



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**Laboratório de Imunologia Aplicada**

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Centro de Ciências Biológicas



**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA UM  
FRAGMENTO RECOMBINANTE DA PROTEÍNA ESTRUTURAL DO  
CAPSÍDEO DO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA DE CAMARÕES**

**MARIANA BORSA**

Florianópolis

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**Laboratório de Imunologia Aplicada**

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia



Centro de Ciências Biológicas

Florianópolis, SC, 88049-970, Brasil

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA UM  
FRAGMENTO RECOMBINANTE DA PROTEÍNA ESTRUTURAL DO  
CAPSÍDEO DO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA DE CAMARÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso referente  
à disciplina Estágio II (BIO 5156), como  
requisito parcial para a obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

**MARIANA BORSA**

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Florianópolis, 2009

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Protozoologia e de Imunologia Aplicada do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Professor Dr. Aguinaldo Roberto Pinto e co-orientação do Professor Dr. Edmundo Carlos Grisard, com apoio financeiro da International Foundation for Science (IFS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Ao meu amado Dani,  
que faz cada dia mais feliz.

## AGRADECIMENTOS

“Não acredite no que você ouviu; não acredite em tradições porque elas existem há muitas gerações; não acredite em algo porque é dito por muitos; não acredite meramente em afirmações escritas de sábios antigos; não acredite em conjecturas; não acredite em algo como verdade por força do hábito; não acredite meramente na autoridade de seus mestres e anciãos. Somente após a observação e análise, quando for de acordo com a razão e condutivo para o bem e benefício de todos, somente então aceite e viva para isso.” (Gautama Buddha – 1600 A.C.)

Gostaria aqui, de agradecer a todos que diretamente ou não colaboraram para a elaboração deste trabalho. Em especial gostaria de agradecer:

Ao meu orientador Aginaldo Roberto Pinto pela oportunidade, pela orientação e pela confiança em mim depositada na realização deste trabalho. Sou muito grata e muito feliz pelo aprendizado, pela experiência e pela convivência que tivemos neste último ano.

Ao professor Edmundo Carlos Grisard pela orientação e por seus valiosos conselhos, que foram de grande ajuda. Agradeço ainda por sempre disponibilizar o seu laboratório para a execução de experimentos que foram essenciais na realização deste trabalho.

Ao professor Carlos Zanetti pelas conversas e pelos apontamentos que nos fazem refletir sobre o estudo da vida e sobre a vida simplesmente.

À Dra. Alitiane Moura L. Pereira da EMBRAPA Meio-Norte, por nos ter concedido camarões *Litopennaeus vannamei* infectados pelo vírus IMNV.

À professora Margherita Barracco, que muito me ensinou e foi essencial na minha iniciação científica e no crescimento do meu interesse e da minha paixão pela Biologia.

Ao Rafa, meu grande companheiro, meu mentor, meu amigo. Nossa convivência muito me ensinou e certamente carrego seus conselhos (e também suas manias!) com muito carinho em tudo o que faço.

A todos os integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada, pela amizade, pelo companheirismo, pelas risadas e pelas paçocas, chopps e pérolas compartilhados: Álvaro, Arthur, Camila, Carol, Douglas, Elis, Fernando, Gi, Jonatan, Luan, Silvia (Guilda), Tiago e Yuri. Um agradecimento especial à Carol, que foi meu braço direito, meu braço esquerdo, minha companheira nos trabalhos nos fins de semana e feriados. Certamente tudo tornou-se possível e infinitamente mais agradável graças a ti.

A todos os integrantes do Laboratório de Protozoologia, pela ajuda, pela disponibilidade e pelos bafões compartilhados. Agradeço imensamente à Pati pela incansável paciência e por estar sempre (sempre mesmo!) disposta a ajudar, dar conselhos e buscar possíveis soluções para os problemas que apareciam no decorrer dos experimentos – e que não foram poucos.

A todos os integrantes do Laboratório de Virologia Aplicada pela disponibilidade na utilização de equipamentos essenciais a este trabalho.

A todos os integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura pela ajuda e pela disponibilidade, sempre. Gostaria de agradecer em especial à Pri, Paulinha, Marion, Liegilda, Pedro, Cris, Dani e ao saudoso Dél, pela amizade e pelo carinho.

Aos meus grandes amigos de Biologia! Esses últimos cinco anos foram muito mais felizes por causa de vocês: Alê, Andrézinho, Elis, Flavinha, Japa, Ju, Kenny, Lari, Luli, Má, Mari, Melzinha, Su... Agradeço especialmente a Dai pela amizade e carinho incondicional e aos meus grandes pedacinhos de mim: Lu e Pri – por fazerem de mim uma pessoa melhor. Certamente é e sempre será um grande privilégio ter vocês na minha vida.

A toda a minha família, aos meus avós, à minha madrinha e em especial aos meus pais, Marília e Rogério, e aos meus irmãos, Ricardo e Vitória, pelo incentivo, pelo amor, por estarem sempre presentes. Sem vocês nada seria possível e certamente todos meus sonhos realizados e que ainda estão por vir precisarão do apoio de vocês para serem concretizados.

Ao meu grande amor, meu melhor amigo, meu companheiro... pelos dias, tardes, noites e madrugadas SEMPRE ao meu lado. Por tudo e por nada... Minhas conquistas certamente trazem muito de ti. Te amo!

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."

(Guimarães Rosa)

## SUMÁRIO

|  |               |
|--|---------------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>  | <b>pg. 01</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>   | <b>pg. 03</b> |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>   | <b>pg. 04</b> |
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>pg. 05</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>pg. 06</b> |
| <br>   |               |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>pg. 07</b> |
| 1.1. Vírus da mionecrose infecciosa de camarões (IMNV).....                                  | pg. 08        |
| 1.2. Anticorpos monoclonais.....   | pg. 12        |
| <br>   |               |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>   | <b>pg. 17</b> |
| 2.1. Objetivo geral.....   | pg. 17        |
| 2.2. Objetivos específicos.....  | pg. 17        |
| <br>   |               |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>   | <b>pg. 18</b> |
| 3.1. Considerações éticas.....   | pg. 18        |
| 3.2. Camarões.....   | pg. 18        |
| 3.3. Extração de RNA total e síntese de cDNA.....  | pg. 18        |
| 3.4. Desenho dos iniciadores.....  | pg. 19        |
| 3.5. Amplificação de fração codificante para a proteína do capsídeo do IMNV<br>.....         | pg. 20        |
| 3.6. Clonagem, sequenciamento dos insertos e análise das sequências...                       | pg. 21        |
| 3.7. Construção do plasmídeo de expressão.....   | pg. 22        |
| 3.8. Expressão heteróloga de um fragmento da proteína estrutural do capsídeo do<br>IMNV..... | pg. 23        |
| 3.9. Purificação do fragmento protéico recombinante.....                                     | pg. 24        |
| 3.10. Verificação da expressão heteróloga da proteína recombinante.....                      | pg. 25        |
| 3.11. Imunizações dos camundongos.....   | pg. 26        |
| 3.12. ELISA para titulação do soro dos camundongos.....                                      | pg. 27        |

|   |               |
|---|---------------|
| 3.13. Hibridomas.....   | pg. 28        |
| 3.13.1. Manipulação dos camundongos.....  | pg. 28        |
| 3.13.2. Células de mieloma.....   | pg. 28        |
| 3.13.3. Produção e manutenção dos hibridomas.....   | pg. 29        |
| 3.13.4. Triagem e expansão clonal dos hibridomas.....   | pg. 29        |
| 3.13.5. Criopreservação dos hibridomas.....   | pg. 30        |
| 3.13.6. Isotipagem dos anticorpos monoclonais.....  | pg. 30        |
| 3.13.7. Avaliação da especificidade dos anticorpos.....   | pg. 31        |
| 3.14. Preparação de lisado de tecido muscular de camarões.....  | pg. 32        |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>   | <b>pg. 33</b> |
| 4.1. Amplificação e sequenciamento do fragmento de interesse IMNV1..  | pg. 33        |
| 4.2. Expressão da proteína recombinante IMNV1 (IMNV1r).....   | pg. 37        |
| 4.3. Purificação da proteína IMNV1r.....  | pg. 39        |
| 4.4. Confirmação da eficiência do procedimento de expressão heteróloga da<br>proteína IMNV1r.....               | pg. 40        |
| 4.5. Produção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais.....   | pg. 43        |
| 4.6. Reatividade dos anticorpos monoclonais contra lisados de tecidos<br>musculares de camarões infectados..... | pg. 45        |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>pg. 48</b> |
| <b>6. SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....</b>   | <b>pg. 58</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>  | <b>pg. 60</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>pg. 61</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BSA** – soro albumina bovina  
**DMSO** – dimetilsulfóxido  
**DEPC** – dietilpirocarbonato  
**dNTP** – deoxinucleotídeos trifosfatados  
**DO** – densidade óptica  
**EDTA** – ácido etilenodiaminotetraacético  
**ELISA** – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
**g** – grama(s)  
**HAT** – hipoxantina, aminopterina, timidina  
**HT** – hipoxantina, timidina  
**Hz** – hertz  
**Ig** – imunoglobulina(s)  
**IMNV** – vírus da mionecrose infecciosa  
**IMNV1r** – proteína recombinante IMNV1  
**IPTG** – isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
**kDa** – kilodalton  
**kV** – kilovolt  
**LB** – meio Luria-Bertani  
**l** – litro(s)  
**M** – molar  
**mA** – miliampéres  
**mg** – miligrama  
**min** – minuto(s)  
**ml** – mililitro(s)  
**mM** – milimolar  
**ng** – nanograma(s)  
**nm** – nanômetros  
**ORF** – janela de leitura  
**OPD** – orto-fenileno-diamina

**pb** – pares de bases  
**PBS** – solução tamponada de fosfato  
**PEG** – polietilenoglicol  
**pmol** – picomol  
**PCR** – reação em cadeia da polimerase  
**PSA** – penicilina, streptomina e anfotericina B  
**rpm** – rotações por minuto  
**RT-PCR** – reação de transcrição reversa  
**s** – segundo(s)  
**SDS** – dodecil sulfato de sódio  
**SDS-PAGE** – eletroforese em gel de poliacrilamida  
**SFB** – soro fetal bovino  
**Taq** – *Thermus aquaticus*  
**TBE** – Tris, borato, EDTA  
**TSV** – vírus da síndrome de Taura  
**µg** – micrograma  
**µl** – microlitro  
**V** – volt  
**x g** – força gravitacional  
**X-GAL** – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo  
**WSSV** – vírus da mancha branca

## LISTA DE FIGURAS

|  |        |
|--|--------|
| <b>Figura 1:</b> Estrutura tridimensional deduzida do IMNV.....  | pg. 14 |
| <b>Figura 2:</b> Espécime de <i>Litopenaeus vannamei</i> infectado por IMNV.....   | pg. 15 |
| <b>Figura 3:</b> Vias de síntese de nucleotídeos.....  | pg. 18 |
| <b>Figura 4:</b> Procedimentos para produção de anticorpos monoclonais.....  | pg. 19 |
| <b>Figura 5:</b> Esquema estrutural do genoma do IMNV e localização do inserto IMNV1<br>.....  | pg. 38 |
| <b>Figura 6:</b> Amplificação da sequência gênica correspondente ao inserto IMNV1..  | pg. 38 |
| <b>Figura 7:</b> Sequência nucleotídica e aminoacídica deduzida do fragmento IMNV1<br>.....  | pg. 39 |
| <b>Figura 8:</b> Alinhamento múltiplo da sequência aminoacídica deduzida de IMNV1 e do seu<br>fragmento correspondente nas sequências já conhecidas do IMNV obtida a partir de isolados<br>virais do Brasil e Indonésia..... | pg. 40 |
| <b>Figura 9:</b> Digestão plasmidial do vetor de expressão pGEM T-easy / IMNV1.....  | pg. 41 |
| <b>Figura 10:</b> Padrões de expressão protéica da bactéria <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada com o<br>plasmídeo pET-14b contendo o inserto IMNV1.....   | pg. 43 |
| <b>Figura 11:</b> Purificação da proteína IMNV1r.....  | pg. 44 |
| <b>Figura 12:</b> Western Blot de amostras purificadas da proteína IMNV1r, utilizando anticorpo<br>anti-cauda de polihistidina.....  | pg. 45 |
| <b>Figura 13:</b> Titulação de anticorpos anti-IMNV1 em camundongos imunizados com<br>IMNV1r.....  | pg. 46 |
| <b>Figura 14:</b> Titulação de anticorpos séricos anti-IMNV1 dos camundongos 1 e 4 pós-reforço<br>intrapertoneal com IMNV.....   | pg. 47 |
| <b>Figura 15:</b> Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-IMNV contra extratos protéicos<br>bacterianos.....   | pg. 50 |
| <b>Figura 16:</b> Reatividade dos anticorpos anti-IMNV 13H, 11D, 33G e 54H contra extratos<br>protéicos totais de tecidos musculares de camarões infectados e não infectados<br>.....  | pg. 52 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Iniciadores utilizados na amplificação da seqüência de cDNA do fragmento do capsídeo do vírus da mionecrose infecciosa de camarões..... pg. 24
- Tabela 2:** Parâmetros bioquímicos deduzidos do fragmento protéico IMNV1..... pg. 42
- Tabela 3:** Títulos de anticorpos séricos anti-IMNV1 após três doses da proteína IMNV1r..... pg. 46
- Tabela 4:** Isotipagem dos anticorpos monoclonais anti-IMNV1..... pg. 49

## RESUMO

O vírus da mionecrose infecciosa de camarões (IMNV) é um patógeno que determina elevadas perdas econômicas nas fazendas de cultivo no Brasil. Os principais sinais da enfermidade são necrose e opacidade dos músculos, além de letargia dos camarões infectados. O agente etiológico da enfermidade, o IMNV, é um vírus icosaédrico e não-envelopado, sendo a proteína estrutural que constitui o capsídeo viral tem aproximadamente 100 kDa e o genoma é constituído por RNA dupla fita que possui 7.560 pb. Métodos moleculares e histológicos de diagnóstico já foram estabelecidos, porém testes rápidos de diagnóstico como testes imunocromatográficos, que possam ser utilizados em campo, ainda não estão disponíveis. O presente trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão heteróloga de um fragmento da proteína estrutural do IMNV e sua posterior utilização para a produção de anticorpos monoclonais. O RNA total do músculo esquelético de camarões *Litopenaeus vannamei* naturalmente infectados foi obtido e o cDNA foi produzido através de RT-PCR, sendo posteriormente amplificado por PCR. Iniciadores específicos foram capazes de amplificar, através de PCR, um segmento de cDNA de 600 pb, correspondente a um fragmento da proteína estrutural do capsídeo do IMNV. O fragmento obtido foi clonado, seqüenciado e, posteriormente, sub-clonado no vetor de expressão pET-14b. Este plasmídeo de expressão foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* BL21(DE3), com as quais foram realizados testes de expressão que possibilitaram a obtenção de uma banda protéica de 25 kDa. A confirmação da identidade da proteína heteróloga expressa foi verificada por SDS-PAGE e Western-blot. Após a purificação da proteína recombinante, esta foi utilizada na imunização de camundongos Balb/c, cujos esplenócitos foram utilizados na fusão com células de mieloma, para produção de hibridomas. A triagem dos hibridomas foi realizada através de ELISA indireto. Foram obtidos seis linhagens monoclonais produtoras de anticorpos anti-IMNV, sendo quatro anticorpos IgM (11D, 33G, 39G e 54H) e dois anticorpos IgG1 (13H, 46C). A reatividade dos anticorpos monoclonais contra extratos de tecido muscular de camarões infectados por IMNV foi avaliada através de Western blot, confirmando assim a especificidade dos anticorpos contra a proteína estrutural do IMNV. Estes anticorpos poderão ser utilizados futuramente para a produção de um *kit* de diagnóstico imunocromatográfico, que será útil para testes em campo, por ser uma estratégia rápida, específica e factível de ser utilizado em fazendas de cultivo de camarões.

Palavras-chave: IMNV, *Litopenaeus vannamei*, proteína recombinante, anticorpo monoclonal

## ABSTRACT

The infectious myonecrosis virus (IMNV) is a pathogen that determines high economical losses in shrimp farms in Brazil. The most important symptoms are skeletal muscle necrosis and opacity, accompanied of lethargy in infected shrimp. The etiologic agent of the disease is a non-enveloped and icosahedral virus that contains a major capsid protein which has a relative mass of approximately 100 kDa, and a genome constituted of dsRNA with 7560 bp. Molecular and histological methods have already been established but there is no report of rapid diagnostic tests as an immunochromatographic detection assay for IMNV designed for use by producers in shrimp farms. The main purpose of this study was to clone and produce a recombinant protein corresponding to a fragment of the IMNV capsid which was used for monoclonal antibodies production. The total RNA from infected *Litopenaeus vannamei* skeletal muscles was extracted and cDNA was obtained by RT-PCR and subsequently amplified by PCR. Specific primers were successful in amplify a 600 bp cDNA fragment correspondent to a portion of the IMNV major capsid protein by PCR. This fragment was cloned, sequenced and subsequently sub-cloned into the pET-14b expression vector. This expression plasmid was then utilized in *E. coli* BL21(DE3) bacteria transformation which were submitted to expression tests that made possible obtaining a protein band with a relative mass of 25 kDa. The identity of the recombinant protein was verified by SDS-PAGE electrophoresis and Western-blot. The purified IMNV1r was used for Balb/c mice immunization whose splenic cells were submitted to a fusion with myeloma cells for hybridoma production. Hybridoma supernatant fluids were screened by indirect ELISA. It was possible to obtain 6 monoclonal antibodies anti-IMNV, wich 4 were isotyped as IgM (11D, 33G, 39G and 54H) and 2 were IgG1. The monoclonal antibodies reactivity against muscle tissue extracts from infected shrimp were evaluated by Western blot for confirmation of their specificity to the major capsid protein of IMNV. The monoclonal antibodies produced in this work can be used on the development of an immunochromatographic diagnostic kit that can provide reliable and sensitive detection capabilities for shrimp farmers, providing opportunities for limiting the extent of viral spread on farms infected with IMNV.

**Key words:** IMNV, *Litopenaeus vannamei*, recombinant protein, monoclonal antibodies

## 1. INTRODUÇÃO

A carcinicultura tem grande importância no contexto econômico e social de muitos países, não somente por fazer parte de uma perspectiva de subsistência e comércio local, mas também por ser uma grande fonte de divisas através da exportação dos produtos cultivados. Além disso, a geração de empregos e renda produzidos são sentidos pelas comunidades locais, colaborando para o desenvolvimento deste setor como alternativa viável na substituição da pesca extrativista, principalmente por conta da crescente diminuição dos estoques pesqueiros naturais. Mundialmente a produção de camarões em cativeiro cresceu 165% no período de 1997 a 2004, o que representa uma expansão anual de 15% (FAO, 2006). As espécies de camarão mais cultivadas no mundo são o camarão branco *Litopenaeus vannamei* (62%) e o camarão tigre *Penaeus monodon* (26%), sendo a maioria dos cultivos proveniente da Ásia, sobretudo da China, Tailândia, Vietnã e Indonésia (FAO, 2006; SUBASINGHE et al., 2008).

Porém, apesar dos aspectos sócio-econômicos positivos do desenvolvimento da carcinicultura, a intensificação da produção de camarões e o crescimento do número de fazendas, tanto no Brasil como no resto do mundo, tem ocasionado uma crescente degradação do meio ambiente, além do surgimento de inúmeras doenças infecciosas, dando-se destaque para aquelas com etiologia viral, que vêm limitando o desenvolvimento desse setor (KAUTSKY, 2000; NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). É relevante lembrar que a durabilidade da produção em escala industrial de camarões é totalmente dependente das condições ambientais e da manutenção do seu equilíbrio, da prevenção de patologias através de diagnóstico precoce e também de estudos epidemiológicos (BACHÈRE, 2000).

Nas Américas, as doenças virais que mais afetaram a carcinicultura foram as causadas pelos vírus da necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética ou IHHNV (do inglês, *infectious hypodermal and hematopietic necrosis virus*), pelo vírus da síndrome de Taura ou TSV (do inglês, *Taura syndrome virus*) e mais recentemente pelo vírus da mancha branca ou WSSV (do inglês, *white spot syndrome virus*), todos estes já identificados no Brasil (LIGHTNER, 2004). Merece ainda destaque no Brasil outro vírus, que foi identificado em

2004 por Lightner e colaboradores: o vírus da mionecrose infecciosa de camarões ou IMNV (do inglês, *infectious myonecrosis virus*).

### **1.1. Vírus da mionecrose infecciosa de camarões (IMNV)**

Os primeiros relatos da doença causada pelo IMNV ocorreram em fazendas de cultivo de camarões no Estado do Piauí, em 2003, e foram inicialmente denominadas de necrose idiopática muscular (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). Este vírus causou uma queda expressiva da produção de camarões no Nordeste do Brasil que, juntamente com outros fatores, como a queda do preço do camarão no mercado internacional e a baixa do dólar no Brasil, têm provocado graves perdas econômicas (RODRIGUES, 2005). Em 2003, os prejuízos causados pela mortalidade dos camarões por conta desta patologia, caracterizada por lesões esbranquiçadas no músculo caudal, ultrapassaram os 40 milhões de reais (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). A doença rapidamente se espalhou por outros Estados da região Nordeste causando severas mortalidades nos cultivos. Somente em 2004, o agente etiológico desta síndrome foi identificado e então foi possível associar o vírus à sua enfermidade, que passou a ser chamada de mionecrose infecciosa de camarões (LIGHTNER et al., 2004). A infecção por IMNV foi primeiramente relatada em indivíduos da espécie *L. vannamei*, porém estudos posteriores indicaram a suscetibilidade das espécies *P. monodon*, *L. stylirostris* e *Farfantepenaeus subtilis* (TANG et al., 2005; COELHO et al., 2009).

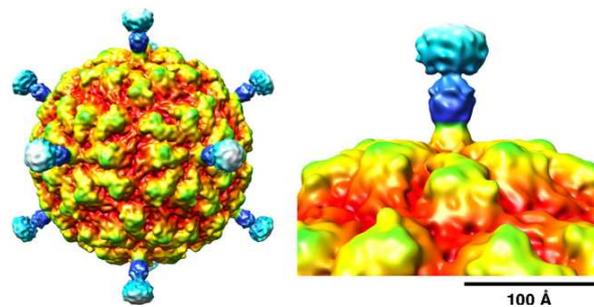
A ocorrência do IMNV em camarões também atingiu outros países além do Brasil nos últimos anos, tendo relatos confirmados na Indonésia e também na China (SENAPIN et al., 2007; ANDRADE; REDMAN; LIGHTNER, 2008). O vírus causador da doença da Indonésia teve sua sequência gênica caracterizada e apresentou 99,6% de identidade nucleotídica com o vírus encontrado no território brasileiro (SENAPIN et al., 2007). Muitos patógenos virais permanecem restritos a uma determinada região geográfica e o seu alastramento por outras regiões pode ser devastador. A hipótese provável para a ocorrência desta enfermidade em outra localidade além do Brasil é o transporte não fiscalizado de animais reprodutores e pré-larvas ao redor do mundo (FLEGEL, 2006).

O IMNV é um vírus não-envelopado e icosaédrico, de 40 nm de diâmetro, cujo genoma é constituído por RNA dupla fita contendo 7560 pares de bases. Sabe-se que este RNA possui duas janelas de leitura, ou ORF (do inglês, *open reading frames*), que codificam para duas proteínas diferentes. A denominada ORF1 codifica a proteína estrutural do capsídeo viral e encontra-se na fase 1 de leitura (nucleotídeos 136–4953). Já a ORF2 localiza-se na fase 3 e codifica para uma RNA polimerase dependente de RNA ou RdRp (do inglês, *RNA-dependent RNA polymerase*) (nucleotídeos 5241-7451). Estas janelas de leitura não se sobrepõem, existindo um espaço de 287 nucleotídeos entre elas (POULOS et al., 2006). Porém, existem controvérsias quanto ao início da janela de leitura da ORF2, codificante para a RdRp, existindo autores como Nibert, que reportam que esta região se inicia no nucleotídeo 4749, o que tornaria as duas janelas de leitura existentes no vírus sobrepostas. Assim, a tradução das duas ORF ocorreria através de uma mudança de fase de leitura que ocorreria no próprio ribossomo (NIBERT, 2007).

Analisando-se a sequência aminoacídica deduzida da RdRp do IMNV e comparando-se a mesma com sequências de outros vírus, foi possível classificá-lo como pertencente à Família Totiviridae (POULOS et al., 2006). É possível ainda dizer que o IMNV possui uma maior similaridade tanto em tamanho como em sequência gênica com o vírus GLV (do inglês, *Giardia lamblia virus*), do gênero *Giardiavirus* (FAUQUET et al., 2005). O IMNV, dentro desta classificação, é o único vírus da sua família que infecta um hospedeiro que não seja um fungo ou um protozoário (GHABRIAL, 2008). A presença de duas janelas de leitura sobrepostas aproximaria o IMNV ainda mais da família Totiviridae, onde este evento é muito comum em muitas espécies virais (NIBERT, 2007).

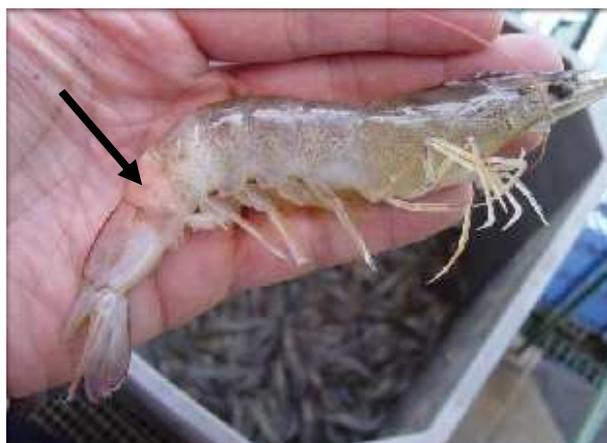
Recentemente, a estrutura tridimensional do IMNV foi elucidada (Figura 1) (TANG et al., 2008). O capsídeo do vírus apresentou-se como uma estrutura dobrada em forma pentamérica e formada por duas subunidades diferentes. Por outro lado, o RNA dupla fita encontrado dentro do capsídeo parece se organizar de forma helicoidal, de maneira bastante simétrica. A novidade maior encontrada nestas novas informações de cunho estrutural foi a presença de protruções ao longo de todo o capsídeo viral, algo inédito dentro

do grupo dos Totiviridae. Essas protruções são de natureza protéica e podem ser importantes para o aumento da virulência desse vírus, através de ligação a receptores nas células-alvo e processos de internalização celular. Isso explicaria a capacidade única do IMNV, dentre os outros vírus da mesma família, de ter a capacidade de ser transmitido extracelularmente entre organismos hospedeiros (TANG et al., 2008).



**Figura 1:** Estrutura tridimensional deduzida da superfície do vírus da mionecrose infecciosa de camarões. Um detalhamento da estrutura da protrução do capsídeo viral pode ser visto à direita (Adaptado de TANG et al., 2008).

Os camarões acometidos pelo IMNV apresentam como principal sintoma uma perda de transparência nos músculos da região posterior do corpo, principalmente no que se refere ao músculo abdominal (Figura 2), como consequência da necrose do tecido muscular, dando aos animais um aspecto de camarão cozido (LIGHTNER et al., 2004). No Nordeste brasileiro, nos primeiros anos de ocorrência do IMNV, as sobrevivências variavam de 35% a 55%, sendo que as mortalidades ocorriam mais acentuadamente ao final do ciclo de cultivo. Os camarões que chegam à fase mais avançada da doença costumam apresentar movimento errático dentro dos tanques e uma diminuição na alimentação, tornando-se ainda mais fracos. É muito comum que camarões neste estágio morram durante o seu manejo (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).



**Figura 2:** Espécime de *Litopenaeus vannamei* de fazenda de cultivo infectados com o vírus da mionecrose infecciosa, apresentando claros sinais de necrose muscular e opacidade na região posterior – indicado pela seta (Reproduzido de NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

Através da técnica de hibridização *in situ* foi verificado que o vírus infecta principalmente o tecido muscular esquelético, além do órgão linfoide e intestino posterior (TANG et al., 2005). Em cortes histológicos se observaram lesões no tecido muscular, corpos de inclusão viral no citoplasma das células deste tecido, do tecido conjuntivo e também nos hemócitos. Durante a infecção ocorre ainda uma infiltração de hemócitos no hepatopâncreas e coração dos camarões (TANG et al., 2005). Foi também observada a presença de esferóides ectópicos do órgão linfóide, principalmente próximos ao coração e glândulas antenais (POULOS; LIGHTNER, 2006).

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico eficientes é essencial para evitar a disseminação de vírus causadores de patologias em camarões, sendo importante no sentido de evitar grandes perdas na produção destes animais. Os métodos de diagnóstico que podem ser utilizados para detecção de doenças infecciosas de crustáceos listadas pela Organização Internacional de Epizotias (OIE) ou para detecção de seus agentes etiológicos baseiam-se em sinais clínicos, métodos de microscopia óptica ou eletrônica, exames histológicos, bioensaios, testes imunológicos baseados em anticorpos policlonais ou monoclonais e métodos moleculares.

Inicialmente, os principais métodos de diagnóstico para detecção do IMNV utilizados foram sinais clínicos e exames histológicos. Estas metodologias, porém, tendem a ser pouco fidedignas, pois até mesmo alterações físicas do ambiente, como temperatura e salinidade da água, podem provocar sintomas muito parecidos (LIGHTNER et al., 1998). Atualmente diversas metodologias já foram padronizadas para o diagnóstico da mionecrose infecciosa de camarões, que incluem principalmente técnicas histológicas, hibridizações *in situ* por sondas de DNA, técnicas de PCR realizadas por transcrição reversa, *nested* PCR e PCR em tempo real (TANG et al., 2005; POULOS; LIGHTNER, 2006; ANDRADE; REDMAN; LIGHTNER, 2007; SENAPIN et al., 2007). Mais recentemente também foram criadas metodologias que combinam reações de amplificação em ciclos únicos de temperatura com técnicas de visualização cromatográfica, utilizando sondas de DNA, que tornaram possível um diagnóstico mais rápido da doença (KIATPATHOMCHAI et al., 2008; PUTHAWIBOOL et al., 2009; ANDRADE; LIGHTNER, 2009).

Porém, ainda não existem técnicas imunológicas de diagnóstico. Os testes imunológicos são amplamente utilizados no diagnóstico de muitas doenças virais em aplicações na saúde humana e animal. A grande vantagem dos testes imunológicos em relação a técnicas moleculares ou histológicas é a possibilidade de metodologias mais simples, que podem ser realizadas por pessoas sem treinamento, mas mantendo características essenciais para o controle eficiente de enfermidades, como especificidade, sensibilidade e baixo custo (SITHIGORNGUL et al., 2000). Nessa perspectiva, duas alternativas são possíveis: o uso de soros policlonais ou a produção de anticorpos monoclonais. Anticorpos policlonais possuem a desvantagem de muitas vezes apresentarem reações inespecíficas e resultados falso-positivos, justamente por possuírem reatividade contra uma gama muito maior de antígenos do que os anticorpos monoclonais, que são altamente específicos (LIU et al., 2002).

## **1.2. Anticorpos monoclonais**

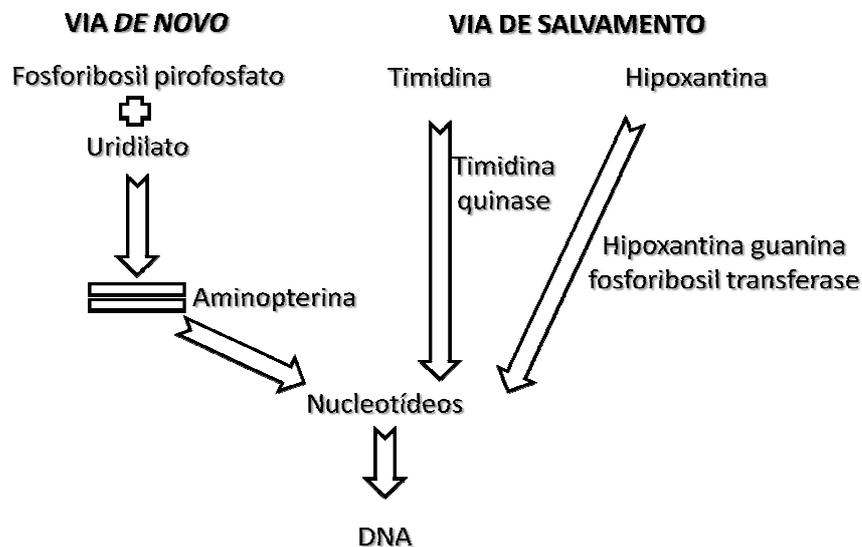
A produção de anticorpos monoclonais teve início após a divulgação do método descrito por George Köhler e César Milstein (1975), utilizando como fundamento a fusão de

linfócitos B produtores de anticorpos com linhagens de plasmocitomas, como alternativa para imortalização destas células. Após a fusão, faz-se necessária a seleção de células, já que hibridizações indesejadas podem ocorrer, como a fusão de mielomas e esplenócitos entre si (KOHLEK; MILSTEIN, 1975; GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002).

A seleção dos hibridomas se dá através do cultivo dos mesmos em meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina), que permite manipular a via de síntese de nucleotídeos pelas células (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002). Células de mamíferos são capazes de sintetizar nucleotídeos por duas vias metabólicas distintas: a via *de novo* e a via de salvamento. Na via *de novo*, as células sintetizam nucleotídeos a partir de fosforibosil pirofosfato e uridilato. A aminopterina presente no meio HAT atua no bloqueio da via *de novo*, obrigando a célula a utilizar a via de salvamento. Esta via utiliza hipoxantina e timidina exógenas como substrato, tendo as enzimas hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) e timidina quinase (TK) como catalisadoras para síntese de nucleotídeos (Figura 3). Sob estas condições, células B podem utilizar a via de salvamento, mas não podem sobreviver mais que uma ou duas semanas, pois não são imortalizadas. No entanto, apesar de células de mieloma serem imortais, faltam-lhes genes das enzimas HGPRT e TK, essencialmente requeridas para a síntese de nucleotídeos pela via de salvamento. Portanto, após alguns dias, as células de mieloma morrem por não haver a possibilidade de síntese de nucleotídeos, visto que as duas vias de síntese estão inibidas. Assim, somente os hibridomas resultantes da fusão mieloma-esplenócito são capazes de sobreviver por maiores períodos, por apresentarem complementaridade metabólica: as células de mieloma fornecem a alta capacidade mitótica e os esplenócitos a possibilidade da utilização da via de salvamento, por possuírem as enzimas necessárias para a metabolização de hipoxantina e timidina.

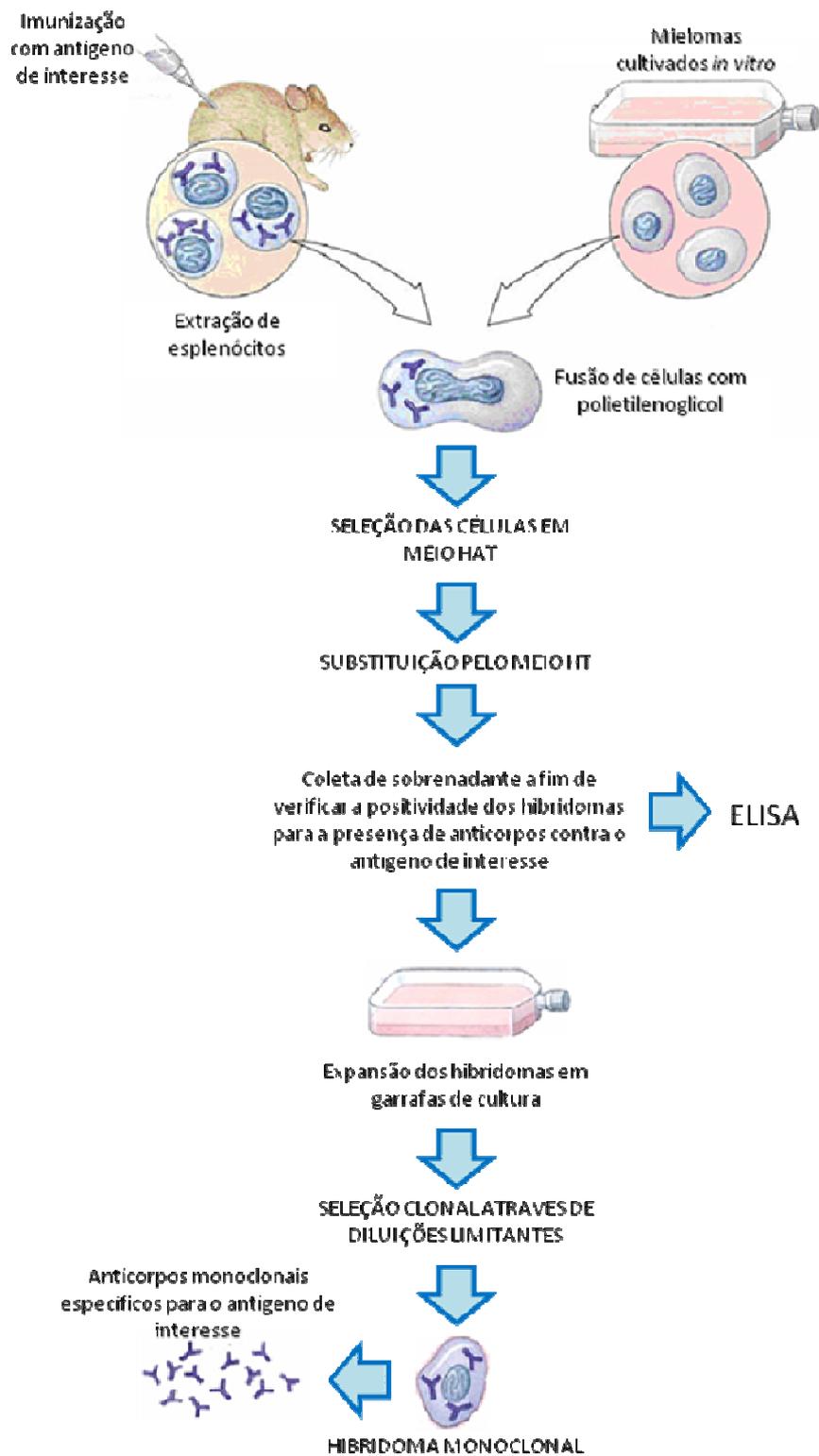
Aproximadamente duas semanas após a adição de meio HAT, há uma mudança para meio HT (hipoxantina e timidina), para que, gradualmente, as células sobreviventes voltem a utilizar a via *de novo* como principal via de síntese de nucleotídeos, mesmo que ainda exista a possibilidade de utilizar a via de salvamento devido à presença de seus substratos. Assim,

através da técnica de fusão, obtêm-se células híbridas com alta capacidade de produzir anticorpos específicos e passíveis de serem cultivadas *in vitro*.



**Figura 3:** Vias de síntese de nucleotídeos: via *de novo* e via de salvamento (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002).

De maneira bastante sucinta, a produção de anticorpos monoclonais consiste em hiperimunização de camundongos com o antígeno de interesse, fusão dos esplenócitos destes animais com células de mieloma, através da utilização do reagente polietilenoglicol, seleção dos hibridomas formados através do cultivo em meio HAT, triagem dos hibridomas produtores dos anticorpos de interesse, expansão dos clones desejados e posterior diluição limitante dos mesmos, a fim de garantir a sua monoclonalidade. Uma visão geral do processo de fusão e seleção de hibridomas pode ser visto na Figura 4.



**Figura 4:** Procedimentos para produção de anticorpos monoclonais específicos para determinado antígeno.

A produção de anticorpos que reconheçam a proteína estrutural que compõe o capsídeo deste vírus é o primeiro passo para a produção de um teste imunocromatográfico do tipo *strip test*, que permitirá um diagnóstico de alta confiabilidade e especificidade mesmo por pessoas não especializadas, com a grande vantagem de poder ser feito rapidamente em condições de campo. Isto permitirá o diagnóstico precoce da enfermidade e a adoção de medidas necessárias ao controle de novas infecções nas fazendas de cultura atingidas em todo o mundo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar anticorpos monoclonais dirigidos a um fragmento recombinante da proteína estrutural do capsídeo do vírus da mionecrose infecciosa de camarões.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Desenhar iniciadores específicos complementares à sequência gênica correspondente a um fragmento da proteína estrutural do capsídeo do IMNV, com base na sequência de IMNV depositada em bancos de dados públicos;
2. Realizar a transcrição reversa a partir do RNA total extraído de camarões naturalmente infectados pelo IMNV e amplificar o cDNA resultante através de PCR utilizando iniciadores gênicos específicos;
3. Realizar a clonagem e o sequenciamento das regiões codificantes para a proteína estrutural do IMNV;
4. Analisar comparativamente as sequências nucleotídicas obtidas e aminoácidas deduzidas da proteína estrutural do IMNV com sequências disponíveis em bancos de dados públicos;
5. Realizar a expressão heteróloga e a purificação de um fragmento da proteína estrutural do vírus IMNV;
6. Imunizar camundongos utilizando o fragmento protéico recombinante, visando a produção de hibridomas, a fim de obter linhagens monoclonais de células produtoras de anticorpos;
7. Realizar a isotipagem e verificar a especificidade dos anticorpos monoclonais obtidos, através de Western Blot utilizando tecidos de camarões naturalmente infectados pelo IMNV.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Considerações éticas**

Este projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (Protocolo PP00203, Processo número 23080.013517/2008-87) da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### **3.2. Camarões**

Neste trabalho foram utilizados animais da espécie exótica de camarão branco *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* Farfante & Kensley (1997), naturalmente infectados com IMNV. Como controle indivíduos de *L. vannamei* sadios foram utilizados. Os espécimes foram obtidos diretamente de fazendas de cultivo da cidade de Parnaíba/PI, graças ao apoio da Dra. Alitiene Moura L. Pereira (EMBRAPA Meio-Norte). Os camarões foram escolhidos baseando-se em sintomas clínicos da doença, sendo que a infecção por IMNV nos mesmos foi confirmada por PCR (conforme descrito no item 3.4).

#### **3.3. Extração de RNA total e síntese de cDNA**

Amostras de tecido muscular dos exemplares de camarão, com aproximadamente 1 g, foram maceradas na presença de 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen®) à temperatura ambiente com auxílio de pistilos estéreis, de acordo com as especificações do fabricante. Posteriormente, foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio, a fim de promover a separação da fração correspondente ao RNA, que em seguida foi precipitada pela adição de 0,5 ml de álcool isopropílico. Após lavagem com álcool etílico 70%, os precipitados de RNA isolados foram secos e dissolvidos em 25 µl de água tratada com DEPC. A concentração e a pureza das amostras foram avaliadas em espectrofotômetro (BioPhotometer – Eppendorf®) ( $A_{260/280} > 1,8$ ). A fim de evitar contaminação das amostras com RNAses, os pistilos, ponteiros e tubos plásticos utilizados para armazenamento e manipulação das amostras foram submetidos a lavagem com água tratada com DEPC.

Para obtenção da primeira fita de cDNA, 1 µg do RNA total foi reversamente transcrito utilizando-se a enzima *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen®) na presença de 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen®), tampão (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM) e um iniciador oligo (dT)<sub>12</sub>, direcionado para região da cauda poli(A) do mRNA. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

Como controle das etapas de extração de RNA e síntese de cDNA, controles de amplificação foram realizados através da detecção de uma sequência gênica de 850 pb, correspondente à proteína intracelular actina, utilizando os iniciadores específicos AV1-Fw (5' – TAA TCC ACA TCT GCT GGA AGG TGG – 3') e AV2-Rv (5' – TCA CCA ACT GGG ATG ACA TGG – 3'). As condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 10 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, temperatura de ligação dos iniciadores de 55°C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final a 72 °C por 10 min. A eficiência do processo de amplificação foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose (1,0%), incubação do mesmo em solução de brometo de etídeo em água bidestilada (0,01% v/v) por 20 min e posterior visualização das bandas em transluminador Macrovue-UV20 (Hoefer), seguido de registro fotográfico digital do gel.

### **3.4. Desenho dos iniciadores**

Para a amplificação de uma sequência codificante para um fragmento da proteína estrutural do capsídeo do vírus, um par de iniciadores específicos foi desenhado. Os iniciadores senso (IMNV1-F) e antisenso (IMNV1-R) foram desenhados a partir da sequência nucleotídica do capsídeo do IMNV disponível no GenBank (Acesso: EF061744) e podem ser visualizados na Tabela 1. A fim de facilitar a expressão heteróloga do gene do capsídeo viral em sistema bacteriano, foi selecionada com auxílio do programa Hydrophobicity Plot 1.0 (<http://www.bmm.icnet.uk/~offman01/hydro.html>) uma região do gene que codifica para aminoácidos menos hidrofóbicos. Além disso, na extremidade 5' de cada um dos iniciadores foram adicionadas sequências correspondentes aos sítios das enzimas de restrição *Bam*HI

(iniciador IMNV1-F) e *NdeI* (iniciador IMNV1-R) visando facilitar a clonagem do fragmento no vetor de expressão (pET-14b). As enzimas *Bam*HI e *NdeI* foram escolhidas por possuírem sequências alvo para clivagem ausentes na sequência de nucleotídeos do inserto de interesse.

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados na amplificação da sequência de cDNA do fragmento do capsídeo do vírus da mionecrose infecciosa de camarões.

| Nome do iniciador | Sequência 5'– 3'                   |
|-------------------|------------------------------------|
| IMNV1-F           | <b>CATATGGGGCAATTACGGTTACAGGG</b>  |
| IMNV1-R           | <b>CGGGATCCGTATACATACCAAATGGCC</b> |

CATATG: sítio de clivagem para enzima de restrição *NdeI*

GGATCC: sítio de clivagem para enzima de restrição *Bam*HI

### 3.5. Amplificação de fração codificante para a proteína do capsídeo do IMNV

A amplificação de sequências de cDNA correspondentes à sequência codificante para o capsídeo do IMNV foi realizada através de PCR, utilizando-se a enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®). As concentrações de cada um dos reagentes necessários para a reação em cadeia da polimerase foram padronizadas com base nas sequências dos iniciadores desenhados, sendo: desnaturação inicial a 94°C por 10 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, temperatura de ligação dos iniciadores a 55°C por 45 s e extensão a 72°C por 1 min. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram diluídos em proporção 1:1 em tampão de amostra 2x (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 25%, ficoll a 15%, p/v em água ultrapurificada) e então analisados em gel de agarose (1%) através de eletroforese a 100 V por 1 h em tampão TBE 1X (Tris 0,89 M, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,89 M, EDTA 25 mM), juntamente com um padrão de tamanho molecular conhecido. Posteriormente, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídeo em água bidestilada (0,01% v/v) por 20 min. A visualização das bandas foi realizada em transluminador Macrovue-UV20 (Hoefer), seguido de registro fotográfico digital do gel.

### 3.6. Clonagem, sequenciamento dos insertos e análise das sequências

Os produtos de PCR amplificados foram ligados ao vetor pGEM T-easy (Invitrogen<sup>®</sup>) utilizando-se a enzima *T4 DNA Ligase* (Promega<sup>®</sup>), conforme especificações do fabricante. Os plasmídeos construídos foram utilizados para transformar, através de eletroporação (2,5 kV) (MicroPulse – BIORAD), bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli* da linhagem DH5- $\alpha$  (Invitrogen<sup>®</sup>). Após transformação, as bactérias foram cultivadas em meio LB-ágar na presença de X-GAL (20  $\mu$ g/ml), IPTG (1 mM) e ampicilina (100  $\mu$ g/ml), a 37°C por 15 h. Uma fração das colônias brancas teve a presença do inserto de interesse confirmada através da amplificação do mesmo por PCR, utilizando os iniciadores específicos para a sequência de DNA do capsídeo do IMNV (IMNV1-F e IMNV1-R). As condições de amplificação para esta reação de PCR foram as mesmas utilizadas para a amplificação inicial de um fragmento codificante para uma região do capsídeo do IMNV. Os produtos de PCR foram examinados para verificação da presença e do tamanho dos insertos em gel de agarose (1%), como descrito no item 3.5. Após a comprovação da presença dos insertos, as colônias positivas foram submetidas a crescimento em meio LB líquido acrescido de ampicilina (100  $\mu$ g/ml) por 15 h a 37°C e tiveram seus plasmídeos extraídos através de um protocolo padrão de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) a fim de realizar o seqüenciamento para verificação da identidade e orientação dos insertos.

Para o sequenciamento dos insertos foi utilizado o Kit DYEnamic<sup>®</sup> ET Dye Terminator (GE Healthcare<sup>®</sup>), conforme as instruções do fabricante, sendo a leitura das bases realizada em um equipamento MegaBace 1000<sup>®</sup> DNA Analysis System (GE Healthcare<sup>®</sup>). A reação de sequenciamento foi realizada na presença de 5 pmol do iniciador pGEM-F (5' – ACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATA – 3') ou EXCEL-R (5' - GTTGTAACGACGGCCAGTGAAT – 3') e aproximadamente 1.000 ng do DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 s, seguidos de 35 ciclos com desnaturação de 95°C por 15 s, ligação dos iniciadores a 50°C por 20 s e extensão a 60°C por 90 s. Os produtos desta reação foram precipitados com álcool isopropílico 70% para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não

incorporados, e, sequencialmente eletroinjetados a 2 KV por 100 s e eletroeluídos por 140 min a 7 KV.

As sequências gênicas obtidas foram posteriormente submetidas a uma avaliação de qualidade pelo programa Phred (índice de confiabilidade  $\geq 20$ ) (EWING et al., 1998) e agrupadas em sequências consenso (clusters) através do programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). Após essa análise, as sequências nucleotídicas e aminoacídicas deduzidas foram confrontadas e analisadas utilizando-se algoritmos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), disponíveis em bancos de dados virtuais, a fim de se confirmar a identidade da sequência amplificada como correspondente a um fragmento da proteína estrutural do IMNV (ALTSCHUL et al., 1997).

### **3.7. Construção do plasmídeo de expressão**

O plasmídeo purificado através do protocolo de lise alcalina foi submetido a um processo de digestão pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I. A verificação do sucesso desta digestão foi feita através de eletroforese em gel de agarose (1%) conforme o descrito em 3.5. A banda correspondente à sequência de interesse foi excisada do gel e purificada utilizando o *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen<sup>®</sup>), conforme recomendações do fabricante. O produto purificado foi ligado no vetor plasmidial de expressão pET-14b (Novagen<sup>®</sup>) através da enzima *T4 DNA Ligase* (Promega<sup>®</sup>). Estes plasmídeos foram então utilizados para transformar, através de eletroporação, as bactérias competentes *E. coli* da linhagem BL21/DE3 (Invitrogen<sup>®</sup>), nas mesmas condições descritas em 3.6.

Após a transformação, as bactérias foram repicadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml). A confirmação das colônias de bactérias positivas para o inserto codificante para um fragmento da proteína estrutural do IMNV se deu através de PCR, utilizando como amostra a ser testada uma fração da própria colônia. Os iniciadores utilizados foram os mesmos usados para amplificação específica do inserto codificante para o um fragmento do capsídeo do IMNV (IMNV1-F e IMNV1-R). Os produtos de PCR foram resolvidos em eletroforese de gel de agarose (1%) conforme o descrito em 3.5.

Para confirmação da identidade da sequência nucleotídica e da orientação do inserto foi realizado um novo sequenciamento, conforme o descrito no item 3.6, utilizando os iniciadores específicos IMNV1-F e IMNV1-R. A confirmação da identidade do fragmento clonado foi realizada através de alinhamento com sequências presentes em bancos de dados virtuais conforme o descrito em 3.6. A fim de verificar o peso molecular esperado para a proteína recombinante IMNV1, a sequência aminoacídica deduzida do inserto obtida após sequenciamento foi submetida a análise através do programa ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

### **3.8. Expressão heteróloga de um fragmento da proteína estrutural do capsídeo do IMNV**

Após a obtenção de colônias de bactérias contendo o vetor de expressão pET-14b associado ao inserto desejado, foi realizado um protocolo de expressão heteróloga em sistema bacteriano. Primeiramente, foi feito um pré-cultivo de 10 ml em meio LB líquido acrescido com ampicilina (100 µg/ml), a partir de uma colônia isolada da placa de LB-ágar contendo bactérias transformadas. O pré-cultivo foi realizado a 37°C por aproximadamente 15 h, sob agitação orbital a 100 rpm (Agitador Kline - Nova Ética). Posteriormente, foi realizada uma transferência de dois ml deste pré-cultivo para um tubo cônico (Falcon®) de 50 ml contendo 23 ml de meio LB líquido suplementado com 100 µg/ml de ampicilina. O crescimento bacteriano foi acompanhado por espectrofotometria, até atingir a densidade óptica (DO) de 0,4-0,6 (fase de crescimento exponencial) a 600 nm, no espectrofotômetro BioPhotometer® (Eppendorf®). Quando atingida essa DO, a expressão do produto plasmidial foi induzida pela adição de IPTG em uma concentração final de 1 mM. Foram testados diferentes tempos e três diferentes temperaturas para o cultivo pós-indução: 37°C, 27°C e 18°C, a fim de se obter a condição ótima para a expressão do fragmento protéico recombinante IMNV-1r. Para a temperatura de 37°C foram testados os tempos de 1,5 h e 3 h e para as temperaturas de 27°C e 18°C os tempos de 3 h e 15 h de cultivo.

Após o cultivo sob indução, a cultura foi centrifugada a 5000 x *g* por 10 min em centrífuga refrigerada (4°C) (Eppendorf®) e ao precipitado formado foi adicionado tampão

Tris-HCl 20mM, pH 7,0. As amostras, mantidas em banho de gelo, foram submetidas à sonicação (5 ciclos de 30 s sob frequência máxima 50-60 Hz, 240 V) no equipamento 60 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific®) e posteriormente centrifugadas a 10.000 x *g* por 20 min (4°C). O sobrenadante e o precipitado foram separados para análise por SDS-PAGE desnaturante (LAEMMLI, 1970), sendo o precipitado diluído em SDS 10%. O padrão de expressão da bactéria *E. coli* transformada com o plasmídeo pET-14b fechado, o padrão de expressão de *E. coli* transformada com o plasmídeo pET-14b contendo o inserto IMNV1 antes da indução por IPTG, os padrões de expressão de *E. coli* transformada com o plasmídeo pET-14b contendo o inserto de interesse IMNV1 após indução com IPTG, sob diferentes temperaturas e as suas respectivas frações solúveis e insolúveis obtidas após sonicação foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE (40 mA por 2 h). Os perfis protéicos foram revelados por coloração pelo Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,25% (Bio-Rad), dissolvidos em isopropanol a 50% e ácido acético a 10% v/v em água ultrapura). Uma solução contendo ácido acético a 10% e metanol a 45% v/v em água ultrapura foi utilizada para descoloração dos géis, a fim de se observar as bandas protéicas obtidas.

### **3.9. Purificação do fragmento protéico recombinante**

A purificação do fragmento protéico recombinante da proteína do capsídeo do vírus IMNV foi realizada através de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (LUCAST; BATEY; DOUDNA, 2001; ESHAGHI et al., 2005). Após a expressão, o cultivo foi centrifugado a 5000 x *g* por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a cada 1 grama de precipitado foram adicionados 2 ml de tampão de lise desnaturante (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 8 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0).

A seguir, foi realizada uma incubação de 1 h a 60°C, sob leve agitação. O produto resultante foi centrifugado por 30 min a 12.000 x *g* a 4°C. O sobrenadante foi posteriormente incubado por 1 h, sob agitação orbital (100 rpm) e refrigeração de 4-8°C, em coluna contendo a resina enriquecida com íons metálicos de níquel imobilizados Ni-NTA

(Qiagen®), pré-tratada com o mesmo tampão utilizado para a incubação do extrato bacteriano.

Após a incubação, foi adicionado à coluna 1 ml de tampão de lavagem ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  8 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 6,0) e a amostra foi centrifugada a  $1.000 \times g$  por 3 min, para que as proteínas não desejadas se desprendessem da resina de purificação por alteração de pH. Posteriormente, a proteína de interesse foi purificada através da adição de 200  $\mu\text{l}$  do tampão de eluição ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  8 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 4,0), incubação da coluna por 3 min em banho de gelo e centrifugação a  $1.000 \times g$  por 3 min. Em cada uma das etapas, amostras foram recolhidas para análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% e coloração por Coomassie Blue conforme o descrito em 3.8.

A fim de promover a renaturação das frações de proteína purificada após tratamento com os tampões desnaturantes utilizados no processo de purificação, as eluições passaram por um processo de diálise. Foram feitos quatro ciclos de diálise de 12 horas sob refrigeração ( $4-8^\circ\text{C}$ ), sendo os dois primeiros com tampão de diálise (NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 0,05 mM) acrescido de 20% de glicerol e os dois últimos utilizando somente tampão de diálise. Após a diálise, procedeu-se a quantificação da concentração protéica das amostras através por espectrofotometria (BioPhotometer – Eppendorf®) utilizando o método de Bradford (1976). Basicamente, realizou-se a comparação da leitura da absorbância a 595 nm da amostra com uma curva padrão de soro albumina bovina – BSA (Sigma).

### **3.10. Verificação da expressão heteróloga da proteína recombinante**

Para confirmar a expressão e o tamanho molecular da proteína purificada, foi utilizada a técnica de Western Blotting (BURNETTI, 1981). As amostras purificadas foram resolvidas eletroforéticamente em gel SDS-PAGE 15% conforme o descrito em 3.8. Após separação eletroforética, o perfil protéico obtido foi submetido a um processo de transferência para membrana de nitrocelulose, em Tampão de Transferência (Tris 25mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,1%) acrescido de 20% de metanol, a 25 V por 15 h, em banho de gelo e sob refrigeração de  $4-8^\circ\text{C}$ . Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau

S 1% em ácido acético 10% por 5 min, a fim de verificar a eficácia do processo através da visualização das bandas formadas. A membrana foi então descorada através de abundante lavagem com água destilada e incubada em solução de bloqueio (5% de leite Mólico (Nestlé®) em Tampão de Transferência por 1 h sob constante agitação.

Posteriormente, a membrana foi submetida a incubação com anticorpo anti-histidina (1:5.000) por 1 h a temperatura ambiente. A seguir, a membrana foi novamente incubada com anticorpo secundário (Anti-IgG GAM murino conjugado a peroxidase – Sigma®) (1:10.000) por mais 1 h. Ambos os anticorpos foram diluídos em tampão de transferência suplementado com 2% de leite desnatado em pó (Mólico). Além disso, entre cada uma das incubações foram feitas cinco lavagens da membrana utilizando o tampão de transferência. Após o último procedimento de lavagem, a membrana foi incubada com 1 ml do reagente ECL (GE - Healthcare®). Posteriormente, a membrana foi utilizada para marcação por quimioluminescência de filmes radiográficos, em câmara escura, segundo as especificações do fabricante. Finalizando o procedimento, o filme foi inserido em uma máquina de revelação (Konica Minolta Medical & Graphic), onde foi incubado sequencialmente em uma solução reveladora, fixadora e lavado em água, sendo ao final aquecido a 45 °C para secagem.

### **3.11. Imunizações dos camundongos**

Foram utilizados cinco camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem BALB/c, isogênicos, haplótipos H-2K<sup>d</sup>, mantidos no biotério setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia/CCB/UFSC, sob padrão sanitário convencional, com água e alimento *ad libitum*.

Uma dose de 50 µg da proteína purificada foi utilizada por camundongo para cada uma das imunizações, que foram feitas em três doses, sendo as duas primeiras por via subcutânea e a última por via intraperitoneal. A primeira imunização foi suplementada com Adjuvante Completo de Freund e a segunda imunização com Adjuvante Incompleto de Freund. O intervalo entre as imunizações foi de dez dias. No dia da realização da terceira

imunização, os camundongos foram sangrados através do plexo retroorbital após anestesia por cloridrato de cetamina (Dopalen<sup>®</sup>) e cloridrato de xilazina (Rompum<sup>®</sup>). O sangue foi mantido por 1 h sob refrigeração de 4-8°C. A seguir, a amostra foi centrifugada a 300 x *g* por 5 min a 4°C. Os soros obtidos foram então testados em diversas diluições por ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas – ELISA (ENGVALL; PEARLMANN, 1972) para verificar os títulos de anticorpos contra a proteína recombinante produzida (conforme descrito no item 3.12). Os três camundongos que apresentaram os maiores títulos de anticorpos, ou seja, reatividade no teste de ELISA com as maiores diluições de soro, foram submetidos a um novo reforço intraperitoneal de 50 µg de proteína, após 15 dias. Por fim, um novo teste de ELISA foi realizado a fim de saber o título final de anticorpos obtidos nestes camundongos.

### **3.12. ELISA para titulação do soro dos camundongos**

Microplacas descartáveis de poliestireno de 96 cavidades (Costar<sup>®</sup>) foram utilizadas, e todos os imunoreagentes ensaiados no volume de 200 µl. Entre todos os passos da reação, as microplacas foram lavadas cinco vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween 20. Para a sensibilização das placas foram utilizados 50 ng da proteína purificada por poço, diluídos em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5 M (pH 9,6), sendo a incubação de 3 h a 37°C. A seguir, foi feito o bloqueio contra reações inespecíficas, sendo adicionados, por poço, 300 µl de solução PBS-Tween 0,05% acrescida de 3% de BSA. O bloqueio ocorreu por 15 h a 4°C.

Como anticorpo primário, foram utilizados os soros obtidos dos camundongos imunizados, sendo os mesmos diluídos seriadamente, iniciando-se com uma diluição de 1:500. A seguir foi acrescido o anticorpo secundário conjugado (Anti-IgG murino conjugado a peroxidase - Sigma<sup>®</sup>) a uma diluição de 7.500 vezes. Ambos foram diluídos no mesmo tampão utilizado para o bloqueio das placas, sendo a incubação de 1 h a 37°C. Como controles da reação foram utilizados, no lugar do soro dos camundongos imunizados, soro de camundongos pré-ímmunes, como controle negativo, e anticorpo anti-histidina produzido em camundongos, como controle positivo.

A revelação foi feita através da adição de 100 µl de solução substrato-cromógeno orto-fenileno-diamina (OPD) (0,4% em solução tampão citrato-fosfato 100 mM, pH 5,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%) por poço. Após 5 min, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2,5N. Por fim, procedeu-se a leitura da densidade óptica a 492 nm em leitor de microplacas (Tecan<sup>®</sup>). O limite de reatividade adotado foi uma absorbância três vezes maior que a média dos controles negativos.

### **3.13. Hibridomas**

#### **3.13.1. Manipulação dos camundongos**

Os camundongos que receberam o reforço intraperitoneal foram sacrificados por deslocamento cervical, embebidos em álcool etílico 70% e, em ambiente estéril, seus baços retirados e macerados em meio RPMI-1640 (Cultilab<sup>®</sup>). O material resultante da maceração, excluindo-se as cápsulas de tecido conjuntivo do órgão, foi submetido à incubação em gelo por 10 min, sendo o sobrenadante coletado e centrifugado duas vezes a 400 x *g* por 10 min, à temperatura ambiente. Ao precipitado celular foram adicionados 5 ml de solução de lise (NH<sub>4</sub>Cl 168 mM, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4), que tem a capacidade de lisar somente os eritrócitos, sendo realizada uma incubação de 5 min. Em seguida, foram adicionados 45 ml de meio RPMI-1640, sendo centrifugados posteriormente nas mesmas condições acima citadas. Por fim, ao precipitado foram adicionados 10 ml de RPMI-1640 e os esplenócitos foram contados utilizando-se câmara de Neubauer, através de microscopia óptica de contraste de fase.

#### **3.13.2. Células de mieloma (plasmocitomas)**

Os plasmocitomas não secretores da linhagem P3X63-Ag8.653 (KEARNEY et al., 1978) provenientes de linfoma de camundongos foram centrifugados a 400 x *g* por 5 min a temperatura ambiente e ao precipitado foi adicionado RPMI-1640, sendo este processo repetido mais duas vezes. Por fim, as células foram suspensas em 10 ml de meio RPMI-1640

acrescido de gentamicina (0,1%) e PSA (1%), fazendo-se então a contagem em câmaras de Neubauer.

### **3.13.3. Produção e manutenção dos hibridomas**

Os mielomas e os esplenócitos foram misturados na proporção de 1:5 e lavados duas vezes com RPMI-1640 (acrescido de PSA 1%, gentamicina 0,1%), sendo o sobrenadante retirado. Sobre o precipitado celular formado após a centrifugação foi adicionado 1 ml de polietilenoglicol 50% (Sigma<sup>®</sup>), vagarosamente, procedendo-se uma homogeneização por 2 min. A seguir, 1 ml de RPMI-1640 (PSA 1%, gentamicina 0,1%) foi adicionado e a mistura foi homogeneizada lentamente por 1 min, sendo este procedimento repetido mais uma vez. Em seguida, 7 ml de meio RPMI-1640 foram adicionados vagarosamente durante 2 min, sob leve homogeneização, sendo as células posteriormente centrifugadas por 5 min a 400 x *g*. O precipitado foi novamente suspenso com RPMI-1640 (PSA 1%, gentamicina 0,1%) acrescido de soro fetal bovino (SFB – 20%) (Cultilab<sup>®</sup>), sendo o volume ajustado a fim de se obter uma solução final de aproximadamente 2x10<sup>6</sup> células/ml. Por fim, em cada cavidade da placa de cultura de 96 cavidades, foram colocados 100 µl da suspensão. Após 24 h, foram adicionados 100 µl de meio RPMI-HAT acrescido de 20% de SFB. Durante 13 dias subsequentes o meio foi trocado a cada 48 h e no 15º dia o meio de cultura foi substituído pelo meio RPMI-HT com 20% de SFB. No 19º dia, o meio foi trocado novamente por RPMI acrescido de 20% de SFB e mantido em cultura. Quando as células ocuparam 2/3 da cavidade da placa, foram realizados os procedimentos de identificação dos anticorpos de interesse.

### **3.13.4. Triagem e expansão clonal dos hibridomas**

A fim de selecionar os hibridomas produtores de anticorpos dirigidos a proteína recombinante do capsídeo estrutural do IMNV, foi utilizado o ensaio de ELISA. O protocolo foi o mesmo utilizado para a titulação dos soros dos camundongos, porém, neste caso, o sobrenadante da cultura dos hibridomas foi utilizado como anticorpo primário na reação. Além disso, o controle positivo foi também substituído, sendo então utilizado o soro dos

camundongos imunizados sabidamente positivos para a presença dos anticorpos contra a proteína recombinante, diluídos 1.000 vezes. As cavidades contendo culturas de hibridomas sabidamente produtoras de anticorpos de interesse tiveram suas células expandidas, a fim de se obter uma quantidade maior das mesmas. Após este passo, foi iniciado um processo de diluição limitante, com o objetivo de obter uma linhagem celular monoclonal.

Após contagem das células em câmara de Neubauer, foram adicionadas 10 células por cavidade, na primeira coluna de uma placa de cultura de 96 cavidades. As células contidas nestas cavidades foram submetidas a um processo de diluição limitante, obtendo-se ao final do procedimento, cavidades com probabilidade de contarem menos de uma célula por poço. Estas células foram mantidas até alcançarem crescimento suficiente para cobrirem cerca de 2/3 da cavidade, sendo então os sobrenadantes testados através de ELISA. Os poços positivos foram escolhidos para uma segunda diluição limitante, a fim de garantir a monoclonalidade dos hibridomas. Os poços contendo hibridomas produtores de anticorpos com maior reatividade contra a proteína recombinante do IMNV, foram expandidos para garrafas de cultura.

### **3.13.5. Criopreservação dos hibridomas**

Hibridomas em expansão foram regularmente estocados em nitrogênio líquido. Para tanto, a suspensão de células em garrafas de cultura foi centrifugada a 400 x *g* por 10 min a 4 °C e ao precipitado celular foi adicionado meio de congelamento contendo 49% de meio RPMI, 40% de SFB, 10% de DMSO (Sigma) e 1% de PSA. A seguir, 2x10<sup>6</sup> células foram distribuídas em cada criotubo e estes foram mantidos por 24 h a -80°C, seguido de transferência para nitrogênio líquido (OI; HERZENBERG, 1980).

### **3.13.6. Isotipagem dos anticorpos monoclonais**

Classes e subclasses dos anticorpos monoclonais obtidos foram determinadas utilizando-se o *kit* de isotipagem *Clonotyping System (Southern Biotech)*, sendo o procedimento realizado conforme as instruções do fabricante. Anticorpos de captura de imunoglobulinas (anti-IgA, anti-IgG<sub>1</sub>, anti-IgG<sub>2a</sub>, anti-IgG<sub>2b</sub>, anti-IgG<sub>3</sub>, anti-IgM, anti-Ig cadeia

leve *kappa* [anti- $\kappa$ ] e anti-Ig cadeia leve *lambda* [anti- $\lambda$ ]) foram diluídos em PBS de forma a se obter uma concentração final de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Em cada cavidade da placa de ELISA, 100  $\mu\text{l}$  dessa solução de anti-anticorpos foram colocados, e procedeu-se uma incubação de 12 h, em atmosfera úmida, com refrigeração de 4 a 8°C. Após esse período, os poços foram submetidos a três ciclos de lavagem com PBS-Tween 0,05% e bloqueados por 1 h a temperatura ambiente com 300  $\mu\text{l}$  de PBS contendo 1% de BSA (Sigma). Novos ciclos de lavagem foram realizados como descrito acima e 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de cultura de hibridomas foram adicionados em cada cavidade, seguindo-se uma incubação de 1 h a 25°C, em câmara escura. Após esse período, a placa foi submetida a novos ciclos de lavagem e 100  $\mu\text{l}$  de anticorpos secundários conjugados com peroxidase (anti-Ig total, anti-IgM, anti-IgG<sub>1</sub>, anti-IgG<sub>2a</sub>, anti-IgG<sub>2b</sub>, anti-IgG<sub>3</sub>, anti-IgA, anti- $\kappa$ , anti- $\lambda$ ) diluídos 250 vezes em PBS acrescido de 1% de BSA foram colocados em cada poço, sendo incubados por 1 h, a temperatura ambiente, no escuro e sob agitação branda. Cinco ciclos de lavagem com PBS Tween 0,05% foram realizadas, seguido da adição de 100  $\mu\text{l}$  da solução substrato-cromógeno em cada cavidade. A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de microplacas (Tecan<sup>®</sup>) a 405 nm, 5 min após a adição da solução de revelação.

### **3.13.7. Avaliação da especificidade dos anticorpos**

A fim de avaliar a eficiência e especificidade dos anticorpos produzidos, os sobrenadante dos hibridomas monoclonais foram testados em duas diferentes etapas, através da técnica de Western Blot. Primeiramente foi realizado um teste a fim de avaliar a reatividade dos sobrenadantes de cultura contendo anticorpos monoclonais anti-IMNV1 contra três diferentes amostras: a proteína IMNV1 recombinante purificada (controle positivo), o perfil protéico de expressão da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pET-14b fechado e o perfil protéico de uma cultura de bactérias *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-14b contendo o inserto IMNV1. Este procedimento foi realizado com a intenção de verificar possíveis reações inespecíficas destes anticorpos monoclonais contra proteínas do perfil de expressão da bactéria BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pET-14b.

As amostras de interesse foram resolvidas eletroforeticamente em gel SDS-PAGE 15%. Após separação eletroforética, as bandas protéicas obtidas foram submetidas a um processo de transferência, em tampão de transferência (Tris 25mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,1%, metanol 20%), para membrana de nitrocelulose, a 100 V por 1 h, em banho de gelo. Após a transferência, a membrana foi corada em Ponceau S 1% em ácido acético 10% por 5 min, a fim de verificar a eficácia do processo. A membrana foi então incubada em solução de bloqueio (5% de leite desnatado em pó em tampão de transferência) por 15 h a 4°C.

Posteriormente, a membrana foi cortada e cada pedaço, contendo uma réplica do perfil protéico das três amostras a serem testadas, foi incubado com um dos sobrenadantes de cultura de linhagens monoclonais obtidas. Como controle negativo foi utilizado o sobrenadante de hibridomas produtores de anticorpo monoclonal anti-rábico (3E6). A seguir, uma nova incubação foi realizada com anticorpo secundário diluído 10.000 vezes em Tampão de Transferência suplementado com 2% de leite desnatado em pó (Anti-Ig GAM murino conjugado a peroxidase – Sigma®) por mais 1 h. Além disso, entre cada uma das incubações foram feitas cinco lavagens da membrana utilizando tampão de transferência. Após o último procedimento de lavagem, as membranas foram incubadas com 1 ml do reagente ECL (GE - Healthcare®). Posteriormente, as membranas foram reveladas em filme radiográfico, conforme descrito em 3.10. Em um segundo momento, os sobrenadantes foram testados, através da mesma técnica, quanto a sua especificidade de reação diante de lisados de tecidos musculares de camarões *L. vannamei* infectados e não infectados.

#### **3.14. Preparação de lisado de tecido muscular de camarões**

A fim de avaliar a especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos contra tecidos de camarões infectados e a ausência de reatividade dos mesmos contra tecidos de camarões saudáveis, foram utilizadas amostras de tecido muscular esquelético de espécimes de *L. vannamei* positivos e negativos para a presença do IMNV.

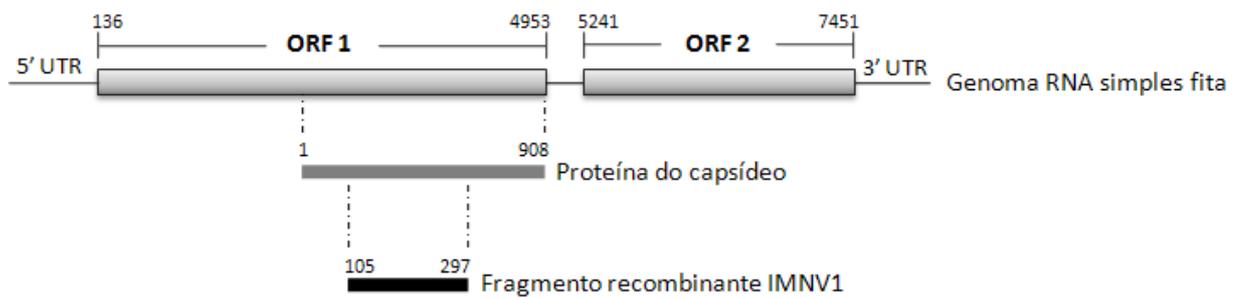
Os tecidos infectados e saudáveis foram submetidos ao mesmo tratamento, a fim de obter um lisado de tecido muscular que serviria como amostra alvo para a ligação dos

anticorpos monoclonais produzidos. As amostras foram inicialmente lavadas três vezes com tampão de lavagem (Tris 0,20 mM NaCl 400 mM), intercalando-se a adição do tampão com centrifugações de 10 min a 10.000 x *g*. Todo o tampão foi então retirado e procedeu-se a pesagem das amostras. Adicionou-se a cada uma das amostras um volume de tampão de lavagem equivalente a três vezes o seu peso. A seguir, foi feita a maceração dos tecidos utilizando um pistilo estéril, até obter uma amostra homogênea. As amostras de tecidos musculares esqueléticos foram então submetidas a sonicação (3 ciclos de 30 s sob frequência máxima 50-60 Hz, 240 V) no equipamento 60 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific®). As amostras foram submetidas a uma última centrifugação de 20 min a 10.000 x *g* a 4°C e o sobrenadante recolhido. Após separação eletroforética das proteínas presentes e posterior transferência para membrana de nitrocelulose, a mesma foi utilizada durante os testes de especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos diante de amostras de tecidos infectados e não infectados, através da técnica de Western blot.

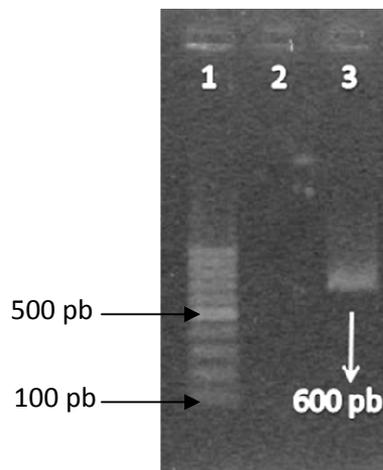
#### **4. RESULTADOS**

##### **4.1. Amplificação e sequenciamento do fragmento de interesse IMNV1**

O produto de amplificação obtido a partir do flanqueamento dos iniciadores desenhados, IMNV1-F e IMNV1-R foi estimado em 600 pb (Figura 5). Através da técnica de PCR, a presença de uma sequência de cDNA correspondente a um fragmento da proteína estrutural do IMNV foi detectada, sendo obtido um produto de 600 pb que pode ser visualizado após resolução por eletroforese em gel de agarose e revelação em brometo de etídeo (Figura 6). A amplificação deste fragmento possibilitou a confirmação do diagnóstico positivo para o vírus IMNV nestes camarões, o que demonstra que o vírus ainda estava em circulação no Brasil durante período de coleta dos animais utilizados no presente trabalho, em agosto de 2008.



**Figura 5:** Esquema estrutural do genoma do IMNV, indicando a região codificante para a proteína do capsídeo e a fração correspondente ao cDNA codificante para o fragmento IMNV1, sendo que o produto de amplificação esperado foi estimado em aproximadamente 600 pb.



**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio mostrando um produto de amplificação de 600 pb através de PCR, a partir de tecidos infectados de *Litopenaeus vannamei*. 1: marcador de tamanho molecular (escala de 100 pb); 2: controle negativo (reação de PCR realizada na ausência de DNA); linha 3: amplificação do inserto IMNV1 a partir de tecidos infectados de *L. vannamei*.

A ligação do produto amplificado no vetor de clonagem pGEM T-easy foi bem sucedida, assim como a transformação das bactérias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  por eletroporação, o que pode ser confirmado através de reações de PCR das colônias de bactérias, utilizando os iniciadores IMNV1-F e IMNV1-R (dados não mostrados). As mesmas

bactérias foram utilizadas para reação de sequenciamento, utilizando os mesmos iniciadores.

A sequência nucleotídica obtida (Figura 7) confirmou o fragmento IMNV1 como correspondente a uma fração da sequência codificante para o capsídeo do IMNV. A sequência aminoacídica deduzida foi confrontada com o genoma completo do IMNV disponível no GenBank, apresentando uma similaridade de 99% com sequências de isolados virais originários do Brasil, ocorrendo divergência em apenas um aminoácido na posição 294 (Figura 8) Já na comparação com a sequência de isolados virais da Indonésia, foi observada uma similaridade de 98%, ocorrendo divergência em dois aminoácidos nas posições 223 e 294 (Figura 8).

```

1  catatggggcaattacggttacagggaattgaaacacacattacagacagttatatttca 60
   H M G Q L R L Q G I E T H I T D S Y I S
61 aaagctgagccatctgactattcgaacaactatctgaaatggttaatgctcaaaagaca 120
   K A E P S D Y S K Q L S E M V N A Q K T
121 tcaacttggcgagcaaaacaatatcgcatcacaggggtgggacatgtttgatactgtacag 180
   S T W R A N N I A S Q G W D M F D T V Q
181 ttaaatacaaacatatacacaanaaatctttcaatggacactgctttgacaaagcttatg 240
   L N T N I S Q K D L S M D T A L T K L M
241 ttggtgtaccagctaacaacacaaaatctgccagcaacacaattaccatcaagctttat 300
   L L Y Q L T T Q N L P A T Q L P S S I Y
301 tctgcatttgattcaagaacacagcctactttacaggatggaatttgggtataaataat 360
   S A F D S R T Q P T L Q D G I W G I N N
361 ggtgtaataatatttgggtgaacaatgcggtggattagccgcgccagtctttccattcagt 420
   G V N I F G E Q C G G L A A P V F P F S
421 gggggcaccggagaaattactttccatcttactttacaatctgttccacaggaatttcaa 480
   G G T G E I T F H L T L Q S V P Q E F Q
481 gaatcagcaattttcgtaccagcaactgcactacaagctgcaaaagagggtgctcgaaca 540
   E S A I F V P A T A L Q A A K E G A R T
541 ttggcaatgtatgttttaaatgtttgcagaatggccatgtggtatgtatacgatccggc 598
   L A M Y V L M F A E W P C G M Y T I R

```

**Figura 7:** Sequência nucleotídica e aminoacídica deduzida do fragmento IMNV1. Em vermelho estão destacadas as sequências correspondentes aos iniciadores, IMNV1-F e IMNV1-R, respectivamente.

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | MHVENGNIIVSMENQSEIDSQTKFFSLEDDNKLPVDELRLVADMTAQRSNVNTAGNHLR     | 60  |
| INDONÉSIA | MHVENGNIIVSMENQSEIDSQTKFFSLEDDNKLPVDELRLVADMTAQRSNVNTAGNHLR     | 60  |
| IMNV1     | -----QLRLQGIETHITDSYI   | 16  |
| BRASIL    | DNDSIRADAVLANNTVRNNCQIPIPVTTLIPRQIRGLNGVLVNQQRLQGIETHITDSYI     | 120 |
| INDONÉSIA | DNDSIRADAVLANNTVRNNCQIPIPVTTLIPRQIRGLNGVLVNQQRLQGIETHITDSYI     | 120 |
|           | *****   |     |
| IMNV1     | SKAEPDYSKQLSEMVNAQKTSTWRANNIASQGWDMFDTVQLNTNISQKDLSDMTALTTL     | 76  |
| BRASIL    | SKAEPDYSKQLSEMVNAQKTSTWRANNIASQGWDMFDTVQLNTNISQKDLSDMTALTTL     | 180 |
| INDONÉSIA | SKAEPDYSKQLSEMVNAQKTSTWRANNIASQGWDMFDTVQLNTNISQKDLSDMTALTTL     | 180 |
|           | *****   |     |
| IMNV1     | MLLYQLTTQNLPATQLPSSIYSAFDSRTQPTLQDGIWGINNGVNIIFGEQCGGLAAPVFPF   | 136 |
| BRASIL    | MLLYQLTTQNLPATQLPSSIYSAFDSRTQPTLQDGIWGINNGVNIIFGEQCGGLAAPVFPF   | 240 |
| INDONÉSIA | MLLYQLTTQNLPATQLPSSIYSAFDSRTQPTLQDGIWGINNGANIFGEQCGGLAAPVFPF    | 240 |
|           | *****   |     |
| IMNV1     | SGGTGEITFHLTLQSVQEFQESAI FVPATALQAAKEGARTLAMVYLMFAEWP CGMYT--   | 194 |
| BRASIL    | SGGTGEITFHLTLQSVQEFQESAI FVPATALQAAKEGARTLAMVYLMFAEWP FGMYTKT   | 300 |
| INDONÉSIA | SGGTGEITFHLTLQSVQEFQESAI FVPATALQAAKEGARTLAMVYLMFAEWP FGMYTKT   | 300 |
|           | *****   |     |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | KQTTDNAGNNQSDQIFIHSESTVHIPGQKQMHIVLPRKVNVMVNP T TIAEANARVVIQPTY | 360 |
| INDONÉSIA | KQTTDNAGNNQSDQIFIHSESTVHIPGQKQMHIVLPRKVNVMVNP T TIAEANARVVIQPTY | 360 |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | GTVAAGAGVANGNINVAAGVALPTVNLTDYLVSWATDFTLGDIKQLVERMKTTLPISR      | 420 |
| INDONÉSIA | GTVAAGAGVANGNINVAAGVALPTVNLTDYLVSWATDFTLGDIKQLVERMKTTLPISR      | 420 |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | LMAARQNAMLLSTLFPPLIQSNVASDTKEVPGTAGAYTACLANLGI PETLTVNWGVDINV   | 480 |
| INDONÉSIA | LMAARQNAMLLSTLFPPLIQSNVASDTKEVPGTAGAYTACLANLGI PETLTVNWGEDINV   | 480 |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | QPLYQLETDITAHNRYVLNLFKREEVAGAYEFGLGHMASYMMGLLLTMNISSVFNWV       | 540 |
| INDONÉSIA | QPLYQLETDITAHNRYVLNLFKREEVIAGAYEFGLGHMASYMMGLLLTMNISSVFNWV      | 540 |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | YSTRRISTKAWDTAYDSNIQAYQDMHYQMFSSWSSMQGSIAPAMVDEILHNLCCQMFGFSL   | 600 |
| INDONÉSIA | YSTRRISTKAWDTAYDSNIQAYQDMHYRMFSSWSSMQGSIAPAMVDEILHNLCCQMFGFSL   | 600 |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | PLRQVLFNALPITFSSFGSWMLPRVSDGFQTVRYDVGPPVINAKRDGEVPSMIDAWTY      | 660 |
| INDONÉSIA | PLRQVLFNALPITFSSFGSWMSPRVSDGFQTVRYDIGPPVINAKRDGEVPSMIDAWTY      | 660 |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | KFTEKLPKSFPLPWPMPPEGKDSTMGYDPEKEPALIDNSNETGNVFRPFMARNGNNSNYLPT  | 720 |
| INDONÉSIA | KFTEKLPKSFPLPWPMPPEGKDSTMGYDPEKEPALIDNSNETGNVFRPFMARNGNNSNYLPT  | 720 |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | NYTIDVSQNGHDESCINVDLFNNAVGVTLTNYDGTATNADVVP T GSYIKQRAMPINANAV  | 780 |
| INDONÉSIA | NYTIDVSQNGHDESCINVDLFNNAVGVTLTNYDGTATNADVVP T GSYIKQRAMPINANAV  | 780 |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | RPTEFLDAANHTKPF AIEGRLVYLGGTIAN TTNVNVAMQRKQRLSKPAFKWAHAQRQRV   | 840 |
| INDONÉSIA | RPTEFLDAANHTKPF AIEGRLVYLGGTIAN TTNVNVAMQRKQRLSKPAFKWAHAQRQRV   | 840 |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | YDSSRPGMDAITKLCARKSGFMNARSTAMMAPKTGLSAVIDQAPNTSQDLIEQPSQQEVM    | 900 |
| INDONÉSIA | YDSSRPGMDAITKLCARKSGFMNARSTAMMAPKTGLSAVIDQAPNTSQDLIEQPSQQEVM    | 900 |
| IMNV1     | -----   |     |
| BRASIL    | DMQATATV 908  |     |
| INDONÉSIA | DMQATATV 908  |     |

**Figura 8:** Alinhamento múltiplo da sequência aminoacídica deduzida de IMNV1 e do seu fragmento correspondente na sequência já conhecida do IMNV obtida a partir de isolados virais do Brasil (GenBank: AY570982.1) e Indonésia (GenBank: EF061744.1). Resíduos

idênticos estão indicados por asterisco(\*). Os hífen (-) indicam espaços vazios, que no caso, correspondem aos resíduos aminoacídicos adicionais presentes na sequência completa da proteína estrutural do IMNV. Em vermelho estão os aminoácidos que apresentaram divergência entre a sequência do genoma do IMNV disponível em bancos de dados virtuais e a sequência aminoacídica deduzida obtida após sequenciamento do fragmento IMNV1.

#### 4.2. Expressão da proteína recombinante IMNV1 (IMNV1r)

O plasmídeo de clonagem pGEM T-easy/IMNV1 foi submetido à digestão com as enzimas *Bam*HI e *Nde*I visando sua sub-clonagem em vetor de expressão (Figura 9).



**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio mostrando a digestão plasmidial do vetor de expressão pGEM T-easy - IMNV1, com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I. 1: Plasmídeo pGEM T-easy (banda superior) e o fragmento correspondente a uma sequência codificante para IMNV (IMNV1), apresentando o tamanho esperado de 600 pb; 2: marcador de peso molecular (primeira banda corresponde a 580 pb).

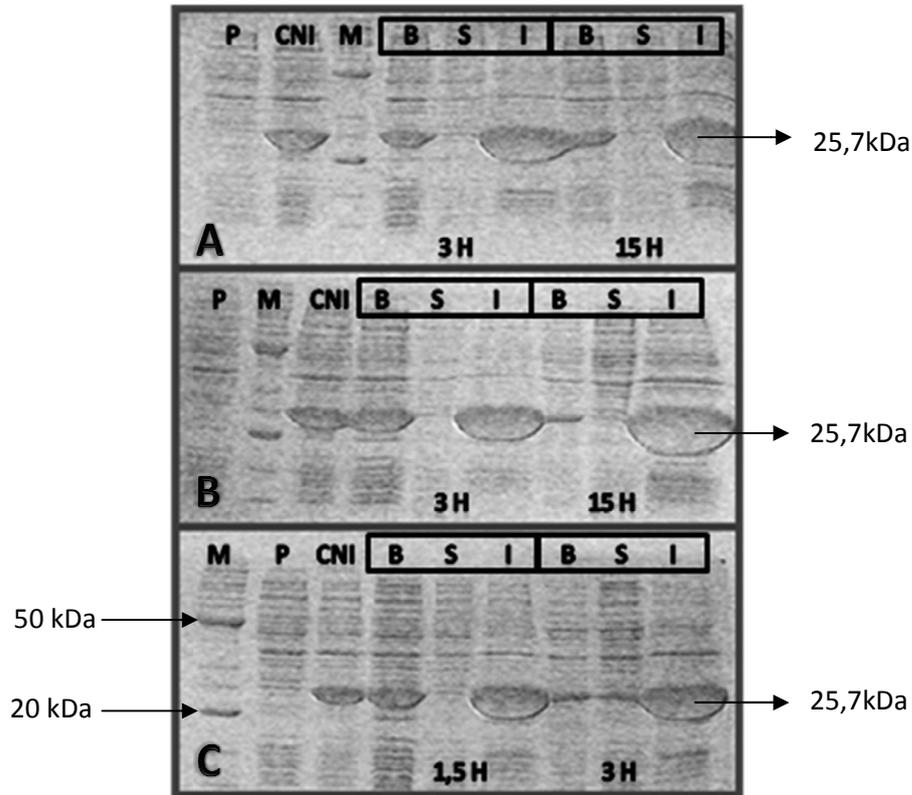
A banda de 600 pb correspondente ao fragmento codificante para IMNV foi excisada, purificada e utilizada para ligação no vetor de expressão pET-14b, o qual foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* BL21(DE3) através de eletroporação. O plasmídeo de expressão pET-14b contendo o inserto de interesse IMNV1 também foi verificado quanto a presença, orientação e fase de leitura do inserto através de sequenciamento. A análise das sequências obtidas confirmou a identidade do inserto IMNV1, revelando que o mesmo encontrava-se na orientação e na fase de leitura corretas.

Com base na sequência aminoacídica de 236 aa deduzida do fragmento IMNV1, o programa ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) calculou como sendo de 25,7 kDa a o peso molecular predito da proteína heteróloga (Tabela 2).

**Tabela 2:** Parâmetros bioquímicos deduzidos do fragmento protéico IMNV1

| <b>Proteína</b> | <b>Aminoácidos</b> | <b>Ponto isoelétrico</b> | <b>Peso molecular</b> |
|-----------------|--------------------|--------------------------|-----------------------|
| <b>IMNV1</b>    | 236                | 5,6                      | 25,7 kDa              |

Foram testadas diferentes temperaturas (18°C, 27°C e 37°C) e tempos de expressão (1,5 h, 3 h, 15 h) pós-indução por IPTG (1mM). As condições que apresentaram maior eficiência de expressão, representada por uma banda proeminente e de tamanho compatível com IMNV1r (25,7 kDa) foram temperatura de 27°C por 15 h pós-indução (Figura 10 B). Além disso, a sonicação da cultura bacteriana após os testes de expressão permitiu a análise de bandas protéicas nas frações solúvel e insolúvel do lisado bacteriano, revelando que a proteína IMNV1r localiza-se na fração insolúvel (Figura 10 A, B, C).

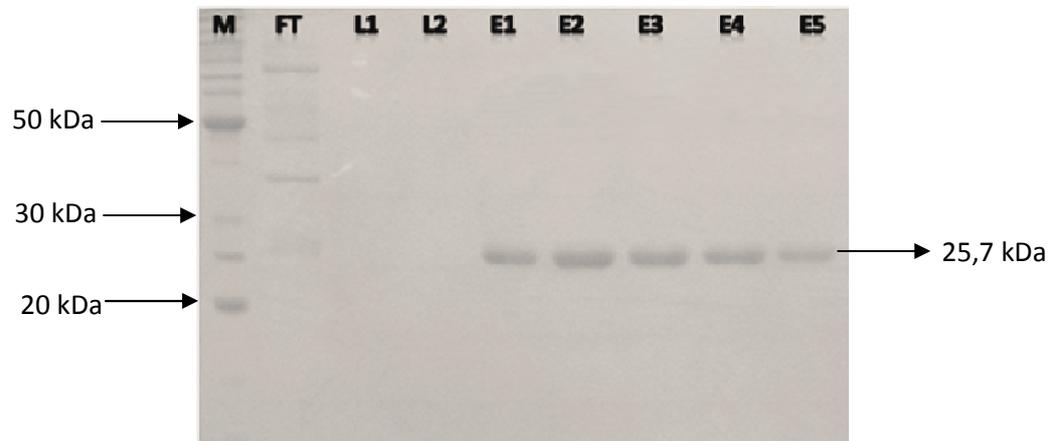


**Figura 10:** Padrões de expressão protéica da bactéria *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pET-14b contendo o inserto codificante para um fragmento da proteína estrutural do IMNV (IMNV1), sob diferentes condições de temperatura e tempo de cultura após expressão. A: 18°C; B: 27°C; C: 37°C; M: marcador de peso molecular; P: padrão de expressão da bactéria *E. coli* transformada com o plasmídeo pET-14b fechado; CNI: padrão de expressão de *E. coli* transformada com o plasmídeo pET-14b contendo o inserto IMNV1 antes da indução por IPTG; B: padrão de expressão de *E. coli* transformada com o plasmídeo pET-14b contendo o inserto de interesse IMNV1, após indução com IPTG; S: fração solúvel do lisado de bactérias *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET-14b contendo o inserto IMNV1 após sonicação; I: fração insolúvel do lisado de bactérias *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET-14b contendo o inserto IMNV1 após sonicação. As setas indicam a altura esperada para a proteína IMNV1r, estimada em 25,7 kDa.

#### 4.3. Purificação da proteína IMNV1r

O fragmento protéico recombinante correspondente a sequência codificante para IMNV foi purificado através de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados ( $\text{Ni}^{2+}$ ), conforme descrito no item 3.9. Após a lise das bactérias obtidas após a expressão em

condições ótimas padronizadas no presente estudo, foram realizadas lavagens e eluições (Figura 11), onde foram obtidas bandas únicas, correspondentes a frações puras da proteína IMNV1r.



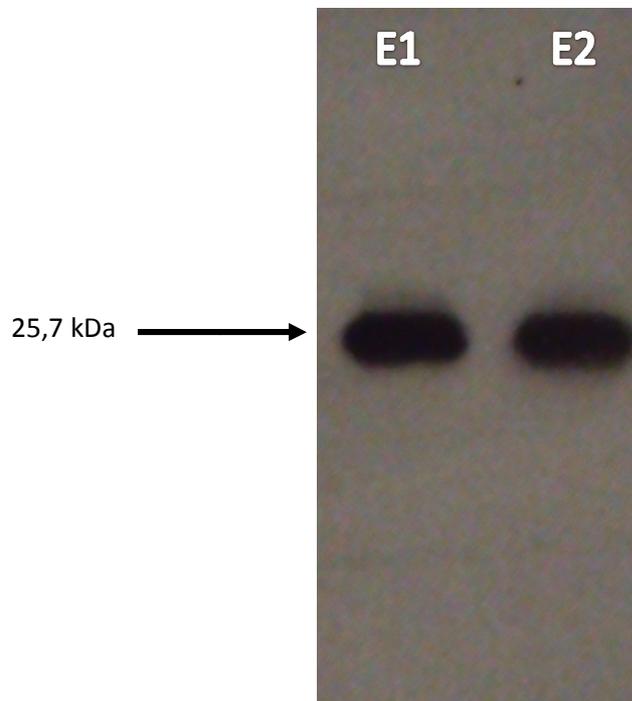
**Figura 11:** Purificação da proteína IMNV1r. M: marcador de peso molecular; FT: Fração de proteínas que não foram aderidas a resina de purificação; L1: primeira lavagem; L2: segunda lavagem; E1: primeira eluição; E2: segunda eluição; E3: terceira eluição; E4: quarta eluição; E5: quinta eluição.

As frações purificadas da proteína IMNV1r, obtidas através das eluições, foram dialisadas e quantificadas em relação a sua concentração protéica através do método de Bradford. As eluições 1, 2 e 3 mostraram ter maior concentração de proteínas (0,8-1 mg/ml), enquanto as eluições 4 e 5 revelaram uma menor liberação de proteína a partir da resina de purificação, apresentação menores concentrações protéicas (0,4-0,5 mg/ml).

#### **4.4. Confirmação da eficiência do procedimento de expressão heteróloga da proteína IMNV1r**

A fim de avaliar a eficiência do procedimento de expressão heteróloga de IMNV1r, a sua presença foi avaliada nas frações purificadas da proteína adquiridas nas fases de eluição da purificação, através de Western Blot. Após separação protéica eletroforética das amostras, o ensaio de Western blot, realizado como descrito em 3.10, permitiu observar uma banda única de 25 kDa (Figura 12), correspondente a proteína IMNV1r purificada. A

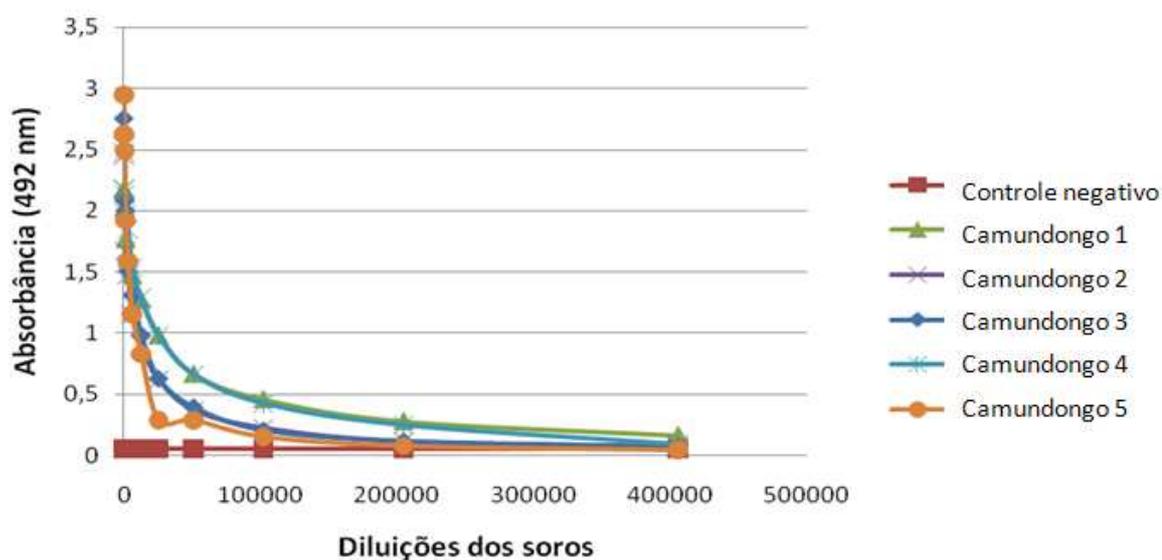
inexistência de outras bandas visíveis confirmou ainda a eficácia do processo de purificação, que foi bem sucedido no isolamento da fração correspondente à proteína recombinante de interesse.



**Figura 12:** Western Blot de amostras purificadas da proteína IMNV1r, utilizando anticorpo anti-cauda de polihistidina. E1: Eluição 1; E2: Eluição 2.

Cinco camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem BALB/c, isogênicos, haplótipos H-2K<sup>d</sup> receberam três doses de 50 µg de proteína IMNV1r purificada. A resposta imune anti-IMNV1 nestes animais foi avaliada através de ELISA, utilizando placas sensibilizadas com a proteína IMNV1r purificada (Figura 13). Adotou-se como valor base para positividade do teste de ELISA valor de absorbância três vezes maior do que o controle negativo, representado pelo título do soro de camundongo não-imunizado. Os títulos de anticorpos séricos anti-IMNV1 dos camundongos imunizados podem ser visualizados na Tabela 3.

### Titulação de anticorpos anti-IMNV1 em camundongos imunizados com IMNV1r

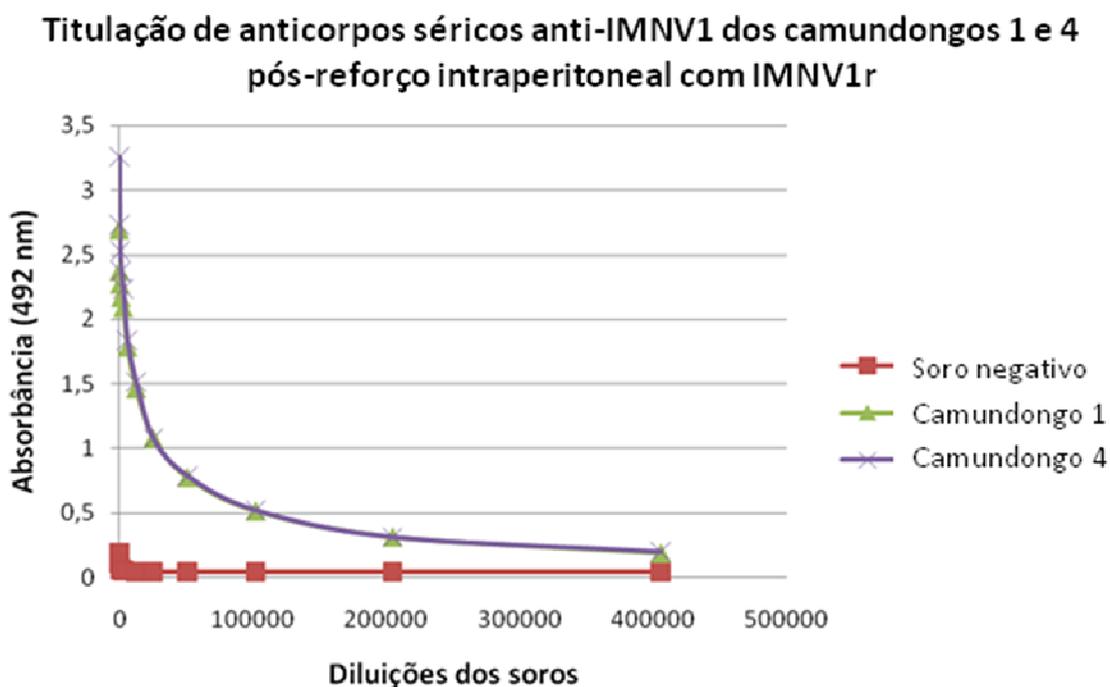


**Figura 13:** Titulação de anticorpos séricos anti-IMNV1 em camundongos imunizados, através da técnica de ELISA, utilizando placas sensibilizadas com a proteína IMNV1r. Controle negativo: soro de camundongo não-imunizado; Camundongos 1 a 5: soros de camundongos imunizados com IMNV1r.

**Tabela 3:** Títulos de anticorpos séricos anti-IMNV1 após três doses da proteína IMNV1r.

| CAMUNDONGO | TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI-IMNV1 |
|------------|---------------------------------|
| 1          | 405.600                         |
| 2          | 102.400                         |
| 3          | 102.400                         |
| 4          | 204.800                         |
| 5          | 102.400                         |

Por apresentarem os maiores títulos de anticorpos anti-IMNV1, os camundongos 1 e 4 foram escolhidos para terem seus esplenócitos utilizados no procedimento de fusão e por isso foram submetidos a uma dose reforço de 50µg da proteína IMNV1r purificada, por via intraperitoneal. Três dias após a última dose de IMNV1r, foi realizada uma nova titulação do soro destes camundongos quanto a presença de anticorpos anti-IMNV1 (Figura 14). Ambos os soros policlonais apresentaram títulos de anticorpos anti-IMNV1 de 1.611.200.



**Figura 14:** Títulos séricos de anticorpos anti-IMNV1 nos camundongos submetidos a dose reforço de IMNV1r, utilizando a técnica de ELISA. Soro negativo: soro de camundongo não imunizado; Camundongos 1 e 4: soro de camundongos submetidos a imunização com IMNV1r.

#### 4.5. Produção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais

Os camundongos 1 e 4 tiveram os seus baços retirados e seus esplenócitos utilizados para fusão com células de mieloma de camundongos. O procedimento de fusão foi bem sucedido, fornecendo um total de cinco placas de 96 poços, contendo  $2 \times 10^5$  células cada um. Após procedimento de seleção em meio HAT, houve crescimento celular em 219 poços, que foram então testados quanto a produção de sobrenadantes contendo anticorpos específicos

para a proteína IMNV1. A fim de verificar possível ligação inespecífica no anticorpo secundário, como controles negativos foram utilizados meio de cultura completo e PBS-Tween 0,05% acrescido de 3% de BSA. O teste foi considerado positivo quando o valor da absorvância foi três vezes maior do que o encontrado no controle negativo.

Do total de poços testados apenas 18 apresentaram reatividade contra IMNV1r, dos quais 12 mantiveram-se estáveis e permaneceram reativos após duas semanas. Dos 12 poços iniciais produtores de sobrenadantes policlonais, os 6 que apresentaram maior reatividade, ou seja, maiores absorvâncias nas reações de ELISA, foram submetidos a procedimentos de diluição limitante, pelos quais foram selecionadas 6 linhagens monoclonais produtoras de anticorpos positivos para a proteína IMNV1r. Estas linhagens monoclonais foram nomeadas de acordo com os poços de origem nas placas de fusão e são: 13H, 11D, 33G, 39G, 46C e 54H. As linhagens policlonais restantes foram submetidas a congelamento em nitrogênio líquido e permanecem armazenadas para possível utilização no futuro. O mesmo procedimento foi realizado para armazenamento de células das linhagens monoclonais.

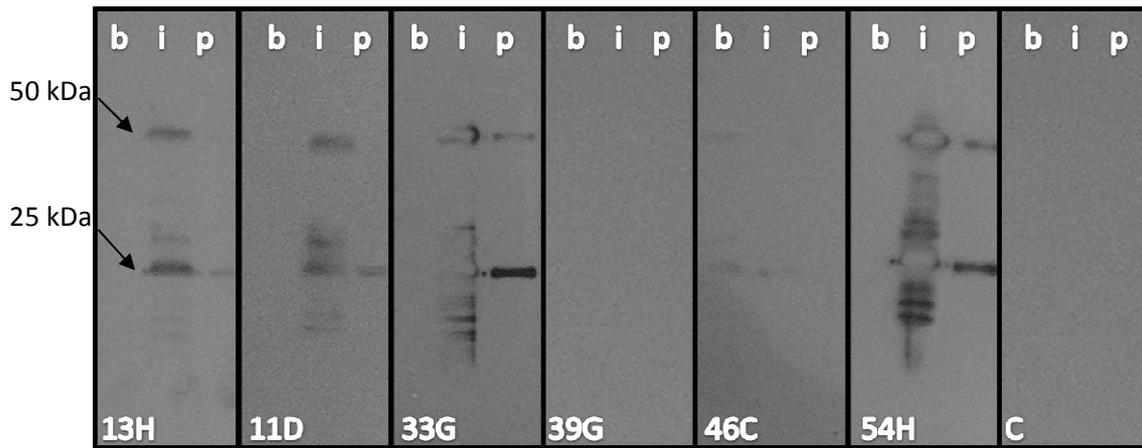
As linhagens monoclonais de células tiveram seus anticorpos submetidos a isotipagem, conforme descrito em 3.13.6. A identificação das classes e subclasses dos anticorpos monoclonais 13H, 11D, 33G, 39G, 46C e 54H pode ser visualizada na Tabela 4. Foram obtidos 4 anticorpos da classe IgM e dois anticorpos da classe IgG, subclasse  $\gamma 1$ . Como controle positivo foi utilizado anticorpo de captura contra todas as classes de imunoglobulinas (Ig total) e como controle negativo foi utilizado meio RPMI acrescido de 20% de SFB durante a incubação do anticorpo primário.

**Tabela 4:** Isotipagem dos anticorpos monoclonais anti-IMNV1.

| HIBRIDOMA | ISOTIPAGEM            |
|-----------|-----------------------|
| 13H       | IgG1; cadeia $\kappa$ |
| 11D       | IgM, cadeia $\kappa$  |
| 33G       | IgM, cadeia $\kappa$  |
| 39G       | IgM, cadeia $\kappa$  |
| 46C       | IgG1, cadeia $\kappa$ |
| 54H       | IgM, cadeia $\kappa$  |

#### 4.6. Reatividade dos anticorpos monoclonais contra lisados de tecidos musculares de camarões infectados

Os anticorpos monoclonais dos hibridomas 13H, 11D, 33G, 39G, 46C e 54H foram testados, através de contra diferentes antígenos, conforme descrito em 3.13.7. Os anticorpos 13H, 11D, 33G e 54H foram capazes de reconhecer a proteína recombinante, porém 39G e 46C não demonstraram reatividade contra a mesma. O perfil protéico de expressão da bactéria *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo fechado não foi reconhecida por nenhum dos anticorpos monoclonais anti-IMNV1, com exceção do anticorpo 46C, que apresentou reatividade cruzada contra o extrato protéico bacteriano. Já no perfil protéico de expressão de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo contendo o inserto IMNV1, foram reconhecidas bandas compatíveis com a proteína IMNV1r pelos anticorpos 13H, 11D, 33G, 46C e 54H (Figura 15). O anticorpo monoclonal anti-rábico 3E6, utilizado como controle negativo, não foi capaz de reconhecer nenhuma proteína, como era esperado.



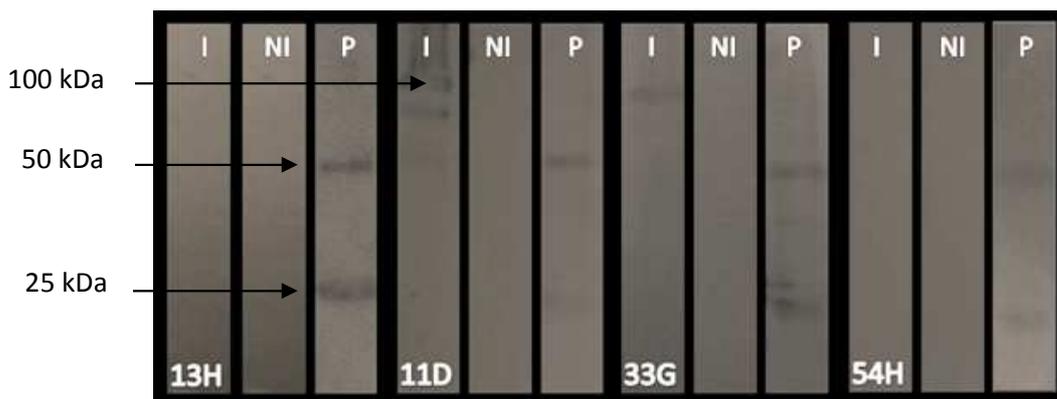
**Figura 15:** Western blot utilizando sobrenadantes dos hibridomas produtores dos anticorpos monoclonais anti-IMNV: 13H, 11D, 33G, 39G, 46C, 54H e como controle negativo, anticorpo monoclonal anti-rábico 3E6(C), a fim de avaliar a reatividade dos mesmos contra: b - perfil protéico *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo fechado; i - perfil protéico de expressão de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo contendo o inserto de interesse IMNV1; p - proteína IMNV1r.

O reconhecimento de bandas compatíveis com IMNV1r pelos anticorpos 13H, 11D, 33G, 46C e 54H foi possível mesmo diante de grandes quantidades de outras proteínas presentes no extrato protéico bacteriano, o que caracteriza uma relação positiva quanto a sua especificidade. A ocorrência de outras bandas que não a correspondente a proteína IMNV1r diante do perfil protéico de expressão de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo de expressão pET-14b - IMNV1 pode decorrer da grande quantidade de proteína presente nos extratos. Ainda foram observadas bandas de aproximadamente 50 kDa que foram reconhecidas pelos anticorpos monoclonais, nas colunas referentes a proteína IMNV1r purificada. Esta banda apresenta aproximadamente o dobro do peso molecular da proteína IMNV1r e provavelmente pode corresponder ao dímero dessa proteína, formado no processo de purificação.

As diferenças de intensidade das bandas obtidas no Western Blot não foram resultado de diferenças na concentração de proteínas presentes nas membranas de nitrocelulose. A quantidade de proteína IMNV1r purificada (5 µg) e também de extratos

protéicos bacterianos (5 µl do precipitado do extrato protéico total de bactérias correspondente a 25 ml de cultura, diluído em 2 ml de tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,4) foi a mesma para cada um dos testes com os anticorpos monoclonais, sendo o diferencial de reatividade dos sobrenadantes testados responsável pela presença de bandas mais fracas ou mais fortes obtidas após revelação em filmes radiográficos.

Por reconhecerem a proteína recombinante purificada e presente nos extratos protéicos pós-expressão bacteriana, os anticorpos monoclonais 13H, 11D, 33G e 54H foram utilizados em testes de reatividade contra lisados de tecidos musculares de camarões *L. vannamei* infectados e sadios, através de Western Blot. Primeiramente, extratos protéicos totais de tecidos musculares de camarões infectados e não infectados foram submetidos a separação eletroforética por SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose, conforme descrito em 3.10. As proteínas foram então submetidas a um procedimento de transferência para membrana de nitrocelulose, utilizada como alvo para os testes de especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais. Nenhum dos sobrenadantes mostrou reatividade contra tecidos de músculos de camarões sadios (Figura 16). Os anticorpos monoclonais 11D e 33G foram capazes de reconhecer uma banda de aproximadamente 100 kDa, correspondente a proteína estrutural do vírus IMNV, porém 11D reconheceu ainda uma outra banda de menor peso molecular (80 kDa), além da proteína de interesse. Já 13H e 54H não apresentaram reatividade contra tecidos de camarões infectados por IMNV.



**Figura 16:** Western Blot dos sobrenadantes dos hibridomas produtores de anticorpos anti-IMNV 13H, 11D, 33G e 54H contra a proteína IMNV1r (P) e extratos protéicos totais de tecidos musculares de camarões infectados (I) e não infectados (NI). A banda majoritária que aparece em I referente aos anticorpos 11D e 54H é relativa a uma massa molecular de aproximadamente 100 kDa, correspondente a proteína estrutural do capsídeo do IMNV.

Dessa forma, neste trabalho foram produzidos dois anticorpos monoclonais, 11D e 33G, contra o fragmento recombinante IMNV1 que também foram capazes de reconhecer de maneira eficaz a proteína do capsídeo viral do IMNV em extratos protéicos de camarões infectados, sendo concordante com o diagnóstico por PCR, em estágios de infecção que ainda não apresentavam sinais clínicos da enfermidade.

## 5. DISCUSSÃO

A indústria de cultivo de camarões no ocidente corresponde a aproximadamente 25% da produção mundial, sendo *L. vannamei* e *L. stylirostris* as espécies de camarões peneídeos mais cultivadas. Porém, apesar de ser um mercado em expansão, além da grande importância econômica e social, a carcinicultura tem sofrido com grandes quedas na produção, principalmente causadas por enfermidades. As doenças de camarões peneídeos cultivados incluem síndromes com etiologias infecciosas e não infecciosas. As doenças não infecciosas de importância econômica para o camarão de cultivo estão ligadas aos extremos ambientais, ao desequilíbrio nutricional, a produtos tóxicos e a fatores genéticos (LIGHTNER & REDMAN, 1998). Porém, a maior causa de perdas está relacionada a infecções de etiologia

viral. Algumas das mais importantes doenças virais de camarões já foram limitadas ao Ocidente ou Oriente, porém a movimentação internacional de espécimes vivos ou mortos promoveu a transmissão e o estabelecimento de certos patógenos de um hemisfério ao outro (LIGHTNER, 1996; FLEGEL; ALDAY-SANZ, 1998).

Como consequência do rápido crescimento e desenvolvimento da aquicultura, muitos patógenos virais de camarões migraram de uma região a outra antes mesmo de serem identificados e caracterizados como agentes etiológicos das suas respectivas doenças. Nas Américas, os principais vírus identificados como causadores de enfermidades em camarões foram IHHNV, TSV, WSSV e IMNV, mais recentemente.

Os invertebrados não contam com um sistema imune adaptativo semelhante aos dos vertebrados, apesar de hoje já serem conhecidas várias moléculas associadas a um reconhecimento altamente específico de patógenos e já existirem estratégias de vacinação destes animais, que incluem vacinas de DNA, uso de proteínas recombinantes, vírus inativados ou ativos (JOHNSON; VAN HULTEN; BARNES, 2008). Porém, nem sempre estas metodologias alcançam o objetivo inicial de conferir proteção contra novas infecções e em alguns casos a proteção existe, porém é bastante efêmera. Trata-se de uma área que ainda necessita vencer muitos desafios e esclarecer mecanismos ainda não conhecidos para que possa se desenvolver com maior relevância.

Diante deste panorama, a maior estratégia de controle de epidemias nas fazendas de cultivo de camarões é o diagnóstico precoce das enfermidades. Com esse objetivo, muitas alternativas são possíveis, incluindo a observação de sinais clínicos, métodos moleculares, histológicos e imunológicos. Recentemente foram padronizadas duas novas alternativas para diagnóstico do IMNV. A primeira delas é conhecida como LAMP (do inglês, *loop mediated isothermal amplification*), que permite a amplificação de sequências nucleotídicas com alta especificidade e em uma temperatura única, tornando desnecessário o uso de termocicladores e longos ciclos de variação de temperaturas. Para aperfeiçoar ainda mais esta técnica, se associou a ela uma forma alternativa de visualização dos resultados no lugar dos géis de eletroforese tradicionais, a LDP (do inglês, *lateral flow dipstick*), que consiste em

um método cromatográfico de revelação em uma pequena membrana, através da utilização de sondas de DNA marcadas, que são então hibridizadas com a sequência nucleotídica amplificada. Através dessas técnicas associadas é possível se obter resultados de diagnóstico para o vírus em até 75 min (KIATPATHOMCHAI et al., 2008; PUTHAWIBOOL et al., 2009). Já a segunda alternativa de diagnóstico desenvolvida ainda mais recentemente, é denominada RT-LAMP-NALF. Esta técnica combina métodos de extração simplificada de ácidos nucleicos, a transcrição reversa de sequências nucleotídicas com alta especificidade e em temperatura única e um passo de confirmação colorimétrica de detecção do IMNV usando um teste qualitativo do tipo NALF (do inglês, *nucleic acid lateral flow*). A sensibilidade deste teste mostrou ser 100 vezes maior do que de um RT-PCR comum, porém 100 vezes menor do que um RT-PCR em tempo real (ANDRADE; LIGHTNER, 2009).

Métodos colorimétricos são bastante interessantes por proporcionarem uma fácil interpretação do diagnóstico. Porém, dentre todas estas metodologias possíveis, os testes imunocromatográficos utilizando anticorpos monoclonais são os mais promissores para utilização nas fazendas de cultivo de camarões, por serem independentes de infra-estrutura laboratorial e permitirem um diagnóstico rápido e preciso, que pode ser realizado em condições de campo, por pessoas não especializadas. Algumas enfermidades de etiologia viral em camarões já possuem testes imunocromatográficos eficientes para a sua detecção, como é o caso das síndromes causadas pelo WSSV e YHV (do inglês *yellow head virus*) (POWELL et al., 2006; WANG; ZHAN, 2006; SITHIGORNGUL et al., 2007).

Para diagnóstico de IMNV ainda não existe relato do desenvolvimento de testes imunocromatográficos baseados na detecção do vírus por anticorpos monoclonais. Uma estratégia bastante utilizada para a produção de anticorpos monoclonais murinos é a utilização de proteínas recombinantes na imunização dos camundongos, estratégia esta que foi utilizada no desenvolvimento deste trabalho.

O sequenciamento do fragmento nucleotídico do inserto IMNV1, obtido após clonagem do mesmo no vetor pGEM T-easy, confirmou a identidade do mesmo como correspondente a um fragmento da sequência codificante para a proteína estrutural do vírus

IMNV. A comparação da sequência aminoacídica deduzida com sequências presentes em bancos de dados virtuais, permitiu observar uma maior identidade aminoacídica com a sequência obtida de isolados virais brasileiros, ocorrendo divergência em apenas um resíduo aminoacídico (GenBank: AY570982.1). Já a comparação com a sequência obtida de isolados da Indonésia, mostrou divergência em dois resíduos aminoacídicos (GenBank: EF061744.1). Estes dados permitem caracterizar o genoma dos isolados de IMNV como bastante conservados, o que serve como forte argumento para a possibilidade de utilização de métodos de diagnóstico de maneira uniforme em todo o mundo. Porém, métodos que utilizem como alvo de detecção da presença do vírus as regiões que apresentam diferença na sequência de nucleotídeos/aminoácidos, podem vir a apresentar resultados falso-negativos.

Tendo sido confirmada a identidade da sequência nucleotídica do inserto, o mesmo foi extraído do plasmídeo de clonagem, utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I. Para que isso fosse possível, foi essencial a presença das sequências alvo para estas enzimas na constituição dos iniciadores, assim como a ausência destes sítios de restrição no restante da sequência nucleotídica do inserto IMNV1, o que poderia causar a clivagem do inserto em regiões não desejadas quando as enzimas de restrição fossem utilizadas. As mesmas enzimas de restrição foram utilizadas para clivagem do plasmídeo de expressão pET-14b, onde já existiam os sítios de restrição para estas duas enzimas, preparando o mesmo para posterior ligação do inserto IMNV1. A clonagem utilizando duas enzimas de restrição diferentes (clonagem unidirecional) possui a vantagem de diminuir a probabilidade de auto-ligação do vetor de expressão e ligação do inserto em sentido contrário, por resultar em extremidades não-complementares no vetor, após a digestão. Esta estratégia aumenta a eficiência do processo comparada à utilização de uma única enzima.

A construção do plasmídeo de expressão pET-14b/IMNV1 foi bem sucedida, assim como utilização do mesmo na transformação de bactérias *E. coli* BL21(DE3). A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é o método prevalente para obtenção de grandes quantidades de proteínas funcionais utilizadas em pesquisas, na área de biotecnologia e

indústria farmacêutica. A expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* pode frequentemente promover a formação de agregados insolúveis da proteína, denominados corpos de inclusão (VALLEJO; RINAS, 2004). Essa formação depende de uma série de fatores, tais como: a natureza intrínseca da proteína recombinante, a taxa de expressão protéica, a concentração celular de intermediários da proteína (enovelamento incompleto), a composição e o pH do meio de cultivo, a temperatura de crescimento e a localização celular da proteína expressa (HOCKNEY, 1994; MARCO et al., 2005).

Neste estudo, os cultivos bacterianos foram submetidos a várias condições de expressão diferentes, utilizando diferentes tempos e temperaturas de crescimento pós-indução com IPTG. Além de ter como objetivo a expressão da proteína de interesse, as diferentes condições de expressão foram realizadas como tentativas de obter a proteína em fase solúvel, o que facilitaria a sua posterior purificação. Todas as condições utilizadas apresentaram uma banda de expressão no tamanho esperado, de aproximadamente 25 kDa, correspondente a proteína de interesse IMNV1, sendo a melhor condição o crescimento pós-indução a 27°C por 15 horas. Porém, apesar da grande variedade de condições, em todos os casos a proteína mostrou estar localizada na fração insolúvel dos lisados bacterianos, correspondente aos corpos de inclusão.

Neste trabalho, foi possível obter frações da proteína purificada em eluições utilizando tampão de pH reduzido (4,5), que posteriormente sofreram processo de diálise para enovelamento e renaturação protéica. Após avaliação da concentração protéica destas frações, pode-se concluir que os protocolos de expressão e purificação utilizados foram eficientes, obtendo-se amostras da proteína IMNV1r em concentrações de até 1 mg/ml. O rendimento obtido na purificação de proteínas ligadas a histidina a partir de corpos de inclusão geralmente é maior quando comparado à purificação em condições nativas. Durante o processo de desnaturação as histidinas são completamente expostas, facilitando a ligação da proteína aos íons metálicos, possibilitando assim uma maior recuperação da proteína de interesse.

A confirmação do sucesso do protocolo de expressão utilizado foi feito através de Western Blot da proteína IMNV1r purificada, utilizando como estratégia a presença da cauda de poli-histidina na proteína IMNV1r. A separação eletroforética por SDS-PAGE desnaturante permitiu a exposição da cauda de histidinas presente na proteína purificada, facilitando a ligação do anticorpo anti-cauda de histidina produzido em camundongos, utilizado para detecção do fragmento recombinante de interesse.

A expressão e purificação eficientes da proteína IMNV1r foram bastante importantes na execução deste trabalho, já que este fragmento protéico tinha como objetivo a imunização de camundongos. A concentração protéica relativamente alta permitiu a inoculação de volumes pequenos durante as imunizações, evitando eventuais complicações no processo. Além disso, a eficiência do processo de imunização teve fundamento nas estratégias estabelecidas: duas imunizações por via subcutânea, utilizando adjuvante – que promovem uma amplificação da resposta imune, e duas imunizações por via intraperitoneal, sem adjuvantes.

Os adjuvantes de Freund são os mais amplamente utilizados para produção de anticorpos, tendo capacidades imunoestimulatórias não superadas por qualquer outro adjuvante (ALTMAN; DIXON, 1989; SMITH et al., 1992; WARREN et al., 1986). A utilização de Adjuvante Completo de Freund na primeira imunização e de Adjuvante Incompleto de Freund na segunda, ambas por via subcutânea, formando uma emulsão estável com a solução contendo a proteína IMNV1r foi essencial para que se atingisse uma resposta imune satisfatória. O óleo mineral utilizado nos adjuvantes de Freund possui três mecanismos de ação: liberação lenta do antígeno de interesse; funcionamento como veículo para transporte do antígeno através do sistema linfático até as células imunoefetoras e interação com células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas. Estudos indicam a persistência da emulsão utilizada em injeção por via subcutânea até 22 semanas depois da imunização. Já a inclusão de membranas de *Mycobacterium* é responsável por uma resposta ampliada na produção humoral de anticorpos (STILLS, 2005).

A eficiência das imunizações pode ser verificada através do elevado título de anticorpos anti-IMNV1 no soro dos camundongos imunizados. Os camundongos que apresentaram os maiores títulos foram utilizados no processo de fusão e produção de hibridomas. Porém, surpreendentemente, os baços destes camundongos não estavam mais volumosos do que o de camundongos não-imunes, como seria esperado diante de indivíduos que sofreram quatro doses de imunização com uma grande quantidade de proteína recombinante, sendo as duas primeiras ainda suplementadas com adjuvantes. O menor volume dos baços refletiu em um menor número de esplenócitos disponíveis para fusão, que apesar disso foi bem sucedida.

O baixo número de poços positivos, assim como a perda de estabilidade de alguns deles deve-se a própria natureza do procedimento de fusão, já que após a sua ocorrência, durante as primeiras divisões celulares, as células sofrem danos ao acaso nos cromossomos, podendo ocorrer uma perda da habilidade de produzir anticorpos (NOWINSKI et al., 1983). A segregação e reorganização dos cromossomos produzem nas células híbridas uma considerável variabilidade nas propriedades de crescimento, que só se estabiliza cerca de 20 a 25 dias após a fusão (NELSON et al., 2000). Além disso, as células híbridas que não produzem anticorpos crescem mais rapidamente, dificultando o crescimento das células produtoras de anticorpos (NOWINSKI et al., 1983).

Assim, as diluições limitantes procedidas a partir dos poços que apresentaram as maiores reatividades contra o antígeno recombinante IMNV1 serviram não só para obtenção de uma linhagem monoclonal de células secretoras dos anticorpos de interesse, como também para garantir que os hibridomas de interesse não se perdessem pelo crescimento em competição de outras células não secretoras presentes.

Antes que tivessem seus sobrenadantes utilizados para testes de reatividade contra perfis de expressão protéica e lisados de tecido muscular de camarões infectados por IMNV, as linhagens monoclonais 13H, 11D, 33G, 39G, 46C e 54H foram mantidas em cultura por aproximadamente 60 dias, a fim de garantir a estabilidade na produção de anticorpos, além de serem submetidas a isotipagem, objetivando caracterizar os anticorpos monoclonais por

ela produzidos. No presente estudos quatro dos seis anticorpos monoclonais obtidos mostraram ter suas cadeias pesadas da classe IgM (11D, 33G, 39G e 54H) e apenas dois da classe IgG subclasse  $\gamma$ 1. Quanto à cadeia leve, todos os anticorpos monoclonais mostraram possuir a *kappa*.

Na literatura, podem ser encontrados muitos trabalhos sobre produção de anticorpos monoclonais contra vírus de camarões, como IHNV, WSSV, TSV e YHV, utilizando como antígenos para imunizações vírus purificados ou então proteínas recombinantes correspondentes a porções estruturais do capsídeo ou envelope virais. Dentre as imunoglobulinas produzidas contra vírus de camarões encontradas na literatura, os anticorpos da classe IgG, subclasses  $\gamma$ 1 ou  $\gamma$ 2 são os mais comuns. (POULOS et al., 1994; SITHIGORNGUL et al., 2000; POULOS et al., 2001; ANIL et al., 2002; ERICKSON; ZARAIN-HERZBERG; LIGHTNER, 2002; LIU et al., 2002; CHAVISUTHANGKURA et al., 2004; WANG et al., 2008). Anticorpos IgM podem reagir não especificamente com tecidos de camarões não infectados, apresentando resultados falso-positivos (SITHIGORNGUL et al., 2000). Anticorpos IgG apresentam a vantagem de possuírem maior afinidade e especificidade, além de menor probabilidade de reações cruzadas em imunoenaios (LIGHTNER; REDMAN, 1998).

A maior prevalência de anticorpos IgM no presente trabalho não era esperada, já que esta classe de anticorpo está associada a respostas imunes recentes. A estratégia de quatro imunizações foi realizada com a intenção de promover uma resposta imune crônica e a longo prazo, para a qual seria esperada uma maior presença de hibridomas secretores de anticorpos da classe IgG. Mesmo diante das possíveis inespecificidades dos anticorpos da classe IgM, estes, juntamente com os anticorpos IgG, foram submetidos a testes de reatividade contra extratos protéicos de expressão bacteriana, através da técnica de Western Blot. Através deste procedimento, foi possível identificar 4 anticorpos que não apresentaram reação inespecífica diante do perfil protéico de expressão da bactéria *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-14b fechado e que foram capazes de reconhecer a proteína recombinante correspondente ao um fragmento da proteína estrutural do IMNV diante do perfil protéico da bactéria *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-14b com o

inserto IMNV1: 13H, 11D, 33G e 54H, dos quais o primeiro é um anticorpo IgG e os outros três são anticorpos IgM. Porém, no presente trabalho, o anticorpo anti-IMNV1 46C, da classe IgG, apresentou reações inespecíficas contra o perfil protéico da bactéria *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-14b fechado.

Assim, somente os anticorpos 13H, 11D, 33G e 54H foram submetidos a testes de especificidade contra os lisados de tecidos musculares de camarões *L. vannamei* infectados e não infectados, através de Western Blot. A proteína estrutural correspondente ao capsídeo do IMNV possui 106 kDa (POULOS et al., 2006), razão para a qual era esperado que os anticorpos monoclonais reconhecessem uma banda protéica de aproximadamente 100 kDa no lisado do tecido muscular de camarões infectados. Nenhum dos anticorpos testados apresentou reatividade contra tecidos de camarões não-infectados, o que demonstra ausência de inespecificidade contra proteínas constitutivas de tecidos de camarões sadios. Porém somente dois anticorpos foram capazes de identificar uma banda na altura correspondente ao capsídeo viral do IMNV em tecidos infectados: 11D e 33G, ambos da classe IgM.

Considerando que os camarões obtidos no estado do Piauí não apresentavam sinais clínicos evidentes da infecção por IMNV, a imunodeteção do vírus nos lisados de tecido muscular através dos anticorpos 11D e 33G indica que os mesmos podem ser utilizados para diagnóstico e controle de epidemias em fazendas de cultivo, sendo eficazes mesmo em estágios mais precoces da enfermidade.

Os anticorpos monoclonais capazes de detectar o IMNV, por serem da classe IgM, podem ser testados para princípio de imunolocalização do vírus por microscopia, sem a necessidade de conjugação com partículas eletrodensas, já que sua conformação pentamérica confere dimensões suficientes para que possa ser visualizado isoladamente (KEENE et al., 1987). Além da possível utilidade de localização do vírus em tecidos infectados, ferramenta que seria de grande importância no estudo da biologia do vírus, os anticorpos monoclonais obtidos podem ainda ser utilizados na confecção de testes

imunocromatográficos, permitindo o controle de epidemias e diagnóstico rápido dos animais em fazendas de cultivo de camarões.

A conveniência e a velocidade do teste imunocromatográfico baseiam-se no transporte de um antígeno até anticorpos imobilizados na superfície de membranas de nitrocelulose, através de capilaridade. Teste imunocromatográficos não somente tornam o diagnóstico mais rápido, como também são específicos, podem ser realizados em campo e independem do transporte de outros reagentes e materiais, o que poderia ser inconveniente na ausência de pessoas treinadas ou em locais sem a infra-estrutura necessária para outros procedimentos normalmente efetuados em laboratório (PAEK et al., 2000). Testes imunocromatográficos desenvolvidos até o momento para diagnóstico de enfermidades de etiologia viral em camarões não apresentaram reatividade cruzada entre os vírus. Dessa forma, pode-se dizer que este é o método mais eficiente para monitoramento *in loco* de camarões infectados por agentes de etiologia viral (POWELL et al., 2006; WANG; ZHAN, 2006; SITHIGORNGUL et al., 2007). A confecção de um teste imunocromatográfico para diagnóstico de IMNV seria muito útil no diagnóstico precoce desta enfermidade em campo.

Os anticorpos monoclonais 11D e 33G produzidos neste trabalho, eficientes na detecção do vírus em tecidos de camarão infectados, podem ser utilizados de maneira bastante ampla no diagnóstico do vírus IMNV. Considerando ainda a baixa variabilidade do genoma e conseqüentemente a homogeneidade dos epítomos protéicos entre os isolados encontrados em todo o mundo, os anticorpos produzidos no presente trabalho poderiam ser importantes ferramentas no diagnóstico de isolados virais brasileiros, assim como também de isolados encontrados em outras regiões, incluindo países do hemisfério oriental. A padronização das técnicas de ELISA e de Western Blot podem ser consideradas ferramentas eficientes na detecção do agente etiológico da mionecrose infecciosa de camarões em laboratório. Adicionalmente, os anticorpos monoclonais 11D e 33G possuem ainda potencial para serem utilizados no desenvolvimento de testes imunocromatográficos sensíveis, específicos e eficientes para diagnóstico em condições de campo, estratégia essencial para a viabilidade do controle de epidemias em fazendas de cultivo de camarões.

## 6. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- Os iniciadores desenhados, IMNV1-F e IMNV1-R foram capazes de amplificar uma sequência nucleotídica de 600 pb, codificante para um fragmento da proteína estrutural do capsídeo do IMNV;
- A proteína recombinante IMNV1 foi expressa na bactéria *E. coli* BL21(DE3), sendo visualizada uma banda de forte intensidade na altura esperada de 25,7 kDa, presente na fração insolúvel na análise por SDS-PAGE;
- A clonagem e a expressão da proteína recombinante IMNV1 em *E. coli* BL21(DE3) foi bem sucedida, sendo visualizada uma banda de forte intensidade na altura esperada de 25,7 kDa, presente na fração insolúvel na análise por SDS-PAGE;
- A proteína recombinante foi purificada a partir dos corpos de inclusão, utilizando cromatografia de afinidade por íons metálicos, apresentando um rendimento de 1 mg/ml de cultivo celular;
- A confirmação da eficiência da expressão heteróloga da proteína recombinante IMNV1 foi realizada através de Western blot direcionado a amostras purificadas da proteína, utilizando anticorpos específicos anti-cauda de histidina;
- A imunização de camundongos utilizando como antígeno a proteína recombinante IMNV1 foi bem sucedida, tendo os soros policlonais dos mesmos apresentado alto título de anticorpos anti-IMNV1;
- Após a realização de duas diluições limitantes, obtiveram-se seis clones produtores de anticorpos monoclonais, denominados 13H, 11D, 33G, 39G, 46C e 54H;
- A isotipagem dos anticorpos monoclonais obtidos revelou que 13H e 46C são imunoglobulinas da classe IgG (cadeia pesada *gamma*) e subclasse  $\gamma$ 1, cadeia leve

do *kappa*, enquanto 11D, 33G, 39G e 54H são imunoglobulinas da classe IgM (cadeia pesada *gamma*), cadeia leve *kappa*.

- Testes de especificidade contra a proteína recombinante IMNV1 e lisados de cultivos de expressão de bactérias *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET-14b sem inserto ou pET-14b-IMNV1, realizados através de Western blot, demonstraram os anticorpos monoclonais 13H, 11D, 33G e 54H como eficientes e específicos contra a proteína recombinante de interesse;
- Os anticorpos 11D e 33G, ambos da classe IgM, foram capazes de detectar com especificidade uma banda protéica de aproximadamente 100 kDa, presente em tecidos musculares esqueléticos de camarões infectados, correspondente a proteína estrutural do capsídeo do IMNV.

## 7. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível produzir e purificar uma proteína recombinante de 25 kDa, correspondente a uma porção da proteína do capsídeo do IMNV, denominada IMNV1r. Foram gerados seis anticorpos monoclonais anti-IMNV1r, sendo quatro da classe IgM e dois da classe IgG1, todos eles contendo cadeia leve *kappa*. Os anticorpos monoclonais 11D e 33G foram eficazes na imunodeteção, em lisados de tecido muscular de camarões *L. vannamei* infectados com IMNV, de um proteína de aproximadamente 100 kDa correspondente à proteína do capsídeo do IMNV. Este resultado sugere que estes anticorpos podem ser utilizados no imunodiagnóstico de animais ainda em estágios precoces da mionecrose infecciosa de camarões, o que pode ser muito interessante no controle de epidemias nas fazendas de cultivo de camarões em todo o mundo.

## REFERÊNCIAS

ALTMAN, A.; DIXON, F.J. Immunomodifiers in vaccines. **Advances in Veterinary Science & Comparative Medicine**, v.33, p. 301-343, 1989.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDRADE, T.P.D.; SRISUVAN, T.; TANG, K.F.J.; LIGHTNER, D.V. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, v. 264, p. 9-15, 2007.

ANDRADE, T.P.D.; REDMAN, R.M.; LIGHTNER, D.V. Evaluation of the reservation of shrimp samples with Davidson's AFA fixative for infectious myonecrosis virus (IMNV) in situ hybridization. **Aquaculture**, v. 278, p. 179-183, 2008.

ANDRADE, T.P.; LIGHTNER, D.V. Development of a method for the detection of infectious myonecrosis virus by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification and nucleic acid lateral flow hybrid assay. **Journal of Fish Diseases**, 2009. (ainda não impresso: doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01072.x)

ANIL, T.M.; SHANKAR, K.M.; MOHAN, C.V. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 51, p. 67-75, 2002.

BACHÈRE, E. Shrimp immunity and diseases control. **Aquaculture**, v. 191, p. 3-11, 2000.

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

BURNETTI, W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112(2), p. 195-203, 1981.

CHAVISUTHANGKURA, P.; TANGKHABUANBUTRA, J.; LONGYANT, S.; SITHIGORNGUL, W.; RUKPRATANPORN, S.; MENASVETA, P.; SITHIGORNGUL, P. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. **Science Asia**, v. 30, p. 359-363, 2004.

COELHO, M.G.L.; SILVA, A.C.G.; VILA NOVA, C.M.V.; NETO, J.M.O.; LIMA, A.C.N.; FEIJÓ, R.G.; APOLINÁRIO, D.F.; MAGGIONI, R.; GESTEIRA, T.C.V. Susceptibility of the wild southern Brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHN) and infectious myonecrosis (IMN). **Aquaculture**, v. 294, p. 1-4, 2009.

ENGVALL, E.; PEARLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **The Journal of Immunology**, v. 109(1), p. 129-135, 1972.

ERICKSON, H.S.; ZARAIN-HERZBERG, M.; LIGHTNER, D.V. Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, p. 1-10, 2002.

ESHAGHI, M.; TAN, W. S.; CHIN, W. K.; YUSOFF, K. Purification of the extra-cellular domain of Nipah virus glycoprotein produced in *Escherichia coli* and possible application in diagnosis. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 221-226, 2005.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Based-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Aquaculture 2006**. 1. ed. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, 2006.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U. & BALL, L. A. Totiviridae. In **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, San Francisco: Elsevier, p. 571-580, 2005.

FLEGEL, T.W.; V. ALDAY-SANZ. The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 14, p.269-273, 1998.

FLEGEL, T.W. 2006. The special danger of viral pathogens in shrimp translocated for aquaculture. **ScienceAsia**, v. 32, p. 215-231, 2006.

GHABRIAL, S.A. Totiviruses. **Encyclopedia of Virology**, eds. Mahy, B.; van REGENMORTEL, M.H.V. 3. ed. London: Elsevier, p. 163-174, 2008.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. Imunoglobulinas: estrutura e função. In:\_\_\_\_\_. **Kuby Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, p. 83-113, 2002.

HOCKNEY, R. C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnology**, v. 12, p. 456-463, 1994.

HOLZINGER, A.; PHILLIPS, K. S.; WEAVER, T. E. Single-step purification/solubilization of recombinant proteins: application to surfactant protein B. **BioTechniques**, v. 20, p. 804–808, 1996.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p. 868-877, 1999.

JOHNSON, K.N.; VAN HULTEN, M.C.; BARNES, A.C. "Vaccination" of shrimp against viral pathogens: phenomenology and underlying mechanisms. **Vaccine**, v. 26, p. 4885-4892, 2008.

KAUTSKY, N.; RONNBACK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspectives of management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145-161, 2000.

KEARNEY, J.F.; TADBRUCH, A.; LIESEGANG, B.; RAJEWSKY, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. **Journal of Immunology**, v. 123, p. 1548-1551, 1979.

KEENE, D.R.; SAKAI, L.Y.; BURGESSON, R.E.; BÄCHINGER, H.P. Direct visualization of IgM antibodies bound to tissue antigens using a monoclonal anti-type III collagen IgM as a model system. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 35, p.311-318, 1987.

KIATPATHOMCHAI, W.; JAROENRAM, W.; ARUNRUT, N.; JITRAKDEE, S.; FLEGEL, T.W. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. **Journal of Virological Methods**, v. 153, p. 214-217, 2008.

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

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

LIGHTNER, D.V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 15, p. 579-601, 1996.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. Shrimp disease and current diagnosis methods. **Aquaculture**, v. 164, p. 201–220, 1998.

LIGHTNER, D.V. The Penaeid Shrimp Viral Pandemics due to IHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and Current Status. **World Aquaculture**, p. 1-20, 2004.

LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R.; TANG, K. F. J.; REDMAN, R.M.; PASOS-DE-ANDRADE, T.; BONAMI, J.R. Infectious Myonecrosis, New disease in pacific white shrimp. **Global Aquaculture**, v. 7, p. 85, 2004.

LIU, W.; WANG, Y.T.; TIAN, D.S.; YIN, Z.C.; KWANG, J. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 49, p. 11-8, 2002.

LUCAST, L. J.; BATEY, R. T.; DOUDNA, J. A. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease. **BioTechniques**, v. 30, p. 544-554, 2001.

MARCO, A.; VIGH, L.; DIAMANT, S.; GOLOUBINOFF, P. Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. **Cell Stress & Chaperones**, v. 10, p. 329-339, 2005.

NIBERT, M.L. '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. **Journal General Virology**, v. 88, p. 1315-1318, 2007.

NELSON, P. N.; REYNOLDS, G. M.; WALDRON, E. E.; WARD, E.; GIANNOPOULOS, K.; MURRAY, P. G. Desmystified... Monoclonal Antibodies. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, p. 111-117, 2000.

NOWINSKI, R. C.; TAM, M. R.; GOLDSTEIN, L. C.; STONG, L.; KUO, C. C.; COREY, L.; STAMM, W. E.; HANDSFIELD, H.H.; KNAP, J. S.; HOLMES, K. K. Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. **Science**, v. 219, p. 637-644, 1983.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aquicultura**, v. 14, p. 37-51, 2004.

OI, V. T.; HERZENBERG, L. A. Immunoglobulin-production hybrid cells lines. In: MISHELL, B. B.; SHIIGI, S. M. **Selection methods in cellular immunology**. New York: W. H. Freeman and Company, p. 351-373, 1980.

PAEK, S.H.; LEE, S.H.; CHO, J.H.; KIM, Y.S. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. **Methods**, v. 22, p. 53-60, 2000.

POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V.; TRUMPER, B.; BONAMI, J.R. Monoclonal Antibodies to a Penaeid Shrimp Parvovirus, Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV). **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 6, p. 149-154, 1994.

POULOS, B.T.; PANTOJA, C.R.; BRADLEY-DUNLOP, D.; AGUILAR, J.; LIGHTNER, D.V. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, p. 13-23, 2001.

POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D. V. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 987-996, 2006.

POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73(1), p. 69-72, 2006.

POWELL, J.W.B.; BURGE, E.J.; BROWDY, C.L.; SHEPARD, E.F. Efficiency and sensitivity determination of Shrimple®, an immunochromatographic assay for white spot syndrome virus (WSSV), using quantitative real-time PCR. **Aquaculture**, v. 257, p. 167–172, 2006.

PUTHAWIBOOL, T.; SENAPIN, S.; KIATPATHOMCHAI, W.; FLEGEL, T.W. Detection of shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. **Journal of Virological Methods**, v. 156, p. 27-31, 2009.

RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha – desempenho em 2004. **Revista da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão**, v. 2, p. 38-44, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SENAPIN, S.; PHEWSAIYA, K.; BRIGGS, M.; FLEGEL, T. W. 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, v. 266, p. 32-38, 2007.

SMITH, D.E.; O'BIEN, M.E.; PALMER, V.J.; SADOWSKI, J.A. The selection of an adjuvant emulsion for polyclonal antibody production using a low molecular-weight antigen in rabbits. **Laboratory Animal Science**, v. 42, p.599-601, 1992.

SITHIGORNGUL, P.; CHAUYCHUWONG, P.; SITHIGORNGUL, W.; LONGYANT, S.; CHAVISUTHANGKURA, P.; MENASVETA, P. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 42, p. 27–34, 2000.

SITHIGORNGUL, W.; RUKPRATANPORN, S.; SITTIDILOKRATNA, N.; PECHARABURANIN, N.; LONGYANT, S.; CHAIVISUTHANGKURA, P.; SITHIGORNGUL, P. A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection in shrimp. **Journal of Virological Methods**, v. 140, p. 193-199, 2007.

STILLS, J.F. Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **Institute For Laboratorial Research Journal**, v. 46, p. 280-293, 2005.

SUBASINGHE, R. P.; BARTLEY, D. M.; MCGLADDERY, S.; BARG, U. Sustainable shrimp development: biotechnological issues and challenges. In: FLEGEL, T. W. **Advanced shrimp technology**. Bangkok: BIOTEC, p. 13-18, 2008.

SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. **Trends Biotechnology**, v. 3, p. 1-7, 1985.

TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; REDMAN, R. M. & LIGHTNER, D. V. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 63, p. 261–265, 2005.

TANG, K.F.J.; OCHOA, W.F.; SINKOVITS, R.S.; POULOS, B.T.; GHABRIAL, S.A.; LIGHTNER, D.V.; BAKER, T.S.; NIBERT, M.L. Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 17526-17531, 2008.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 3, p. 1-12, 2004.

WANG, X.; ZHAN, W. Developmental of an immunochromatographic test to detect White Spot Syndrome Virus of shrimp. **Aquaculture**, v. 255, p. 196-200, 2006.

WANG, Y.; ZHANG, X.; YUAN, L.; XU, T.; RAO, Y.; LI, J.; DAI, H. Generation of recombinant monoclonal antibodies to study structure–function of envelope protein VP28 of white spot syndrome virus from shrimp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 902–906, 2008.

WARREN, H.S.; VOGEL, F.R.; CHEDID, L.A. Current status of immunological adjuvants. **Annual Review of Immunology**, v. 4, p. 369-388, 1986.