonares, evoluindo rapidamente da forma clássica para a forma respiratória grave (LEMOES; SILVA, 2005; McCAUGHEY; HART, 2000). A SCPH caracteristicamente apresenta quatro estágios: febre prodrômica, fase cardiopulmonar, diurese e convalescença (PETERS; KHAN, 2002).

No período prodrômico, que pode durar de 3-6 dias, observam-se frequentemente febre, mialgias, náuseas e diarreia. Mais raramente são relatados vômitos, cefaléia, dor abdominal, dor torácica, sudorese, vertigem, tosse e dispnéia (NICHOL, 2001; PETERS; KHAN, 2002).

O início da fase cardiopulmonar pode durar em torno de 2-10 dias, a doença progride rapidamente aparecendo tosse e dispneia. Nesta fase, surge a insuficiência respiratória que se manifesta por taquipneia, dispneia, hipoxemia e taquicardia. Concomitante a isto, surge a hipotensão que pode evoluir para o choque e consequente depressão miocárdica. Portanto, trata-se de uma doença que resulta em grave acometimento pulmonar e cardiovascular que pode levar o paciente a óbito (FIGUEIREDO et al., 2001). Geralmente, há uma rápida descompensação, onde 30%-40% dos pacientes morrem de 24-48h após a admissão, mesmo bem assistidos em unidades de cuidados intensivos (UTIs) (PETERS; KHAN, 2002).

De acordo com relatos, as formas clínicas de infecção por hantavírus na América do Sul, na fase cardiopulmonar incluem apresentações clínicas que variam de infecções

assintomáticas e formas leves de doença a SCPH. A ocorrência de acometimento renal foi observada em muitos casos. Entre 30% e 70% dos casos causados por vírus *Andes* apresentaram transtornos hemorrágicos de magnitude variável e 6% desenvolveram insuficiência renal, necessitando de diálise transitória (SOSA-ESTANI et al., 2001; SOTOMAYOR; AGUILERA, 2000).

A coalescência dos pacientes com SCPH, especialmente daqueles que foram submetidos à ventilação mecânica, é frequentemente prolongada. A avaliação tardia destes pacientes pode resultar em seqüelas, tais como fadiga crônica e restrição da função pulmonar (FIGUEIREDO et al., 2001).

### 1.6 Epidemiologia

As hantavíroses compreendem uma ameaça global emergente de saúde pública, afetando cerca de 30.000 seres humanos anualmente (WATSON et al., 2013). A epidemiologia das infecções por hantavírus em populações humanas é baseada em casos de exposição peridoméstica de seres humanos a roedores em áreas de endemicidade. Em decorrência de atividades rurais, fatores de risco associado à agricultura e desmatamento fazem com que os humanos acabem por entrar em contato com os roedores reservatórios (SIMPSON et al., 2010). Fatores ambientais, tais como mudanças ecológicas e alterações climáticas, estão relacionados às flutuações nas populações de roedores e, conseqüentemente, às epidemias humanas (WATSON et al., 2013).

A SCPH constitui um problema de saúde pública, especialmente na América do Sul, onde um número crescente de casos de SCPH é relatado a cada ano (ZHENQIANG et al., 2008). Desde a sua notificação nos Estados Unidos em 1993, casos clínicos vem sendo confirmados na Argentina, Bolívia, Venezuela, Brasil, Canadá, Chile, Panamá, Paraguai, Estados Unidos e Uruguai (NICHOL et al., 1993; PADULA et al., 2000; WEIR, 2005).

Atualmente, no Brasil, são notificados casos da doença em todas as regiões brasileiras. Foram confirmados pelo Ministério da Saúde, de 1993 a 2012, 1573 casos de hantavirose com letalidade de 41% (BRASIL, 2012). No estado de Rondônia em 2013 de 13 casos confirmados de infecções por hantavírus 11 evoluíram para a letalidade (SVS, 2013). No entanto, a falta de diagnóstico na fase aguda da infecção poderia explicar a disparidade entre a soroprevalência e os casos clínicos relatados em todo o mundo (WATSON et al.,

2013). Vale a pena ressaltar que ainda existem vários estados que não possuem dados sobre as infecções causadas por hantavirus.

### 1.7 Diagnóstico

As hantavirose podem ser detectadas por vários testes moleculares ou técnicas imunológicas (RABONI et al., 2007). O diagnóstico das infecções por hantavírus são realizados em sua grande maioria por meio de testes sorológicos imunoenzimáticos (ELISA) onde podem ser identificados anticorpos específicos das classes IgM e IgG (FIGUEIREDO et al., 2008; LOMONGI et al., 2009). Vários formatos de ELISA foram desenvolvidos para melhorar a sensibilidade e especificidade deste método (RABONI et al., 2005). Ensaio para detecção das infecções por hantavírus utilizando proteínas recombinantes do nucleocápsideo de hantavírus cepa Hantaan 76-118 (sorotipo Hantaan) e glicoproteínas 18-20 (sorotipo Puumala) como antígenos para diagnóstico, assim como o uso de mAbs específicos foram desenvolvidos inicialmente por Zöller e colaboradores (1993).

Para o diagnóstico sorológico das infecções por hantavírus, realizado nos laboratórios brasileiros de saúde pública, é utilizada como antígeno a nucleoproteína recombinante do hantavírus (PADULA et al., 2000).

Uma variedade de testes foi proposta para diagnóstico dos hantavírus brasileiros, fortalecido por registros anteriores de que o desenvolvimento de ensaios contendo regiões antigênicas específicas otimizam a reatividade sorológica (PADULA et al., 2000; SCHMIDT et al., 2005). Trabalhos como de Moreli (2005) baseado na cepa Araraquara isolada em São Paulo, e de Raboni e colaboradores (2007) a partir da cepa Araucária, isolada no Paraná, demonstram o desenvolvimento de ensaios utilizando a proteína N recombinante. O kit diagnóstico de ELISA indireto desenvolvido pelo Instituto Carlos Chagas (ICC/PR) utilizando a proteína rN<sub>Δ85</sub> da cepa Araucária como antígeno (kit ICC EIE IgG e IgM HANTEC), apresentou uma sensibilidade de 94,1% e uma especificidade de 99,1% para detecção de IgM, e para detecção de anticorpos IgG apresentou uma sensibilidade de 95,2% e uma especificidade de 98,4%. O kit foi submetido a um processo de validação utilizando amostras de soro humano e de roedores de todas as regiões do Brasil e América do Sul, e atualmente é utilizado nos laboratórios de referência para a identificação das infecções por hantavírus (RABONI, et al 2007). Ainda, a partir da proteína rN<sub>Δ85</sub>, Mazzaroto e colaboradores (2009)



desenvolveram e caracterizaram anticorpos monoclonais (mAbs) anti-rN<sub>85</sub> para o auxílio no diagnóstico das infecções por hantavírus.

O isolamento viral em cultura celular seguido por testes de redução/neutralização em placas (PNRT) permite a identificação específica do hantavírus. O isolamento primário dos hantavírus é usualmente realizado pela inoculação em culturas de células Vero, clone E6, oriundas de rins do macaco verde africano, que são consideradas as mais susceptíveis. Os hantavirus replicam-se lentamente, alcançando a produção máxima da progênie entre 5 e 14 dias. Uma vez que a replicação do vírus apresenta pouco ou quase nenhum efeito citopático (PETERS, 1999), a infecção precisa ser confirmada por imunofluorescência indireta ou RT-PCR após duas semanas da inoculação (GALENO et al., 2002; LEE et al., 1985). A restrição desta metodologia diagnóstica se deve ao grau de patogenicidade e virulência dos hantavírus, conferindo alto risco de contaminação na manipulação viral. Para isso, o manuseio das amostras clínicas e o isolamento viral devem ser realizados em laboratórios especiais de biossegurança nível três (*Bio Safety Level 3*), adequados ao trabalho com agentes altamente patogênicos e potencialmente letais. Outro fator de restrição à técnica de isolamento são os aspectos relacionados à viremia, que precede o aparecimento dos sintomas e desaparecem rapidamente após o surgimento dos anticorpos neutralizantes, que podem estar presentes na fase assintomática da doença (LEDNICKI, 2003).

As técnicas moleculares de transcrição reversa seguidas de ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) constituem métodos rápidos de caracterização genética viral, permitindo a identificação espécie/específica do vírus. A técnica pode ser utilizada na detecção viral de uma infecção antes que os sintomas se tornem mais graves. Em trabalho descrito por Galeno e colaboradores (2002) foi possível isolar o RNA viral do vírus Andes por RT-PCR a partir do soro de um paciente chileno de 10 anos, assintomático, que foi a óbito após desenvolver SCPH. A técnica de RT-PCR pode ser efetuada após extração de RNA, diretamente do sangue total ou soro de pacientes com suspeita de SCPH (FIGUEIREDO et al., 2009; RABONI et al., 2009), saliva ou materiais extraído de roedores, sendo possível a detecção do genoma viral (PETTERSSON et al., 2008; ZOU et al., 2008).

A técnica de RT-PCR em tempo real ou PCR quantitativo também é utilizada e permite a distinção entre os vírus responsáveis pela FHSR e aqueles causadores da SCPH, cujos sintomas iniciais podem ser confundidos por apresentarem similaridade. A técnica ainda permite a determinação da carga viral, que poderá eventualmente ser correlacionada com a

evolução clínica e prognóstica, podendo contribuir para a definição de estratégias terapêuticas adequadas (AITICHOU et al., 2005).

A detecção imuno-histoquímica de antígenos do hantavírus tem sido particularmente útil para estabelecer o diagnóstico retrospectivo de SCPH de amostras de tecidos fixados (PETERS et al., 1999). Assim como as técnicas baseadas em micro-arranjos de alta densidade de DNA podem ser utilizadas para a identificação e caracterização de grande variedade de hantavírus, dependendo diretamente das informações de seqüenciamento genético e da caracterização do maior número de hantavírus possível (NORDSTROM et al., 2004).

### 1.8 Tratamento

Nenhuma terapia antiviral específica está atualmente disponível para o tratamento de infecções por hantavírus. O tratamento de pacientes infectados, apresentando a SCPH, se baseia exclusivamente de suporte em tratamento em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI), com monitoramento da oxigenação, balanço dos fluídos e da pressão arterial, além da diálise e da ventilação mecânica ou oxigenação extracorpórea, até que o vírus seja eliminado pelo sistema imune (FIGUEIREDO et al., 2001; MAES et al., 2009; MURÁNYI et al., 2005).

A ribavirina tem demonstrado atividade antiviral tanto *in vitro* como *in vivo*, na inibição da replicação dos hantavírus (HUGGINS et al., 1986; MEDINA et al., 2007). Em ensaio clínico verificou-se a diminuição dos títulos de vírus, morbidade e mortalidade em pacientes chineses com FHSR do Velho Mundo (HUGGINS et al., 1991). Porém a eficácia ocorre somente quando administrada na fase inicial da infecção, ou seja, nos primeiros cinco dias após o início dos sintomas (HUGGINS et al., 1991). Estudos realizados nos EUA e no Brasil não mostraram resultados clínicos benéficos, após a administração dessa droga em pacientes com SCPH (CHAPMAN et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 2001; MERTZ et al., 2004).

Ainda não há descrição de nenhuma vacina capaz de fornecer proteção cruzada, e que possa conseqüentemente cobrir todas as infecções causadas por diferentes hantavírus. No entanto, têm sido desenvolvidas, na Coréia e na China, pesquisas com vacinas inativadas com cepas de hantavírus do Velho Mundo. A vacina inativada com formalina HTNV(Hantavax<sup>TM</sup>) desenvolvida pelo *Rhein Biotech Group*, contra o vírus Hantaan, derivada de cérebro de camundongo é utilizada na Coréia desde a década de 90 (CHO et al., 2002). Estudos demonstraram eficácia desta vacina em que 97% dos voluntários humanos, que após

administração da vacina desenvolveram títulos elevados de anticorpos neutralizantes específicos, a partir de uma dose de reforço. Entretanto, a resposta imune humoral induzida foi de curta duração (CHO;HOWARD, 1999). Outra vacina inativada com formalina, produzida a partir de suspensões de células Vero, foi responsável pelo desenvolvimento de anticorpos neutralizantes em camundongos, o qual foi cinco vezes mais elevado do que Hantavax<sup>TM</sup> (CHOI et al., 2003). No entanto, seria improvável que estas vacinas possam proporcionar proteção contra todos os hantavírus. Essas vacinas foram capazes de induzir uma forte resposta imune humoral, porém a resposta neutralizante foi mantida por um curto período de tempo (DONG et al., 2005; CHOI et al., 2003).

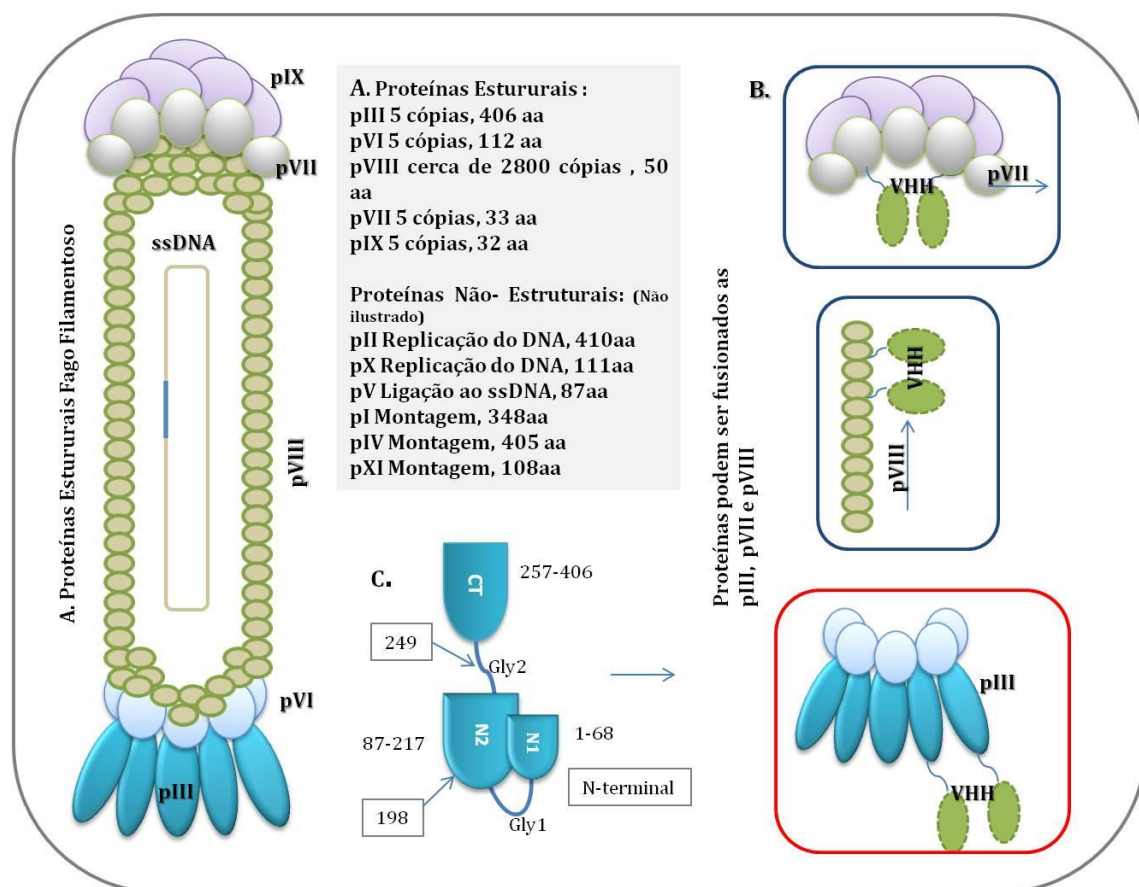
As proteínas N, Gn e Gc de hantavírus são altamente imunogênicas (BHARADWAJ et al., 2002). Portanto, diferentes abordagens foram realizadas para o desenvolvimento de vacinas recombinantes utilizando proteínas expressa em baculovírus e em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, capazes de induzir uma resposta imune protetora (CHU et al., 1995; SCHMALJOHN et al., 1990; YOSHIMATSU et al., 1993). As proteínas N recombinantes das cepas PUUV e DOBV, expressas em levedura induziram uma resposta imunológica protetora em modelos de roedores (DARGEVICIUTE et al., 2002; GELDMACHER et al., 2004). Existem relatos clínicos demonstrando que pacientes que apresentam altos títulos de anticorpos neutralizantes demonstraram uma evolução clínica mais favorável (BHARADWAJ et al., 2000), sugerindo que a imunoterapia poderia ser uma opção de tratamento viável às pessoas expostas a SCPH, suportando a hipótese levantada nesta tese.

### 1.9 Tecnologia *Phage Display* e sua aplicabilidade

Na tecnologia *Phage Display*, peptídeos e polipeptídeos exógenos podem ser expressos e apresentados fusionados às proteínas do capsídeo de bacteriófagos. A tecnologia descrita primeiramente por Smith em meados de 1985, demonstra a possibilidade de inserção de uma seqüência exógena do gene codantada endonuclease de restrição *Eco RI* entre os dois domínios da proteína III (pIII) de fagos filamentosos (SMITH, 1985). Atualmente, a metodologia, desenvolvida para a seleção de anticorpos, tem possibilitado a seleção de moléculas com alta afinidade e especificidade para uma diversidade de alvos (ARAP, 2005; PASHKE, 2006).

A tecnologia *Phage Display* usada para a busca de um extenso repertório de alvos, tais como anticorpos, peptídeos, pesquisa de atividade enzimática e sítios alostéricos (GRØN

et al., 2001; HYDE-DERUYSCHER, 2000; ROBERTS, 2005), influencia vários campos científicos, incluindo descoberta de novas drogas e seus alvos (HONG et al., 2008; TAO et al., 2000), elucidação dos mecanismos moleculares de ação, especialmente na carcinogênese (STAQUICINI et al., 2010), triagem para agonismo e antagonismo de receptores (TIPPS et al., 2010), desenvolvimento de vacinas (HAIGWOOD, 2004) descobertas de agentes para endereçamento de drogas e terapia gênica (ARAP et al., 2002; SERGEEVA et al., 2006), análise da interação proteína-proteína (HERTVELDT et al., 2009), mapeamento de epítipo (ROWLEY et al., 2005), identificação de substratos e inibidores enzimáticos (CHEN, 2005; HAMILTON, 1999), além das técnicas de potencialização do uso de nanocorpos em terapias (SAERENS et al.; 2008). Para o desenvolvimento da técnica, os codons referentes aos peptídeos são expressos e exibidos na superfície do fago como um produto de fusão com as proteínas do capsídeo, sendo utilizadas como modelo principalmente as proteínas de superfície: III, VII, VIII (Fig. 3B).



**Figura 3. Estrutura de fago filamentoso.** A. Ilustração das proteínas estruturais que constituem os fagos filamentosos: pIII, pVI, pVIII, pVII e pIX. B. As proteínas mais comuns utilizadas para fusão, em vermelho pIII (utilizada nesse trabalho), pVIII e pVII. C. Domínios estruturais da pIII. Adaptado: ARAP et al., 2005.

Os fagos filamentosos mais amplamente utilizados para fins de exposição das proteínas em seu capsídeo são conhecidos como Ff e incluem as cepas M13, f1, Fd e Fd (ARAP, 2005). São constituídos por uma proteína capsídeo longa e cilíndrica com 930nm de comprimento e apresentam aproximadamente 6,5nm de diâmetro, que encerra em uma única cadeia DNA com genoma de aproximadamente 6400 nucleótidos, que consistem 11 genes, apresentando uma massa molecular de cerca de 16,3 Mda (RUSSEL et al., 2007). A partícula do fago é constituída por cinco proteínas estruturais: pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. O capsídeo é composto por 2700 cópias da proteína pVIII, uma proteína que apresenta 50 resíduos de aminoácido codificada pelo gene VIII. O filamento é mantido unido por interações entre a secção central hidrofóbica das subunidades adjacentes, exceto por cinco resíduos expostos na superfície N-terminal, formando uma única e contínua  $\alpha$ -hélice, orientados de tal modo que o N-terminal é localizado no exterior do revestimento (HEMMINGA et al., 2010) (Fig.3A). Na região apical da partícula do fago existem de 3 a 5 cópias das pVII e pIX e na outra extremidade do fago existem de 3 a 5 cópias do pIII e pVI. As bibliotecas utilizando a pIII permitem a inserção de peptídeos sem que haja a perda da infectividade do fago ou alteração na montagem das partículas, visto que o fago pode exibir de 3 a 5 cópias de cada peptídeo individualmente (SCOTT; SMITH 1990), enquanto as bibliotecas que utilizam para fusão a pVIII podem exibir até 2.700 cópias de pequenos peptídeos com cerca de seis aminoácidos (GEENWOOD et al., 1991). Para o desenvolvimento desse trabalho foi utilizado a pIII do capsídeo para exposição dos VHH.

A técnica *Phage Display* apresenta particularidades tais como: a seleção do fenótipo e seu genótipo encapsulado correspondente devido à capacidade de ligação dos polipeptídeos expressos no capsídeo viral e o resgate dos fagos após processo de seleção com ligantes específicos, além de permitir o enriquecimento dos fagos que apresentam ligação específica por sucessivas rodadas de seleção, eluição e amplificação. Desta forma, em vez de ter geneticamente diferentes proteínas ou peptídeos, um de cada vez e depois expressar, purificar e analisar cada variante, bibliotecas de fagos expõem até  $10^{10}$  variantes que podem ser construídos simultaneamente (ARAP, 2005). Essa capacidade de exposição de peptídeos e proteínas no capsídeo de fagos apresenta vantagens sobre outras tecnologias, devido à facilidade de mapear um maior número de clones de forma simultânea.

## 1.10 Nanocorpos de camelídeos

No ano de 1993 Hamers-Casterman e colaboradores descreveram uma surpreendente diferença no funcionamento do sistema imune dos camelídeos comparado aos demais mamíferos. Foi observado que durante o desenvolvimento da resposta imune humoral, camelos (*Camelus bactrianus*), dromedários (*Camelus dromedarius*) e lhamas produzem, além de anticorpos convencionais, anticorpos funcionais desprovidos de cadeia leve (L) (HAMERS-CASTERMAN et al.,1993). Assim como nos camelídeos foi verificado em peixes cartilagosos receptores de antígenos, chamados NAR (*new or nurse shark antigen receptor*), secretada por esplenócitos, também desprovidos de cadeia leve (ROUX et al., 1998). Embora anticorpos de domínio único, também tenham sido identificados nesses animais, a maioria dos estudos relacionados a aplicação biotecnológica destes compostos foi realizada utilizando camelídeos, devido, entre outros fatores, a facilidade de manipulação dos animais (GREENBERG et al.,1995).

O domínio N-terminal único desses anticorpos, denominado VHH ou nanocorpo, liga-se ao antígeno sem a necessidade de emparelhamento entre VH e VL (HARMSSEN; HAARD, 2007; HOLLIGER; HUDSON, 2005). Métodos para isolar VHHs antígenos específicos a partir de bibliotecas formadas após imunização (ARBABI-GHAHROUDI et al.,1997; VANDER LINDEN et al., 2000), bibliotecas não imune (TANHA et al., 2002; YAU et al., 2003;VERHEESEN et al., 2006), semi-sintético ou (GOLDMAN et al., 2006), bibliotecas utilizando bacteriófagos, levedura e ribossomo *display* são bem estabelecidos (DUFNER et al., 2006; MUYLDERMANS, 2001), implicando em uma vasta aplicação biotecnológica e terapêutica.

### ***1.10.1 Nanocorpos: estrutura e aplicabilidade***

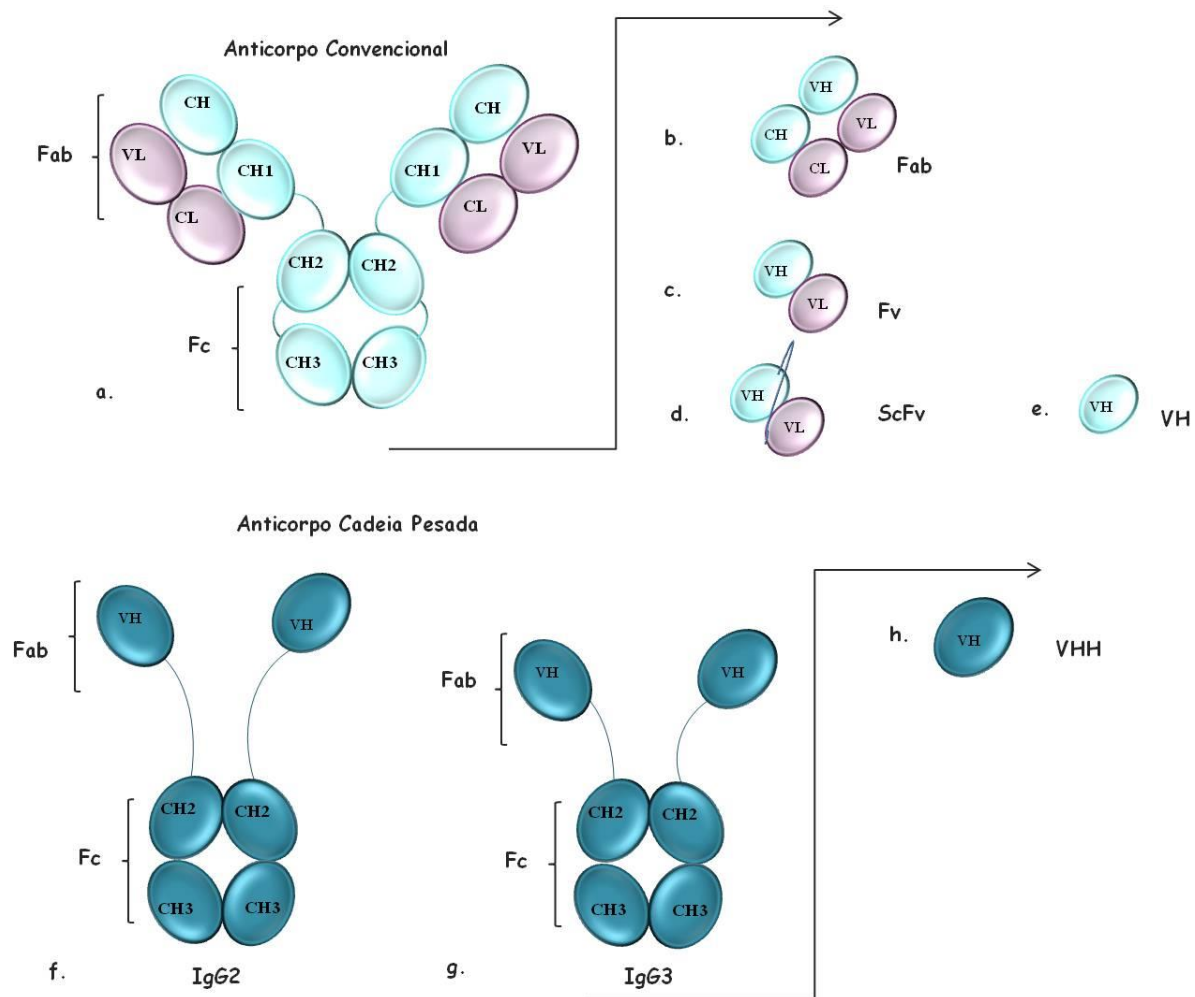
As imunoglobulinas de subclasse 1 (IgG<sub>1</sub>) correspondem aos anticorpos convencionais heterotetramérico, constituído de cadeia (L) e (H), comuns a todos os vertebrados (Fig. 4a). As subclasses de IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub> (natural dos camelídeos) são anticorpos destituídos de cadeia leve, constituídas apenaspor duas cadeias (H) (Fig.4f e 4g). As IgG<sub>2</sub> dos camelídeos apresentam um peso molecular de cerca de 92 kDa, uma vez dissociado por redução liberam duas cadeias H com cerca de 45 kDa. Já as IgG<sub>3</sub> apresentam um peso molecular de cerca de 90 kDa, e quando reduzidas apresentam duas cadeias polipeptídicas

com peso molecular de cerca de 42 kDa. Esses anticorpos apresentam um único domínio variável denominado de VHH ou nanocorpo (Fig.4h) (RIECHMANN; MUYLDERMANS, 1999).

De acordo com análise das sequências e elucidação por meio de cristalografia foi possível revelar várias características estruturais dos domínios VHH do anticorpo de camelídeos (DESMYTER et al., 1996, 2001; HARMSEN et al., 2000; MUYLDERMANS et al., 1994; SPINELLI et al., 1996). Diferenças notáveis, tais como a substituição do aminoácido Leu45 conservado por uma Arg ou Cis na região VH de camelídeos, determina a ausência de interação da região VL nos anticorpos de cadeia pesada. Outra substituição é a Leu11 por Ser, este aminoácido normalmente interage com o domínio CH1, um domínio que também está ausente nas imunoglobulinas de cadeias pesadas dos camelídeos. A natureza dessas substituições corrobora com o comportamento de aumento de solubilidade desses anticorpos de camelídeos (MUYLDERMANS et al., 1994).

Semelhante aos domínios VH dos anticorpos convencionais, VHHs contêm quatro regiões estruturais (FRs) que formam a estrutura do core do domínio das imunoglobulinas e de três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) que estão envolvidos na ligação ao antígeno. A região CDR3 dos VHHs é frequentemente muito mais longa do que a dos domínios H convencionais (HARMSEN; HAARD, 2007; WU et al., 1993). O prolongamento da CDR3 é muitas vezes, estabilizada por uma ligação dissulfeto adicional ligando a CDR3 a CDR1 adjacente formando um *loop*, comum em camelos e tubarões, ou na região da CDR2, em lhamas (WESOLOWSKI et al., 2009). A interface da VH e VL convencional é estabilizada por interações entre os domínios hidrofóbicos, os resíduos correspondentes em anticorpos de lhamas são substituídos por resíduos hidrófilos (WESOLOWSKI et al., 2009).

A tecnologia de anticorpos permite a fragmentação da molécula de anticorpo convencional, em tamanhos menores, conservando a especificidade dos anticorpos monoclonais inteiros, tais como fragmento monovalente do anticorpo Fab (Fab'<sub>2</sub>, e scFv (*single chain fragment variable*))(JANEWAY et al., 2010) (Fig.4b e 4d). No entanto, esses Fab's apresentam problemas, tais como, um baixo rendimento de expressão em sistemas microbianos, baixa estabilidade e alto potencial de agregação, tornando sua utilização clínica mais difícil (SAERENS et al., 2008).



**Figura 4. Estrutura dos anticorpos convencionais e de anticorpos de cadeia pesada de camelídeos.** Onde: **a.** Estrutura do anticorpo IgG convencional; **b.** Estrutura Fab: fragmento de ligação ao antígeno; **c.**Fv: fragmento variável do anticorpo; **d.** ScFv: fragmento variável de cadeia única; **e.**VH: Variável cadeia pesada anticorpo convencional; **f.** IgG2: Anticorpo de cadeia pesada; **g.** IgG3: Anticorpo de cadeia pesada; **h.** VHH: Domínio único de cadeia pesada. (Adaptado: VANLANDSCHOOT et al., 2011).

Existem vantagens devido a estrutura dos anticorpos de cadeia pesada apresentarem um domínio único. As bibliotecas geradas a partir da imunização de camelídeos mantêm uma grande diversidade de anticorpos funcionais, contrastando com a diminuição da diversidade de bibliotecas oriundas de anticorpos convencionais, devido ao rearranjo dos domínios VL e VH, durante a construção da biblioteca. Sendo assim, os VHHs de alta afinidade de ligação ao antígeno podem ser isolados por *screening* diretamente com um número limitado de clones a



partir de bibliotecas imunes sem seleção prévia, utilizando a tecnologia *Phage Display* (FRENKEN et al., 2000; HARMSSEN et al., 2006).

Nos resultados discutidos no trabalho de Van der Linden e colaboradores (1999), onde foi comparada a capacidade de reconhecimento VHH antígeno específico com a de anticorpos monoclonais de camundongo no que se refere à sua afinidade, especificidade e estabilidade, os resultados mostraram que ao contrário dos anticorpos convencionais os VHHs permanecem funcionais após serem submetidos a temperaturas de 90 °C. A alta estabilidade é atribuída principalmente a sua renaturação eficiente após ação química ou desnaturação térmica e, em menor grau por causa de um aumento da resistência contra a desnaturação (DUMOULIN et al., 2002; EWERT et al., 2002; PEREZ et al., 2001).

Outra característica de grande relevância em relação a atividade funcional dos anticorpos do tipo VHHs é que eles podem reconhecer os locais antigênicos que não são normalmente reconhecidos por anticorpos convencionais, tais como sítios ativos enzimáticos (DEGENST et al., 2006; LAUWEREYS et al., 1998). Característica atribuída à capacidade de extensão do *loop* da região da CDR3 facilitando a penetração nestes sítios (DEGENST et al., 2006; DESMYTER et al., 1996).

Devido ao seu pequeno tamanho de cerca de 15kDa, os VHHs rapidamente passam por filtração renal, resultando em sua rápida absorção em tecidos, assim como uma rápida eliminação. Esta característica confere vantagens para o direcionamento de VHHs acoplados a substâncias tóxicas para tumores, diagnóstico *in vivo* utilizando imagiologia e tratamento de picadas de serpentes (CORTEZ-RETAMOZO et al., 2004; HARRISON et al, 2006).

Existe uma variedade de trabalhos mostrando os nanocorpos como ferramentas tecnológicas, aplicáveis em diferentes campos da ciência com uma diversidade de funções. Minaeian e colaboradores (2012) demonstraram que o nanocorpo C74 apresentava forte ligação com a proteína L1 de HPV-16, indicando uma nova geração de abordagens como potenciais ferramentas para diagnóstico do HPV. Foram também desenvolvidos nanocorpos de camélídeos que reconhecem especificamente o antígeno TAG-72, uma glicoproteína, tumor-associada, cuja expressão correlaciona-se com a fase do tumor avançado, invasão aumentada e metástase, estes nanocorpos oligoclonais representam uma ferramenta promissora para detecção de células tumorais (SHARIFZADEH et al., 2013). Em outra perspectiva, os nanocorpos podem ser utilizados no combate de forma mais eficiente à toxicidade oriunda dos acidentes com animais peçonhentos, como na neutralização eficiente das

toxinas presentes no veneno do escorpião *Androctonus australis hector* citado no trabalho de Hmila e colaboradores (2012).

Dada as características particulares e a versatilidade relacionadas à aplicação dos nanocorpos, este trabalho mostra a seleção de VHHs de camelídeos a partir da técnica *Phage Display* capazes de reconhecer a proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus, tendo em vista o seu uso como um protótipo para auxiliar no diagnóstico alternativo das infecções por hantavírus, assim como levanta a hipótese do seu uso potencial como *intrabody*, visando à inibição da replicação viral.

O uso de anticorpos recombinantes do tipo VHH é proposto como alternativa de diagnóstico para as infecções por hantavírus, visto que há uma dificuldade relacionada a identificação das infecções por hantavírus devido ao desenvolvimento da infecção viral, onde a viremia antecede o aparecimento dos sintomas. A hantavirose é uma infecção que apresenta alta letalidade, havendo a necessidade de se desenvolver novos insumos para diagnósticos, visando aumentar a sensibilidade e acurácia dos testes sorológicos, podendo ser aplicados em investigações sorológicas nas regiões que apresentem o foco ou a suspeita da infecção por hantavírus, visando medidas profiláticas e auxiliando na notificação das infecções em roedores. Visto que novas metodologias e insumos podem vir a favorecer a identificação de possíveis protótipos para o desenvolvimento de testes auxiliares para a detecção da infecção pelo hantavírus, tais como, imunofluorescência, imunohistoquímica pós morte e *western blotting*.

Ressaltando ainda, que os dados relacionados às infecções em humanos e em roedores não são notificados em alguns estados brasileiros, testes diagnósticos para detecção dos hantavírus circulantes, podem auxiliar na vigilância em saúde, permitindo a identificação da etiologia de doenças febris hemorrágicas, como também favorecer o desenvolvimento de inquéritos sorológicos das infecções por hantavírus em algumas regiões do Brasil. Logo, devido as características físico-químicas apresentados pelos nanocorpos os tornam insumos potenciais para as aplicações relacionadas ao desenvolvimento de testes de imunodeteção e imunoterapia voltadas as hantavirose.

## 2. OBJETIVOS:

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar através da técnica de *Phage Display* nanocorpos de *Lama glama* capazes de reconhecer especificamente a rN $\Delta$ <sub>85</sub> do hantavírus.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir uma biblioteca recombinante de VHHs;
- Isolar e caracterizar o segmento de VHH de anticorpos de camelídeos capazes de reconhecer a proteína rN $\Delta$ <sub>85</sub>;
- Analisar e caracterizar “*in silico*” as sequências dos clones selecionados;
- Realizar imunoenaios para verificação da especificidade dos VHHs à proteína recombinante do hantavírus comparados com os anticorpos monoclonais anti rN $\Delta$ <sub>85</sub>;
- Verificar a cinética de ligação do VHH anti proteína rN $\Delta$ <sub>85</sub> em *sensorchip*, por ressonância plasmônica de superfície comparando a especificidade de ligação com o anticorpo monoclonal anti-rN $\Delta$ <sub>85</sub>;
- Analisar por ensaios imunoenzimáticos a capacidade de reconhecimento do VHH à proteína rN $\Delta$ <sub>85</sub>;

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 Imunização dos animais e titulação dos anticorpos por ELISA

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e submetidos a aprovação pela Comissão de Ética institucional no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz Rondônia, sob o protocolo 11/2012 (anexo 01).

Para a imunização foi utilizado como antígeno, a proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus (rN<sub>Δ85</sub>), que foi cedida gentilmente pela Dra Claudia Nunes Duarte dos Santos do laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas- ICC/ FIOCRUZ-PR.

Antes de iniciar o protocolo de imunização da *Lama glama*, foram verificadas as condições de saúde do animal, por meio da avaliação do médico veterinário e exames laboratoriais, tais como, hemograma completo e testes parasitológicos. O animal utilizado era macho, jovem adulto, mantido estabulado nas condições do clima da região amazônica *ad libitum*.

Foram realizadas três imunizações com intervalos de quinze dias entre elas, sendo administrado na primeira e segunda imunização 200µg da proteína rN<sub>Δ85</sub> associada com 200µL de adjuvante completo de *Freund* e água de injeção qsp 500µL, com administração por via subcutânea. A terceira imunização foi realizada com 200µg da proteína rN<sub>Δ85</sub>, diluída em 0,9% de NaCl para 500µL de solução e a administração foi realizada por via endovenosa de acordo com protocolo adaptado do *Canadian Council on Animal Care* (2002).

As coletas do sangue do animal, foram realizadas com intervalo de 7 dias a partir da primeira imunização, para separação do soro, visando o acompanhamento do título de anticorpos produzido pelos animais por ensaios imunoenzimáticos de captura ELISA (EIE) de captura de anticorpos contidos no soro dos camelídeos imunizados.

Para a verificação do aumento do título de anticorpos produzidos pela *Lama glama* foram adsorvidos em placa de microtitulação de alta afinidade, *Immuno 96 MicroWell® Plates*, de fundo chato *Nunc Maxisorp®* cerca de 1µg/mL de proteína rN<sub>Δ85</sub> por poço diluídos em solução de PBS 1X pH 7,4, sensibilizadas por cerca de 16h a 4 °C em câmara úmida. Após incubação as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS 1X/0,05% Tween 20 (PBST) em lavadora de placas modelo ELx50®, marca Bio-Tek (todas as etapas de lavagens foram

realizadas mecanicamente nesta lavadora). O bloqueio das superfícies não adsorvidas foi realizado com 200µL de solução de 5% de leite desnatado, por poço, diluído em PBS 1X pH 7,4 (SB), incubado por 3h a 4 °C em câmara úmida e novamente foram realizadas três lavagens com PBST. Os soros do animal pré e pós-imunizado foram diluídos de forma seriada em SB de 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> dispostos na placa em triplicata. As placas foram incubadas por 16h a 4 °C em câmara úmida, e lavadas três vezes com PBST. Foram adicionados 100µL por poço do anticorpo secundário IgG de coelho anti-VHH de alpaca diluído 1:12000 em SB, e procedeu-se uma nova incubação por cerca de 16h a 4 °C em câmara úmida. Após lavagem foram adicionados 100µL por poço do anti-IgG de coelho produzido em camundongo conjugado com peroxidase (SIGMA®) na diluição de 1:40.000 em SB, e as placas incubadas por 2h a 4 °C em câmara úmida. Em seguida, após lavagem com PBST a reação foi revelada com 100 µL por poço de substrato enzimático, TMB *Substrate ultrasensitive (Millipore)*, incubado por 30 min a temperatura ambiente. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 100µL por poço de ácido sulfúrico 0,32 M e as absorbâncias foram mensuradas por meio do leitor de microplaca *BioTek-Synergy HT* (Bio-Tek) com a densidade óptica (OD) medida com um comprimento de onda de 450nm.

Para determinação do *cut off* foi considerado 3X Média do Negativo + 3X Desvio Padrão.

## 3.2 Construção da biblioteca primária de VHH

### 3.2.1 Isolamento de linfócitos periféricos

Após verificação do aumento de título dos anticorpos produzidos pelos animais confirmando uma resposta imune induzida pela exposição à proteína rNΔ<sub>85</sub>, foram coletados 30mL de sangue para obtenção do soro em tubo contendo EDTA 3M pH 6,7, o mesmo foi diluído na proporção 1:1 volume de solução balanceadora (D- Glicose Anidra 0.1 %; CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O 5.0 × 10<sup>-5</sup> M; MgCl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O 9.8 × 10<sup>-4</sup> M; KCl 5.4 × 10<sup>-3</sup> M, Tris Base 0.145 M e NaCl 0.14 M) e submetido à formação de gradiente de densidade um tubo tipo Falcon sobre o *Ficoll-Paque PLUS® - For in vitro isolation of lymphocytes (Amershan Biosciences)*. O material foi centrifugado por 400 *xg* por 30min a 20 °C. Após centrifugação a interface formada contendo os linfócitos foi recuperada em um novo tubo e foram adicionados 1:3 volumes de solução balanceadora e seguidos de uma nova centrifugação a 100 *xg* por 10min a

20 °C. Os linfócitos precipitados (“*pellet*”) foram ressuspensos com um volume de 6 mL de solução balanceadora e centrifugados por 100 *xg* por 10 min a 20 °C, em seguida foi descartado o sobrenadante e as células foram solubilizadas em 1mL de solução balanceadora.

A contagem das células isoladas foi realizada em câmara de Neubauer com diluição 1:20 volumes em corante azul de tripan (0,1%), observadas em microscópio óptico na objetiva de 40X. O cálculo baseou-se na contagem dos linfócitos encontrados nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer (4 mm<sup>2</sup>), considerando o cálculo para número de células/mL:

$$\frac{\text{Número de células contadas} \times \text{Diluição} \times \text{Fator de correção da câmara} (10^4)}{\text{N}^\circ \text{ quadrantes contados}}$$

### 3.2.2 *Extração de RNA total*

A extração de RNA foi realizada a partir do método de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™) adaptado de Chomcynski e Sacchi (1987). Para a lise celular foi utilizado 250µL de suspensão de 6,8x10<sup>6</sup> células e 750µL de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™), homogeneizadas por pipetagem e incubado durante 5 min à temperatura ambiente para permitir adissociação completado complexo de nucleoproteínas. Seguindo para a etapa de separação foi adicionado 200µL de clorofórmio, homogeneizado vigorosamente por inversão por cerca de 15 segundos e submetido a incubação por 3 min a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 *xg* por 15min a 4 °C. A fase aquosa superior formada foi recuperada em um novo tubo para o procedimento de precipitação do RNA. Para isso foi adicionado 500µL de isopropanol (P.A) homogeneizado por inversão e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Centrifugadas a 12.000 *xg* por 10min a 4 °C o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a lavagem com 1mL de etanol a 75%, e subsequente centrifugação a 7500 *xg* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e sedimento foi solubilizado com 30µL de água tratada DEPC, incubada a 55 °C por 15 min para total solubilização, a concentração foi estimada por leitura em es espectrofotometro e armazenado a -80 °C.

### 3.2.3 Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA foi utilizado a enzima *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação uma mistura contendo 2µg de RNA total, 1µL de 10 mM de dNTP mix, 1µL de iniciador Random hexamero (50 ng/µL), qsp 10µL água tratada com DEPC. A reação foi incubada a 65 °C por 5 min e logo após resfriado no gelo por 1 minuto. Em seguida, 2µL de 10X RT tampão, 4µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2µL de 0,1M DTT, 1µL de RNaseOUT (40 U/µL) e 1µL de *SuperScript III RT* (200 U/µL) foram adicionados. A amostra foi submetida a incubação por 10 min a 25 °C seguida por 50min a 50 °C. A reação foi finalizada por meio de uma incubação a 85 °C por 5 minutos. Foi adicionado ainda 1µL de RNase H (2U/µL) para degradação do RNA residual, incubada por 20 min a 37 °C. O produto de cDNA obtido foi alíquotado e armazenado em freezer a -20 °C, para posteriores passos de amplificação por PCR.

### 3.2.4 Reação em cadeia da polimerase para amplificação da região variável da cadeia pesada (VHH)

Para a amplificação das regiões codantes que correspondem às cadeias pesadas das imunoglobulinas do tipo G (IgG2 e IgG3) foram realizadas duas reações de PCR utilizando oligonucleotídeos genes específicos, descritos por Ghahroudi e colaboradores (1997). A primeira PCR é responsável pela amplificação das regiões codantes correspondentes ao VHH-CH1-CH2 dos anticorpos convencionais (IgG1), resultando em um fragmento com cerca de 800pb e a região codante das regiões do VHH-CH2 dos anticorpos de cadeia pesada (IgG2 e 3), resultando em um *amplicon* de 600pb. Para isso foram utilizados os oligonucleotídeos genes específicos **VH BACK A6**: 5' GAT GTGCAGCTGCAGGCCTCTGG(A/G)GGAGG 3' e **CH2 FOR TA4**: 5' CGCCAT CAAGGTACCAGTTGA 3'. Para a reação foi realizado uma mistura contendo 5µL de 10x HotMaster™ *Taq* tampão com Mg<sup>2+</sup> ( 2,5mM Mg<sup>2+</sup>), 1µL 0.25 mM de dNTPs mix, 10pmol/µL de cada oligonucleotídeo VH BACK A6 e oligonucleotídeo CH2 FOR TA4, 0,5µL de 2.5U HotMaster™ *Taq* DNA Polymerase e qsp 50 µL de água tratada com DEPC. A reação foi realizada em termociclador automático (*Applied Biosystems*) com temperatura inicial de 94 °C por 30 seg, para desnaturação, 56 °C por 30 seg, para anelamento e 72 °C por 45 seg para extensão, a reação foi realizada com 35 ciclos, além de 10 min a 72 °C para extensão final.

O fragmento de 600pb correspondente ao segmento de interesse das IgG2 e 3 foi excisados do gel de agarose e após purificação (*Kit Real Genomic*) de acordo com as instruções do fabricante, foi submetido a PCRII utilizando os oligonucleotídeos contendo as seqüências para inserção de sítios das enzimas de restrição SfiI e NotI (sublinhados), mantendo as mesmas condições da reação da PCRI, substituindo os oligonucleotídeos para **VH** **FOR** **36:** **5'**- ATGCCATGACTGCGGGCCAGCCGGCCATGGCCGA(G/C)GT(G/C)CAGCT- 3' e **VH BACK A4:** 5'- GGACTAGTTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACGGTGAC CTG - 3'. A reação foi realizada em termociclador automático (*Applied Biosystems*) com a seguinte ciclagem: 35 ciclos a 94 °C por 30 seg para desnaturação, 45 °C por 30 segundos para anelamento, 72 °C por 45 seg, e mais 10 min a 72 °C para extensão final.

Os fragmentos de DNA obtidos após a amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5% corados com GelRed™ 1X (*Biotium Glowing Products for Science™*), visualizados com auxílio de transluminador por meio de luz UV e em seguida os produtos da purificação foram analisados comparativamente com marcador de DNA de 100pb Low (SIGMA®). Os fragmentos foram submetidos a purificação para eliminação de excesso de oligonucleotídeos e sais oriundos da reação, minimizando os pontos interferentes para as próximas reações.

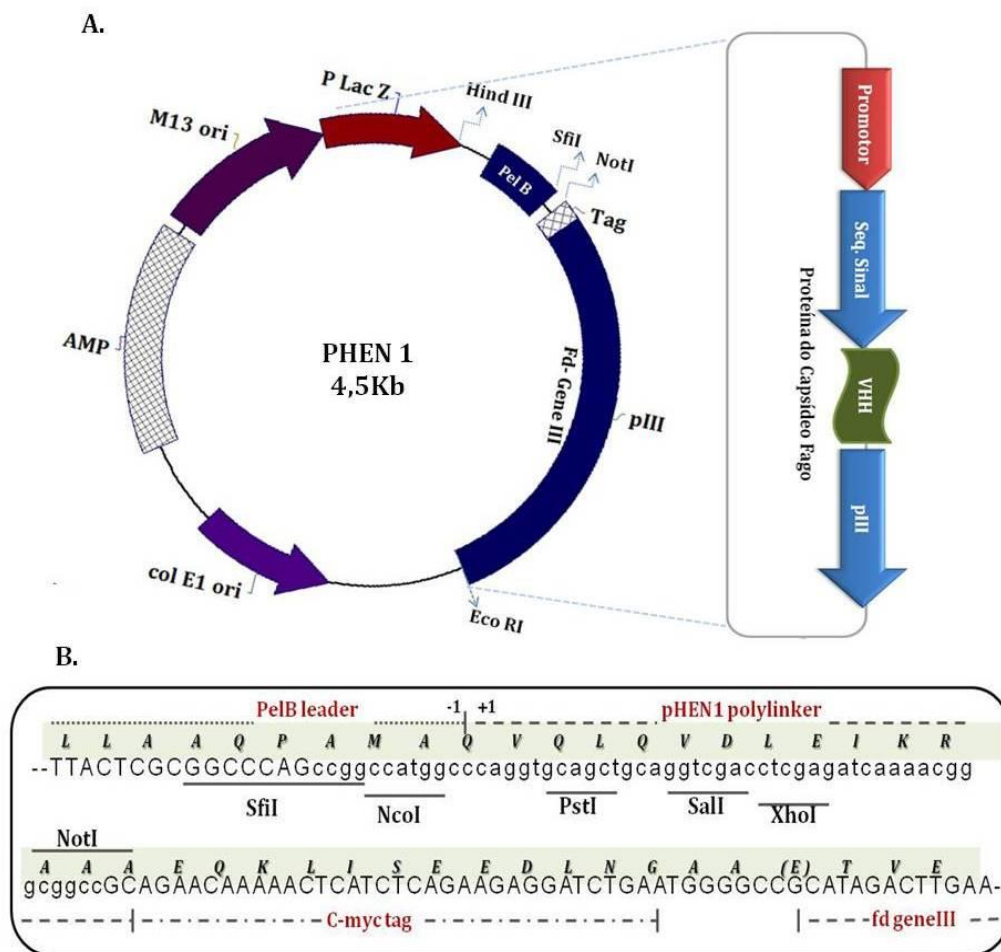
### ***3.2.5 Tratamento com endonucleases de restrição e síntese do DNA recombinante***

Após a realização da reação da PCR II, os fragmentos amplificados e o vetor fagomídeo foram submetidos à tratamento com as enzimas NotI-HF e SfiI (*New England Biolabs*).

Na reação de digestão enzimática foi utilizado 4µg do produto da PCRII purificada (*Kit real Genomic*) de acordo com as instruções do fabricante, 10µL de 10X NE *Tampão* 4 (50mM CH<sub>3</sub>COOK, 20mM Tris-acetato, 10mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 1mM DTT e pH 7,9), 1µL BSA 100X, 1µL de NotI-HF 20.000U/mL e qsp 100µL, incubado por 8 h 37 °C em seguida foram adicionados 1µL SfiI 20.000U/mL e a reação foi incubada a 50 °C por mais 8h e armazenado em *freezer* a -20 °C. As mesmas condições foram utilizadas para digestão do vetor fagomídeo, no entanto este foi submetido a desfosforilação após a reação de restrição enzimática com 1µL de enzima *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*- CIAP (*Fermentas Thermo Scientific*), incubado a 37 °C por 1h e inativada a 85 °C por 10 min.



Os produtos digeridos foram purificados (*Kit Real Genomic*) e submetidos à reação de ligação, nas proporções molares de 2:1(inserto:vetor), com 10µL de tampão *2X Rapid ligation* tampão, 500ng de inserto, 250ng de vetor fagomídeo, 2µL de T4 DNA ligase 3U/µL (Promega) qsp 20µL de reação incubado a 4 °C *overnight*, então purificados (*Kit Real Genomic*) e transformados em *E.coli*, cepa TG1 (Stratagene) eletrocompetentes previamente preparadas *in-house*.



**Figura 5: Vetor fagomídeo.** **A.** O vetor pHEN1 utilizado para clonagem do segmento de VHH contendo um origem para o fago auxiliar M13, origem de replicação para *E.coli*, gene que confere resistência a ampicilina (hachurada) e sítios de restrição para as enzimas *Sfi* e *NotI*, Operon LacZ, proteína sinalizadora PelB, Mic tag e proteína III de fusão. **B.** Seqüência dos sítios das enzimas de restrição, região promotora e Mic tag. (Adaptado: HOOGENBOOM et al., 1991).

### 3.2.6 Transformação em *E.coli* TG1 para confecção da biblioteca primária de VHH

As células *E.coli* cepa TG1 eletrocompetentes, previamente preparadas e armazenadas em freezer -80 °C, foram descongeladas em repouso no gelo. Em seguida foi adicionado 1µL

da reação de ligação em 40µL de células eletrocompetente, homogêneo e incubado por 10min no gelo sem agitação. As bactérias contendo a ligação foram então transferidas para cubetas de eletroporação de 0,1cm (*BioAgency*) previamente resfriada e submetidas a um pulso de 1,8 kV em eletroporador (BioRad MicroPulser™), imediatamente foi adicionado 960µL de meio SOC (a partir de SOB para 100mL: peptona- 2g; extrato de levedura- 0,5g- NaCl 2M- 0,5 mL; KCl 250mM-1 mL, com a adição de glicose a 20%- 500µL; MgSO<sup>-4</sup> 250 µL; MgCl<sup>-2</sup> 125 µL) transferido para um novo tubo de 2,0mL e incubado a 200 xg a 37 °C por 2 horas. Em seguida a cultura foi centrifugada a 2.000 xg, por 10 min a 4 °C, o precipitado foi eluído em 1mL de 2-YT *broth* (Invitrogen™) e posteriormente plaqueado o conteúdo de 4 transformações em recipientes de 30x30cm, com 2-YT *broth* (Invitrogen™) contendo 1,5% de ágar bacteriológico (HIMEDIA), 100µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) (2YT/Amp) e 2% de glicose foram incubadas a 30 °C por 16 h para isolamento das colônias. Para a confecção da biblioteca primária foram realizadas 20 transformações.

As colônias isoladas foram removidas da superfície das placas com auxílio de *cell scraper* (Corning®) e solubilizadas em meio de cultura 2YT/Amp/glicose e 15% de glicerol. Foram preparadas alíquotas contendo 500µL de volume final da biblioteca em tubos de 1,5mL e armazenado em *freezer* -80 °C.

A eficiência de ligação foi verificada a partir de PCR de colônias, utilizando os oligonucleotídeos da PCRII, para confirmação da inserção do segmento correspondente ao VHH ao vetor pHEN1. O tamanho da biblioteca primária de VHH foi determinado a partir de diluições seriadas: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-10</sup> plaqueados 100µL de cada diluição em placa de petri, 30x30mm contendo meio de cultura 2YT/amp/glicose e colocadas a 37 °C por 16 h para crescimento e isolamento de colônias.

Para o cálculo para titulação da biblioteca primária de VHH foi considerado: Número de colônia X Fator de diluição X 100 (Volume plaqueado da amostra por placa), ao final o valor encontrado é relacionado ao número de colônias encontrada por 1mL.

### 3.3 Mutagênese para inserção de 6XHistag em vetor fagomídeo pHEN1

Devido a ausência da 6x Histag no vetor fagomídeo pHEN1, ponto que dificultava a purificação por cromatografia de afinidade, foi necessário a inserção do códon tag por mutagênese para possibilitar a cromatografia em coluna de níquel (Ni<sup>2+</sup>). Para a mutagênese

foi utilizado o miniprep do vetor pHEN 1, extraído de acordo com as instruções do fabricante (*QIAprep Spin Miniprep Kit*). Os oligonucleotídeos PHEN1HISF2 5'- CAA ACG GGC GGC CGC ACA TCA TCA TCA CCA TCA CGG GGC CGC AGA ACA AAA ACT-3' e PHEN1HISR2 5'- GAT GAG TTT TTG TTC TGC GGC CCC GTG ATG GTG ATG ATG ATG TGC GGC CGC CCG TTT G – 3' foram sintetizados de acordo com a seqüência do pHEN. Foram realizadas diferentes reações utilizando concentrações do DNA plasmidial entre 5 a 50ng (5, 10, 20 e 50ng) mantendo uma concentração de 125ng de oligonucleotídeos entre as reações, utilizando o *Quik Change® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene).

Para a reação de mutagênese foi utilizado 5µL de 10X tampão, 1µL de pfuTurbo DNA polimerase (2.5U/ µL), 125ng dos oligonucleotídeos PHEN1HISF2 e PHEN1HISR2, 1µL dNTP's mix e qsp 50µL de reação. A reação foi realizada em termociclador automático (*Applied Biosystems*) com um ciclo inicial de 95 °C por 30 seg, 18 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min e 68 °C por 1 minuto. O produto da PCR mutagênica foi digerido com enzima de restrição DpnI (10U/µL) e incubada por 1 h a 37°C. Após restrição enzimática o produto foi submetido a transformação em bactéria *E. coli* supercompetente cepa XL1-Blue, fornecida pelo kit (Stratagene).

Para a transformação foi utilizada uma alíquota contendo 50 µL da bactéria, que foi retirada inicialmente do -80 °C e descongelada no gelo, nesse volume de células bacterianas foi adicionado 1µL do produto da PCR mutagênica digerida, homogeneizado por pipetagem e incubado no gelo por 30 min, na seqüência foi dado um choque térmico a 42°C por 45 seg e imediatamente incubado no gelo por 2 min, após incubação foi adicionado 500µL de NZY<sup>+</sup> (10g caseína hidrolisada, 5g extrato de levedura, 5g de NaCl pH 7,5, 12,5mL de 1 M MgCl<sub>2</sub>, 12,5 mL de 1M MgSO<sub>4</sub>, 20 mL de 20% (w/v) glicose) e incubado em *shaker* a 37°C por 1 hora. As amostras foram plaqueadas em duplicata em LB/Amp e incubadas por 18h a 37 °C. Para a confirmação da inserção da seqüência do Histag foi realizada a caracterização gênica por seqüenciamento dos plasmídeos extraídos.

#### 3.4 Expressão dos VHHs na superfície de bacteriófagos

Para a confecção da biblioteca secundária os clones VHHs foram infectados com fago auxiliar cepa M13K07(*New England Biolabs*). Para isso foi inoculado cerca de 150µL da biblioteca estoque (OD<sub>600</sub> 0,04) que estava armazenado em *freezer* -80 °C em frascos de cultura de 2L contendo 500 mL de 2YT/Amp e 2% glicose. Nesta fase houve a preocupação

em determinar um comprimento de onda de OD<sub>600nm</sub> uma leitura <0,05, garantindo uma maior variabilidade de clones individuais. A cultura foi incubada a 37 °C em shaker, a 300 *xg*, até um OD 0,5 (A<sub>600nm</sub>). Foi então adicionado 1x10<sup>12</sup> UFP/mL (Unidade formadora de placa/mL) do fago auxiliar cepa M13K07, correspondente uma razão de 10-20:1 (fago auxiliar: bactéria). Após incubado a 37°C por 1 hora com homogeneização ocasionais, seguido de incubação sob agitação constante a 300*xg*, em shaker a 37 °C por 1 hora. Para determinação a infecção do fago auxiliar foi removido 1µL da cultura e diluído em 1mL de 2YT e plaqueado 1µL e 10µL em 2YT/Amp e 2% glicose e 2YT/Kana e 2% glicose. O número de colônias em cada placa deve ser similar, com a proporção de colônias resistentes a canamicina maior do que 10% do número de colônias resistentes a ampicilina, visto que o fago possui o gene que confere resistência para canamicina estimando assim a eficiência de infecção pelo fago auxiliar.

O restante da cultura foi centrifugado por 15 min a 4000 *xg* a temperatura ambiente. O sobrenadante descartado e o precipitado foi ressuscitado em 500mL 2YT/amp/kana, incubado sob agitação, 300 *xg* em shaker a 30 °C por cerca de 18 h visando a propagação dos fagos expondo a pIII recombinada em seu capsídeo. Os passos seguintes estão relacionados à purificação dos fagos, que correspondem a biblioteca secundária.

### 3.5 Purificação e titulação da biblioteca de fagos

Após propagação pela incubação da cultura infectada com o fago auxiliar, a mesma foi centrifugada a 10.000 *xg* em tubos de 250mL por 30 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para um novo frasco e adicionar 1/5 volumes da solução de PEG 6000/NaCl 2,5M para o volume de sobrenadante recuperado, submetidos a incubação a 4 °C por 4 horas. Em seguida centrifugado a 4000 *xg* por 15min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado passou por uma centrifugação adicional de 30 segundos visando descartar sobrenadante residual. O precipitado então foi ressuscitado com 1/10 volumes de PBS 1X pH 7,4 e submetido a nova centrifugação por 10.000 *xg* por 15 min para precipitar as bactérias restantes (*debris celular*), o sobrenadante foi transferido para um novo frasco para completa purificação do fago com a adição de 1/5 volumes de PEG 6000/NaCl 2,5M e incubação por 1h a 4 °C seguida de centrifugação por 15min, 10.000 *xg*, a 4 °C, o precipitado foi então ressuscitado em um volume final de 1/50 do volume da cultura original com PBS 1X pH 7,4, obtendo assim a biblioteca secundária de fagos.

O eluato de fago foi titulado com o auxílio de bactérias *E.coli* cepa XL-Blue (Stratagene, Tet<sup>R</sup>). As mesmas foram cultivadas em 2YT *broth* com 50 µg/mL tetraciclina, e incubada a 37 °C em shaker com rotação de 300 *xg* até atingir uma densidade de OD<sub>550nm</sub> 1,0. A preparação de fago foi submetida a diluições seriadas, 0,01mL desta preparação de fago foi adicionada a 0,5mL de cultura de célula XL-Blue em um tubo de 15 mL tipo falcon, onde foram acrescentados 3 mL de 2YT Top ágar a 45 °C (16g de bacto-triptona, 10g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 7,5g de ágar bacteriológico qsp 1L) devidamente homogeneizado e em seguida plaqueado em LB ágar (Invitrogen™) e incubado em estufa bacteriológica a 37 °C por 16 h. Os plaques foram contados para determinação do título da biblioteca secundária. Para o cálculo foi considerado: Número de plaques formado X 100 (por conta da diluição dos fagos por placa 0,01mL) X fator de diluição apropriada onde se formaram os plaques.

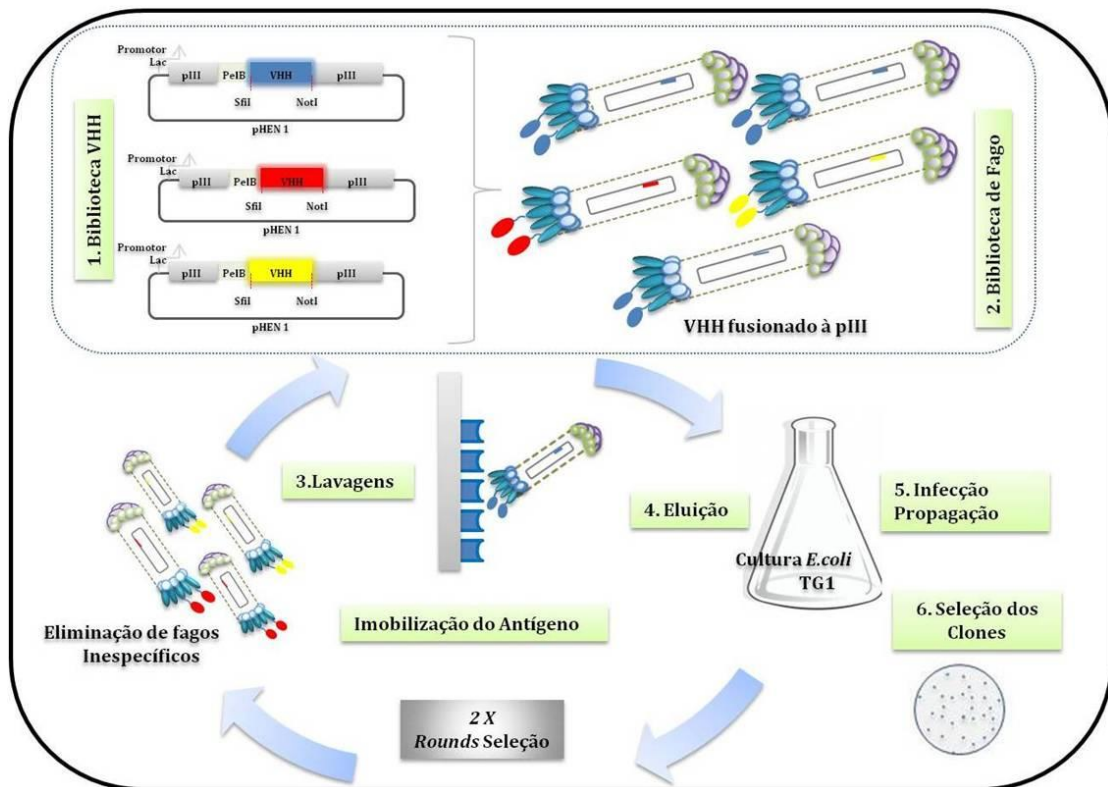
### 3.6 Seleção de VHHs anti proteína rNΔ<sub>85</sub> pela metodologia de *biopanning*

Para a seleção dos fagos carregando o VHH anti proteína rNΔ<sub>85</sub>, imunotubos MaxiSorb<sup>®</sup> foram sensibilizados com 300µg da proteína rNΔ<sub>85</sub> diluída em 3mL de tampão PBS 1X pH 7,4, incubado por 48 h sob agitação leve em homogeneizador (Phoenix) a temperatura ambiente. Os imunotubos foram lavados por 3 vezes com PBS 1X pH 7,4 e foi adicionado 3 mL de SB, incubado por 3 h a temperatura ambiente. Antes do término de período de incubação 1mL da biblioteca de fago 2,7x10<sup>11</sup>ufc/mL foi adicionada a qsp 3mL de SB e por 45 min homogeneizado sob agitação. A SB foi descartada, e sem submeter o imunotubo a lavagem, foi adicionado a solução de fago previamente preparada com SB, incubadas por 1 h sem agitação e 1 h sob agitação constante em homogeneizador. Em seguida, os imunotubos foram lavados sucessivamente por 5 vezes com PBST e por 5 vezes com PBS 1X pH7,4, com intervalos de 2 min entre as lavagens, visando a remoção de todos os fagos que não haviam expressado o VHH capaz de reconhecer a proteína rNΔ<sub>85</sub>. Os fagos foram eluídos com 1mL de HCl 100mM incubados por 10 min a temperatura ambiente, a reação foi neutralizada rapidamente com 1mL de Tris-HCl 1M.

A suspensão de fago selecionado foi amplificada em culturas de *E. coli* cepa TG1 na fase *mid-log* OD 0,5 (A<sub>600nm</sub>) as quais foram incubadas por 30 min a 37 °C sem agitação e 30 min sob mesma temperatura com agitação de 225 *xg* para re-infecção das bactérias pelos fagos. Em seguida a cultura foi centrifugada a 4000 *xg* por 15 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 500µL de 2YT e plaqueado em 2YT/amp/2% glicose. As

placas foram incubadas por cerca de 20 h a 30 °C. Após o isolamento, 118 colônias foram selecionadas aleatoriamente para análise por PCR e ELISA, o restante da massa bacteriana foi recuperada com auxílio de *cell scraper* e solubilizada em meio 2YT/Amp/glicose e 15% de glicerol e armazenada em *freezer* a -80 °C para dar seqüência aos próximos *biopannings*. O procedimento de seleção foi repetido novamente por mais uma vez, aumentando o número de lavagens, submetendo-se os imunotubos a 10 lavagens com PBST e 10 lavagens com PBS 1X, com intervalo de 2 min entre cada lavagem, visando aumentar a especificidade de ligação entre os fagos apresentando o VHH no seu capsídeo a proteína rNΔ<sub>85</sub> do hantavírus imobilizada no imunotubo (Fig.6).

Foram realizados no total, dois *biopanning* utilizando as mesmas concentrações da proteína rNΔ<sub>85</sub> imobilizadas no imunotubo, havendo alterações, no segundo *biopanning*, do aumento no número e estrigência nas lavagens, visando uma maior especificidade de seleção.



**Figura 6: Etapas de seleção por *biopanning*.** 1. Biblioteca demonstrando variabilidades entre os VHH clonados; 2. Após infecção fágica é obtida uma biblioteca de fagos expondo em seu capsídeo diferentes VHH, além de transporte de fagomídeo em seu interior. O antígeno é imobilizado em um suporte fixo onde a biblioteca de fagos é exposta. 3. São realizadas sucessivas lavagens para eliminação dos fagos inespecíficos; 4. Os fagos selecionados por especificidade de ligação são eluídos; 5. Propagação é realizada infectando bactéria *E.coli* cepa TG1. 6. Os clones são isolados em placa com antibiótico que confere seletividade. O produto da propagação foi submetido a nova rodada (2x etapas)de seleção aumentando o número de lavagens.

### 3.7 Verificação da especificidade dos clones anti-rN $\Delta_{85}$

Após seleção aleatória de 80 clones isolados a partir de dois *biopanning*, a confirmação da presença do VHH foi realizada a partir de PCR utilizando os oligonucleotídeos da PCRII (sequencia supracitada no item 3.2.4). Para a verificação da especificidade dos clones VHH selecionados positivamente por PCR foi realizado ensaios de imunodeteção por ELISA expondo-os a proteína rN $\Delta_{85}$ . Ainda para confirmação de especificidade dos clones VHHs a proteína recombinante foi realizado ELISA utilizando o vírus vacinal da febre amarela. Para isso, cada clone foi adicionado em 1,5mL de 2YT/amp/0,1% glicose em microtubos tipo *ependorf*, incubados em shaker a 37 °C sob agitação até atingir a OD<sub>600nm</sub> 0,9, então adicionado 500 $\mu$ L de 2YT/amp/IPTG 3mM (Isopropil- $\beta$ -D-thiogalactopiranosideo), incubado em *shaker* sob agitação 250xg a 30 °C por cerca de 16 h, para expressão do VHH solúvel. A cultura foi centrifugada a 2700 xg, por 15min a temperatura ambiente, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para os testes de ELISA.

Paralelamente a expressão do VHH, uma microplaca *Immuno 96 MicroWell® Plates*, de fundo chato *Nunc Maxisorp®* cerca de 10 $\mu$ g/mL da proteína rN $\Delta_{85}$  por poço diluídos em solução de PBS 1X pH 7,4, sensibilizadas por cerca de 18 h a 4 °C em câmara úmida. Após incubação as placas foram lavadas por 3 vezes com PBST em lavadora de placas modelo ELx50®, marca Bio-Tek, todas as etapas seguintes, após incubação foi seguida de lavagem. O bloqueio foi realizado com 200 $\mu$ L por poço de SB, 5% de leite desnatado solubilizado em PBS 1X pH 7,4. Após lavagem com PBST foi adicionado 200 $\mu$ L por poço do sobrenadante contendo VHH expresso diluído 1:1 volume da SB, distribuído em duplicata na placa e incubado por 16 h a 4 °C em câmara úmida. Submetido a nova lavagem com PBST, após adicionado 100 $\mu$ L por poço do IgG de coelho anti-VHH diluído 1:12000 em SB, seguido de incubação por 16 h a 4 °C em câmara úmida.

A incubação seguinte foi realizado com 100 $\mu$ L por poço do anticorpo IgG anti-coelho conjugado com peroxidase produzido em camundongo (SIGMA®) na diluição de 1:40000 em SB, incubado por 2 h a 4 °C em câmara úmida. Em seguida, após lavagem com PBST a reação foi revelada com 100 $\mu$ L por poço de TMB *Substrate ultrasensitive* (Millipore), incubado por 30 min a temperatura ambiente. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 100 $\mu$ L por poço de Ácido sulfúrico 0,32 M e as absorbâncias foram mensuradas por

meio do leitor de microplaca *BioTek-Synergy HT*, Bio-Tek, com a OD medida com um comprimento de onda de 450 nm.

Como controle positivo foi utilizado o soro do animal coletado três dias após a última imunização diluído 1:1000 em SB e para controle negativo foi utilizado o soro pré-imune do animal. Ainda para teste de especificidade 39 clones que apresentaram capacidade de interação com a proteína rN $\Delta_{85}$  foram selecionados aleatoriamente e submetidos a ELISA contra o vírus vacinal atenuado da febre amarela 17DD (BioManguinhos) (Fig. 15).

### 3.8 Extração plasmidial dos clones selecionados por ELISA

Os clones positivos selecionados por ELISA foram submetidos a extração de DNA plasmidial utilizando o QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante. O DNA plasmidial de 26 amostras foram enviadas para sequenciamento para a caracterização gênica dos clones.

### 3.9 Sequenciamento e modelagem

A reação de sequenciamento foi realizada usando o *BigDye Terminator<sup>®</sup> v3.1 Cycle Sequencing Kit* da *Applied Biosystems*. Os produtos do sequenciamento foram submetidos à eletroforese em um sequenciador modelo 3130xl da *Applied Biosystems*. Utilizando 3,2 pmol de oligonucleotídeos pHENR1 e pHENF1. As seqüências obtidas foram editadas com uso das ferramentas *EditSeq* e alinhadas no aplicativo *MegaAlign* disponíveis no *software DNASTAR* (LASERGENE, 1994), foram então submetidas ao *BLAST* e posteriormente alinhadas com as sequências depositadas nos bancos de dados *Gen Bank Nucleotide Database* (NCBI BLAST). Após análise um clone foi selecionado e retransformado em bactéria *E. coli* cepa HB2151, linhagem não supressora do códon de terminação âmbar (códon de terminação), que permite a expressão do VHH na forma solúvel não fusionada à pIII.

A modelagem por homologia foi realizada em colaboração com o Dr. Fernando Berton Zanchi (Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais/ IPEPATRO). Foi utilizado como molde a estrutura cristalizada de anticorpos de domínios únicos de *Lama glama* contra proteína editossomo de *Trypanosoma brucei* (PDB code: 3K7U cadeia A) com resolução de 2.1Å (KROEMER et al., 1996). Para pesquisa e recuperação do modelo foram utilizados os programas *Protein Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1990) e o *Protein*



*Data Bank* (PDB) (<http://www.pdb.org>). Os alinhamentos das sequências foram realizados utilizando os *softwares* MODELLER v9.10 (SALI, 1993) e *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994). A construção do modelo foi realizada no *software* MODELLER v9.10. A qualidade do modelo também foi avaliada por comparação da estrutura prevista com a estrutura molde por meio de sobreposição e avaliação de desvio de átomos RMS (RMSD). A visualização interativa e a análise comparativa das estruturas moleculares foram realizadas no Swiss-PDB viewer (GUEX et al., 1997) e as estruturas das imagens no *software Persistence of Vision Raytracer* (POV-ray) 3.62.

### 3.10 Análise da interação entre a proteína rN<sub>Δ85</sub> com produtos de expressão do VHH por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

Os estudos de cinética de interação dos VHHs a proteína rN<sub>Δ85</sub> foram realizados em colaboração com o Centro de Estudos de Biomoléculas aplicadas a saúde (CeBio/UNIR). Como ferramenta para os estudos de afinidade foi utilizado ressonância plasmônica de superfície (SPR) em *sensorchip* T200 BIAcore (GE *Healthcare*). Os parâmetros de ligação, tais como a afinidade, a cinética, a especificidade e seletividades são parâmetros importantes relacionados à seleção de candidatos com propriedades específicas.

A proteína rN<sub>Δ85</sub> utilizada para a imobilização no *sensorchip* foi tratada com solução HBS-P 1X (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3.4 mM EDTA, e 0.005% tween 20 pH 7,4) para retirar os resquícios de uréia e imidazol provenientes do processo de purificação em coluna de níquel. Tal substituição de tampão foi necessária para eliminar possíveis interferentes presentes na composição do meio, que poderiam resultar em um falso positivo, ou seja, uma falsa interação dos VHHs. O procedimento de troca de tampão foi realizado utilizando um tubo *Amicon*® Ultra (Merck Millipore) com *cut off* de 3 kDa, com adições de 15mL de solução de HBS-p 1X e centrifugações de 5.000g por 30 minutos.

Para os testes de viabilidade de interação da proteína rN<sub>Δ85</sub> foi realizado um escalonamento utilizando tampões com diferentes pH's. Após análise, verificou-se maior estabilidade de ligação da proteína rN<sub>Δ85</sub> ao *sensorchip* com os tampões acetato 10mM nos pH's: 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e tampão fosfato 42mM no pH 6,5. Para as condições analíticas foram utilizadas tampão de corrida HBS-P 1X. Para análise foi utilizada a temperatura de 25°C, com 180s de tempo de contato e para regeneração foi utilizada a solução NaOH 50 mM com fluxo 5 µL/min.

### **3.10.1 Para a imobilização**

Para imobilização foi levado em consideração a massa aproximada dos VHHs a serem analisados, de acordo com os dados disponíveis na literatura, e da proteína rN<sub>Δ85</sub> para se calcular os níveis de ligantes a serem imobilizados na superfície do *chip*. Este procedimento limita o nível de resposta do *sensorchip* com a finalidade de prevenir efeitos secundários de interações cruzadas, conhecido como “efeito de transporte de massa”.

Neste estudo a proteína rN<sub>Δ85</sub> ligante apresenta uma massa molecular de aproximadamente 48 kDa, entretanto o analito em questão, ou seja, o VHH proveniente da fração do sobrenadante do meio de cultura de bactérias (extrato total), é um analito heterogêneo. Os valores de massa estimado para os VHHs, para efeito de cálculo, foi determinada de acordo com a massa aproximada do domínio único do anticorpo de cadeia pesada com cerca de 15 kDa.

Para os estudos preliminares, de acordo com as massas apresentadas pelos VHHs e da proteína rN<sub>Δ85</sub> determinou-se uma resposta máxima para a célula de fluxo a ser imobilizada em 200 unidades de ressonância (RU). Sendo assim, ao resolver a equação o resultado da quantidade de ligante a ser imobilizado sobre o *sensorchip* foi de aproximadamente 800 RU. A imobilização procedeu-se utilizando como tampão de imobilização acetato 10 mM; pH 5,5, como tampão de corrida HBS-P 1X. Para a análise foi mantida a 37 °C, com níveis de imobilização de 800 RU, 50µg/mL de concentração da proteína rN<sub>Δ85</sub> e um fluxo de 5µL/minutos.

### **3.10.2 Testes preliminares para análise da interação**

O *sensorchip* imobilizado com a proteína rN<sub>Δ85</sub> foi submetido a um ensaio de ligação (*Binding Assay*) específico para verificação da interação antígeno-anticorpo, denominado de *Immunoscreening*, onde os VHHs utilizados foram obtidos do processamento de meio de cultura de vários clones de bactérias recombinantes que expressam VHH.

Nos testes preliminares foram utilizados os sobrenadantes e precipitados de 16 clones selecionadas aleatoriamente, produtos do primeiro e segundo *biopanning*. Os clones foram então cultivados e a expressão foi induzida com 100mM de IPTG. Os produtos da expressão, provenientes do sobrenadante e precipitados foram separados e submetidos a filtração com filtro 0,22µm, para retirar restos celulares e artefatos do meio de cultura. Os produtos da

filtração foram diluídos em tampão HBPS1X para os testes de interação. Para fins de reprodutividade todas as amostras foram analisadas em duplicata.

As condições analíticas foram ajustadas às condições fisiológicas, utilizando tampão de corrida HBS-P 1X, com temperatura de análise de 37 °C, com fluxo de 20µL/min, 180seg contato e 60seg para dissociação. A regeneração foi realizada em duas etapas, onde na primeira utilizou-se uma solução denominada AIC (ácido oxálico, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ácido fórmico e ácido málico, cada um com 0.15M, pH 5.0 com 4 M NaOH; KSCN (0.46 M), MgCl<sub>2</sub> (1.83 M), uréia (0.92 M), guanidina HCl (1.83 M) e 20mM de solução de EDTA) que é composto por uma mistura de ácidos orgânicos, sais inorgânicos e um agente caotrópico. Na segunda regeneração utilizou-se uma solução denominada ICW (KSCN (0.46 M), MgCl<sub>2</sub> (1.83 M), uréia (0.92 M), guanidina HCl (1.83 M), solução de 20mM EDTA e água) que é composto por sais inorgânicos, agente caotrópico e água. Ambas as soluções de regeneração estão de acordo com a metodologia empregada por (ANDERSSON et al., 1999). Os produtos do sobrenadante foram diluídos 1:1(v/v) com tampão de corrida HBS-P 1X, visto que este ensaio foi realizado em duplicata repetitiva.

### 3.11 Verificação do reconhecimento do clone VHH a proteína rN $\Delta_{85}$

Para testar a capacidade de reconhecimento do VHH à proteína rN $\Delta_{85}$  foi realizado o testes de *western blotting*, para isso foi necessário a expressão de um dos clones para seleção do sobrenadante e do precipitado, para isso o clone KC329708 que havia sido selecionado previamente por ELISA, apresentando boa capacidade de reconhecimento à proteína rN $\Delta_{85}$  foi retransformado em *E.coli* cepa HB2151 (visando a expressão solúvel do VHH). A cultura foi incubada em shaker até alcançar a OD<sub>600nm</sub> 0,5, então a expressão foi induzida com 1mM de IPTG, seguida de incubação por cerca de 18 h a 30 °C sob agitação. A cultura foi centrifugada a 2.700xg por 15min a 4 °C, o sobrenadante foi recuperado em um novo tubo e concentrado em centrifuga a vácuo por cerca de 4 h a 60 °C. O precipitado foi tratado para extração das proteínas a partir da lise da parede celular, para isso foi adicionado 5mL de solução de tratamento do precipitado (10mM Tris HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0 e 20% sacarose), homogeneizado no vortex e incubado sob homogeneização por 30min a temperatura ambiente e centrifugado a 2.700xg por 15min a 4 °C, o produto do lisado foi recuperado para análise.

### 3.12 Subclonagem e expressão em vetor pHEN1-6xHistag

Os clones que apresentaram afinidade e capacidade de reconhecimento a proteína recombinante do hantavírus nos testes imunoenzimáticos e SPR foram subclonados no vetor fagomídeo pHEN1-6xHistag. O mesmo foi submetido a restrição enzimática com as enzimas SfiI e NotI-HF (*New England BioLabs*). Foi utilizado 1,5µg do vetor pHEN-6xHistag, 10µL de 10X NE tampão 4 (50mM CH<sub>3</sub>COOK, 20mM Tris-acetato, 10mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 1mM DTT e pH 7,9), 1µL BSA 100X, 1µL de NotI-HF20,000U/mL e qsp 100µL, incubado por 8 h a 37 °C em seguida foi adicionado 1µL SfiI 20,000U/mL e a reação foi colocada a 50 °C por mais 8h e armazenado em *freezer* a -20°C. As mesmas condições foram utilizadas para a realização da restrição enzimática do VHH recombinado ao vetor fagomídeo (*miniprep* do clone 21(KC329708- oriundo da clonagem). Os produtos da reação de restrição enzimática foram purificados com o kit (*Qiagen PCR purification*).

Para a recombinação do VHH ao pHEN1-6xHistag foi realizada a ligação com 50µL de tampão *2X Rapid Ligation buffer*, 125ng de inserto (VHH Clone 21- KC329708), 50ng de vetor fagomídeo pHEN1-6xHistag, 2µL da enzima T4 DNA ligase 3U/µL (Promega) qsp 100µL de reação incubado a 4 °C por cerca de 18 horas. Após reação de ligação para confecção do DNA recombinante foi realizada purificação com o kit (*Qiagen Purification kit*) e 1µL da ligação foi utilizada para transformação em *E.coli*, cepa HB2151 (Stratagene) não supressora de *stop codon* eletrocompetentes previamente preparadas *in house*. A cultura foi plaqueada em 2YT amp + 2% glicose, incubada por cerca de 18 h a 37 °C em estufa bacteriológica. Para confirmação da subclonagem foi realizado PCR utilizando oligonucleotídeos da PCR II.

Para a expressão do VHH solúvel foi selecionado uma colônia aleatoriamente da placa de cultura e adicionada em 250mL de meio de cultura 2YT amp/ 0,1% glicose, incubado em shaker sob movimentos contínuos de cerca de 250 xg e o crescimento acompanhado até atingir OD<sub>600nm</sub> 0,9 então induzidas com adição de 250mL de meio de cultura 2YT amp/1mM IPTG, incubados 18h a 30 °C sob agitação constante.

### 3.13 Purificação do VHH por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel

Após a incubação da cultura de bactérias expressando o VHH, a massa celular foi recuperada por centrifugação a 2.700xg, por 15 min a 4 °C. A purificação foi iniciada com a

solubilização do precipitado em tampão de lise com 50mM de Tris HCl pH 8,0, seguindo com sonicação (Missonix *Ultrasonic Processors*). O material do lisado celular foi centrifugado por 8000xg por 15 minutos. Após centrifugação 10 volumes do sobrenadante foi transferido para um filtro contendo resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) previamente equilibrada com 10 volumes de tampão de lise (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20mM Imidazol pH 8,0) e deixados sobre a bancada para fluxo por gravidade a temperatura ambiente, a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de lavagem (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 40mM Imidazol pH 8,0) e seguidamente submetido a eluição com tampão (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 250mM Imidazol pH 8,0). O eluído da coluna Ni-NTA foi coletado para análise posterior em gel desnaturante de SDS-PAGE 12,5% corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

Após a purificação para a execução do teste de ressonância plasmônica foi necessário a concentração e troca do tampão no qual o VHH havia sido eluído, devido a presença de 250mM imidazol (tampão de eluição). Para tal foi utilizado Amicon® Ultra-15 *Centrifugal Filter Devices* (Millipore) seguidas de 3 centrifugações com 15mL de PBS1X pH 7,4 a 4.000xg por 60min a 4°C. Seguido por dosagem para verificação da concentração do VHH purificado pelo método de *Bradford*.

### 3.14 Ensaios de imunodeteção para verificação da capacidade de reconhecimento do VHH purificado anti proteína rN<sub>Δ85</sub> por ELISA e *western blotting*

Para testar a afinidade de reconhecimento do VHH à proteína rN<sub>Δ85</sub>, foram realizados testes de imunodeteção por ensaios de ELISA, onde foram adsorvidos cerca de 1µg/mL da proteína rN<sub>Δ85</sub> do hantavírus por poço, diluídos em solução de PBS 1X pH 7,4 em placa *Immuno 96 MicroWell® Plates*, de fundo chato *Nunc Maxisorp®*, incubados em câmara úmida a 4 °C por cerca de 18 horas. Após incubação a placa foi lavada por 3 vezes com PBST em lavadora de placa modelo ELx50® (Bio-Tek) e adicionados 200µL por poço de SB, incubado em câmara úmida por 3 h a 4 °C. Foi adicionado 200µL por poço do VHH purificado na diluição 1:1.000 em SB, o mAbs anti-rN<sub>Δ85</sub> α-hanta 432-6BF na mesma diluição e incubado em câmara úmida a 16 h a 4 °C e como controle negativo somente SB, todas as amostras foram analisadas em duplicata. A placa foi lavada por 3 vezes com PBST, e adicionado 100µL por poço do anticorpo secundário anti-IgG<sub>2</sub>/IgG<sub>3</sub> de alpaca produzido em coelho diluído 1:12.000 em SB, submetida a nova incubação por cerca de 16 h a 4°C em

câmara úmida e lavado novamente. Foram adicionados 100µL por poço do anti-IgG de coelho produzido em camundongo conjugado com peroxidase (SIGMA®) na diluição de 1:40.000 em SB, incubado por 2 h a 4 °C em câmara úmida. Em seguida, após lavagem com PBST a reação foi revelada com 100µL por poço de substrato enzimático, TMB *Substrate ultrasensitive* (Millipore), incubado por 30 min a temperatura ambiente. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 100µL por poço de ácido sulfúrico 0,32 M e as absorbâncias foram mensuradas por meio do leitor de microplaca *BioTek-Synergy HT*, Bio-Tek, com a OD medida com um comprimento de onda de 450nm.

Para o *western blotting* foi utilizada a metodologia padrão conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989) com algumas adaptações. Em gel de 10% de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS/ PAGE), foram aplicados: 8,0µL do marcador de peso molecular (ColorPlus™ *Prestained Protein Marker* New England BioLabs), aproximadamente 18µg da proteína rNΔ<sub>85</sub> do hantavírus (1,2mg/mL) foram desnaturadas em solução de Laemmli (glicerol 30%, SDS 10%, Tris 62,5 mM, DTT 750 mg e 0,001 % azul de bromofenol) a 75°C por 15min, e aplicados 15µL em três poços distintos, e 15µL de mAbs anti-rNΔ<sub>85</sub>α-hanta 432-6BF(0,7mg/mL) no gel de empacotamento.

A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. Submetidos a eletroforese a 100V por aproximadamente 2 h, a corrida foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular colorido.

Após eletroforese o gel de poliacrilamida foi transferido para o aparato de eletrotransferência semi dry (*Semi-Dry transfer unit* TE-77, GE) em contato com a membrana de nitrocelulose, coberto com tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM e metanol 10% pH8,3) a eletrotransferência foi realizada a 20mA por aproximadamente 2 horas. A membrana de nitrocelulose após transferência foi incubada em solução de bloqueio 5% (p/v) de leite em pó desnatado em TBS 1X incubado por 18 h a temperatura ambiente sob agitação constante em homogeneizador. Em seguida, a membrana foi lavada por 4 vezes com solução de TTBS 1X e seccionada separando em tiras os respectivos poços onde correram a proteína rNΔ<sub>85</sub> e mAbs anti-rNΔ<sub>85</sub>α-hanta 432-6BF, onde foram transferidos para tubo tipo falcon de 15mL contendo VHH purificado, mAbs anti-rNΔ<sub>85</sub>α-hanta 432-6BF, e soro do animal imunizado (reforço após 3ª imunização) nas diluições 1:200, 1:1 e 1:1000 em solução de bloqueio, respectivamente, incubado por 18 h sob agitação constante.

As tiras da membrana de nitrocelulose foram lavadas separadamente por 4 vezes por 5 min e foram adicionados o anticorpo secundário anti-IgG<sub>2</sub>/IgG<sub>3</sub> de alpaca produzido em coelho diluído 1:10.000 em SB, nos tubos contendo o VHH purificado e soro do animal. À tira incubada com mAbs anti-rN<sub>Δ85</sub>α-hanta 432-6BF foi adicionado anticorpo anti IgG de mouse conjugado com peroxidase (SIGMA®), e submetidos a nova incubação por cerca de 18 horas.

Após incubação as tiras incubadas com anti-VHH foram submetidas a nova lavagem e adicionado anti-IgG de coelho produzido em camundongo conjugado com peroxidase (SIGMA®) na diluição de 1:10.000 em SB, incubado por 18 h sob agitação a temperatura ambiente.

Para revelação das tiras foi adicionado 5mL por tubo de solução de revelação (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Tris HCl 1M pH 7,0 e 0,028g de DAB) incubado por 10 min a temperatura ambiente, protegido da luz, em seguida as tiras foram lavadas por 4 vezes em TTBS 1X para neutralização da solução reveladora. Para fins de registro a membrana foi montada novamente para fotodocumentação.

### 3.15 Cinética de interação por Ressonância Plasmônica de Superfície (SRP)

Para verificação de afinidade e cinética do VHH selecionado anti proteína rN<sub>Δ85</sub> do hantavírus foi utilizado o teste de ressonância plasmônica de superfície. Para isso os experimentos foram realizados em um sistema T200 BIAcore (GE Healthcare) utilizando carboximetilcelulose dextrano série S sensor de *chips* CM5. Inicialmente foi realizado um teste de pré-concentração a fim de estabelecer a melhor tampão de imobilização como descrito no item 3.10.1.

Diferentes diluições do VHH foram preparadas a uma concentração de 50µg/mL, foi escolhida uma das quatro células de fluxo independentes CM5 sensores de chip e foi definida a taxa de fluxo do tampão de corrida para 5µL/min para a avaliação da melhor condição de imobilização.

Uma vez que as condições de imobilização foram estabelecidas, a ligação covalente da proteína rN<sub>Δ85</sub> a superfície do *sensorchip* foi determinada pelo método de acoplamento de amina. O procedimento foi realizado em temperatura de 25 °C e 5µL/min fluxo em um dos quatro canais de fluxo (FCS). A superfície do *sensorchip* foi ativada por uma mistura de 1:1 (v/v) de 0,4 M de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) 0,1 M e NHS (N-

hidroxysuccinimide). Após a ativação, foram injetados pulsos de imobilização da solução contendo rN $\Delta_{85}$  50 $\mu$ g/mL para atingir o nível de 400 unidades de resposta (RU desejados). Após a imobilização foi injetada uma solução de 1M de etanolamina hidro-cloreto para bloquear os sítios ativos superficiais não reativos e inativar os grupos reativos restantes. Em todas as etapas de imobilização do tampão de corrida utilizado foi o PBS 1X.

A triagem de soluções de regeneração foi realizada de acordo com a metodologia de Anderson e colaboradores (1999). Os ensaios cinéticos foram operados a uma temperatura constante de 37 °C do Biacore T200 e um fluxo constante de 30 $\mu$ L/minutos. Os ensaios foram realizados com VHH purificado nas concentrações de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78 $\mu$ g/mL diluído em tampão (PBS), foram injetados correndo ao longo dos dois Fcs ligados em série. Da mesma forma foi feito com anticorpo Mabs anti-rN $\Delta_{85}\alpha$ -hanta 432-6BF. Todos sensorgramas foram analisados por subtração do sinal do canal de fluxo de referência de canal de fluxo ligando e foram avaliados utilizando o *software BIAevaluation*. Os ensaios cinéticos foram realizados em duplicata, a fim de obter um melhor ajuste experimental.

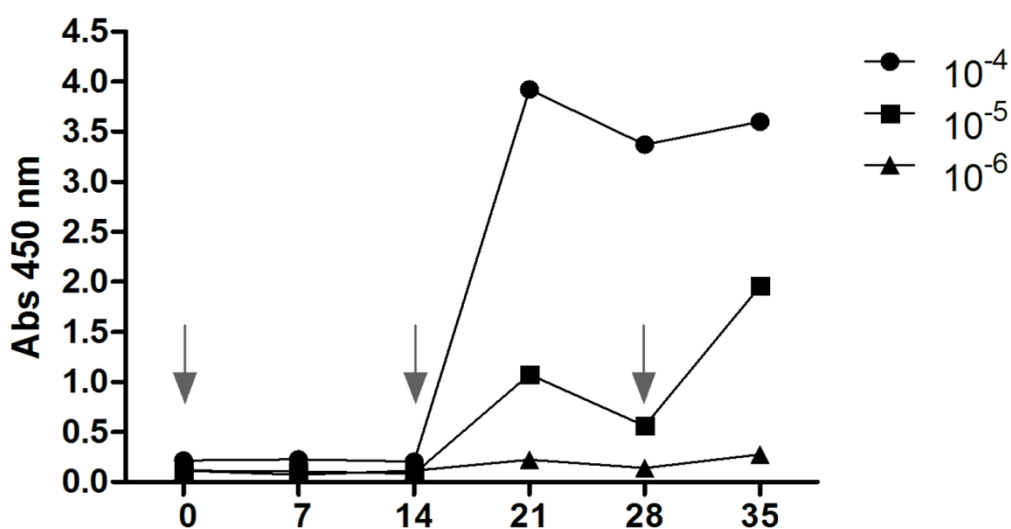


## 4. RESULTADOS

### 4.1 Titulação de anticorpos induzida por imunização por ensaio imuno enzimático (ELISA)

Após indução da resposta imune mediante imunização com a proteína rN $\Delta_{85}$ , o monitoramento do título de anticorpos produzido pelo camélídeo, contra a proteína recombinante, foi acompanhado por ELISA. No gráfico abaixo está sendo demonstrado o aumento gradual do título de anticorpos em relação aos dias de imunização do animal. Os títulos de anticorpos aumentaram de acordo com que as imunizações foram sendo realizadas. Após a terceira imunização os anticorpos circulantes no soro do animal estavam detectáveis na diluição 1:1.000000, confirmando a capacidade de reconhecimento dos anticorpos circulantes à proteína recombinante rN $\Delta_{85}$ , após indução da maturação clonal linfocitária por meio de hiperimunização do camélídeo. A coleta para fins de isolamento de linfócito foi realizada três dias após a terceira imunização (após dia 35), uma vez que durante esse período o título de anticorpos se manteve na diluição  $1 \times 10^{-6}$ .

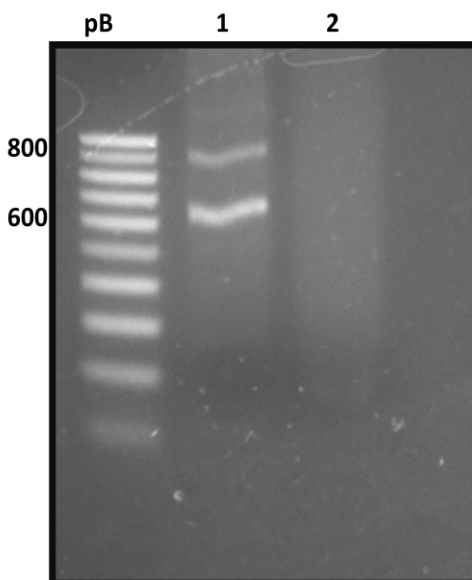
A partir da coleta de 30mL sangue do sangue periférico do animal, foi possível isolar cerca de  $6,8 \times 10^6$  linfócitos.



**Figura 7. Monitoramento da resposta imune dos camélídeos.** Na vertical esta sendo demonstrada as absorbâncias em um comprimento de onda de 450nm ( $OD_{450nm}$ ), e na horizontal os dias referente a coleta e imunização (indicados por setas). As coleta para monitoramento da resposta imune do animal, mediada por imunização foram realizadas em intervalos de 7 dias, e a coleta para isolamento de linfócito foi realizada três dias após a última imunização.

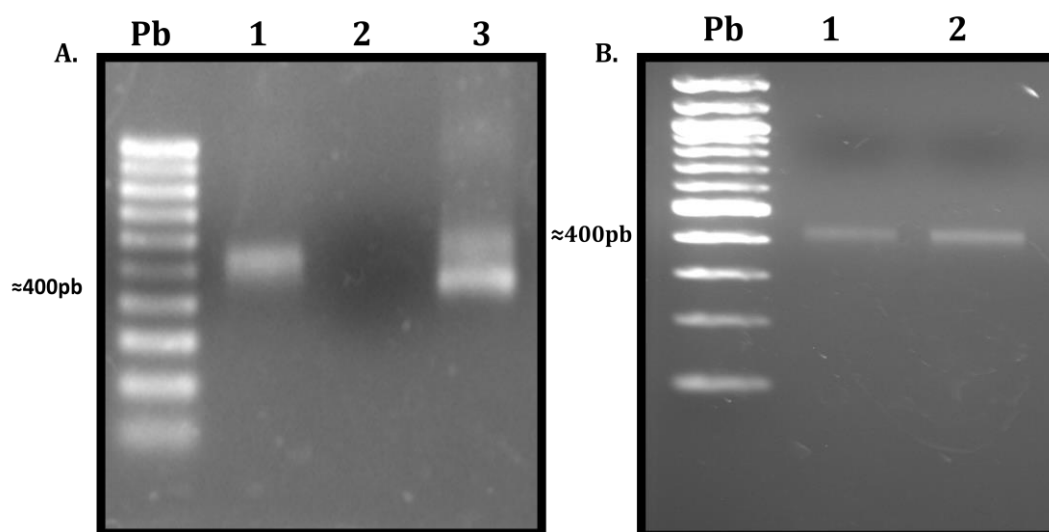
#### 4.2 Transcriptase reversa e Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação da região variável da cadeia pesada (VHH)

Após extração de RNA a partir dos linfócitos periféricos, foi possível obter o cDNA visando a amplificação domínio único dos anticorpos de cadeia pesada dos camelídeos, através da metodologia de PCR. Na primeira PCR foram amplificados dois fragmentos visualizados em gel e agarose (Fig.8), os segmentos de cerca de 800pb são correspondentes as regiões codantes do gene VHH-CH1-CH2 dos anticorpos convencionais dos camelídeos, ao passo que os segmentos com tamanho aproximado de 600pb correspondem as regiões codantes do gene VHH-CH2 dos anticorpos de cadeia pesada, especificamente das imunoglobulinas de classe 2 e 3(IgG2 e IgG3) dos camelídeos.



**Figura 8. Amplificação do segmento do VH e VHH dos anticorpos de camelídeo.** Eletroforese em gel de agarose, onde pB: 100pb low ladder (SIGMA); Linha 1: Segmentos amplificados a partir de cDNA, com os segmentos de tamanho aproximado de 800pb correspondentes a amplificação da região codante dos genes VHH-CH1-CH2 de anticorpos convencionais e segmentos de 600pb correspondentes a amplificação da região codante dos genes VHH-CH2 dos anticorpos de cadeia pesada; Linha 2: Correspondente ao controle negativo.

Os segmentos correspondentes a 600pb foram excisados do gel de agarose e submetidos à purificação. O seu produto foi utilizado para a realização da segunda PCR visando a amplificação do segmento codante do domínio único da cadeia pesada, o VHH, correspondente a um fragmento de cerca de 400pb (Fig. 9A).

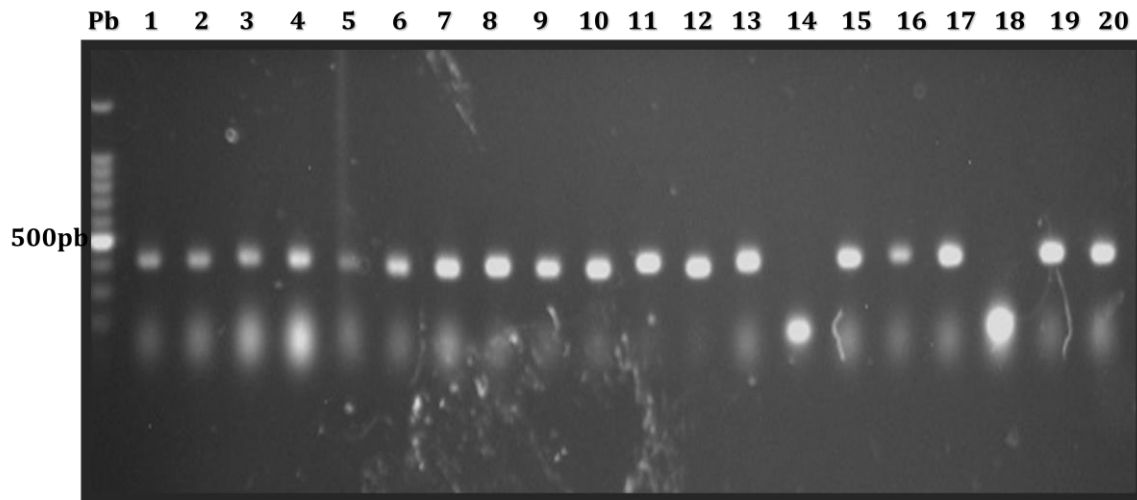


**Figura 9. Amplificação das regiões codantes do VHH das IgG2 e 3 de camélídeo e purificação.** **A.** PCRII onde, pb: corresponde a 100pb *low ladder* (SIGMA®); coluna 1: Amplificação do segmento correspondente  $\approx$  400pb referente a região do VHH; 2: Controle negativo; 3: Controle positivo (miniprep clone VHH). **B.** Purificação do produto da PCRII, onde pb: 100pb *low ladder* (SIGMA); coluna 1 e 2: fragmento VHH purificado em diferentes concentrações;

Após 20 eletroporações, construiu-se uma biblioteca primária com título de  $3 \times 10^7$  clones individuais. Para a preparação da biblioteca de fagos, denominada de biblioteca secundária (fagos expondo o VHH fusionado a pIII), foram realizadas duas infecções, utilizado para isso o fago auxiliar M13K07, seguido por processo de purificação e titulação fágica, onde foi possível obter um título de  $1,7 \times 10^{11}$  cfu/mL.

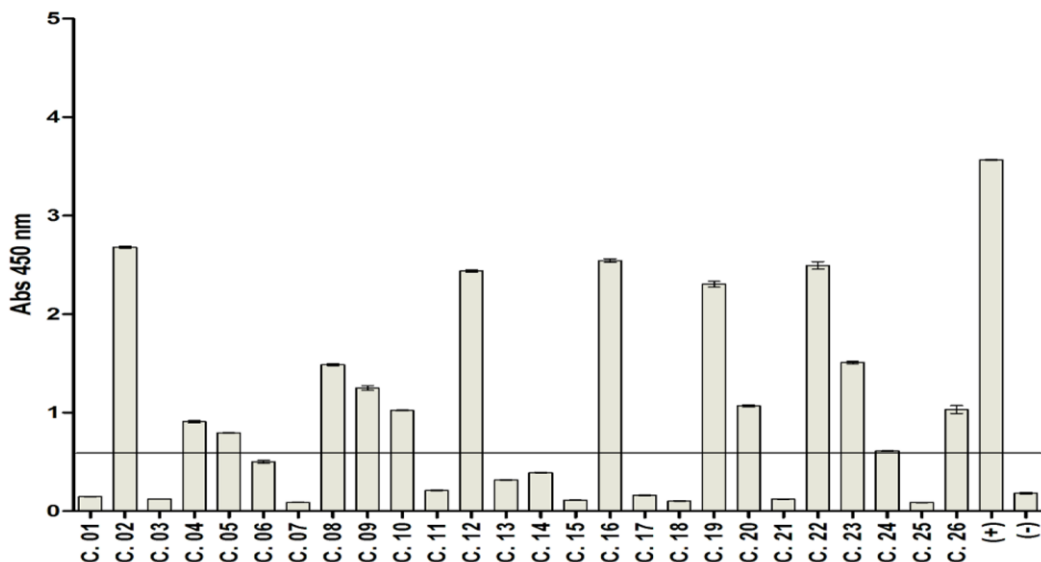
#### 4.3 Verificação da capacidade de reconhecimento dos clones VHHs a proteína rN $\Delta_{85}$

Foram selecionados cento e dezoito clones, sendo que vinte e seis e noventa e dois clones selecionados na primeira e segunda rodada de seleção por *biopanning*, respectivamente, apresentando o segmentos de VHH ligado ao pHEN1, confirmados por meio de PCR de colônias, utilizando pares de oligonucleotídeos genes específicos (seqüências descritas anteriormente). Abaixo o demonstrativo dos produtos de PCR de colônia realizados com clones individuais, selecionados aleatoriamente, para confirmação de clonagem após *biopanning* 1 (Fig. 10).



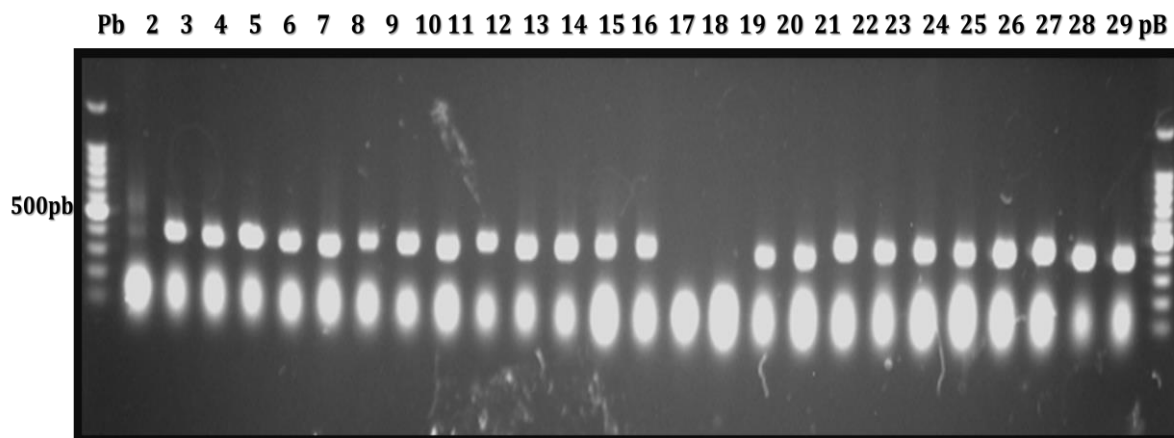
**Figura 10. PCR de colônia para confirmação de recombinação gênica.** Foram utilizados pares de oligonucleotídeos genes específicos utilizados para amplificação da PCRII visando confirmação da presença do VHH a partir de colônias selecionados aleatoriamente, após do primeiro *biopanning*. pB: 100pb low ladder (SIGMA); coluna 1 a 20: número de colônias individuais selecionados aleatoriamente na placa após primeiro *biopanning*.

Após confirmação da presença do VHH em vinte e seis clones positivos selecionados por PCR oriundos da primeira rodada de seleção por *biopanning*, treze clones foram capazes de reconhecer a proteína rN $\Delta_{85}$  por ELISA. De acordo com o cálculo pré-estabelecido considerando o controle negativo e o desvio padrão, os clones positivos apresentaram uma OD<sub>450nm</sub> de até 10 vezes maior o valor do *cut off* (Fig.11).



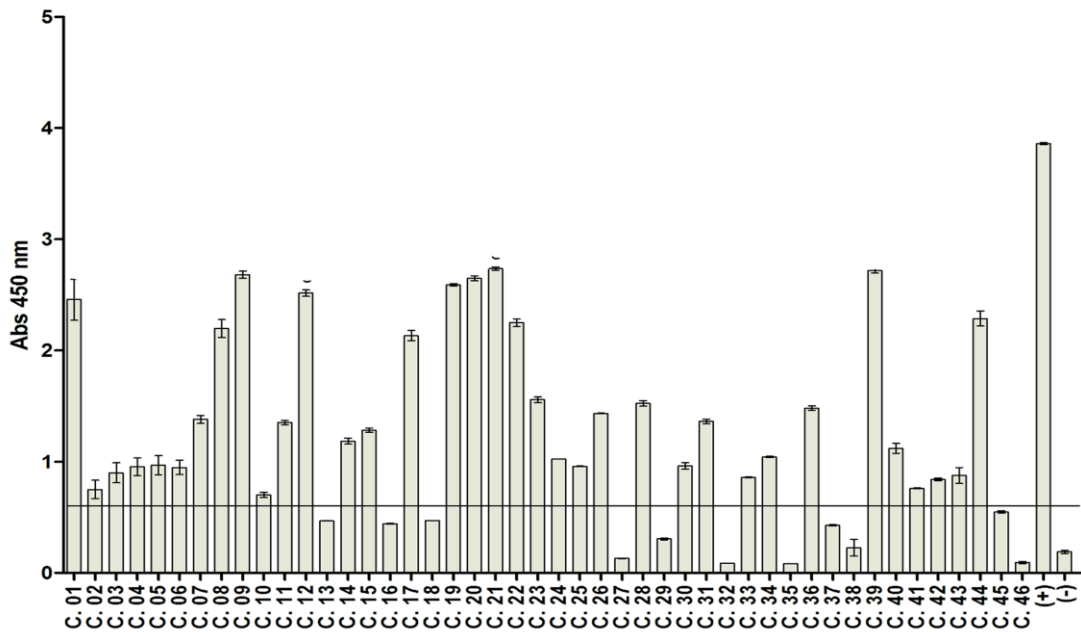
**Figura 11. Capacidade de reconhecimento dos VHHs clones selecionados após primeiro *biopanning* quando expostos a proteína rN $\Delta_{85}$  por ELISA.** Na abscissa estão os clones numerados de acordo com o isolamento feito em placa. Na ordenada estão as absorbâncias no intervalo de 0,5 em uma OD<sub>450nm</sub>. A linha horizontal determina o valor das médias do valor de *cut off* ( $3 \times$ Média Negativo  $+3 \times$ Desvio padrão).

A partir da segunda rodada de *biopanning* foram selecionados noventa e dois clones, a presença do VHH confirmado por PCR de colônia (Fig.12), onde sessenta e sete clones foram capazes de reconhecer a proteína rN<sub>Δ85</sub> por ELISA.

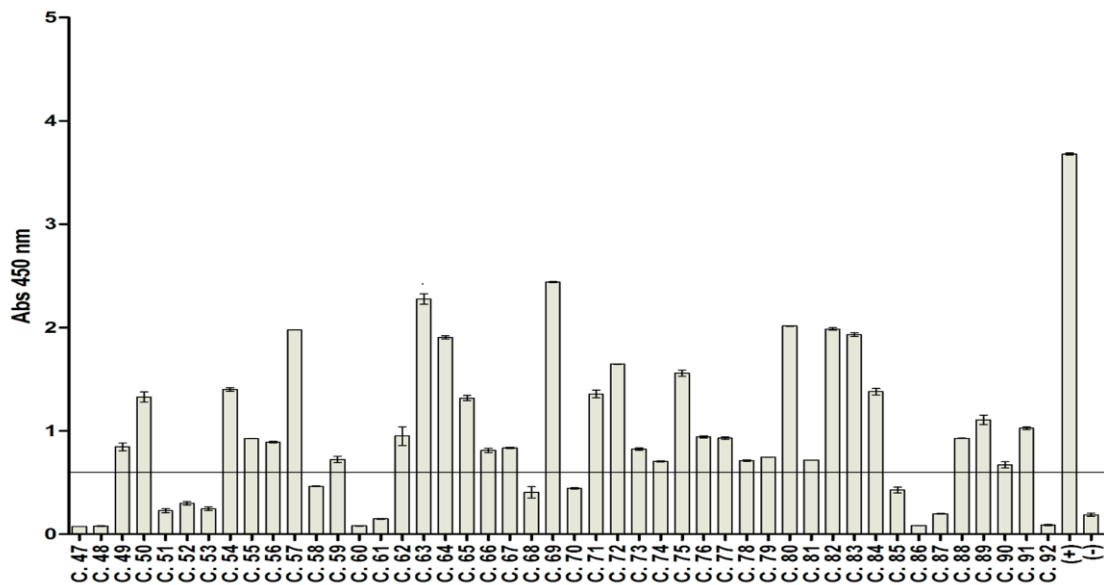


**Figura 12. PCR de colônia utilizando pares de oligonucleotídeos da PCRII para confirmação da presença do VHH em clones selecionados após segundo *biopanning*.** pB: 100pb low ladder (SIGMA); coluna 2 a 29: Clones selecionados aleatoriamente na placa após segundo *biopanning*.

Os clones cujo PCR de colônias apresentaram-se positivos foram cultivados em meio de cultura, para expressão do VHH solúvel para submissão a teste de especificidade por ELISA. Nas figuras abaixo são apresentadas as relações das absorvâncias dos clones positivos selecionados no segundo *biopanning*, quando expostos a proteína rN<sub>Δ85</sub>. Assim como observado nos VHHs oriundos da primeira rodada, as absorvâncias apresentados pelos clones selecionados na segunda rodada apresentaram uma absorvância cerca de 10 a 15 vezes maiores que o valor do *cut off* (Fig.13).



**Figura 13. Especificidade de reconhecimento dos clones após segundo *biopanning* selecionados por ELISA.** Na abscissa estão os clones numerados de acordo com o isolamento feito em placa. Na ordenada estão as absorbâncias no intervalo de 0,5 na OD<sub>450nm</sub>. Como controle positivo (+) foi utilizado o soro do animal imunizado com a proteína rN $\Delta_{85}$  na diluição 1:1000; Controle negativo (soro pré-imune).



**Figura 14. Especificidade de reconhecimento dos clones selecionados por ELISA após segundo *biopanning*.** Na abscissa estão os clones numerados de acordo com o isolamento feito em placa. Na ordenada estão as absorbâncias no intervalo de 0,5 na OD<sub>450nm</sub>. Como controle positivo (+) foi utilizado o soro do animal imunizado com a proteína rN $\Delta_{85}$  na diluição 1:1000; Controle negativo (soro pré-imune). A linha horizontal indica o valor média do *cut off* (3xMédia Negativo +3xDesvio padrão).

Ao término das duas rodadas de *biopanning* foram selecionados oitenta clones, sendo treze clones positivos, produtos da primeira rodada de seleção e sessenta e sete clones selecionados a partir da segunda rodada, salientando que a afinidade expressa à proteína rN $\Delta_{85}$  em ELISA foi de até 15 vezes maior que o valor do *cut off* estipulado pelo cálculo (3xMN + 3x DP).

Para confirmação de especificidade dos VHHs a proteína rN $\Delta_{85}$  trinta e nove clones foram selecionados aleatoriamente e submetidos a ELISA contra o vírus vacinal da febre amarela 17DD, não mostrando afinidade de reconhecimento ao vírus vacinal, com absorvâncias similar ao controle negativo.



**Figura 15. Análise de especificidade dos clones selecionados por ELISA após segundo *biopanning* contra o vírus vacinal da febre amarela 17DD.** Na abscissa estão os clones selecionados aleatoriamente que reconheceram a proteína rN $\Delta_{85}$  por ensaio de ELISA. Na ordenada está as absorvâncias no intervalo de 0,5 OD $_{450\text{nm}}$ . Como controle positivo foi utilizado soro do animal imunizado com vírus vacinal da febre amarela na diluição 1:1000 e controle negativo (soro pré-imune não relacionado).

#### 4.4 Seqüenciamento e análise das amostras

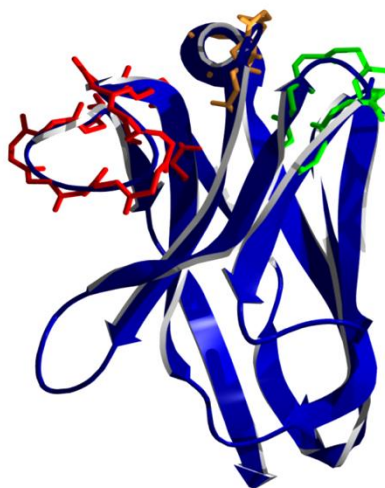
Após confirmação por ELISA, vinte e seis VHHs clones que apresentaram uma expressiva capacidade de reconhecimento à proteína rN $\Delta_{85}$  foram submetidos a caracterização gênica por seqüenciamento. Do total onze clones foram caracterizados, identificados numericamente como clones 01, 12, 17,18, 20, 21, 23, 28, 31,39, 44 e *submetidas ao GenBank* com os números de acesso: KC329699, KC329700, KC329705, KC329703, KC329707, KC329708, KC329698, KC329706, KC329702, KC329704, KC329701 respectivamente.

	FR1	CDR1	FR2	CDR2		
KC329700	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLS	CAAS	GSIFSSDV	MAWFRQAPGKERELVAM	ITD-DGGT	NYADSVKGRF
KC329703	EVQLQASGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	GSIFSSDV	MAWFRQAPGKERELVAM	ITD-DGET	NYADSVKGRF
KC329699	EVQLQASGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	GSIFSSDV	MGWFRQAPGKERELVAF	IS--DGAT	NYADSVKGRF
KC329704	DVQLQASGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	GSIFSSDV	MAWFRQAPGKERELVAM	ITD-DGGT	NYADSVKGRF
KC329701	EVQLQASGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	GSIFSSDV	MGWFRQAPGKERELVAF	ITD-DGGT	NYADSVKGRF
KC329702	DVQLQASGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	GSIFSSDV	MAWFRQAPGKERELVAM	ITD-DGGT	NYADSVKGRF
KC329707	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLS	CAAS	GRTFSSLT	FGWFRQAPGKERDFVAG	ISWSGGST	NLADSVKGRF
<u>KC329708</u>	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLS	CAAS	GRTFSSLT	FGWFRQAPGKERDFVAG	ISWSGGST	NLADSVKGRF
KC329705	EVQLQASGGGLVQAGGSLKLS	CAAS	GRTASSLT	FGWFRQAPGKERDFVAG	ISWSGGST	NLADSVKGRF
KC329698	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLS	CAAS	GRTSSMYS	MVWFRQAPGKEREFVAG	IIWTSSTL	YYADSLKGRF
KC329706	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLS	CAAS	GRTSSMYS	MVWFRQAPGKEREFVAG	IIWTSSTL	YYADSLKGRF
	:*****.***.*:*****	* *	:*****:***	* .. *	***:****	

	FR3	CDR3	FR4	
KC329700	TISRDN AENTVSLQMNSLKPEDTAVYYC	NARYY-----SGGYRNY	WGQGTQVTVTVSS	I
KC329703	TISRDN AENTVSLQMNSLKPEDTAVYYC	NARYY-----SGGYRNY	WGQGTQVTVTVSS	
KC329699	TISRDN AENTVSLQMNSLKPEDTAVYYC	NARYY-----SGGYRNY	WGQGTQVTVTVSS	
KC329704	TISRDN GAKSMVSLQMNSLKPEDTAVYYC	NARYY-----SGTYRSY	WGQGTQVTVTVSS	
KC329701	TISRDN AENTVSLQMNSLKPEDTAVYYC	NARYY-----SGGYRNY	WG---QVTVTVSS	II
KC329702	TISRDN GAKNMVSLQMNSLKPEDTAVYYC	NARYY-----SGTYRSY	WG---QVTVTVSS	
KC329707	TISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC	AANEYGLPTWAHPAYDY	WDQGTQVTVTVSS	III
<u>KC329708</u>	TISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC	AANEYGLPTWAHPAYDY	WGQGTQVTVTVSS	
KC329705	TISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC	AANEYGLPTHAPAYDY	WGQGTQVTVTVSS	
KC329698	TISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYC	AADTKT----GGGGYEY	WG---QVTVTVSS	IV
KC329706	TISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYC	AADTKT----GGGGYEY	WG---QVTVTVSS	
	*****.*:..* *****:***	* *	:*****	

A



B

**Figura 16. Alinhamento e modelagem.** A. Alinhamento dos 11 clones que foram depositados no GenBank, onde são ilustradas os frameworks (FR 1, FR2, FR3 e FR 4) e as regiões de complementaridade (CDR1, CDR2 e CDR 3). A seqüência sublinhada corresponde ao VHH clone 21(KC329708), note que a seqüência apresenta a região CDR3 completa com cerca de 17 aminoácidos. B. Modelagem do VHH (KC329708), sendo demonstradas as regiões de complementaridade em amarelo FR1, em verde FR2 e vermelho CDR3, utilizando Modeller V9.9.

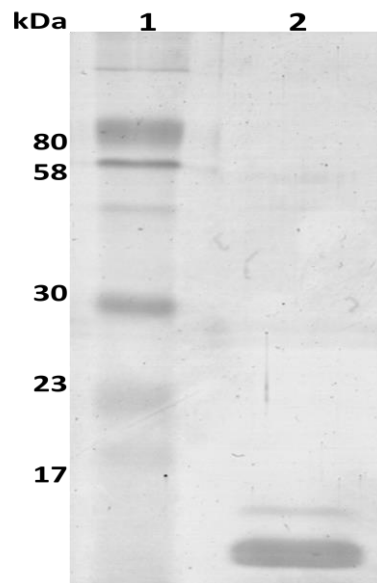


A partir da análise do seqüenciamento e posterior alinhamento entre os clones os mesmos foram divididos em quatro grupos (Fig. 16). Onde a divisão proposta foi de acordo com a variabilidade das sequências observadas, levando em consideração as sequências de aminoácidos das regiões determinantes de complementaridade, assim como o comprimento do CDR3.

Enquanto o grupo 3 apresentou 17 resíduos de aminoácidos na região da CDR3, nos grupos 1, 2 e 4 observou-se a presença de 12 ou 13 aminoácidos na mesma região hipervariável. Os aminoácidos responsáveis pela caracterização dos domínios VHHs de camelídeos no FR2 foram detectados em todas as 11 seqüências (Phe42, Glu49, Arg50, Leu/Phe52), mostrando as substituições pontuais, dos aminoácidos hidrofóbicos por hidrofílicos. Todas as seqüências apresentaram o aminoácido cisteína na posição 22 da FR1 e posição 96 da FR3, característicos do VHH, permitindo a formação da ponte dissulfeto, estabilizando a CDR3.

#### 4.5 Expressão e purificação do VHH clone KC329708 por cromatografia de afinidade em coluna de níquel

O clone identificado com o número e acesso KC329708, selecionado devido a sua alta capacidade de reconhecimento à proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus, definidos a partir dos testes prévios de ELISA e capacidade de interação apresentada nos testes de ressonância plasmônica de superfície, foi submetido a expressão e purificação por cromatografia em coluna de Ni<sup>2+</sup> e concentrado em coluna Amicon® Ultra-15 (Fig.20).



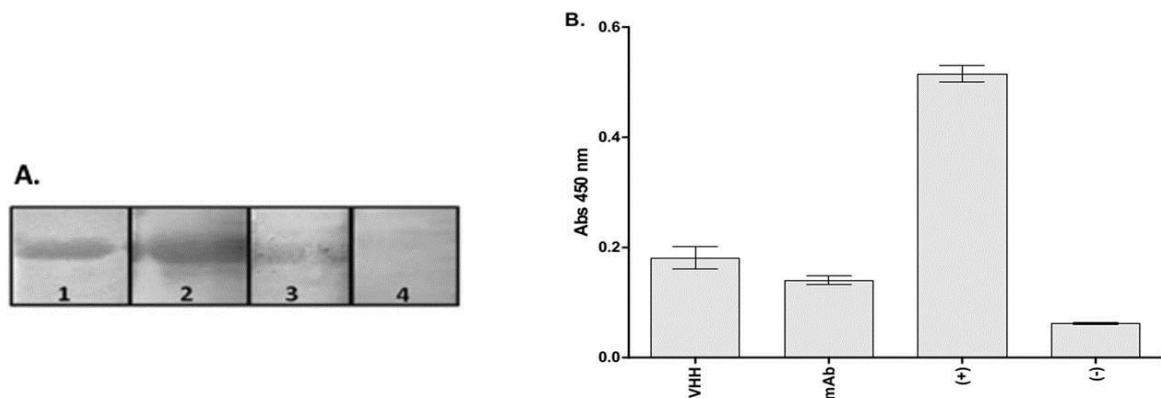
**Figura 17. Eletroforese em gel desnaturante de produto VHH após purificação.** Gel de SDS-PAGE 12,5% corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Linha 1: marcador de peso molecular (ColorPlus™ Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa)); linha 2: VHH (clone KC329708) após purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, com cerca de 15kDa.

#### 4.6 Verificação de afinidade do VHH purificado anti proteína rNΔ<sub>85</sub> por ELISA e *western blotting*

A especificidade do VHH (clone KC329708) foi avaliada por ensaios de ELISA e *western blotting* contra a proteína rNΔ<sub>85</sub>, a mesma utilizada para a imunização dos animais para a obtenção da biblioteca de anticorpos recombinantes. Estes ensaios foram realizados visando determinar a capacidade de reconhecimento do VHH anti proteína rNΔ<sub>85</sub>, após a purificação, comparando-o com a afinidade de reconhecimento do anticorpo monoclonal anti-rNΔ<sub>85</sub> α-hanta 432-6BF.

Os ensaios de *western blotting* confirmaram a especificidade e capacidade de reconhecimento pelo clone KC329708 à proteína rNΔ<sub>85</sub>, imobilizada na membrana de nitrocelulose, assim como o mAbs anti proteína recombinante. Como controle positivo foi utilizado o soro do animal previamente imunizado com a proteína rNΔ<sub>85</sub>, utilizado para construção da biblioteca de anticorpos recombinantes.

Adicionalmente, avaliou-se a especificidade também através de ELISA. Onde foram adsorvidos a proteína rNΔ<sub>85</sub> na superfície da placa *Nunc Maxisorp*®, os VHHs foram analisados em duplicata, o mAbs anti-rNΔ<sub>85</sub>α-hanta 432-6BF, o soro do animal imunizado como controle positivo e PBS 1X como controle negativo, nas mesmas condições de diluição (Fig. 18).



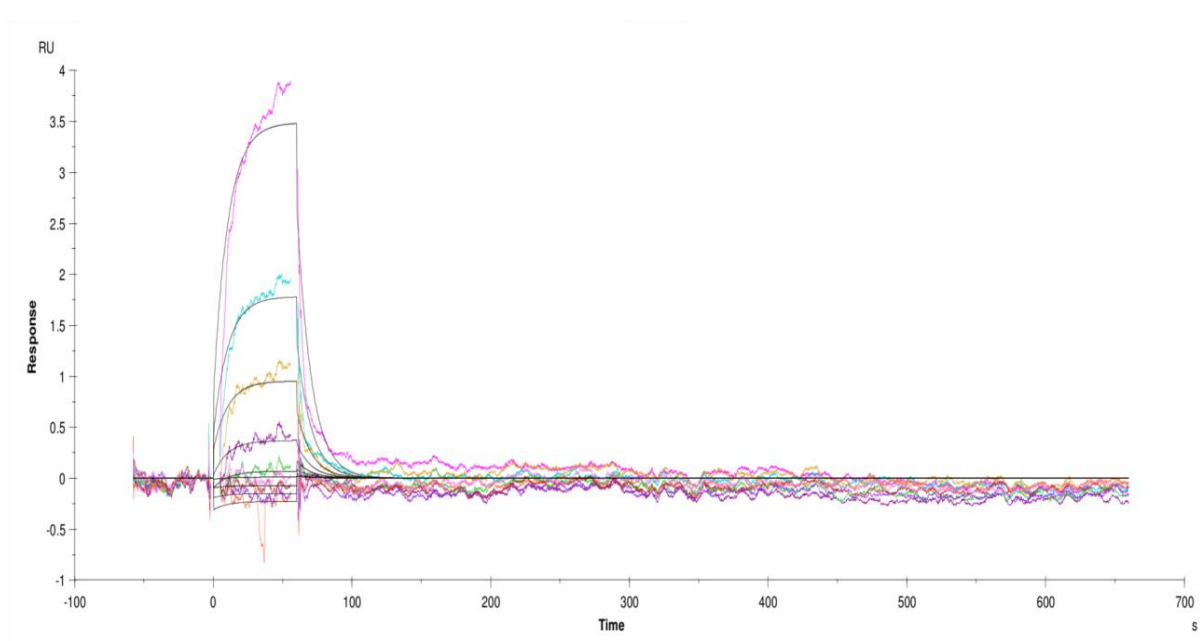
**Figura 18. Teste de especificidade por imunoenaios** A. Ensaio de western blotting para verificação da especificidade de reconhecimento do VHH purificado com a proteína rN $\Delta_{85}$ . As linhas 2,3 e 4 foram imobilizado e transferido para a membrana de nitrocelulose a prN, sendo submetidos ao teste de especificidade na linha 1: anticorpo monoclonal anti-rN $\Delta_{85}$  (diluição 1:1000), na linha 2: VHH purificado (diluição 1:200), linha 3: soro do animal imunizado (reforço após 3<sup>o</sup> imunização na diluição 1:1000) e linha 4: controle negativo para teste de especificidade cruzando com febre amarela. **B. Ilustrando teste de imunodeteção por ELISA contra a prN $\Delta_{85}$ , onde é demonstrada a absorbância OD<sub>450nm</sub>.** Onde: mAbs anti-rN $\Delta_{85}$   $\alpha$ -hanta 432-6BF, VHH purificado (0,525mg/mL) diluído 1:1000 SB; controle positivo (soro do animal imunizado com a proteína rN $\Delta_{85}$ ) diluído 1:1000 SB; Controle negativo (PBS 1X).

#### 4.7 Verificação da afinidade do VHH por Ressonância Plasmônica de Superfície

O tampão acetato a pH 5,5 foi utilizado, tendo em vista que demonstrou uma melhor condição de imobilização em testes prévios. A fim de caracterizar as propriedades de ligação do VHH anti proteína rN $\Delta_{85}$  à proteína recombinante do hantavírus, neste estudo foi utilizado para fins de comparação de afinidade o anticorpo monoclonal.

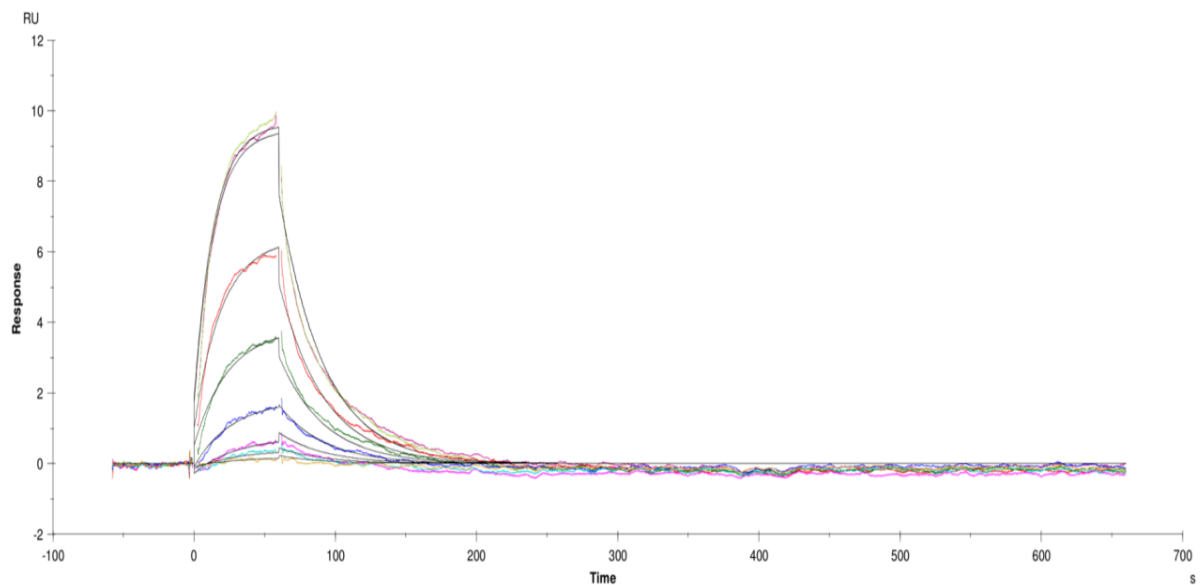
A afinidade do anticorpo monoclonal e do VHH anti proteína rN $\Delta_{85}$  foi mensurada após a imobilização da proteína recombinante, sendo que o anticorpo monoclonal apresentou um sinal de resposta de 404 (RU) à proteína no *sensorchip* CM5. As melhores condições de regeneração foram realizadas em duas etapas, a primeira solução utilizada foi a AIW e o segundo é a ICW 30 uL/min ambos injetados no fluxo de 30 segundos.

Para a análise dos resultados foi utilizado o *software BIA evaluation* as curvas experimentais ajustadas de acordo como modelo de Langmuir 01:01 ligação. Cinética de ligação foram calculados a partir do modelo de fornecer o melhor ajuste ( $\chi^2 < 0,05$ ). Os resultados da interação podem ser visto no sensorgrama demonstrado abaixo. Os valores da associação, dissociação e afinidade constantes para mAbs de  $k_a = 1029$  (1/Ms),  $k_d = 0,09662$  (1/s) e  $KD = 3.38 \times 10^{-6}$  (M).



**Figura 19. Análise da especificidade de reconhecimento do mAbs a proteína rN $\Delta_{85}$  por RPS.** Sensorgrama obtido após a injeção de anticorpo monoclonal nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78ng/mL.

Os valores da associação, dissociação e afinidade constantes para o VHH clone KC329708 anti proteína rN $\Delta_{85}$  é  $k_a=1.097 \times 10^4$  (1/Ms),  $k_d=0,03155$  (1/s) e  $K_D=5.52 \times 10^{-6}$  (M).



**Figura 20. Análise da especificidade de reconhecimento do VHH a proteína rN $\Delta_{85}$  por RPS.** Sensorgrama obtido após a injeção de VHH purificada em concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78ng/mL.

O clone VHH anti-proteína rN $\Delta_{85}$  apresentou um  $K_D$  cerca de 32 vezes menor em comparação com o mAbs anti-rN $\Delta_{85}$ . Além disso, os valores baixos do Chi21:1 demonstrados

pelo modelo de Langmuir, onde as curvas de ambos os anticorpos refletem a alta qualidade deste modelo que se aproxima da cinética de ligação e comportamento antígeno/anticorpo reais. O VHH anti-proteína rN485 também apresentou uma menor taxa constante de dissociação ( $K_{off}$ ) do que o mAbs anti-rN485 (3 vezes) e constante de velocidade de associação mais elevada ( $K_{on}$ ) cerca de 10 vezes.

## 5. DISCUSSÃO

Devido à capacidade de reconhecimento, afinidade e especificidade proveniente de uma ampla variedade de antígenos, os anticorpos são atualmente ferramentas essenciais às pesquisas biomédicas, ao diagnóstico de patologias e à terapêutica (VINCKE; MUYLDERMANS, 2012).

Em contraste com os anticorpos convencionais, os domínios variáveis dos anticorpos de camélídeos, nanocorpos ou VHHs, apresentam características peculiares, tais como, rápida biodistribuição e eliminação, devido ao seu tamanho reduzido (SCHOONOOGHE et al., 2012) eficiente penetração tecidual, alta solubilidade, boa termoestabilidade (DUMOULIN et al., 2002; OLICHON et al., 2006), são funcionais em condições de pH extremos e resistentes a atividade proteolítica (GHAHROUDI et al., 1997; HARMSEN et al., 2006; NGUYEN et al., 2009).

Alguns trabalhos propõem o uso de nanocorpos como agentes de diagnóstico ou na terapia anti-viral (GARAICOECHEA et al., 2008; HULTBERG et al., 2011). Estes subsidiam o uso de nanocorpos como protótipos para o diagnóstico rápido de infecções por hantavírus e baseado nas características da proteína do nucleocapsídeo do hantavírus, como alta imunogenicidade e participação do ciclo de replicação viral (JIANDONG et al., 2010), incitam a aplicação dos nanocorpos como *intrabody* visando o rastreamento da proteína do nucleocapsídeo do hantavírus, durante as fases de replicação viral e sua possível inibição durante o curso da infecção.

Para obtenção de nanocorpos específicos contra a proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus, optou-se por construir uma biblioteca de VHHs a partir da imunização de um *Lama glama* com a rN<sub>Δ85</sub> e selecioná-los utilizando a tecnologia *Phage Display*.

O sucesso da seleção por *Phage Display*, depende intimamente da complexidade da biblioteca primária, ou seja, quanto maior diversidade de clones dentro da biblioteca, maior a probabilidade de conter seqüências que se ligarão a um determinado alvo com maior afinidade (NOREN, 2001). Nessa perspectiva houve o acompanhamento do aumento do título de anticorpos produzido pelos animais através de ELISA de captura dos anticorpos contidos no soro dos camélídeos imunizados com a proteína rN<sub>Δ85</sub>. O esquema de imunização foi realizado com base no protocolo descrito por Chotwiwatthanakun e colaboradores, com

modificações em termos de intervalo de tempo entre as injeções, o número total de locais de injeção, e volumes de injeção. Em comparação ao estudo realizado por Richard e colaboradores, percebeu-se uma diminuição na resposta humoral do animal para proteína rN<sub>Δ85</sub> após a segunda imunização (dia 28). Assim, um terceiro reforço foi realizado, e verificou-se o aumento da resposta imunológica do animal. Ao término foi possível alcançar um título de anti-soro mais elevada do que foi observado em estudos anteriores (RICHARD et al., 2013) (fig.7).

Ao término do protocolo de imunização estabelecido, o animal apresentou um título de anticorpos circulantes capazes de reconhecer da proteína rN<sub>Δ85</sub>, na diluição  $1 \times 10^6$  o que possibilitou isolar cerca de  $6,8 \times 10^6$  linfócitos, após coleta de 30 mL de sangue do camélídeo, próximo do que foi observado e discutido por Muyldermans (2013) que afirma que pequenas bibliotecas, com cerca de  $10^6$  transformantes individuais, são representantes do repertório imunológico de células B em uma amostra de 50 mL de sangue do animal. A obtenção de uma biblioteca oriunda de hiperimunização possibilita a obtenção de clones específicos para o antígeno inoculado, onde linfócitos B específicos são enriquecidos e passam pelo processo de maturação *in vivo* no sistema imune do animal (BENHAR, 2001; WILLATS, 2002).

A capacidade de seleção de clones com propriedades desejadas depende diretamente da qualidade da biblioteca inicial. Naturalmente, bibliotecas *náive*, construídas a partir de animais não imunizados, podem ser utilizadas para seleção de peptídeos/proteínas por *Phage Display*, no entanto, há registros em que a afinidade dos anticorpos selecionados para com os antígenos alvos é frequentemente baixa, o que compromete a seleção clonal (BRADBURY et al., 2004). Por outro lado, a construção de bibliotecas oriundas de animais imunizados busca garantir a maturação da afinidade de anticorpos *in vivo* possibilitando a obtenção de elevados títulos de ligantes específicos ao antígeno alvo, como foi observado no desenvolvimento deste trabalho.

Em trabalhos de Ghahroudi e colaboradores (1997), foi possível o isolamento de ligantes com alta afinidade, após imunizar camélídeos com toxóide tetânico e lisozima foi possível selecionar ligantes competentes, partindo de bibliotecas imunes com considerável repertório de VHH. Já no trabalho de Kolkman & Law (2010) foi demonstrado que ao utilizar bibliotecas imunes era possível isolar nanocorpos capazes de reconhecer uma vasta gama de epítomos com afinidade a antígenos na faixa nano ou picomolar. Dados como esses corroboraram para a escolha da metodologia para o desenvolvimento da técnica a partir de

bibliotecas de nanocorpos oriundas de animais hiperimunizados com alvo proteico de interesse.

Para a confecção de uma biblioteca primária de clones contendo sequencias variadas de VHHs foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos genes específicos desenhados inicialmente por Ghahroudi e colaboradores (1997) responsáveis por amplificar a região do VHH de caméldeo, correspondente aos perfis eletroforéticos observados nas PCRI e PCRII, figuras 8 e 9A, respectivamente.

Para o desenvolvimento da técnica de *Phage Display*, optou por construir uma biblioteca apresentando os VHHs, fusionados a pIII do capsídeo do fago. Para isso, os segmentos dos VHHs amplificados após PCR, foram clonados em um vetor fagomídeo, pHEN1(fig. 5), e expressos fusionados ao capsídeo do bacteriófago filamentosso M13K07. Devido a eficiência de transformação ser fator limitante ao tamanho da biblioteca, as bactérias *E.coli*, cepa TG1 foram preparadas, apresentando ao final, uma competência de  $1,0 \times 10^9$  ufc/mL, o que possibilitou a construção de uma biblioteca primária de clones de VHH. Competência bacteriana similar a encontrada nos trabalhos de Ostermeier e Benkovic (2000) para a construção da biblioteca primária.

Após 20 sucessivas transformações, a biblioteca apresentou um título de  $3 \times 10^7$  clones individuais, garantindo uma considerável diversidade no repertório gênico de VHH como discutido por Bradbury e colaboradores (2004), além de assegurar a maturação da afinidade de anticorpos in vivo, para permitir a seleção de VHHs capazes de reconhecer uma grande diversidade de epitopos com afinidade em nano ou mesmo num intervalo picomolar (GHAHROUDI et al., 1997; KOLKMAN; LAW, 2010).

Outro ponto crítico relacionada a metodologia esta relacionado a capacidade de seleção dos fagos, para isso é construída uma biblioteca de fagos, denominada biblioteca secundária, onde seu tamanho e qualidade determina a capacidade de seleção de ligantes específicos (LING, 2003). Para isso, as bactérias contendo os clones fagomídeos foram infectadas com o fago auxiliar M13K07. A biblioteca secundária apresentou um título de  $1,7 \times 10^{11}$  cfu/mL de fagos o que possibilitou a seleção de clones VHHs pela metodologia de *biopanning*.

Após a primeira rodada de *biopanning*, 50% dos clones selecionados aleatoriamente foram capazes de reconhecer a proteína rN $\Delta_{85}$  (figura 11), este número aumentou para 73% após a segunda rodada de seleção (figuras 13 e 14). A especificidade dos clones VHHs a



proteína recombinante do hantavírus foi verificada, a partir de testes cruzados com o vírus vacinal da febre amarela cepa 17DD, demonstrado no gráfico, na figura 15, onde 39 clones VHHs selecionados aleatoriamente, que reconheceram a proteína rN<sub>Δ85</sub> com uma absorvância cerca de 10 a 15 vezes maior que o valor de corte, não foram capazes de reconhecer o vírus vacinal. Os resultados encontrados são semelhantes ao que foi discutido por Russel e colaboradores (2007) que afirmam que com o enriquecimento da população clonal, após duas rodadas de seleção, uma porcentagem de anticorpos específicos para o antígeno alvo pode ser identificado por ELISA.

A partir do seqüenciamento dos 26 clones selecionados, 11 perfis distintos foram identificados e estes subdivididos em quatro grupos (I,II,III e IV), baseados essencialmente nos resíduos de aminoácidos presentes nas regiões CDR, especialmente CDR3 (figura 16). Sendo importante registrar que a diferença estrutural entre o VH humano e VHH de camelídeos está localizada principalmente nas regiões CDR. Em VH humanos os domínios CDR1 e CDR2 adotam um número limitado de conformações, enquanto que os nanocorpos apresentam maior flexibilidade estrutural (KOLKMAN;LAW, 2010). O comprimento médio da CDR3 de VH humano e de rato são 12 e 9 resíduos de aminoácidos, respectivamente (WU et al., 1993), nos grupos I, II e IV foram observados 12 a 13 aminoácidos na região hipervariável 3, enquanto o grupo três apresentou uma CDR3 mais longa com 17 aa, caracterizando o VHH de camelídeo.

Três das quatro substituições de aminoácidos comparadas entre as seqüências de VH e VHH dos trabalhos de Muyldermans e colaboradores (1994) e Vu e colaboradores (1997) foram verificadas nos clones selecionados: V37F, G44E, L45R, não sendo observada a substituição dos aminoácidos na posição W47G discutidas, nos trabalhos supracitados mantendo entre 6 seqüências com aminoácidos com substituições de W47L e cinco sequencias com substituição de W47F.

Os aminoácidos característicos bem estabelecidos na FR2 foram detectados em todas as 11 seqüências analisadas (Phe42, Glu49, Arg50, Leu/Phe52). Estas variações distinguem os domínios de VHH dos domínios de VH de anticorpos convencionais, substituindo, na FR2, aminoácidos hidrofóbicos altamente conservados (domínios VH Val47, Gly49, Leu50, Trp52). Como discutido inicialmente por Hamers e colaboradores (1993) a presença da cisteína conservada possibilita a formação de ponte dissulfeto, estabilizando a CDR3 longa nos nanocorpos, em todos os clones caracterizados observou-se a presença da cisteína na

posição 22 da FR1 e posição 96 da FR3, confirmando o que foi identificado nos trabalhos de Muyldermans e colaboradores (1994) e Vu e colaboradores (1997).

O tamanho do CDR3 também foi um ponto essencial para a seleção de marcadores de células cancerígenas no trabalho de Kastelic e colaboradores (2009), que após três rodadas de seleção isolou VHHs que apresentavam de 13-14 resíduos de aa na região CDR3. Devido à maior reatividade no ELISA e por apresentar uma CDR3 mais extensa comparado aos demais clones selecionados, constituído por 17aa, o clone KC329708 foi selecionado e expresso em vetor pHEN 6xHistag e purificado por cromatografia em coluna de Ni<sup>2+</sup> (Fig.17).

Foi possível verificar a reatividade e especificidade do VHH clone KC329708 após purificação, por ensaio de *western blotting* (Fig.18A) por ELISA (Fig.18B). Na perspectiva de caracterizar o VHH selecionado, foram realizados ensaios de SPR para avaliar as propriedades de associação e dissociação à proteína rN $\Delta_{85}$ , entre o VHH KC329708 selecionado, bem como o mAbs. Ambos os sensorgramas, ilustram os perfis cinéticos da interação entre VHH e mAbs contra a proteína imobilizada proteína rN $\Delta_{85}$ , exibindo perfis semelhantes de associação e dissociação, visto que o VHH apresentou vantagens quando comparados com o mAb (Fig.19). Estes resultados estão em conformidade com a literatura, de acordo com modelos de estudo de interação antígeno-anticorpo, onde  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  e  $K_D$  são observados, geralmente constantes de  $10^{+4}$ , e  $10^{-2}$  até  $10^{-7}$ , respectivamente. Neste estudo, os valores das constantes obtidos são muito semelhantes a outros modelos de interação antígeno-anticorpo. Os resultados de SPR apresentaram bons padrões estatísticos, visto que, os pequenos valores do  $\chi^2$  obtidos, inferiores a 0,05 para ambas as análises de interações, mostraram a elevada qualidade dos dados obtidos (DOYLE et al., 2008; KARLSSON et al., 1991; TANHA et al., 2002).

Metodologias utilizando segmentos da proteína N como antígenos para a detecção de infecções por hantavírus foram demonstrados previamente por Wang e colaboradores (1993). Em 2005, Moreli produziu uma proteína N recombinante do vírus Araraquara expressa em *E. coli*, a partir do RNA viral extraído do soro de pacientes da região de Ribeirão Preto (MORELI, 2005; FIGUEIREDO et al., 2008). Raboni e colaboradores (2006) desenvolveram um teste de ELISA indireta para a detecção de anticorpos IgM e IgG, com uma elevada sensibilidade e especificidade, utilizando a proteína rN $\Delta_{85}$  da cepa Araucária, também isolada a partir de soro de paciente. Em outra vertente, na perspectiva do uso de anticorpos para desenvolvimento de diagnóstico, Mazzarotto e colaboradores (2009) propuseram o uso de

mAbs anti proteína rN<sub>Δ85</sub>, cepa Araucária, para o desenvolvimento de imunoenaios como ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG do soro de pacientes com suspeita de infecções por hantavírus. Wang e colaboradores (2007) já haviam desenvolvido um teste de ELISA de captura também utilizando os mAbs contra a nucleoproteína do hantavírus, traçando um comparativo com o teste de ELISA direto, que mostrou ser mais específicos para a detecção, especialmente nas os estágios iniciais da infecção (WANG et al., 2007).

De acordo com os dados já registrados na literatura, o emprego de anticorpos nos testes para detecção de infecções por hantavírus são promissores. Os resultados obtidos após caracterização dos VHH, com testes de sensibilidade e especificidade por meio de ELISA, *western blotting* e ressonância plasmônica de superfície (Fig.20), corroboram com o possível uso do VHH, como insumo para detecção da proteína do nucleocapsídeo do hantavírus, vislumbrando-os como protótipos para o desenvolvimento de diagnóstico para detecção de infecções por hantavírus. Não esquecendo ainda, que em virtude da sua capacidade de reconhecimento, podem ser utilizados para outros testes, tais como, imunohistoquímica, imunofluorescência no auxílio do diagnóstico.

Outra perspectiva, esta voltada para aplicabilidade terapêutica dos nanocorpos, como já demonstrado, podem ser utilizados para bloquear epítomos funcionais em um antígeno alvo, reduzindo os riscos de infecções oriundas de escapes virais (KOLKMAN;LAW, 2010). Em trabalhos com essa vertente, as perspectivas são do uso dos nanocorpos como *intrabodies*, visando bloquear a replicação, inibindo atividade enzimática intracelular e até mesmo a secreção de diferentes vírus. Em trabalho de Jiandong e colaboradores (2010), foi demonstrado que o bloqueio do tráfico de proteína N do hantavírus do ER/cis-Golgi é uma etapa essencial para a replicação do vírus, logo, o bloqueio deste tráfico com uso de nanocorpos, como *intrabodies*, devido as suas características físico-químicas, poderia ser uma alternativa para a inibição da atividade viral.

Finalmente, considerando a alta letalidade relacionada às infecções pelos hantavírus e a necessidade de um diagnóstico precoce e de alta acurácia, a produção de anticorpos no tipo VHH se mostra como uma metodologia alternativa, podendo ser aplicados como insumos potenciais, para detecção das infecções por hantavírus, como também, alternativamente, podem ser relacionados às aplicações terapêuticas, devido as propriedades apresentados por esses nanocorpos, visando a redução dos agravos ocasionados pelas hantavirose.

## 6. CONCLUSÃO

- ✓ A partir de uma biblioteca imune, pós-imunização utilizando a técnica de *Phage Display* foi possível selecionar 80 VHHs de camelídeos que reconheceram a proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus;
- ✓ Os testes prévios com as frações do sobrenadante e precipitado por ressonância plasmônica de superfície mostraram que os diferentes clones apresentaram uma boa interação com a rNΔ<sub>85</sub> imobilizada no *sensorchip*;
- ✓ Por meio de sequenciamento, 11 VHHs clones foram genicamente caracterizados, onde, a partir do alinhamento dos aminoácidos, foi possível determinar a similaridade das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) e *frameworks* (FRs), compatíveis com os VHH de camelídeos, disponíveis no *GenBank*,
- ✓ O clone (KC329708) que apresentou maior reatividade nos testes de ELISA e testes cinéticos prévios por ressonância plasmônica de superfície foi subclonado em vetor pHEN1-6xHistag, o que possibilitou a sua expressão e purificação;
- ✓ O clone VHH KC329708 foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de Ni<sup>2+</sup> sem perder sua capacidade de reconhecimento;
- ✓ Nos testes imunoenzimáticos de ELISA e *western blotting* o VHH após purificação, mostrou capacidade de reconhecimento à proteína rNΔ<sub>85</sub>;
- ✓ A partir dos ensaios de RPS foi possível analisar a cinética de interação do VHH comparado ao mAbs, onde o VHH apresentou uma expressiva cinética de interação em *sensorchip*.

## 7. PERSPECTIVAS

Os resultados prévios de sensibilidade e especificidade realizados por ELISA e *western Blotting* demonstraram que o clone VHH KC329708 reconhece expressivamente a proteína recombinante do hantavírus, fato este que corrobora para seu possível uso como insumo para um diagnóstico alternativo, para reconhecimento da proteína no nucleocapsídeo do hantavírus em soro de roedor que permanece infectado durante toda a sua vida e em soro de humano em regiões onde há notificação de casos de hantaviruses, auxiliando no prognóstico e no controle das infecções. Fato este que incita para a caracterização dos demais clones selecionados, além de buscar meios para otimizar a expressão dos clones VHHs em sistema eucarioto, como em hospedeiro *Pichia pastoris*.

A obtenção e desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos, que apresentem uma alta acurácia permitirão detectar a circulação dos hantavírus tanto em humanos, como em roedores em regiões que não apresentam dados sobre a prevalência e circulação do vírus, fato que auxiliará a vigilância em saúde e nos dados epidemiológicos.

Ainda será necessária a realização dos testes de imunodeteção, utilizando soro de humanos e roedores para a confirmação da verificação da capacidade de detecção do agente etiológico, por testes imunoenzimáticos diretos, assim como realizar a verificação da sensibilidade e especificidades dos testes, estabelecendo *cut off* e padronização dos ensaios.

Uma vez que foi proposto o uso dos nanocorpos como protótipos potenciais para a neutralização viral, será necessário o estabelecimento de parcerias para a realização dos testes em cultura celular, visto que a cultura do vírus requer laboratórios de segurança NB3.

Enfim, dados demonstrados nesse trabalho corroboram para o potencial uso dos nanocorpos para o desenvolvimento de testes de imunodeteção e imunoterapêutica voltados para os hantavírus, devido sua potencial capacidade de reconhecer a proteína recombinante do nucleocapsídeo demonstrados nos testes de reconhecimento, sensibilidade e interação discutidos previamente neste trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS

- AITICHOU, M.; SALEH, S. S.; MCELROY, A. K.; SCHMALJOHN, C.; IBRAHIM, M. S.; Identification of Dobrava, Hantaan, Seoul, and Puumala viruses by one-step real-time RT-PCR. **J Virol Methods**. v. 124, n. 1-2, p. 21-6, 2005.
- ALFADHLI, A.; LOVE, Z.; ARVIDSON, B.; SEEDS, J.; WILLEY, J.; BARKLIS, E. Hantavirusnucleocapsid protein oligomerization. **J Virol**. v. 75, n. 4, p.2019-23. 2001.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**. v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.
- ANDERSSON, a M.; PETTERSSON, R. F. Targeting of a short peptide derived from the cytoplasmic tail of the G1 membrane glycoprotein of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) to the Golgi complex. **J Virol**. v. 72, n. 12, p. 9585-96, 1998.
- ARAP, M.A. Phage display technology - Applications and innovations. **Genet. Mol.Biol**. v. 28, n. 1, p. 1-9, 2005.
- ARAP, W.; HAEDICKE, W.; BERNASCONI, M.; KAIN, R.; RAJOTTE, D.; KRAJEWSKI, S.; ELLERBY, H. M.; BREDESEN, P. R.; RUOSLAHTI, E. 2002 Targeting the prostate for destruction through a vascular address. **ProcNatlAcadSci USA**. v. 99, n. 3, p. 1527-1531, 2002.
- ARBABI GHAHROUDI, M.; DESMYTER, A.; WYNS, L.; HAMERS, R.; MUYLDERMANS, S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. **FEBS Letters**. v. 414, n. 3, p. 521-526, 1997.
- BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol Adv**. v.19, n.1, p:1-33. 2001.
- BHARADWAJ, M.; MIROWSKY, K.; YE, C.; BOTTEN, J.; MASTEN, B.; YEE, J.; LYONS, C. R.; HJELLE, B. Genetic vaccines protect against Sin Nombre hantavirus challenge in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). **J GenVirol**. v.83, n. Pt 7, p. 1745-51, 2002.
- BHARADWAJ, M.; NOFCHISSEY, R.; GOADE, D.; KOSTER, F.; HJELLE, B. Humoral immune responses in the hantavirus cardiopulmonary syndrome. **J. Infect. Dis**. v. 182, n. 1, p.43-48, 2000.
- BORGES, A. A.; CAMPOS, G. M.; MORELI, M. L.; SOUZA, R. L.; AQUINO, V. H.; SAGGIORO, R. P. Hantavirus cardiopulmonary syndrome: immune response and pathogenesis. **Microbes Infect**. v. 8, n. 8, p. 2324-30, 2006.
- BRADBURY, A.; MARKS, J.D. Phage antibody ibraries. In: Clackson, T.; Lowman, H.B. Phage Display. New York: **Oxford University Press**. p. 243-288, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Hantavirose: Casos e óbitos confirmados totais, 1993 – 2012 (dados preliminares até Junho 2012). Acesso: 19 de Janeiro de 2013.

CAMPOS, G. M.; BORGES, A. A.; BADRA, S. J.; FIGUEIREDO, G. G.; SOUZA, R. L. M.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus: aspectos clínicos de uma doença emergente no sudeste brasileiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* v.42, n. 3, p. 282-289, 2009.

CHO, H. W.; HOWARD, C. R. Antibody responses in humans to an inactivated hantavirus. *Vaccine.* v. 17, n. 20-21, p. 2569-75, 1999.

CHO, H. W.; HOWARD, C. R.; LEE, H. W. Review of an inactivated vaccine against hantaviruses. *Intervirology.* v. 45, n. 4-6, p.328-33, 2002.

CHOI, Y.; AHN, C.J.; SEONG, K.M.; JUNG, M.Y.; AHN, B.Y. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero Cells. *Vaccine.* v. 21, n. 17-18, p. 1867-73.2003.

CHU, Y. K.; JENNINGS, G. B.; SCHMALJOHN, C. S. A vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. *J Virol.* v. 69, n. 10, p. 6417-6423, 1995.

CIFUENTES-MUÑOZ, N.; BARRIGA, G. P.; VALENZUELA, P. D.; TISCHLER, N. D. Aromatic and polar residues spanning the candidate fusion peptide of the Andesvirus Gc protein are essential for membranefusion and infection. *J Gen Virol.* v. 92, Pt 3, p. 552-63, 2011.

CHOTWIWATTHANAKUN C, PRATANAPHON R, AKESOWAN S, SRIPRAPAT S, RATANABANANGKOON K. Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms using a low dose, low volume, multi-site immunization protocol. *Toxicon* 39(10):1487-94, 2001.

CORTEZ-RETAMOZO, V.; BACKMANN, N.; SENTER, P. D.; WERNERY, U.; DE BAETSELIER, P.; MUYLDERMANS, S.; REVETS, H. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res.* v. 64, n. 8, p. 2853-2857, 2004.

da SILVA, M.V.; VASCONCELOS, M. J.; HIDALGO, N. T.; VEIGA, A. P.; CANZIAN, M.; MAROTTO, P.C.; DE LIMA, V.C. Hantavirus pulmonary syndrome. Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop. São Paulo.** v. 39, n. 4, p. 231-234, 1997.

DARGEVICIUTE, A.; BRUS SJÖLANDER, K.; SASNAUSKAS, K.; KRÜGER, D.; MEISEL, H.; ULRICH, R.; LUNDKVIST, A. Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model. *Vaccine.* v. 20, n. 29-30, p. 3523-31, 2002.

DE GENST, E.; SILENCE, K.; DECANNIERE, K.; CONRATH, K.; LORIS, R.; KINNE, J.; MUYLDERMANS, S.; WYNS, L. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 103, n. 12, p. 4586-9, 2006.

DESMYTER, A.; DECANNIERE, K.; MUYLDERMANS, S.; WYNS, L. Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. **J Biol Chem**. v. 276, n. 28, p. 26285-90, 2001.

DESMYTER, A.; TRANSUE, T. R.; GHAHROUDI, M. A.; THI, M. H.; POORTMANS, F.; HAMERS, R.; MUYLDERMANS, S.; WYNS, L. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. **Nat Struct Biol**. v. 3, n. 9, p. 803-811, 1996.

DONG, G. M.; HAN, L.; AN, Q.; LIU, W. X.; KONG, Y.; YANG, L. H. Immunization effect of purified bivalent vaccine to haemorrhagic fever with renal syndrome manufactured from primary cultured hamster kidney cells. **Chin Med J (Engl)**. v. 118, n. 9, p. 766-8, 2005.

DUFNER, P.; JERMUTUS, L.; MINTER, R. R. Harnessing phage and ribosome display for antibody optimisation. **Trends Biotechnol**. v. 24, n. 11, p. 523-529, 2006.

DUMOULIN, M.; CONRATH, K.; VAN MEIRHAEGHE, A.; MEERSMAN, F.; HEREMANS, K.; FRENKEN, L. G.; MUYLDERMANS, S.; WYNS, L.; MATAGNE, A. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. **Protein Sci**. v. 11, n.3, p. 500-15, 2002.

EWERT, S.; CAMBILLAU, C.; CONRATH, K.; PLUCKTHUN, A. Biophysical properties of camelid V(HH) domains compared to those of human V(H)3 domains. **Biochemistry**. v. 41, n. 11, p. 3628-3636, 2002.

FERREIRA, M.S.; NISHIOKA, S.A.; SANTOS, T.L.; SANTOS, R.P.; SANTOS, P.S.; ROCHA, A. Hantavirus pulmonary syndrome in Brazil: Clinical aspects of three new cases. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v. 42, n. 1, p. 41-6, 2000.

FERRÉS, M.; VIAL, P.; MARCO, C.; YAÑEZ, L.; GODOY, P.; CASTILLO, C.; HJELLE, B.; DELGADO, I.; LEE, S. J.; MERTZ, G. J. Prospective Evaluation of House hold Contacts of Persons with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome in Chile. **J Infect Dis**. v. 195, n. 11, p.1563-1571, 2007.

FIGUEIREDO, L. T.; CAMPOS, G. M.; RODRIGUES, F. B. Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus: aspectos epidemiológicos, clínicos, do diagnóstico laboratorial e do tratamento. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 34, n. 1, p. 13-23, 2001.

FIGUEIREDO, L. T.; MORELI, M. L.; BORGES, A. A.; FIGUEIREDO, G. G.; SOUZA, R.L.; AQUINO, V. H. Expression of a hantavírus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. **Braz J Med Biol Res**. v. 41, n. 7, p. 596-9, 2008.

FIGUEIREDO, L.T.; MORELI, M.L.; BORGES, A.A.; FIGUEIREDO, G.G.; BADRA, S.J.; BISORDI, I.; SUZUKI, A.; CAPRIA, S.; PADULA, P. Evaluation of an enzyme-linked



immunosorbent assay based on Araraquara virus recombinant nucleocapsid protein. **Am J TropMedHyg.**v. 81, n. 2, p. 273-276, 2009.

FRENKEN, L. G. J.; VAN DER LINDEN, R. H. J.; HERMANS, P.; BOS, J. W.; RUULS, R. C. DE GEUS, B.; VERRIPS, C. T. Isolation of antigen specific llama V-HH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biotechnol.**v. 78, n. 1, p. 11-21, 2000.

GALENO, H.; MORA, J.; VILLAGRA, E.; FERNANDEZ, J.; HERNANDEZ, J.; MERTZ, G. J.; RAMIREZ, E. First human isolate of hantavirus (Andes virus) in the Americas. **Emerg Infect Dis.** v.8, n.7, p.657-61, 2002.

GAO, C.; MAO, S.; KAUFMANN, G.; WIRSCHING, P.; LERNER, R. A.; JANDA, K. D. A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. **ProcNatlAcadSci USA.** v.99, n. 20, p. 12612-6, 2002.

GARAICOECHEA, L.; OLIHON, A.; MARCOPPIDO, G.; WIGDOROVITZ, A.; MOZGOVOJ, M.; et al. Protein Possess Broad Neutralizing Activity In Vitro and Confer Protection Llama-Derived Single-Chain Antibody Fragments Directed to Rotavirus VP6 Protein Possess Broad Neutralizing Activity In Vitro and Confer Protection against Diarrhea in Mice. **J Virol.** v. 82, n. 19, p. 9753-64, 2008.

GAVRILOVSKAYA, I. N.; GORBUNOVA, E. E.; MACKOW, E.R. Pathogenic hantaviruses direct the adherence of quiescent platelets to infected endothelial cells. **J Virol.** v. 89, n.9, p. 4832-9, 2010.

GAVRILOVSKAYA, I. N.; SHEPLEY, M.; SHAW, R.; GINSBERG, M. H.; MACKOW, E. R. b3-integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. **ProcNatlAcadSci USA.** v.95, n. 12, p.7074-9, 1998.

GELDMACHER, A.; SCHMALER, M.; KRÜGER, D. H.; ULRICH, R. Yeast-expressed hantavirus Dobravanucleocapsid protein induces a strong, long-lasting, and highly cross-reactive immune response in mice. **Viral Immunol.** v. 17, n. 1, p. 115-22, 2004.

GHAHROUDI, M. A.; DESMYTER, A.; WYNS, L.; HAMERS, R.; MUYLDERMANS, S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. **FEBS Lett.** v. 414, p. 521-26, 1997.

GOLDMAN, E. R.; ANDERSON, G. P.; LIU, J. L.; DELEHANTY, J. B.; SHERWOOD, L. J.; OSBORN, L. E.; CUMMINS, L. B.; HAYHURST, A. Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. **Anal Chem.** v. 78, n. 24, p. 8245-55, 2006.

GOLDSMITH, C. S.; ELLIOT, L. H.; PETERS, C. J.; ZAKI, S. R.Ultrastructural characteristics of Sin Nombre virus, causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. **Arch Virol.** v. 140, n. 12, p. 2107-22, 1995.

GREENBERG, A. S.; AVILA, D.; HUGHES, M.; HUGHES, A.; MCKINNEY, E. C.; FLAJNIK, M. F. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. **Nature**. v. 374, n. 6518, p. 168-73, 1995.

GREENWOOD, J.; HUNTER, G.J.; PERHAM, R. N. Regulation of filamentous bacteriophage length by modification of electrostatic interactions between coat protein and DNA. **J Mol Biol**. v. 217, n. 2, p. 223-227, 1991.

GRØN, H.; HYDE-DERUYSCHEER, R. Peptides as tools in drug discovery. **Curr Opin Drug Discov Devel**. v. 3, n. 5, p. 636-645, 2000.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**. v. 18, n. 15, p. 2714-23, 1997.

HALLIN G. W.; SIMPSON S. Q.; CROWELL R. E.; JAMES D. S.; KOSTER F. T.; MERTZ G. J.; LEVY H. Cardiopulmonary manifestations of hantavirus pulmonary syndrome. **Crit Care Med**. v.24, n. 2, 252-8, 1996.

HAMERS-CASTERMAN, C.; ATARHOUCHE, T.; MUYLDERMANS, S.; ROBINSON, G.; HAMERS, C.; SONGA, E. B.; BENDAHDAN, N.; HAMERS, R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**. v. 363, n. 6438, p. 446-448. 1993.

HARDESTAM, J.; KARLSSON, M.; FALK, I. K.; OLSSON, G.; JONAS KLINGSTRÖM, J.; LUNDKVIST, Å. A. Puumala hantavirus excretion kinetics in bank voles (*Myodes glareolus*). **Emerg Infect Dis**. v. 14, n. 8, p. 1209-1215, 2008.

HARMSSEN, M. M.; DE HAARD, H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 77, n. 1, p. 13-22, 2007.

HARMSSEN, M. M.; RUULS, R. C.; NIJMAN, I. J.; NIEWOLD, T. A.; FRENKEN, L. G.; DE GEUS, B. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. **Mol Immunol**. v. 37, n. 10, p. 579-90, 2000.

HARMSSEN, M. M.; VAN SOLT, C. B.; VAN ZIJDERVELD-VAN BEMMEL, A M.; NIEWOLD, T. A; VAN ZIJDERVELD, F. G. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 72, n. 3, p. 544-51, 2006.

HARRISON, R. A.; HASSON, S. S.; HARMSSEN, M.; LAING, G. D.; CONRATH, K.; THEAKSTON, R. D. G. Neutralisation of venom-induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non-IgG components in camelid sera. **Toxicon**. v. 47, n. 3, p. 364-68, 2006.

HART, C.A.; BENNETT, M. Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis. **Microbes Infect**. v.1, n.14, 1229-37, 1999.

HEMMINGA, M. A.; VOS, W. L.; NAZAROV, P. V.; KOEHORST, R. B.; WOLFS, C. J.; SPRUIJT, R. B.; STOPAR, D. Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages. **EurBiophys J.** v. 39, n. 4, p. 541-50, 2010.

HEPOJOKI, J.; STRANDIN, T.; LANKINEN, H.; VAHERI, A. Hantavirus structure-molecular interactions behind the scene. **J Gen Virol.** v. 93, n. Pt 8, p.1631-44, 2012.

HEPOJOKI, J.; STRANDIN, T.; WANG, H.; VAPALAHTI, O.; VAHERI, A.; LANKINEN, H. Cytoplasmic tails of hantavirus glycoproteins interact with the nucleocapsid protein. **J Gen Virol.** v. 91, n. Pt 9, p. 2341-50, 2010.

HJELLE, B.; JENISON, S.; TORREZ-MARTINEZ, N.; YAMADA, T.; NOLTE, K.; ZUMWALT, R.; MACINNES, K.; MYERS, G. A novel hantavirus associated with an outbreak of fatal respiratory disease in the southwestern United States: evolutionary relationships to known hantaviruses. **J Virol.** v. 68, n. 2, p. 592-6, 1994.

HMILA, I.; COSYNS, B.; TOUNSI, H.; ROOSENS, B.; CAVELIERS, V.; ABDERRAZEK, R. B.; BOUBAKER, S.; MUYLDERMANS, S.; EL AYEB, M.; BOUHAOUALA-ZAHAR, B.; LAHOUTTE, T. Pre-clinical studies of toxin-specific nanobodies: evidence of in vivo efficacy to prevent fatal disturbances provoked by scorpion envenoming. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 264, n. 2, p. 222-31, 2012.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nat Biotechnol.** v. 23, n. 9, p. 1126-36. 2005.

HONG, H. Y.; LEE, H. Y.; KWAK, W.; YOO, J.; NA, M. H.; SO, I. S.; KWON, T. H.; PARK, H. S.; HUH, S.; OH, G. T.; KWON, I. C.; KIM, I. S.; LEE, B. H. Phage display selection of peptides that home to atherosclerotic plaques: IL-4 receptor as a candidate target in atherosclerosis. **J Cell Mol Med.** v. 12, n. 5B, p. 2003-14, 2008.

HUGGINS, J. W.; HSIANG, C. M.; COSGRIFF, T. M.; GUANG, M.Y.; SMITH, J. I.; WU, Z. O.; LEDUC, J. W.; ZHENG, Z. M.; MEEGAN, J. M.; WANG, Q. N.; OLAND, D. D.; GUI, X. E.; GIBBS, P. H.; YUAN, G. H.; ZHANG, T. M. Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. **J InfectDis.** v. 164, n. 6, p. 1119-27, 1991.

HUGGINS, J. W.; KIM, G. R.; BRAND, O. M.; MCKEE JR, K.T. Ribavirin therapy for Hantaan virus infection in suckling mice. **J Infect Dis.** v. 153, n. 3, p. 489-497, 1986.

HULTBERG, A.; TEMPERTON, N. J.; ROSSEELS, V.; KOENDERS, M.; GONZALEZ-PAJUELO, M. et al. Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. **PLoS ONE.** v. 6, n. 4, p. e17665, 2011.

HUSSEIN, I. T. M.; HASEEB, A.; HAQUE, A.; MIR, M. A. Recent advances in hantavirus molecular biology and disease. In: ALLEN, Laskin; GEOFFREY, Gadd; SIMA, Sariaslani. *Adv Appl Microbiol.* Philadelphia: Elsevier, Cap. 2, p.35-75. 2011.

HUTCHINSON, K. L.; PETERS, C. J.; NICHOL, S. T. Sin Nombre virus mRNA synthesis. **Virology**. v. 224, n. 1, p. 139-49, 1996.

HYDE-DERUYSCHER, R.; PAIGE, L. A.; CHRISTENSEN, D. J.; HYDE-DERUYSCHER, N.; LIM, A.; FREDERICKS, Z. L.; KRANZ, J.; GALLANT, P.; ZHANG, J.; ROCKLAGE, S. M.; FOWLKES, D. M.; WENDLER, P. A.; HAMILTON, P. T. Detection of small-molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries. **Chem Biol**. v. 7, n. 1, p. 17-25, 2000.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**. v. 69, n. 1, p. 11–25, 1992.

JIANDONG, LI.;QUANFU, ZHANG.;TAO, WANG.;CHUAN, LI.;MIFANG, LIANG.;DEXIN, LI.Tracking hantavirus nucleocapsid protein using intracellular antibodies. **Virol J**.v.7, n.339, 2010.

JIN, M.;PARK, J.; LEE, S.; PARK, B.; SHIN, J;et al. Hantaanvirus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. **Virology**. v. 294, n. 1, p. 60–69, 2002.

JOHNSON, A. M.;DE SOUZA, L. T.;FERREIRA, I. B.;PEREIRA, L. E.;KSIĄZEK, T. G.;ROLLIN, P. E.;PETERS, C. J.;NICHOL, S. T. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. **J Med Virol**.v.59, n. 4, p. 527-35,1999.

JONSSON, C. B.; FIGUEIREDO, L. T.; VAPALAHTI, O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. **Clin Microbiol Rev**. v. 23, n. 2, p. 412-41, 2010.

KARLSSON, R.; MICHAELSSON, A.; MATTSSON, L. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. **J Immunol Methods**. v.145, p. 229-40, 1991.

KASTELIC, D.; FRKOVIĆ-GRAZIO, S.; BATY, D.; TRUAN, G.; KOMEL, R.; POMPON, D. A single-step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers. **J Immunol Methods**.v. 350, n. 1-2, p. 54-62, 2009.

KAUKINEN, P.; KUMAR, V.; TULIMÄKI, K.; ENGELHARDT, P.; VAHERI, A.; PLYUSNIN, A. Oligomerization of Hantavirus N protein: C-terminal alpha-helices interact to form a shared hydrophobic space. **J Virol**. v. 78, n. 24, p. 13669-77, 2004.

KAUKINEN, P.; VAHERI, A.; PLYUSNIN, A. Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. **Arch Virol**. v. 150, n. 9, p. 1693-713, 2005.

KING A. M. Q., ADAMS M. J., CARSTENS E. B., LEFKOWITZ E. J. (editors) **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: **Elsevier Academic Press**, 2011.

- KOLKMAN, J. A.; LAW, D. A. Nanobodies - from llamas to therapeutic proteins. **Drug Discov Today Technol**7: p. 139-146, 2010.
- KRÜGER, D. H.; SCHÖNRICH, G.; KLEMPA, B. Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection. **Hum Vaccin.** v. 7, n. 6, p. 685-693, 2011.
- KSIAZEK, T. G.; PETERS, C. J.; ROLLIN, P. E.; ZAKI, S.; NICHOL, S.; SPIROPOULOU, C. . Identification of a new North American hantavirus that causes acute pulmonary insufficiency. **Am J Trop Med Hyg.** v. 52, n. 2, p. 117-23, 1995.
- LAFAYE P, ACHOUR I, ENGLAND P, DUYCKAERTS C, ROUGEON F. Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid  $\beta$ , prevent  $A\beta$ -induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. **Mol Immunol** 46: 695-704, 2009.
- LAUWEREYS, M.; GHAHROUDI, M. A.; DESMYTER, A.; KINNE, J.; HOLZER, W.; et al. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. **EMBO J.**v. 17, n. 13, p. 3512-20,1998.
- LEDNICKY, J. A.; Hantaviruses: a short review. **Arch Pathol Lab Med.** v. 127, p. 30-35, 2003.
- LEE, H. W.; LEE, P W.; JOHNSON, K. M. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. 1978. **J Infect Dis.** v. 190, n. 9, p. 1711-21, 2004.
- LEE, H.; LEE, P.; JOHNSON, K. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. **J InfectDis.**v.137, n.3, p.298-308, 1978.
- LEE, H.W.; AN, C. N. Development of vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome. **J Korean Soc Virol.** v. 18, p. 143-148, 1988.
- LEE, H.W.; VAN DER GROEN, G. Hemorrhagic fever with renal syndrome. **ProgMedVirol.** v. 36; 62-102, 1989.
- LEE, P. W.; GIBBS JR, C. J.; GAJDUSEK, D. C.; YANAGIHARA, R. Serotype classification of hantaviruses by indirect immunofluorescence antibody and plaque reduction neutralization test. **J ClinMicrobiol.** v. 22, n. 6, p. 940-944, 1985.
- LEMOS, E. R. S; SILVA, M.V. Hantavírus. In: COURA, J.R. (ed.) Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1845-1853 (2005).
- LIMONGI, J. E.; DA COSTA, F. C.; PINTO, R. M.; DE OLIVEIRA, R. C.; BRAGAGNOLO, C.; LEMOS, E. R.; DE PAULA, M. B.; PAJUABA NETO, A. A.; FERREIRA, M. S. Cross-sectional survey of hantavirus infection, Brazil. **EmergInfect Dis.** v. 15, n. 12, p. 1981-3, 2009.
- LING MM. Large antibody display libraries for isolation of high-affinity antibodies. **CombChem High Throughput Screen.** v.6, n.5, p.421-32.2003.

- LOZACH, P. Y.; MANCINI, R.; BITTO, D.; MEIER, R.; OESTEREICH, L.; et al. Entry of bunyaviruses into mammalian cells. **Cell Host Microbe**. v. 7, n. 6, p. 488–499, 2009.
- LUNDKVIST, A.; KALLIO-KOKKO, H.; SJOLANDER, K. B.; LANKINEN, H.; NIKLASSON, B.; VAHERI, A.; VAPALAHTI, O. Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein: identification of B cell epitopes and domains involved in protective immunity. **Virology**. v. 216, n. 2, p. 397-406, 1996.
- MACKOW, E. R.; GAVRILOVSKAYA, I. N. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**. v. 256, p. 91-115, 2001.
- MACNEIL, A.; NICHOL, S. T.; SPIROPOULOU, C. F. Hantavirus pulmonary syndrome. **Virus Research**. v. 162, n. 1-2, p. 138-47, 2011.
- MAES, P.; CLEMENT, J.; GAVRILOVSKAYA, I.; VAN RANST, M. Hantavirus: immunology, treatment and prevention. **Viral Immunol**. v. 17, n. 4, p. 481-97, 2004.
- MAES, P.; CLEMENT, J.; VAN RANST, M. Recent approaches in hantavirus vaccine development. **Expert Rev Vaccines**. v. 8, n.1, p. 67-76, 2009.
- MAES, P.; KEYAERTS, E.; BONNET, V.; CLEMENT, J.; AVSIC-ZUPANC, T.; ROBERT, A.; VAN RANST, M. Truncated recombinant Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins induce strong, long-lasting immune responses in mice. **Intervirology**. v. 49, n. 5, p. 253-60, 2006.
- MÄKELÄ, S.; MUSTONEN, J.; ALA-HOUHALA, I.; HURME, M.; KOIVISTO, A. M.; VAHERI, A.; PASTERNAK, A. Urinary excretion of interleukin-6 correlates with proteinuria in acute Puumala hantavirus-induced nephritis. **Am J Kidney Dis**. v. 43, n. 5, p. 809-816, 2004.
- MARTINEZ, V. P.; BELLOMO, C. M.; CACACE, M. L.; SUÁREZ, P.; BOGNI, L.; PADULA, P. J. Hantavirus Pulmonary Syndrome in Argentina, 1995-2008. **Emerg. Infect Dis**. v. 16, n. 12, p. 1853-1860, 2010.
- MAZZAROTTO, G. A.; RABONI, S. M.; STELLA, V.; CARSTENSEN, S.; DE NORONHA, L.; LEVIS, S.; ZANLUCA, C.; ZANETTI, C. R.; BORDIGNON, J.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of Araucária hantavirus. **J Virol Methods**. v. 162, n. 1-2, p. 96-100, 2009.
- MEDINA, R. A.; MIROWSKY-GARCIA, K.; HUTT, J.; HJELLE, B. Ribavirin, human convalescent plasma and anti-beta3 integrin antibody inhibit infection by Sin Nombre virus in the deer mouse model. **J Gen Virol**. v. 88, n. Pt 2, p. 493-505, 2007.
- MEISEL, H.; WOLBERT, A.; RAZANSKIENE, A.; MARG, A.; KAZAKS, A.; SASNAUSKAS, K.; PAULI, G.; ULRICH, R.; KRÜGER, D. H. Development of novel immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM enzyme immunoassays based on recombinant

- Puumala and Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins. **Clin vaccine immunol.** v. 13, n. 12, p. 1349-57, 2006.
- MEYER, B. J.; SCHMALJOHN, C. S. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. **Trends Microbiol.** v. 8, n.2, p. 61-67, 2000.
- MINAEIAN, S.; RAHBARIZADEH, F.; ZARKESH-ESFAHANI, S. H.; AHMADVAND, D.; BROOM, O. J. Neutralization of human papilloma virus by specific nanobodies against major capsid protein L1. **J MicrobiolBiotechnol.** v. 22, n. 5, p. 721-8,2012.
- MIR, M. A.; PANGANIBAN, A. T. The bunyavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone: possible roles in viral RNA panhandle formation and genome replication. **RNA.** v. 12, n. 2, p. 272–282, 2006.
- MIR, M. A.; PANGANIBAN, A. T. Trimeric hantavirus nucleocapsid protein binds specifically to the viral RNA panhandle. **J Virol.** v. 78, n. 15, p. 8281-8, 2004.
- MOHL, B. P.; BARR, J. N. Investigating the specificity and stoichiometry of RNA binding by the nucleocapsid protein of Bunyamwera virus. **RNA.**v. 15, n. 3, p. 391-399, 2009.
- MORELI, M. L.; SOUSA, R. L. M. De; FIGUEIREDO, L. T. M. Detection of Brazilian hantavirus by reverse transcription polymerase chain reaction amplification of N gene in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 99, n. 6, p. 633-8, 2004.
- MURANYI, W.; BAHR, U.; ZEIER, M.; VAN DER WOUDE, F. J. Hantavirus infection.**J AmSocNephrol.** v. 16, n. 12, p. 3669-79, 2005.
- MUYLDERMANS S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. **Annu. Rev. Biochem.** v. 82, n.17. p.1–17.23, 2013.
- MUYLDERMANS, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. **AnnualReviewofBiochemistry.** v. 82, p. 1-23, 2013.
- MUYLDERMANS, S. Single domain camel antibodies: current status. **J Biotechnol.** v. 74, n. 4, p. 277-302, 2001.
- MUYLDERMANS, S.; ATARHOUCHE, T.; SALDANHA, J.; BARBOSA, J. A.; HAMERS, R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. **Protein Eng.** v. 7, n. 9, p. 1129-1135, 1994.
- MUYLDERMANS, S.; LAUWEREYS, M. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavychain antibodies. **J MolRecognit.** v. 12, n. 2, p. 131-140, 1999.
- NICHOL, S. T.; SPIROPOULOU, C. F.; MORZUNOV, S.; ROLLIN, P. E.; KSIAZEK, T. G.; FELDMANN, H.; SANCHEZ, A.; CHILDS, J. E.; ZAKI, S.; PETERS, C. J. Genetic

identification of a novel Hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness in the southwestern United States. **Science**. v. 262, p. 914-917, 1993.

NICHOL, S.T. Bunyaviruses. In: KNIPE, A.M.; HOWLEY, P.M. *Field's Virology*. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. v.2. p.1603-1633. 1

NORDSTRÖM, H.; JOHANSSON, P.; LI, Q. G.; LUNDKVIST, A.; NILSSON, P.; ELGH, F. Microarray technology for identification and distinction of hantaviruses. **J Med Virol**. v.72, n. 4, p.646-55, 2004.

NOREN, KA.; NOREN, CJ. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. **Methods**. v.23, n.2. p.169-78. 2001.

OGINO, M.; YOSHIMATSU, K.; EBIHARA, H.; ARAKI, K.; LEE, BYOUNG-HEE; OKUMURA, M.; ARIKAWA, J. Cell Fusion Activities of Hantaan Virus Envelope Glycoproteins. **J Virol**. v. 78, n. 19, p. 10776-10782, 2004.

OLICHON, A.; SCHWEIZER, D.; MUYLDERMANS, S.; MARCO, A. Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. **BMC Biotechnology**. v. 7, p. 7, 2006.

OSTERMEIER, M.; BENKOVIC, SJ. A two-phagemid system for the creation of non-phage displayed antibody libraries approaching one trillion members. **J Immunol Methods**. v.237, n(1-2), p.175-86. 2000.

OVERBY, A. K.; POPOV, V. L.; PETTERSSON, R. F.; NEVE, E. P. The cytoplasmic tails of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) GN and GC glycoproteins are important for intracellular targeting and the budding of virus-like particles. **J Virol**. v. 81, n. 20, p. 11381-91, 2007.

PADULA, P. J.; COLAVECCHIA, S. B.; MARTÍNEZ, V. P.; GONZALEZ DELLA VALLE, M. O.; EDELSTEIN, A.; MIGUEL, S. D.; RUSSI, J.; RIQUELME, J. M.; COLUCCI, N.; ALMIRÓN, M.; RABINOVICH, R. D. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. **J Clin Microbiol**. v. 38, n. 8, p. 3029-35, 2000b.

PADULA, P. J.; EDELSTEIN, A.; MIGUEL, S. D.; LÓPEZ, N. M.; ROSSI, C. M.; RABINOVICH, R. D. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. **J Med Microbiol**. v. 49, n. 2, p. 149-55, 2000a.

PADULA, P. J.; EDELSTEIN, A.; MIGUEL, S. D.; LÓPEZ, N. M.; ROSSI, C. M.; RABINOVICH, R. D. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. **Virology**. v. 241, n. 2, p. 323-30, 1998.

PASCHKE, M. Phage display systems and their applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.70, n. 1, p. 2-11, 2006.



PEREZ, J. M.; RENISIO, J. G.; PROMPERS, J. J.; VAN PLATERINK, C. J.; CABBILLAU, C.; DARBON, H.; FRENKEN, L. G. Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process. **Biochemistry**. v. 40, n. 1, p. 74-83, 2001.

PETERS, C. J.; KHAN, A. S. Hantavirus pulmonary syndrome: the new American hemorrhagic fever. **Clin Infect Dis**. v.34, n. 9, p.1224-31, 2002.

PETERS, C. J.; SIMPSON, G. L.; LEVY, H. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. **Annu Rev Med**. v.50, p.531-545, 1999.

PETTERSSON, L.; KLINGSTROM, J.; HARDESTAM, J.; LUNDKVIST, A.; AHLM, C.; EVANDER, M. Hantavirus RNA in saliva from Patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. **Emerg Infect Dis**. v. 14, n. 3, p. 406-11, 2008.

RABONI, S. M., RUBIO, G., DE BORBA, L., ZEFERINO, A., SKRABA, I., GOLDEMBERG, S., DUARTE DOS SANTOS, C. N. Clinical survey of hantavirus in southern Brazil and the development of specific molecular diagnosis tools. **Am J Trop Med Hyg**. v. 72, n. 6, p. 800-804, 2005.

RABONI, S. M.; DE BORBA, L.; HOFFMANN, F. G.; DE NORONHA, L.; AZEVEDO, M. L.; CARSTENSEN, S.; MAZZAROTTO, G. A.; BORDIGNON, J.; DOS SANTOS, C. N. Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: case report. **J Clin Virol**. v. 45, n. 2, p. 153-6, 2009.

RABONI, S. M.; LEVIS, S.; ROSA, E. S. T.; BISORDI, I.; DELFRARO, A.; LEMOS, E.; CORREIA, DIONE, C.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 58, n. 1, p. 89-97, 2007.

RAVKOV, E. V.; NICHOL, S. T.; COMPANS, R. W. Polarized entry and release in epithelial cells of Black Creek Canal virus, a New World hantavirus. **J Virol**. v. 71, n. 2, p. 1147-54, 1997.

RAVKOV, E. V.; NICHOL, S. T.; PETERS, C. J.; COMPANS, R. W. Role of actin micro filaments in Black Creek Canal virus morphogenesis. **J Virol**. v. 72, n. 4 2865-2870. 1998.

RIBEIRO, D.; BORST, J. W.; GOLDBACH, R.; KORMELINK, R. Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. **Virology**. v. 383, n.1, p. 121-130, 2009.

RICHARD G, MEYERS AJ, MCLEAN MD, ARBABI-GHAHROUDI M, MACKENZIE R, et al. In vivo neutralization of  $\alpha$ -cobratoxin with high-affinity llama single-domain antibodies (VHHs) and a VHH-Fc antibody. **PLoS One**. 8(7):2013

RIECHMANN, L.; MUYLDERMANS, S. Single domain antibodies: Comparison of camel VH and camelised-human VH domains. **J Immunol Methods**. v. 231, n. 1-2, p. 25-38, 1999.

ROSA, E. S.; MILLS, J. N.; PADULA, P. J.; ELKHOORY, M. R.; KSIAZEK, T. G.; MENDES, W. S.; SANTOS, E. D.; ARAÚJO, G. C.; MARTINEZ, V. P.; ROSA, J. F.; EDELSTEIN, A.; VASCONCELOS, P. F. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome: partial genetic characterization of viruses and serologic implications of likely reservoirs. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v.5, n.1, p.11-19, 2005.

ROUX, K. H., GREENBERG, A. S., GREENE, L., STRELETS, L., AVILA, D., MCKINNEY, E. C., FLAJNIK, M.F. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 95, n. 20, 11804-809, 1998.

RUSSEL, M; MODEL, P. Filamentous phage. In: Calendar R, ed. The Bacteriophages. **Oxford: Oxford University Press, Inc.** pp 146–160. 2006.

RUUSALA, A.; PERSSON, R.; SCHMALJOHN, C. S.; AND PETTERSSON, R. F. Coexpression of the membrane glycoproteins G1 and G2 of Hantaan virus is required for targeting to the Golgi complex. **Virology.** v. 186, n. 1, p. 53-64, 1992.

SAERENS, D.; CONRATH, K.; GOVAERT, J.; MUYLDERMANS, S. Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains. **J Mol Biol.** v. 377, n. 2, p. 478-88, 2008.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J Mol Biomol.** v. 234, n. 3, p. 779-815.

SCHMALJOHN C, HJELLE B. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerg Infect Dis.** v. 3, n. 2, p. 95-104, 1997.

SCHMALJOHN, C. S.; CHU, Y. K.; SCHMALJOHN, A. L.; DALRYMPLE, J. M. Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants. **J Virol.** v. 64, n. 7, p. 3162-3170, 1990.

SCHMALJOHN, C. S.; DALRYMPLE, J. M. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of bunyaviridae. **Virology.** v. 131, n. 2, p. 482-91, 1983.

SCHMALJOHN, C. S.; HASTY, S. E.; DALRYMPLE, J. M.; LEDUC, J. W.; LEE, H. W.; VON BONSDORFF, C. H.; BRUMMER-KORVENKONTIO, M.; VAHERI, A.; TSAI, T. F.; REGNERY, H. L.; et al. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. **Science.** v. 227, n. 4690, p.1041–1044, 1985.

SCHMALJOHN, C. S.; HOOPER, J. W. Bunyaviridae: the viruses and their replication, p.1581-1633. In: FIELDS B.N.; KNIPE, D. M.; Howley editors. **Fields Virology.** Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2001.

SCHMALJOHN, C. S.; PATTERSON, J. L. Bunyaviridae and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Fundamental Virology.** 2.ed. New York: Raven Press, 1991. p.545-566.

SCHMALJOHN, C. S.; SCHMALJOHN, A. L.; DALRYMPLE, J. M. Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. **Virology**. v. 157, n. 1, p. 31-39, 1987.

SCHMIDT, J.; MEISEL, H.; HJELLE, B.; KRÜGER, D. H.; ULRICH, R. Development and evaluation of serological assays for detection of human hantavirus infections caused by Sin Nombre virus. **J Clin Virol.**, Amsterdam, v.33, n.3, p.247-253, 2005.

SCHOONOOGHE, S.; LAOUI, D.; VAN GINDERACHTER, J. A.; DEVOOGDT, N.; LAHOUTTE, T.; et al. Novel applications of nanobodies for in vivo bio-imaging of inflamed tissues in inflammatory diseases and cancer. **Immunobiology**. v. 217, p. 1266-72, 2012.

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

SERGEEVA, A.; KOLONIN, M. G.; MOLLDREM, J. J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 58, n. 15, p. 1622-1654, 2006.

SEVERSON, W.; XU, X.; KUHN, M.; SENUTOVITCH, N.; THOKALA, M.; FERRON, F.; LONGHI, S.; CANARD, B.; JONSSON, C. B. Essential amino acids of the Hantaan virus N protein in its interaction with RNA. **J Virol**. v. 79, n. 15, p. 10032-9, 2005.

SHARIFZADEH, Z.; RAHBARIZADEH, F.; SHOKRGOZAR, M. A.; AHMADVAND, D.; MAHBOUDI, F.; RAHIMI, J. F.; AGHAEI BAKHTIARI, S. H. Development of Oligoclonal Nanobodies for Targeting the Tumor-Associated Glycoprotein 72 Antigen. **Mol Biotechnol**. v.54, n.2, p.590-601, 2013.

SIMPSON, S.Q. Hantavirus pulmonary syndrome. **Heart & Lung**. v. 27, n. 1, p. 51-57, 1998.

SINISALO, M.; VAPALAHTI, O.; EKBLÖM-KULLBERG, S.; LAINE, O.; MÄKELÄ, S.; RINTALA, H.; VAHERI, A. Headache and low platelets in a patient with acute leukemia. **J Clin Virol.** v. 48, n. 3, p. 159-161. 2010

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science** (New York, NY) 1985; 228.

SOSA-ESTANI, S.; SALOMON, O.D.; GOMEZ, A.O.; ESQUIVEL, M.L.; SEGURA, E.L. Regional differences and hantavirus pulmonary syndrome. **Cad Saúde Pública**. v. 17, Suppl. 47- 57, 2001.

SOTOMAYOR, V.; AGUILERA, X. S. Epidemiología de la infección humana por hantavirus en Chile. **Rev Chil Infectol**. v. 17, n. 3, p. 220-32, 2000.

SPINELLI, S.; FRENKEN, L.; BOURGEOIS, D.; DE RON, L.; BOS, W.; VERRIPS, T.; ANGUILE, C.; CAMBILLAU, C.; TEGONI, M. The crystal structure of a llama heavy chain variable domain. **Nat Struct Biol**. v. 3, n. 9, p. 752-757, 1996.

SPIROPOULOU, C. F. Hantavirus maturation. **Curr Top Microbiol Immunol.** v. 256, p. 33-46, 2001.

SPIROPOULOU, C. F.; GOLDSMITH, C. S.; SHOEMAKER, T. R.; PETERS, C. J.; COMPANS, R.W. Sin Nombre virus glycoprotein trafficking. **Virology.** v. 308, n. 1, p. 48-63, 2003.

STAQUICINI, F. I.; SIDMAN, R. L.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Phage display technology for stem cell delivery and systemic therapy. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 62, n. 12, p. 1213-6, 2010

STIJLEMANS, B.; CONRATH, K.; CORTEZ-RETAMOZO, V.; VAN XONG, H.; WYNS, L.; SENTER, P.; REVETS, H.; DE BAETSELIER, P.; MUYLDERMANS, S.; MAGEZ, S. Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. **J Biol Chem.** v. 279, n. 2, p.1256-61. 2004.

SUMIBCAY, L.; KADJO, B.; GU, S. H.; KANG, H. J.; LIM, B. K.; COOK, J. A.; et al. Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromiciananus*) in Côte d'Ivoire. **Virol J.** v.9, n. 34, doi: 10.1186/1743-422X-9-34, 2012.

SUZUKI, A.; BISORDI, I.; LEVIS, S.; GARCIA, J.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P.; SUGAHARA, T. K. N.; PINI, N.; ENRIA, D.; SOUZA, L. T. M. Identifying rodent hantaviruses reservoirs, Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 10, n. 12, p. 2127-2134, 2004.

TANHA, J.; DUBUC, G.; HIRAMA, T.; NARANG, S. A.; MACKENZIE, C. R. Selection by phage display of llama conventional V(H) fragments with heavy chain antibody V(H)H properties. **J Immunol Methods.** v. 263, n. 1-2, p. 97-109, 2002.

TAO, J.; WENDLER, P.; CONNELLY, G.; LIM, A.; ZHANG, J.; KING, M.; LI, T.; SILVERMAN, J.A.; SCHIMMEL, P. R.; TALLY, F. P. Drug target validation: Lethal infection blocked by inducible peptide. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 97, n. 2, p. 783-786, 2000.

TERSAGO, K.; VERHAGEN, R.; VAPALAHTI, O.; HEYMAN, P.; DUCOFFRE, G.; LEIRS, H. Hantavirus outbreak in Western Europe : reservoir host infection dynamics related to human disease patterns. **Epidemiol Infect.** v. 139, n. 3, p. 381-390, 2011.

TIPPS, M. E.; LAWSHE, J. E.; ELLINGTON, A. D.; MIHIC, S. J. Identification of novel specific allosteric modulators of the glycine receptor using phage display. **J Biol Chem.** v. 285, n. 30, p. 22840-5, 2010.

TISCHLER, N. D.; GONZALEZ, A.; PEREZ-ACLE, T.; ROSEMBLATT, M.; VALENZUELA, P. D. Hantavirus Gc glycoprotein: evidence for a class II fusion protein. **J Gen Virol.** v.86, Pt. 11, p. 2937-2947, 2005.

TORNETTA, M.; BAKER, S.; WHITAKER, B.; LU, J.; CHEN, Q.; PISORS, E.; SHI, L.; LUO, J.; SWEET, R.; TSUI, P. Antibody Fab display and selection through fusion to the pIX coat protein of filamentous phage. **J Immunol Methods.** v. 360, n.1-2, p.39-46, 2010.

VAHERI, A.; MILLS, J. N.; SPIROPOULOU, C. F.; HJELLE, B. Hantaviruses. In: Zoonoses –Biology. **Clinical Practice and Public Health**, 2nd edn, pp. 307–322. 2011.

VAHERI, A.; STRANDIN, T.; HEPOJOKI, J.; SIRONEN, T.; HENTTONEN, H.; MÄKELÄ, S.; MUSTONEN, J. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. **Nat Rev Microbiol.** v. 11, n. 8, p. 539-50, 2013.

VAN DER LINDEN, R. H. J.; FRENKEN, L. G. J.; DE GEUS, B.; HARMSSEN, M. M.; RUULS, R. C.; RUULS, R. C.; STOK, W. DE RON, L.; WILSON, S.; DAVIS, P.; VERRIPS, C. T. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. **BiochimBiophysActa.** v. 1431, n. 1, p. 37-6, 1999.

VAN DER LINDEN, R.; DE GEUS, B.; STOK, W.; BOS, W.; VAN WASSENAAR, D.; VERRIPS, T.; FRENKEN, L. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. **J Immunol Methods.** v. 240, n. 1-2, p. 185-95, 2000.

VANLANDSCHOOT, P.; STORTELEERS, C.; BEIRNAERT, E.; IBAÑEZ, L. I.; SCHEPENS, B.; DEPLA, E.; SAELENS, X. Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. **Antiviral Res.** v. 92, n. 3, p. 389-407, 2011.

VAPALAHTI, O.; KALLIO-KOKKO, H.; NARVANEN, A.; JULKUNEN, I.; LUNDKVIST, A.; PLYUSNIN, A.; LEHVASLAIHO, H.; BRUMMER-KORVENKONTIO, M.; VAHERI, A.; LANKINEN, H. Human B-cell epitopes of Puumala virus nucleocapsid protein, the major antigen in early serological response. **J Med Virol.** v. 46, n. 4, p. 293-303, 1995.

VAPALAHTI, O.; LUNDKVIST, A.; KALLIO-KOKKO, H.; PAUKKU, K.; JULKUNEN, I.; LANKINEN, H.; VAHERI, A. Antigenic properties and diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in insect cells. **J ClinMicrobiol.** v. 34, n. 1, p. 119-125, 1996.

VAPALAHTI, O.; MUSTONEN, J.; LUNDKVIST, A.; HENTTONEN, H.; PLYUSNIN, A.; VAHERI, A. Hantavirus infections in Europe. **Lancet Infect Dis.** v.3, n.10, p. 653-661, 2003.

VASCONCELOS, M. I.; LIMA, V.P.; IVERSSON, L. B., ROSA, M. D. B.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; PEREIRA, L. E.; NASSAR, E.; KATZ, G.; MATIDA, L. H.; ZAPAROLI, M. A.; FERREIRA, J. J. B. PETERS, C. J. Hantavirus pulmonar syndrome in the rural area of Juquitiba, São Paulo metropolitan area, Brazil. **Rev Inst Med Trop.** v. 39, n. 4, p. 237-238, 1997.

VERHEESEN, P.; ROUSSIS, A.; DE HAARD, H. J.; GROOT, A. J.; STAM, J. C.; DEN DUNNEN, J. T.; FRANTS, R. R.; VERKLEIJ, A. J.; VERRIPS, C.T.; VAN DER MAAREL S. M. Reliable and controllable antibody fragment selections from camelid non-immune libraries for target validation. **BiochimBiophysActa** v. 1764, n. 8, p. 1307-1319, 2006.

VINCKE, C.; MUYLDERMANS, S. Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies. In: Saerens D, Muyldermans S editors. Single domain antibodies: methods and protocols. **Humana Press**. pp. 15-26, 2012.

VU, K. B.; GHAHROUDI, M. A.; WYNS, L.; MUYLDERMANS, S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. **MolImmunol**. v. 34, p. 1121-31, 1997.

WANG, Y.C.; ZHANG, H.H.; YU, L.S.; ZHU, B.C. Detection of circulating antigen with a mAb-baseds and wich-elisa and its comparison with specific IgM detection in será of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome.**Hybridoma**. v.26, n.1, p. 42–45. 2007.

WANG,M.; ROSSI, C.; SCHMALJOHN, CS. Expression of non-conserved regions ofthe S genome segments of three hantaviruses: evaluation of the expressed polypeptides for diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome. **J GenVirol**. v.74, n. 6, p.1115-24. 1993.

WATSON, D. C.; SARGIANOU, M.; PAPA, A.; CHRA, P.; STARAKIS, I.; PANOS, G. Epidemiology of Hantavirus infections in humans: A comprehensive, global overview.**Crit Rev Microbiol**.Apr 22, 2013.

WEIR, E. Hantavirus: tis the season. **CMAJ**. v. 173, n. 2, p. 147, 2005.

WEISS, S.; WITKOWSKI, P. T.; AUSTE, B.; NOWAK, K.; WEBER, N.; FAHR, J.; et al. Hantavirus in bat, Sierra Leone. **EmergInfectDis**.v. 18, n. 1, p. 159–61, 2012.

WELLS, S. J.; GARBER, L. P.; HILL, G. W. Health status of preweaned dairy heifers in the United States. **Prev Vet Med**. v. 29, n. 3, p. 185-99, 1997.

WESOLOWSKI, J.; ALZOGARAY, V.; REYELT, J.; UNGER, M.; JUAREZ, K. URRUTIA, M.; CAUERHFF, A.; DANQUAH, W.; RISSIEK, B.; SCHEUPLEIN, F.; SCHWARZ, N.; ADRIOUCH, S.; BOYER, O.; SEMAN, M.; LICEA, A.; SERREZE, D. V.; GOLDBAUM, F. A.; HAAG, F.; KOCH-NOLTE, F. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. **Med MicrobiolImmunol**. v. 198, n. 3, p. 157-74, 2009.

WILLATS, WG. Phage display: practicalities and prospects.**Plant Mol Biol**. v.50, n.6, p.837-54. 2002.

WU, T.T., JOHNSON, G., KABAT, E.A. Length distribution of CDR H3 in antibodies. Proteins: **StructFunct Genetics**. 1993.

XU, X.; SEVERSON, W.; VILLEGAS, N.; SCHMALJOHN, C. S.; JONSSON, C. B. The RNA binding domain of the Hantaan virus N protein maps to a central, conserved region.**J Virol**.v. 76, n. 7, p. 3301-3308, 2002.

YAU, K. Y.; GROVES, M. A.; LI, S.; SHEEDY, C.; LEE, H.; TANHA, J.; MACKENZIE, C. R.; JERMUTUS, L.; HALL, J. C. Selection of hapten-specific single-domain antibodies from

a non-immunized llama ribosome display library. **J Immunol Methods**. v. 281, n. 1-2, p. 161-175, 2003.

YOSHIMATSU, K.; YOO, Y. C.; YOSHIDA, R.; ISHIHARA, C.; AZUMA, I.; ARIKAWA, J. Protective immunity of Hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studied using baculovirus expressed proteins. **Arch Virol**. v. 130, n. 3-4, p. 365 -376, 1993.

YOUNG, J.C.; HANSEN, G.R.; GRAVES, T.K.; DEASY, M.P.; HUMPHREYS, J.G.; FRITZ, C.L.; GORHAM, K.L.; KHAN, A.S.; KSIAZEK, T.G.; METZGER, K.B.; PETERS, C.J. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. **Am J Trop Med Hyg**. v.62, n. 6, p.714-717, 2000.

ZAKI, S. R.;GREER, P.W.;COFFIELD, L. M.; GOLDSMITH, C. S.;NOLTE, K. B.;FOUCAR, K.;FEDDERSEN, R. M.;ZUMWALT, R.E.;MILLER, G. L.;KHAN, A. S.; ROLLIN, P. E.; KSIAZEK, T. G.; NICHOL, S. T.; MAHY, B. W. J.; PETERS, C. J. Hantavirus pulmonary syndrome: pathogenesis of an emerging infectious disease. **Am J Pathol**. v.146, n.3, p.552-579, 1995.

ZHAO, X.; HAY, J. The evolution of hantaviruses. **Immunol Invest**. v. 26, n. 1-2, p. 191-7, 1997.

ZHENQIANG, B.,; FOMENTY, P. B. H.; ROTH, C. Hantavirus infection: review and global update. **J Infect Devel Countries**. v. 2, n. 1, p. 3-23, 2008.

ZHU, J.; DECLERCQ, J.; ROUCOURT, B.; GHASSABEH, G. H.; MEULEMANS, S.; KINNE, J.; DAVID, G.; VERMORKEN, A. J.; VAN DE VEN, W. J.; LINDBERG, I.; MUYLDERMANS, S.; CREEMERS, J. W. Generation and characterization of non-competitive furin-inhibiting nanobodies.**Biochem J**. v. 448, n. 1, p. 73-82, 2012.

ZÖLLER, L. G.; YANG, S.; GÖTT, P.; BAUTZ, E. K.; DARAI, G. A novel mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. **J ClinMicrobiol**. v.31, n.5, p.1194-1199, 1993.

ZOU, Y.; HU, J.; WANG, Z. X.; WANG, D. M.; YU, C.; ZHOU, J. Z.; FU, Z. F.; ZHANG, Y. F. Genetic characterization of hantavirus isolated from Guizhou, China: evidence for spillover and reassortment in nature. **J Med Virol**. v. 80, n. 6, p. 1033-1041, 2008.

## 9. ANEXO 1



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE PESQUISAS EM PATOLOGIAS TROPICAIS

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 78912-000, Porto Velho, RO, Brazil  
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

#### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo projeto 2012/11 registrado sob no 2012/11 na folha 11 do livro 1 da Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), sob a responsabilidade da Dra. Carla Celedônio intitulado "Nanocorpos de camelídeos como ferramenta de diagnóstico ou estratégia farmacológica para tratamento de doenças relacionadas a pobreza" está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), em 06 de novembro de 2012.

Porto Velho, 06 de novembro de 2012.

Relatores:

- Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA IPEPATRO)

- Ms. Luis Herman Soares Gil