

VANESSA CRISTINA RATÃO BRÁS ROCHA

**O USO DE NANOANTICORPOS NO DESIGN DE
VACINAS**

Orientador: Prof.^a Doutora Rita da Costa Nogueira

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Departamento Ciências da Saúde

Lisboa

2012

VANESSA CRISTINA RATÃO BRÁS ROCHA

**O USO DE NANOANTICORPOS NO DESIGN DE
VACINAS**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas no Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador: Prof.^a Doutora Rita da Costa Nogueira

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Departamento Ciências da Saúde

Lisboa

2012

Ser empreendedor é executar os sonhos, mesmo que haja riscos. É enfrentar os problemas, mesmo não tendo forças. É caminhar por lugares desconhecidos, mesmo sem bússola. É tomar atitudes que ninguém tomou. É ter consciência de que quem vence sem obstáculos triunfa sem glória. É não esperar uma herança, mas construir uma história. Ser empreendedor não é esperar a felicidade acontecer, mas conquistá-la.

Augusto Cury

Resumo

Por volta da década de 90, foram descobertos na família Camelidae anticorpos desprovidos de cadeias leves e em que o seu domínio variável era constituído unicamente por cadeias pesadas (V_{HH}) e dois domínios constantes (C_{H2} e C_{H3}). Estes fragmentos passaram a ser conhecidos por Nanoanticorpos, não só pelo seu pequeno tamanho e flexibilidade, mas também por se tratar de uma nova geração de anticorpos terapêuticos, os quais apresentam várias vantagens face aos anticorpos convencionais, uma vez que não são imunogénicos e têm uma alta estabilidade térmica e química, entre tantas outras características inerentes. As suas aplicações são diversas: podem ser usados como tratamento e diagnóstico médico, na veiculação de fármacos e no desenvolvimento de vacinas.

Uma das tecnologias moleculares mais usadas na clonagem e expressão dos Nanoanticorpos é a tecnologia de «Phage Display» que pode ser categorizada em duas vertentes: o sistema vector de fago e o sistema vector de fagemídeo. Os vectores fágicos mais usados são os bacteriófagos filamentosos, como o M13, capazes de infetar bactérias gram negativas, como a *Escherichia coli*. Trata-se de uma ferramenta biotecnológica poderosa e promissora, destacando-se na área da medicina.

Palavras-chave: Família Camelidae, Fragmento V_{HH} , Nanoanticorpos, «Phage Display», Vacinas

Abstract

In the 90's it was discovered in family Camelidae, antibodies devoid of light chains and that their variable domain consisted only of heavy chains (V_{HH}) and two constant domains (C_{H2} and C_{H3}). These fragments are known as Nanoantibodies, not only by its small size and flexibility but also because it is a new generation of therapeutic antibodies, which provide several advantages compared with conventional antibodies, since they are not immunogenic and have high thermal and chemical stability, among other inherent characteristics. Its applications are diverse, can be used as medical diagnosis and treatment, drug delivery and developing vaccines.

One of the technologies commonly used in molecular cloning and expression of Nanoantibodies is the technology «Phage Display» and that can be categorized into two parts: the vector system of phage and the vector system phagemid. The phage vectors most frequently used are the filamentous bacteriophage, as M13, capable of infecting gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*. It is a powerful and promising biotechnological tool, especially in medicine.

Keywords: Family Camelidae, V_{HH} fragment, Nanoantibodies, «Phage Display», Vaccines

Lista de Acrónimos

Abreviatura	Definição
Ac(s)	Anticorpo(s)
Ag(s)	Antigénio(s)
cDNA	DNA complementar (do inglês: <i>complementary DNA</i>)
CDR	Regiões determinantes da complementariedade (do inglês: <i>complementarity-determining regions</i>)
CFA	(do inglês: <i>Freund's Complete Adjuvant</i>)
CH ₁ , CH ₂ , CH ₃	Domínios carboxi-terminais constantes da cadeia pesada (do inglês: <i>constant heavy</i>)
C _L	Domínio constante da cadeia leve (do inglês: <i>constant light</i>)
Da	Dalton, unidade padrão utilizada para a massa atômica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês: <i>acid deoxyribonucleic</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês: <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês: <i>epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	(do inglês: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
F _{ab}	(do inglês: <i>fragment, antibody binding</i>)
F _c	(do inglês: <i>fragment, constant</i>)
FR	(do inglês: <i>framework region</i>)
F _v	(do inglês: <i>fragment variable</i>)
g3p	Gene da proteína 3
g8p	Gene da proteína 8
GFP	(do inglês: <i>green fluorescent protein</i>)
H	Cadeia pesada
HCAb	Anticorpos de cadeia pesada (do inglês: <i>Heavy chain antibodies</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
IF	Imunofluorescência
IFA	(do inglês: <i>Freund's Incomplete Adjuvant</i>)
IgG	Imunoglobulina G
IP	Imunoprecipitação
L	Cadeia Leve

mRNA	RNA mensageiro (do inglês: <i>messenger RNA</i>)
pIII	Proteína de revestimento III
pIV	Proteína de revestimento IV
pVIII	Proteína de revestimento VIII
PCR	(do inglês: <i>polymerase chain reaction</i>)
QCM	(do inglês: <i>quartz cristal microbalance</i>)
RT	Transcriptase Reversa (do inglês: <i>reverse transcriptase</i>)
sdAb	(do inglês: <i>single domain antibody</i>)
SPR	(do inglês: <i>surface plasmon resonance</i>)
$t^{1/2}$	Tempo de semi-vida
TGF- β 1	(do inglês: <i>transforming growth factor receptor β1</i>)
TNF α	Fator de necrose tumoral α (do inglês: <i>tumor necrosis factor α</i>)
V _H	Domínio variável de cadeia pesada (do inglês: <i>variable domain of immunoglobulin heavy chain</i>)
V _{HH}	(do inglês: <i>variable domain of the heavy chain of HCAb</i>)
V _L	Domínio variável de cadeia leve (do inglês: <i>variable light</i>)
VLA-3	Integrina α 3 β 1
V _{NAR}	(do inglês: <i>variable domain of shark new antigen receptor</i>)
WB	Western Blot

Índice Geral

	Páginas
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE ACRÓNIMOS	6
ÍNDICE DE QUADROS	9
INTRODUÇÃO	11
CAPÍTULO 1- ANTICORPOS CONVENCIONAIS	13
1.1 Definição e Função de Anticorpos	13
1.2 Estrutura de Anticorpos	13
1.3 Classificação de Anticorpos	14
1.4 IgG Convencional	15
CAPÍTULO 2- ANTICORPOS DE CADEIA PESADA	18
2.1 Origem dos Anticorpos de Cadeia Pesada	18
2.2 Fragmento do Anticorpo de Cadeia Pesada da Família Camelidae: V_{HH}	19
2.3 Aplicações dos Fragmentos V_{HHS}	23
CAPÍTULO 3- PRINCÍPIOS «PHAGE DISPLAY»	26
3.1 Tecnologia «Phage Display»	26
3.2 Construção de Bibliotecas de Acs	27
3.4 Fagos Filamentosos	30
3.5 Aplicação da Tecnologia «Phage Display»	34
CAPÍTULO 4- PROCESSO DE OBTENÇÃO DE V_{HHS}	36
4.1 Processo de Imunização	36
4.2 Preparação dos Antígenos específicos	37
4.3 Clonagem do Repertório dos Fragmentos V_{HH}	37
4.4 Seleção de Ag específico do Fragmento V_{HH}	38
4.5 Afinidade dos Clones obtidos	39
CAPÍTULO 5- VANTAGENS/DESVANTAGENS DA TÉCNICA «PHAGE DISPLAY»	41
CONCLUSÃO	43
BIBLIOGRAFIA	45

Índice de Quadros

	Páginas
Tabela 1- Propriedades biológicas das suclasses de IgG humana.	17
Tabela 2- Exemplos de peptídeos e proteínas selecionados usando a tecnologia «Phage Display».....	35
Tabela 3- Vantagens e desvantagens de métodos para o estudo de anticorpos.....	42

Índice de Figuras

	Páginas
Figura 1- Estrutura de uma Imunoglobulina G.....	14
Figura 2- Representação de diferentes classes de Imunoglobulinas, IgG (a), IgD (b), IgE (c), IgA (d) e IgM (e).....	15
Figura 3- Estrutura geral de 4 subclasses de IgG humana que diferem no número e no arranjo das pontes dissulfídicas entre cadeias	16
Figura 4- Representação esquemática da IgG convencional , de um anticorpo de cadeia pesada da família Camelidae (HCAb) e domínio variável de HCAb (V_{HH})	19
Figura 5- Esquema ilustrativo das diferenças entre V_H e V_{HH} , baseado na comparação das seqüências de aminoácidos.....	21
Figura 6- Exibição de um fragmento de anticorpo convencional a um bacteriófago com uma proteína de revestimento menor (pIII) associada	27
Figura 7- Representação esquemática da fusão de um anticorpo com um fago (anticorpo-fago)	28
Figura 8- Esquema representativo da construção de bibliotecas fago de fragmentos de V_{HH}	28
Figura 9- Esquema representativo de fagos filamentosos em «phage display»	32
Figura 10- Representação esquemática do ciclo de infecção do fago M13, mostrando os diferentes tipos de replicação de DNA que ocorrem.	33
Figura 11-Ciclo de «phage display».....	40

Introdução

Esta monografia foi desenvolvida de forma a compreender as vantagens e desvantagens da utilização de Nanoanticorpos face aos anticorpos convencionais e qual a melhor metodologia para a produção de vacinas, ilustrando cada passo desta tecnologia com exemplos onde pode ser aplicada e quais as vantagens face a outras tecnologias. Pretende-se conciliar o conteúdo de ambos os estudos com os benefícios para a saúde pública com uma possível vacina com nanoanticorpos através da tecnologia «phage display».

Durante vários anos, a população mundial foi vítima de diversas doenças mortíferas. No século XVIII, a varíola foi uma doença que causou milhares de mortes: várias foram, então, as pesquisas em torno desta doença infecciosa. Ainda neste século, um médico inglês, Edward Jenner, após várias observações, concluiu que indivíduos que conviviam com vacas infetadas com varíola, não eram contagiados. Após anos de estudo, Edward Jenner desenvolveu um tratamento que combatia a varíola, a que deu o nome de «vacina». A descoberta de agentes infecciosos, no século XIX, catapultou a produção de novas vacinas como a vacina da tuberculose, do tétano, da cólera, entre outras.

A vacinação é considerada uma das mais benéficas intervenções biofarmacêuticas devido à sua habilidade em induzir proteção contra doenças infecciosas, através da ativação do sistema imune humano. Apesar de a vacinação ser uma mais-valia no combate a doenças infecciosas, ainda assim milhões de pessoas continuam a morrer a cada ano que passa, pois nem todos têm acesso à vacinação, o que acontece normalmente em países subdesenvolvidos por questões económicas, falta de infraestruturas médicas e de formação dos mesmos. Ao contrário destes países, os mais desenvolvidos têm vindo a criar vacinas que oferecem maior segurança e eficácia (Bae, Choi, Jang, Ahn, & Hur, 2009).

As vacinas têm como objetivo principal a imunização prévia do indivíduo, de maneira que possa responder rapidamente quando em contato com o agente infeccioso (Júnior, et al., 2004). O desenvolvimento de vacinas demora anos e requer muito investimento; logo, há prioridades aquando do seu desenvolvimento, dando primazia a vacinas que possam combater doenças que causam milhares de mortes, até às que evitam sofrimento, como é o caso das gastroenterites provocadas por rotavírus.

As vacinas de primeira geração podem ser produzidas com o vírus atenuado ou com o vírus morto, contudo a eficácia destas vacinas ainda é muito questionada. No caso de vacinas de vírus atenuados, o agente patogénico é atenuado através de agentes químicos ou por ação de calor, continuando o vírus com capacidade de reprodução, sendo os vírus isolados de uma pessoa infetada (Kennedy, Ovsyannikova, & Poland, 2009). Estes vírus

atenuados vão estimular o sistema imune a produzir anticorpos, de forma a combater o vírus de uma dada patologia. Estas vacinas têm a desvantagem de induzir sintomas da doença que se pretende evitar (Kennedy, Ovsyannikova, & Poland, 2009).

Vacinas com vírus inativados, provêm de partículas virais mortas (antígenos), sendo que a imunidade é de curta duração, uma vez que os antígenos tendem a degradar-se (Júnior, et al., 2004). A grande vantagem das vacinas inativadas é a incapacidade de se multiplicar no organismo vacina, sendo a sua maior desvantagem a necessidade da associação de adjuvantes e da administração de várias doses de reforço (Kennedy, Ovsyannikova, & Poland, 2009).

Nas últimas décadas, os avanços tecnológicos têm permitido o desenvolvimento de novas estratégias para a obtenção de antígenos e a aquisição de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Existem as vacinas de segunda geração, ou seja, vacinas de subunidades constituídas por antígenos purificados ou vacinas recombinantes e, mais recentemente, as vacinas de terceira geração, vacinas genéticas, em que os genes que codificam antígenos potencialmente imunizantes, são carregados por plasmídeos de DNA (Júnior, et al., 2004). Vacinas para doenças como o HIV e Hepatite C ainda não estão disponíveis, apesar de vários progressos conseguidos nos últimos tempos.

O sistema imune dos vertebrados tem a capacidade surpreendente de gerar moléculas específicas contra substâncias estranhas ao organismo, designadas de anticorpos. Nas últimas décadas, os anticorpos têm sido usados como meio de diagnóstico ou como agentes terapêuticos, sendo o tamanho e a estabilidade fatores críticos na sua eficiência. Os Nanoanticorpos têm sido apresentados como uma possível terapêutica na neutralização de vírus, dado possuírem características únicas, quando comparados aos anticorpos convencionais, tais como o seu tamanho reduzido, boa capacidade de penetração tecidual, maior estabilidade face a alterações de temperatura e pH, capacidade de reconhecimento de epítomos escondidos que são inacessíveis aos anticorpos convencionais, diminuindo a fuga da neutralização de certos vírus, entre outras.

O processo de produção de vacinas pode ser variado mas nas últimas décadas a tecnologia de «Phage Display» tem vindo a adquirir um maior relevo. Esta técnica foi descoberta em 1985 e até á década de 90 tornou-se numa das ferramentas de investigação mais usadas em diversas áreas científicas (Wang & Fu, 2004). Trata-se de uma técnica molecular que é bastante útil na seleção de péptidos e proteínas com propriedades ligantes específicas de um número vasto de agentes variantes e em que a sua utilidade reside essencialmente em gerar probabilidades contra alvos específicos e na análise e manipulação de proteínas ligantes (Lee, Iorno, Sierro, & Christ, 2007; Bazan, Calkosinski, & Gamian, 2012).

Capítulo 1- Anticorpos Convencionais

1.1 Definição e Função de Anticorpos

Os anticorpos (Acs) são componentes essenciais do sistema imunitário que protege o ser humano de doenças. São moléculas glicoproteicas, originárias das células B que circulam através do sangue e da linfa. São responsáveis pela capacidade de detetar, localizar, reconhecer, ligar-se e inativar ou dar início á eliminação de substâncias estranhas ao organismo (Woof & Burton, 2004).

São proteínas da família das imunoglobulinas que contém dois domínios idênticos constituídos por uma cadeia leve e uma cadeia pesada, denominada paratopo. A essa região liga-se o epitopo que não é mais que uma região diferenciada dos antigénios (Ags) (Actor, 2007).

A imunidade humoral é o braço do sistema imune adquirido que é mediado pelo reconhecimento por Ac's de Ag's associados a substâncias patogénicas ou estranhas. O reconhecimento do Ag está ligado á capacidade de iniciar respostas biológicas que protegem contra microorganismos e neutralizam vírus. O reconhecimento pelos linfócitos B ocorre pelos recetores ligados à membrana e inicia a proliferação e diferenciação em plasmócitos produtores de Ac's (Gene, 2012).

Os Ac's são assim utilizados para controlar o equilíbrio imunológico do organismo, sendo esta a função principal do sistema imune humoral.

1.2 Estrutura de Anticorpos

O anticorpo é uma estrutura polipeptídica tetramérica com atividades biológicas distintas atribuídas a cada extremidade da molécula.

É constituído por duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas (H) e duas cadeias polipeptídicas leves idênticas (L). A cadeia pesada contém um domínio em dobradiça denominada de «região da charneira» que confere flexibilidade de forma a proporcionar uma ligação mais favorável ao antigénio (Actor, 2007).

Ambas as cadeias possuem domínios variáveis e constantes que interagem através de pontes dissulfídicas intra e intercadeias e ligações não covalentes. Os domínios variáveis da cadeia leve (V_L) e da cadeia pesada (V_H) são extremamente variáveis em sequências de aminoácidos e estão localizados na parte N-terminal da molécula do anticorpo. V_L e V_H juntos formam o local de ligação ao antigénio. Cada domínio apresenta quatro regiões sem variabilidade, as «Frameworks» (FR) e três regiões determinantes da complementaridade (CDR) diferentes, que variam nas suas sequências e assim determinam a especificidade do

cadeia pesada e cada tipo e subtipo da cadeia leve numa determinada espécie (Figura 2) (Goldsby, Kindt, & Osborne, 2002).

Cada isótopo é codificado por um gene separado da região constante e todos os membros da espécie transportam os mesmos genes da região constante. Espécies diferentes herdam diferentes genes da região constante e portanto, expressam diferentes isótopos (Goldsby, Kindt, & Osborne, 2002).

Cada classe é diferenciada por sequências únicas de aminoácidos na região constante da cadeia pesada, sendo que todas as cinco classes apresentam uma percentagem de semelhança entre as sequências de aminoácidos (Actor, 2007).

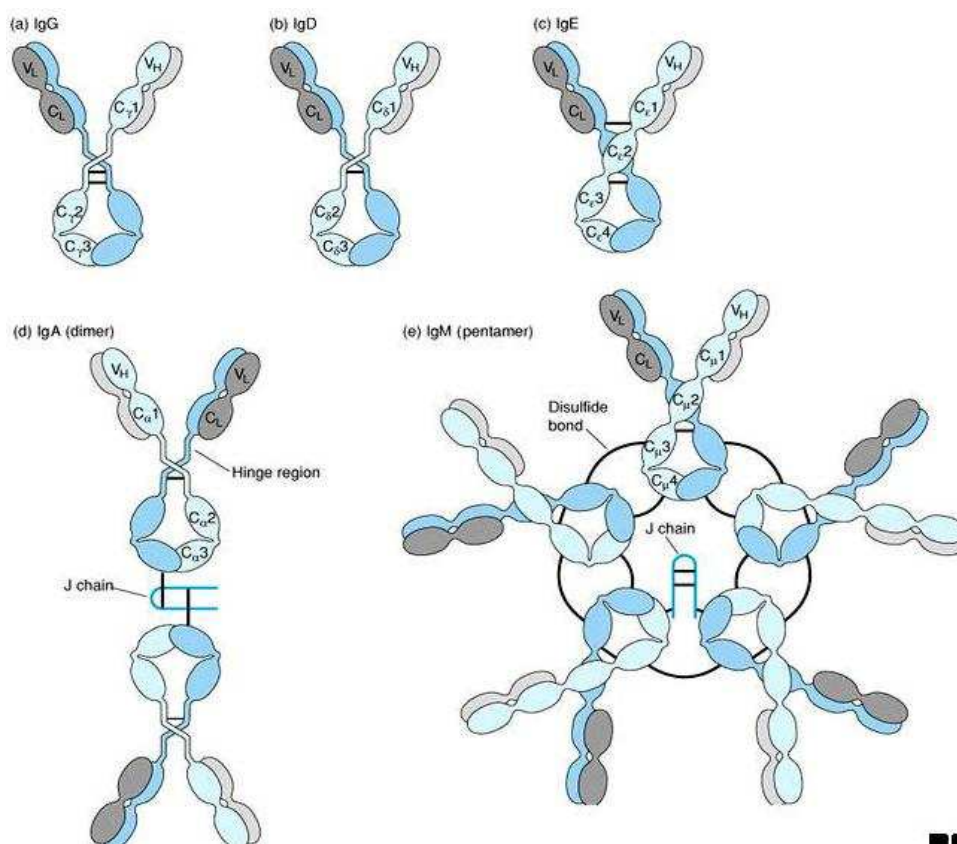


Figura 2- Representação de diferentes classes de Imunoglobulinas, IgG (a), IgD (b), IgE (c), IgA (d) e IgM (e). (Kuby, 2007)

1.4 IgG Convencional

Imunoglobulina G é a classe de Ac's mais abundante e é responsável por cerca de 80% do total de anticorpos do sangue. Encontram-se no sangue e podem neutralizar toxinas, vírus e bactérias, assim como ativar o sistema do complemento. A estrutura e composição das IgG's são altamente conservadas entre os vertebrados, enquanto a sua especificidade pode diferir extensivamente (Goldsby, Kindt, & Osborne, 2002).

Esta molécula é composta por duas cadeias pesadas idênticas (~55 kDa) e duas cadeias leves idênticas (~22 kDa) formando uma molécula tetramérica de cerca de 150 kDa. As cadeias pesadas são constituídas por três domínios constantes e um domínio variável que está localizado no terminal amino do polipéptido. Existem seis regiões determinantes de complementaridade, três fornecidos por cada um dos domínios V_H e V_L e que contribuem para o local de ligação ao Ag (Goldsby, Kindt, & Osborne, 2002).

Existem 4 subclasses de IgG humanas, distintas pelas suas diferenças na sequência da cadeia Y e numeradas de acordo com as suas concentrações séricas médias decrescentes: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Erro! A origem da referência não foi encontrada.). As características estruturais que diferenciam estas subclasses umas das outras são os tamanhos da região flexível e o número e posição das pontes dissulfídicas entre as cadeias pesadas. A diferença do número de aminoácidos entre as subclasses de IgG afetam a atividade biológica da molécula e todas atravessam a placenta (Goldsby, Kindt, & Osborne, 2002).

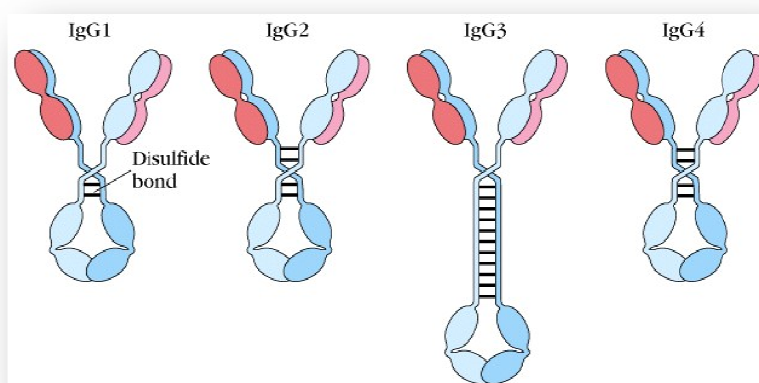


Figura 3- Estrutura geral de 4 subclasses de IgG humana que diferem no número e no arranjo das pontes dissulfídicas entre cadeias (Goldsby, Kindt, & Osborne, 2002).

A IgG1, IgG2, IgG3 e a IgG4 correspondente, respectivamente, a 70, 20, 7 e 3% do teor total do isótipo IgG como demonstrado na Tabela 1.

As IgG1, IgG3 e IgG4 atravessam a placenta facilmente e desempenham um papel importante na proteção do desenvolvimento do feto. A IgG3 é a mais eficaz ativadora do complemento, seguida pela IgG1, sendo que a IgG4 não é capaz de ativar o complemento. A IgG1 e a IgG3 medeiam a opsonização (Goldsby, Kindt, & Osborne, 2002).

Tabela 1- Propriedades biológicas das subclasses de IgG humana, adaptado de (Actor, 2007).

<i>Propriedades Biológicas Específicas das Subclasses de IgG Humanas</i>				
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Ocorrência (% da IgG total)	70	20	7	3
Tempo de semi-vida (dias)	23	23	7	23
Ligação ao complemento	+	+	Forte	Não
Passagem pela placenta	++	±	++	++
Ligação do receptor a monócitos	Forte	+	Forte	±

Capítulo 2- Anticorpos de Cadeia Pesada

2.1 Origem dos Anticorpos de Cadeia Pesada

Uma série de coincidências nos anos 90, levou à descoberta de um grupo distinto de Acs compostos unicamente por duas cadeias pesadas idênticas (tendo, portanto, uma menor massa molecular), na família Camelidae (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactriamus*, *Llama glama*, *Llama guamoco*, *Llama alpaca* e *Llama vicugna*) e em alguns peixes cartilagosos (Muyldermans, et al., 2009) Dado estes Acs estarem desprovidos de cadeias leves, passaram a ser conhecidos por anticorpos de cadeia pesada (HCAs)¹ e representam cerca de 75% dos Ac's (Gene, 2012; Eyer & Hruska, 2012).

A presença estrutural unicamente de cadeias pesadas, leva a que o local de ligação aos Ag's específicos seja composto apenas por um domínio variável de cadeia pesada designando-se por V_{HH} na família Camelidae e por V_{NAR} nos peixes cartilagosos (Eyer & Hruska, 2012; Gene, 2012).

Uma das principais características estruturais destes Ac's é a ausência do domínio C_{H1} que proporciona ao fragmento V_{HH} , posteriormente à «região da charneira», estabelecer ligação aos domínios C_{H2} e C_{H3} , no caso da família Camelidae, resultando em características/funções específicas só destes Ac's (Deffar, Shi, Li, Wang, & Zhu, 2009; Tillib, 2011; Gene, 2012). Os genes do C_{H1} são responsáveis pela perda deste primeiro domínio constante nos HCAs, dada a presença de mutação (Muyldermans, 2011).

A nível estrutural, os HCAs, nos tubarões, são diferentes dos HCAs dos Camelidae's, uma vez que após o fragmento do domínio variável do recetor do antigénio (V_{NAR}) e á «região da charneira» seguem-se cinco domínios constantes (C_{1NAR} , C_{2NAR} , C_{3NAR} , C_{4NAR} e C_{5NAR}) (Gene, 2012). Estes Ac's captam os Ag's através deste domínio variável único, apresentam um tamanho molecular de aproximadamente 16 kDa, o domínio CDR3 é alongado, a ocorrência de mutações somáticas está aumentada e têm um par adicional de cisteínas que estabilizam toda a estrutura deste tipo de Acs (Gene, 2012; Rahbarizadeh, Ahmadvand, & Sharifzadeh, 2011; Smolarek, Bertrand, & Czerwinski, 2012).

Os HCAs são formados, nos linfócitos B, por um reportório específico de genes de anticorpos, distintos dos responsáveis pela formação dos Ac's convencionais.

¹ Também designados por *Nanocorpos*, *Nanoanticorpos* ou *Anticorpos de Domínio Único*. (Tillib, Ivanova, & Vasilev, 2010)

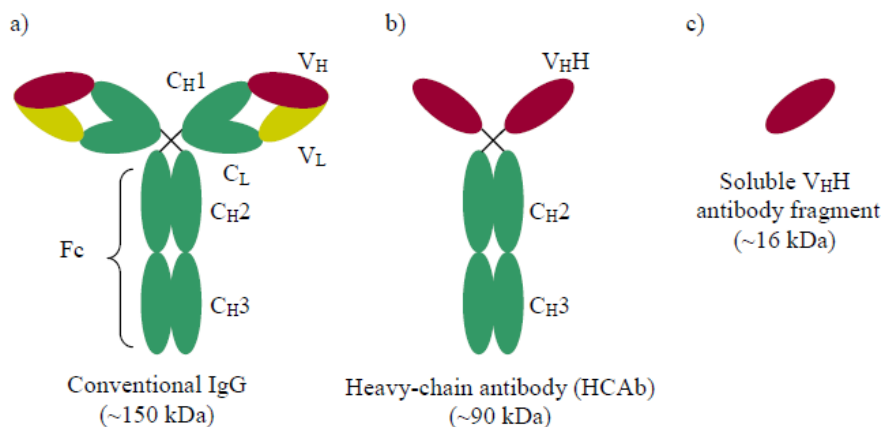


Figura 4- Representação esquemática da IgG convencional (a), de um anticorpo de cadeia pesada da família Camelidae (HCAb) (b) e domínio variável de HCAb (V_{HH}) (c). (Richard, 2009)

2.2 Fragmento do Anticorpo de Cadeia Pesada da Família Camelidae: V_{HH}

2.2.1 Características Estruturais e Funcionais

Os V_{HHs} representam um dos fragmentos de ligação aos Ag's dos mais pequenos conhecidos atualmente (~16kDa) (

Figura 4). Têm recebido considerável atenção pelas suas características, tais como, estabilidade conformacional, alta solubilidade, produção económica e tamanho reduzido. São estas qualidades que tornam os V_{HHs} adequados para os sistemas «display», evitando os sistemas que consomem mais tempo e custos (Gene, 2012).

Assim como os V_{Hs} dos Acs convencionais, as sequências de aminoácidos (AA) dos V_{HHs} são organizadas em três regiões hipervariáveis (CDR₁, CDR₂ e CDR₃), separados por quatro regiões «Framework» (FR₁, FR₂, FR₃ e FR₄) (Muyldermans, 2011). Como as sequências de AA dos FRs presentes nos V_{HHs} são altamente semelhantes aos dos V_{Hs}, a arquitetura geral de ambos os fragmentos são semelhantes. Ambos os fragmentos se dobram em duas folhas β com os três CDRs que ligam estas duas folhas numa extremidade, ou seja, num domínio (De Genst, et al., 2006; Desmyter, et al., 1997).

Apesar de os Ac's convencionais, como os HCAbs, possuírem os mesmos FR e CDR, estes últimos exibem algumas diferenças. Os CDR₁ e os CDR₃ são normalmente mais longos, o N-terminal do CDR₁ é mais variável e o extenso «loop» do CDR₃ é uma média de cinco aminoácidos mais longo do que o CDR₃ encontrado no fragmento V_H. Estruturalmente os «loops» dos CDRs assumem conformações não presentes nos Ac's convencionais, o que juntamente com a extensão do CDR₁ e CDR₃, pode compensar a falta dos três CDRs presentes no fragmento V_L, proporcionando um aumento da superfície do paratopo do V_{HH}, o que torna o paratopo mais convexo em oposição à forma plana e côncava dos paratopos

convencionais e origina, assim, uma maior eficiência na ligação ao Ag (Gene, 2012; Muyldermans, 2011).

Nos fragmentos V_{HHs} , o domínio V_L está ausente; logo, como consequência desta ausência, os AA hidrofóbicos presentes na superfície do domínio V_H , que normalmente interage com o domínio V_L , são substituídos por AA hidrofílicos, o que altera a solubilidade dos V_{HHs} face aos V_{Hs} . (Muyldermans, 2011; Gene, 2012).

Para compensar a perda da estabilidade pela falta do fragmento V_L , várias são as características que têm sido documentadas: um CDR₃ longo, maior número de resíduos, etc. Um CDR₃ mais longo não só leva a um aumento no repertório das ligações ao Ag (maior número de resíduos envolvidos nas ligações), como também oferece ao V_{HH} uma maior complexidade estrutural (Dolk, 2004). Como já foi referido, a região dos CDR₃ presentes nos HCAbs são normalmente mais longos (13-17 aminoácidos) que a região dos CDR₃ presentes nos fragmentos V_{Hs} dos ratos e dos humanos (9-12 e 9-17 aminoácidos respectivamente) (Wu, Johnson, & Kabat, 1993).

Os fragmentos V_{HHs} são transcritos de um conjunto de genes separados, proporcionando características únicas quando comparados com os fragmentos V_{Hs} dos Acs convencionais. Os domínios variáveis dos HCAbs contêm várias substituições de aminoácidos em comparação com as cadeias pesadas dos Acs convencionais e a maioria destas mudanças de aminoácidos encontra-se na região que está envolvida em interações hidrofóbicas com a cadeia leve: Val37, Gly44, Leu45 e Trp47, sendo estes resíduos substituídos nos V_{HHs} por **Phe37²/Tyr37**, **Glu44/Gln44**, **Arg45** e **Phe47/Leu47/Gly47**, nas posições 37, 44, 45 e 47 respectivamente (Figura 5) (Smolarek, Bertrand, & Czerwinski, 2012). Dado que as cadeias leves não estão presentes nos HCAbs, estas mutações proporcionam uma maior solubilidade e estabilidade aos fragmentos V_{HHs} (Smolarek, Bertrand, & Czerwinski, 2012).

A substituição do resíduo Leu11Ser no fragmento V_{HH} , é vista como uma adaptação à ausência do domínio CH_1 (Muyldermans & Lauwereys, 1999). Ambos os fragmentos provenientes dos diferentes Acs aqui referidos, exibem resíduos na interface hidrofóbica, mas os substituintes dos resíduos dos V_{Hs} , tornam a interface hidrofóbica mais hidrofílica, ou seja, proporcionam uma maior solubilidade aos fragmentos V_{HHs} , de forma a compensar a perda da estabilidade induzida pela falta do fragmento V_L (Dolk, 2004; Gene, 2012).

O adicionar estas características a uma grande diversidade de genes, leva a que os Nanoanticorpos tenham uma grande capacidade de ligação ao Ag.

² Vários são os artigos consultados que consideram os aminoácidos que estão a negrito como substituintes mais comuns dos presentes em Acs convencionais, sendo também possível a substituição pelos outros aminoácidos descritos no trabalho em sucessão a esta pequena nota.

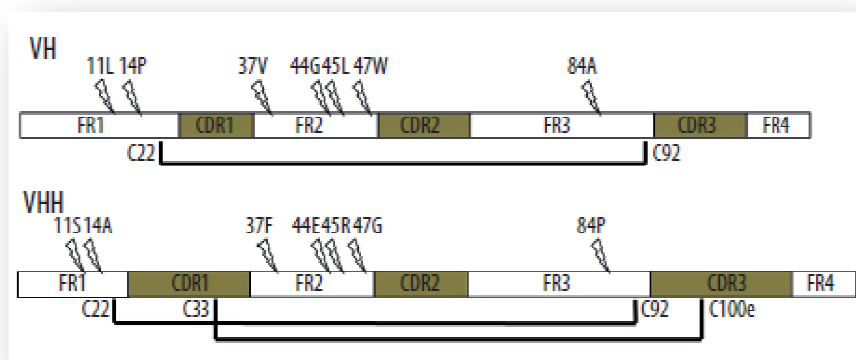


Figura 5- Esquema ilustrativo das diferenças entre V_H e V_{HH} , baseado na comparação das sequências de aminoácidos entre as regiões de codificação de cDNA. As substituições de aminoácidos críticas nos fragmentos V_{HHs} estão marcadas por pequenos símbolos de relâmpago e as linhas pretas a negrito que ligam o FR₁ ao FR₃ e o CDR₁ ao CDR₃, representa as pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura da cadeia pesada. (Smolarek, Bertrand, & Czerwinski, 2012)

2.2.2 Vantagens dos V_{HHs} em Relação aos Convencionais V_{Hs}

Os fragmentos V_{HHs} são únicos, pois não só apresentam as mesmas características que os convencionais V_{Hs} como também têm outras vantagens que permitem ultrapassar o desempenho dos fragmentos V_{Hs} em várias áreas, podendo ser de grande utilidade como tratamento, diagnóstico clínico ou na área das biotecnologias (Deffar, Shi, Li, Wang, & Zhu, 2009). As vantagens incluem o seu tamanho reduzido, características estruturais novas, possibilidade de serem produzidos em grandes quantidades de forma eficiente e económica, boa solubilidade, resistência a alterações significativas de temperatura e pH, simplicidade quando manipulados geneticamente (gene único) e baixa toxicidade inerente (Tillib, Ivanova, & Vasilev, 2010).

2.2.2.1 Penetração Tecidual

Devido à reduzida massa molecular (~16 kDa) dos Nanoanticorpos comparativamente com os 30 kDa dos Acs convencionais, esta característica permite aos fragmentos V_{HHs} , uma melhor farmacocinética e penetração ao nível dos tecidos, reconhecimento de epítomos pouco comuns ou escondidos e uma baixa resposta imunológica (Rahbarizadeh, Ahmadvand, & Sharifzadeh, 2011; Wesolowski, et al., 2009).

2.2.2.2 Solubilidade Aumentada

Uma das características mais importantes, que diferenciam os fragmentos V_{HHs} dos fragmentos V_{Hs} dos Acs convencionais, é a sua solubilidade aumentada. São altamente solúveis em soluções aquosas e não têm tendência para agregar, provavelmente devido às

substituições de resíduos hidrofílicos por hidrofóbicos na região FR₂ comparativamente com os Ac's convencionais que interagem através das áreas hidrofóbicas com o C_{H1} e o domínio V_L. Em adição à sua alta solubilidade, estes oferecem um aumento da estabilidade química e proteolítica (Gene, 2012; Deffar, Shi, Li, Wang, & Zhu, 2009).

2.2.2.3 Reconhecimento de Epítomos Escondidos/ Inibição Enzimática

Uma vez que os HCAs são codificados por um gene único, os Nanoanticorpos são não só multivalentes como facilmente clonáveis, ou seja, podem adquirir múltiplos formatos, o que proporciona uma alta flexibilidade, permitindo reconhecer epítomos pouco comuns e ligar-se a cavidades de enzimas ativas, originando inibição da atividade enzimática e oferecendo potencial para desenvolver novas terapêuticas (Vaeck, Mark, 2006; Rahbarizadeh, Ahmadvand, & Sharifzadeh, 2011; Muyldermans, 2011).

2.2.2.4 Elevada Estabilidade Intrínseca

Os HCAs são altamente estáveis na presença de proteases, em pH extremos; conseguem ligar-se ao alvo a altas concentrações de agentes caotrópicos³ e apresentam resistência a altas temperaturas (termoestáveis). Estudos têm demonstrado que os HCAs, após incubações prolongadas a temperaturas de 90°C, readquirem propriedades de ligação a Ag's (Deffar, Shi, Li, Wang, & Zhu, 2009; Rahbarizadeh, Ahmadvand, & Sharifzadeh, 2011). Os Ac's convencionais perderiam funções, o que explica a elevada estabilidade intrínseca dos V_{HHs}.

Esta alta estabilidade e solubilidade, assim como o seu tamanho reduzido, permitem que possam ser desenvolvidas novas formulações, por exemplo, novas injeções e administrações orais.

2.2.2.5 Clearance Sanguínea Rápida

O tempo de semi-vida ($t^{1/2}$) curto, é adequado para certas aplicações em que é essencial uma clearance sanguínea rápida por filtração renal (Eyer & Hruska, 2012). Foi constatado que os Nanoanticorpos apresentavam similaridades nas ligações aos Ag's ou ainda melhores que as imunoglobulinas G (IgG) (Farzaneh, et al., 2010).

2.2.2.6 Imunogenicidade Baixa

Estudos referem que os fragmentos V_{HHs} apresentam uma imunogenicidade baixa para os seres humanos devido ao seu pequeno tamanho e também à homologia existente com o

³ Agente caotrópico é uma substância que rompe estruturas, desnatura macromoléculas, tais como proteínas e ácidos nucleicos e aumentam a entropia do sistema. (Chaotropic agent)

gene humano da família V_H3 . Assim, a administração de fragmentos V_{HHs} em hospedeiros humanos é provavelmente segura e sem reações adversas graves (Vu, Ghahroudi, Wyns, & Muyldermans, 1997).

2.2.2.7 Humanização

Tem sido demonstrado que os Nanoanticorpos podem ser humanizados sem perda significativa da sua atividade específica, por intermédio de algumas substituições de aminoácidos, nas regiões FR. Estes Nanoanticorpos humanizados retêm as suas características no que toca à solubilidade, estabilidade e à alta afinidade com o Ag. Esta particularidade leva a grandes expectativas no que diz respeito à utilização destes Acs na imunização passiva, de forma a prevenir várias infeções (Vaeck, Mark, 2006; Tillib, Ivanova, & Vasilev, 2010).

De um modo geral, a facilidade de clonagem, a produção económica e a alta estabilidade, tornam os fragmentos V_{HHs} muito úteis para uma vasta gama de aplicações.

2.3 Aplicações dos Fragmentos V_{HHs}

As características particulares dos Nanoanticorpos fazem deles uma interessante ferramenta de pesquisa, quer como meio de tratamento, quer como meio de diagnóstico.

Os Nanoanticorpos da família Camelidae e dos peixes cartilaginosos são uma nova geração de agentes potencialmente terapêuticos para o tratamento de doenças humanas graves. Atualmente, alguns fármacos baseados nestes Ac's estão a ser testados em animais ou *in vitro*, em etapas pré-clínicas e outros fármacos já avançaram para a fase I ou II de ensaios clínicos (Eyer & Hruska, 2012; Muyldermans, 2011).

2.3.1 Nanoanticorpos como Terapêutica

2.3.1.1 Terapêutica Cancerígena

Os fragmentos V_{HHs} revelaram, em alguns estudos, potenciais valores terapêuticos no tratamento do cancro. O mecanismo de atuação destes fragmentos baseia-se essencialmente no reconhecimento de Ag's expressos em células cancerígenas presentes em alguns tipos de cancro.

A angiogénese desempenha um papel importante no desenvolvimento tumoral. A endogлина, um Ac monoclonal CD105, que é expressa nas células endoteliais na

angiogénese tumoral e nos processos inflamatórios, identifica o recetor do fator transformador de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) desregulando-o (Soares, Bettencourt, Preto, Soares, & Lopes, 2010). Os fragmentos V_{HHs} vão atuar ligando-se à endogлина, inibindo o processo de angiogénese e assim diminuindo o crescimento e metastização tumoral. Desta forma, uma terapêutica anti-angiogénica tem o intuito de normalizar o microambiente tumoral (Ahmadvand, Rasaee, Rahbarizadeh, Kontermann, & Sheikholislami, 2009).

Foi demonstrado ainda na mesma área de estudo que os V_{HHs} podem bloquear a adesão celular mediada pela modulação das funções da integrina $\alpha 3\beta 1$ (VLA3), através do reconhecimento desta proteína e assim diminuindo as metástases tumorais (Groot, et al., 2009).

2.3.1.2 Doenças Autoimunes

As doenças autoimunes advêm de uma falha no sistema imunológico, resultando em respostas imunes contra células e tecidos do próprio organismo (por exemplo: artrite reumatoide, psoríase, esclerose múltipla, doença de Addison, entre tantas outras).

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina que desempenha um relevante papel nos processos inflamatórios crónicos. A principal função do TNF α é a promoção da resposta imune através de neutrófilos e monócitos. As terapêuticas com anti-TNF são muito caras e muitas destas requerem injeções regulares, apesar de estes tratamentos terem proporcionado uma melhor qualidade de vida aos doentes.

Investigações científicas mostraram que animais que apresentem HCAs, ao serem imunizados com TNF α humano, exibiam proteínas anti-TNF α - V_{HH} que iam atuar com antagonistas da ação do TNF α humano. Face aos Acs anti-TNF convencionais, usados na terapêutica da artrite reumatoide, os anti-TNF α - V_{HH} são agentes mais potentes e podem ser produzidos e purificados de forma rentável (Coppieters, et al., 2006).

2.3.1.3 Toxinas

Outra das aplicações dos fragmentos V_{HHs} é a neutralização de toxinas, como a toxina presente no escorpião *Androctonus australis*, e a inibição da atividade enzimática da neurotoxina botulínica que pode ser usada em casos de envenenamento por toxina botulínica (Smolarek, Bertrand, & Czerwinski, 2012).

2.3.1.4 Doenças Infeciosas

Os Nanoanticorpos têm demonstrado poder inibitório, tanto em infeções bacterianas como em infeções virais; no entanto exibem atividade limitante face ao HIV. No caso do HIV, os fragmentos V_{HHs} têm propriedades superiores em comparação com os Acs

convencionais. Estes vão interferir com a ligação do CD4 para o HIV-1, ou seja, reconhecem proteínas da cápside do vírus do HIV-1, envolvidas nas infecções provenientes desta patologia, neutralizando-as. As características únicas destes fragmentos, no futuro, podem vir a desenvolver vacinas para esta doença tão infecciosa e que mata milhares de pessoas em todo o mundo (Koh, et al., 2010).

No caso da Hepatite B e do Rotavírus, os V_{HHS} ligam-se às proteínas da cápside do vírus da Hepatite B *in vitro* e *in vivo* neutralizando-as e reconhecem rotavírus, reduzindo a replicação viral (Smolarek, Bertrand, & Czerwinski, 2012; Serruys, Van Houtte, Farhoudi-Moghadam, Leroux-Roels, & Vanlandschoot, 2010).

2.3.2 Nanoanticorpos como Diagnóstico

2.3.2.1 Imagem

Estudos têm demonstrado que os Nanoanticorpos, devido ao seu pequeno tamanho e fácil penetração tecidual, entre tantas outras características particulares, conseguem reconhecer e ligar-se *in vivo* ao recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Os fragmentos V_{HHS} , ao ligarem-se ao EGFR, bloqueiam o fator de crescimento epidérmico (EGF), podendo ser usados no tratamento de tumores sólidos. (Harmsen & De Haard, 2007)

Este fator contribui para a diminuição do desenvolvimento e progressão tumoral (Oliveira, Schiffelens, Van der Veeken, Van der Meel, & Strom, 2010).

Os fragmentos V_{HHS} podem também ser usados na obtenção de imagens, se fundidos, por exemplo, com a proteína fluorescente verde (GFP) e expressos em compartimentos intracelulares (Smolarek, Bertrand, & Czerwinski, 2012).

Capítulo 3- Tecnologia «Phage Display»

3.1 «Phage Display»

«Phage Display» ou exibição de fagos, é uma tecnologia que foi introduzida pela primeira vez por George Smith em 1985 (Arap, 2005). É uma técnica *in vitro* que permite o isolamento de Ac's a partir de uma biblioteca de Ac's, usando uma das convenções de seleção que imitam basicamente o processo *in vivo* e que representam essencialmente (Hoogenboom H. R., 2005): geração da diversidade genotípica, emparelhamento do fenótipo ao genótipo, aplicação da pressão seletiva e amplificação dos genótipos/fenótipos selecionados. Esta tecnologia pode ser efetuada *in vivo*, a biblioteca é injetada no hospedeiro, este desenvolve uma resposta imunológica e posteriormente é recolhida uma amostra para análise (Arap, 2005).

A tecnologia «phage display» permite a seleção de um fenótipo (ligante específico de um Ag desejado), de um repertório de péptidos, proteínas ou outras moléculas, por exemplo anticorpos, exibidos à superfície de bacteriófagos, permitindo a pesquisa de bibliotecas e a recuperação do gene específico por infecção e propagação bacteriana. O fago suporta condições extremas como baixos pH's e baixas temperaturas, sem perder o seu grau de infecciosidade (Arap, 2005). É a partícula de fago que permite a ligação física do genótipo ao fenótipo (Figura 6) (Sommavilla, 2010; Gene, 2012)

Esta metodologia inicialmente foi usada como um vector de expressão capaz de apresentar sequências de aminoácidos acessível à ligação de anticorpos. O sistema «phage display» pode ser categorizado em duas vertentes: o sistema de vector de fago e sistema de vector de fagemídeo (Sommavilla, 2010). O sistema de vector de fago consiste em dois componentes: uma proteína de revestimento associada á superfície de um fago e o fago de apoio. A maior vantagem destes vectores é o seu pequeno tamanho e a facilidade de clonagem, o que permite um vasto número de bibliotecas (Arap, 2005; Riechmann & Muyldermans, 1999).

Todos os métodos «display» têm uma grande vantagem em comum: podem ser aplicados a uma grande seleção de Ag (Ponsel, Neugebauer, Ladetzki-Baehs, & Tissot, 2011). Uma das maiores vantagens do «Phage Display», face à tecnologia de hibridoma padrão ou à imunização, é a ausência de limitações técnicas, tal como a escolha de Ags e a ligação existente entre o fenótipo experimental e o seu genótipo encapsulado que permite a evolução das ligações selecionadas em moléculas otimizadas (Ponsel, Neugebauer, Ladetzki-Baehs, & Tissot, 2011). Para que esta técnica funcione é importante a escolha da estirpe do hospedeiro, por exemplo, a *Escherichia coli* e a construção e qualidade da

biblioteca de Ac's, uma vez que uma boa biblioteca permite uma melhor seleção de Ac's específicos para o Ag de interesse (Arap, 2005; Stricker & Li, 2001).

A face inicial desta tecnologia é normalmente uma biblioteca de Ac's, quer de origens «naïve⁴», quer sintéticas, compreendendo uma população ideal de 10^9 - 10^{11} clones (Gene, 2012). A diferença entre Ac's «naïve» e sintéticos depende da origem dos genes dos Ac's. Após 3-4 ciclos de seleção, a população é enriquecida por uma alta percentagem de fragmentos de Ac's específicos para os Ag's alvo (Jermutus & Carmen, 2002).

«Phage display» teve uma grande influência nas descobertas feitas no campo da imunologia, biologia celular, farmacologia e na descoberta de novas fórmulas, nas últimas décadas.

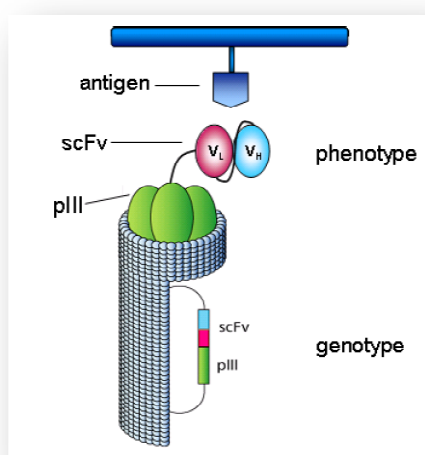


Figura 6- Exibição de um fragmento de anticorpo convencional a um bacteriófago com uma proteína de revestimento menor (pIII) associada. (Sommavilla, 2010)

3.2 Construção de Bibliotecas de Acs

Uma das metodologias para a criação de bibliotecas de Ac's mais usadas na utilização de fagos filamentosos, ou seja, bacteriófagos que residem na *Escherichia coli*, é a técnica de «Phage Display».

Por definição Biblioteca de Ac's por «phage display» é uma coleção de fagos recombinantes que exibem fragmentos de Ac's na superfície e que podem ser preparadas a partir de fontes de DNA naturais, sintéticas ou mistas. Cada fago apresenta um único Ac mas toda a biblioteca apresenta diversas moléculas de Ac's com especificidades diferentes para Ag's diferentes (Figura 7) (Mullen, Nair, Ward, Ryroft, & Henderson, 2006). Quanto maior a biblioteca, maior a probabilidade de encontrar Ac's que se liguem a diferentes epítomos e maior a afinidade. (Sommavilla, 2010)

⁴ Sem ocorrência de imunização.

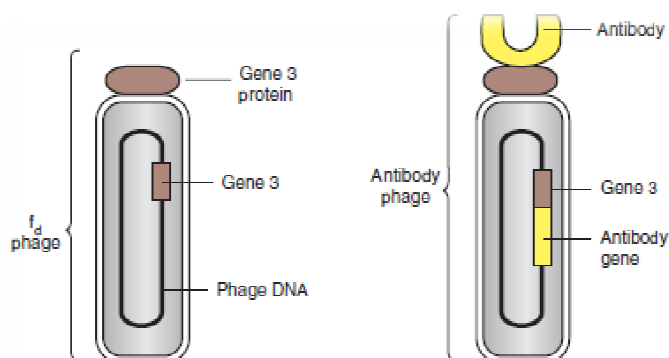


Figura 7- Representação esquemática da fusão de um anticorpo com um fago (anticorpo-fago). (Bradbury, Waldo, & Zeytun, 2003)

Uma pequena amostra de sangue é utilizada para isolar o RNAm e como modelo para a transcriptase reversa, possibilitando gerar cDNA. A partir dos genes do cDNA e através de primers específicos, os fragmentos dos Ac's em estudo vão ser amplificados. Depois de restrição do DNA nos fragmentos em análise, este DNA pode ser clonado num vector fagemídeo com proteína de revestimento pIII associada, as bactérias são transformadas e usadas no procedimento de «phage display» (Figura 8).

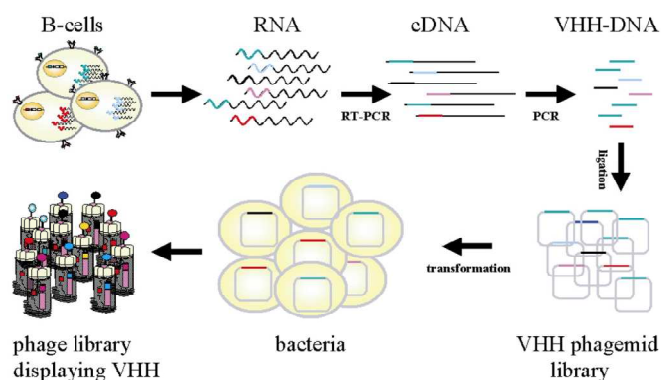


Figura 8- Esquema representativo da construção de bibliotecas fago de fragmentos de V_{HH}. (Sommavilla, 2010)

3.3 Tipos de Bibliotecas de Anticorpos

3.3.1 Biblioteca de Anticorpos «Naïve»

As bibliotecas «naïve» derivam da coleção de genes V⁵ das células B de dadores não imunizados, ou seja, de dadores que nunca estiveram em contacto com nenhum Ag, isolados do sangue periférico dos linfócitos, medula óssea ou de células do baço (Ponsel,

⁵ Os segmentos dos genes regionais (V, D, J) são reconhecidos por um grupo de enzimas conhecidas como recombinase VDJ que são específicas de linfócitos.

Neugebauer, Ladetzki-Baehs, & Tissot, 2011; Hoogenboom H. R., 2005). A diversidade dos Ac's isolados aumenta com a amplificação do tamanho da biblioteca, assim a probabilidade de obter Ac's com uma maior afinidade é superior.

A construção de bibliotecas «naïve» envolve técnicas moleculares, tais como transcriptase reversa, RT, ou RNA mensageiro, mRNA, seguido de um PCR de forma a amplificar os segmentos dos genes do fragmento V_{HH} do DNA complementar, cDNA, e clonagem restrita, pois vai incorporar os segmentos de Ac's rearranjados num vector apropriado (Jermutus & Carmen, 2002). De forma mais simplificada a construção destas bibliotecas, envolve numa primeira fase a recolha de RNAm do sangue periférico dos linfócitos e posteriormente, usando primers específicos, as regiões variáveis dos Ac's são amplificadas por PCR e clonadas em vectores específicos (Willats, 2002).

As principais vantagens da utilização deste tipo de bibliotecas são (Brichta, Hnilova, & Viskovic, 2005): não à necessidade de injetar Ag's invasivos ou substâncias tóxicas em animais, apresenta uma grande variedade de Ac's contra uma grande variedade de Ag's, uma biblioteca «naïve» pode ser usada para um qualquer Ag, não havendo necessidade na construção de uma nova, por fim a geração de Ac's são obtidas num curto espaço de tempo. Assim como qualquer técnica molecular, existem vantagens e desvantagens, sendo estas últimas as seguintes (Brichta, Hnilova, & Viskovic, 2005): um baixo reportório de Ac's leva a uma diminuição da afinidade para com os Ag's e por fim a formação ocasional de corpos de inclusão induz toxicidade para as células bacterianas.

Em contraste com as bibliotecas imunes, as bibliotecas «naïves» têm a vantagem de poderem ser usadas para uma gama ilimitada de Ag's, ou seja, uma única biblioteca «naïve» pode ser usada na geração de anticorpos face a uma variadíssima gama de Ag's, incluindo toxinas e auto-antigénios (Jermutus & Carmen, 2002; Ponsel, Neugebauer, Ladetzki-Baehs, & Tissot, 2011).

3.3.2 Biblioteca Imune

Este tipo de bibliotecas deriva de dadores imunes e por isso estão predispostas ao reconhecimento de Ag's específicos, logo, apresentam tamanhos mais pequenos que as outras bibliotecas (Ponsel, Neugebauer, Ladetzki-Baehs, & Tissot, 2011). Assim como as bibliotecas «naïve», os Ac's provêm dos linfócitos B de animais previamente imunizado e que desenvolveram uma resposta imunológica contra determinado Ag (Goldsby, Kindt, & Osborne, 2002). Uma biblioteca de Ac's imunizados tem duas características essenciais (Brichta, Hnilova, & Viskovic, 2005): (1) o seu reportório de Ac's é enriquecido com Ag's

específicos e (2) uma parte significativa destes mesmo Ac's sofreram maturação ao nível da afinidade pelo sistema imunitário.

Estas bibliotecas apresentam também vantagens e desvantagens, sendo as vantagens (Brichta, Hnilova, & Viskovic, 2005): são mais fáceis de preparar e possibilitam o isolamento de inúmeros Ac's específicos contra diversos Ag's virais, bacterianos e parasitários. Entre as desvantagens estão (Brichta, Hnilova, & Viskovic, 2005; Willats, 2002): o tempo necessário para a imunização do animal, a resposta imunológica do animal ser imprevisível e sempre que o Ag for alterado, nova biblioteca imune deve ser construída. Em contraste com as bibliotecas «naïve», as bibliotecas imunes têm a vantagem de não necessitarem de ser tão vastas como as «naïve» (Brichta, Hnilova, & Viskovic, 2005).

As bibliotecas imunes têm duas aplicações principais: a seleção de Ac's neutralizantes de vírus a partir de um alvo infectado e a identificação de Ac's específicos de tumores a partir de doentes que padeçam de cancro (Ponsel, Neugebauer, Ladetzki-Baehs, & Tissot, 2011).

3.3.3 Biblioteca de Anticorpos Sintéticos

A grande diferença entre bibliotecas imunes e bibliotecas «naïve» face às bibliotecas sintéticas, consiste na origem das sequências para a construção da biblioteca, isto é, enquanto as duas primeiras bibliotecas são sintetizadas de uma fonte natural, parte das bibliotecas sintéticas são produzidas ou desenhadas *in silico* e depois sintetizadas de uma forma controlada (Ponsel, Neugebauer, Ladetzki-Baehs, & Tissot, 2011).

A construção de bibliotecas sintéticas envolve o rearranjo de segmentos dos genes do fragmento Ac's *in vitro* e numa indução de CDRs artificiais⁶ de diferentes «loops», usando a tecnologia molecular de PCR e primers aleatoriamente (Jermutus & Carmen, 2002).

Uma das vantagens deste tipo de bibliotecas é na composição dos CDRs que podem ser exatamente definidos e oferecem uma solução na identificação de ligações de Ag's quando há impossibilidade de imunização (falta de antigénio, antigénio tóxico ou não imunogénico) (Muyldermans, 2011; Ponsel, Neugebauer, Ladetzki-Baehs, & Tissot, 2011).

3.4 Fagos Filamentosos

A exibição de bacteriófagos ou de fagos é um sistema de expressão de (poli) peptídeos ou de proteínas na superfície de fagos (fenótipo) e que estão ligados fisicamente ao seu

⁶ Bibliotecas de anticorpos «naïve» apresentam CDRs de forma natural ao contrário das bibliotecas de anticorpos sintéticos, em que os CDRs são artificiais.

DNA de codificação (genótipo) (Stricker & Li, 2001). Isto é conseguido através da clonagem de um gene estranho em fusão com uma proteína de revestimento do fago.

Os vetores de clonagem apresentam as seguintes características (Amorim, 2011): sofrem replicação na célula hospedeira (necessitam de uma origem de replicação para que possam ser produzidas várias cópias de DNA) e têm um tamanho relativamente pequeno, pois moléculas grandes tendem a quebrar durante a purificação.

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular, geralmente em cadeia dupla, que existem essencialmente em bactéria e têm uma existência independente na célula, ou seja, replicam-se independentemente e não fazem parte do cromossoma (Amorim, 2011).

Epissomas ou plasmídeos integrativos podem existir sob a forma circular ou integrados no cromossoma, sendo que esta integração depende do fator F (Amorim, 2011).

Os bacteriófagos têm contribuído muito para o campo da biotecnologia e da biologia molecular. Hoje em dia os bacteriófagos têm recebido uma enorme atenção devido à sua potencialidade para serem usados em «phage display», como veículos para a produção de vacinas e como fins de diagnóstico (Haq, Chaudhry, Akhtar, Andleeb, & Qadri, 2012).

Os bacteriófagos, frequentemente referidos como fagos, são vírus que infetam única e exclusivamente células bacterianas e que têm uma estrutura simples que consiste numa molécula de DNA empacotada numa cápsula (Amorim, 2011). À semelhança de outros vírus, os fagos são parasitas obrigatórios, necessitando de um organismo hospedeiro para se multiplicarem (Moreira, 2011). Estes podem ser de dois tipos (Amorim, 2011):

- «**Head and Tail**»: consiste numa molécula de DNA linear de cadeia dupla (exemplo- fago λ : infecta a *Escherichia coli*);
- **Filamentoso**: consiste numa molécula de DNA circular de cadeia simples (exemplo- fago M13: infecta bactérias com pilus sexual).

3.4.1 Bacteriófagos Ff

Diferentes tipos de fagos têm sido usados como veículos na tecnologia «Phage Display», incluindo os bacteriófagos filamentosos Ff, Lambda e T7. No entanto, os mais usados nesta tecnologia são os bacteriófagos da família Ff (Brichta, Hnilova, & Viskovic, 2005). Bacteriófagos filamentosos, especialmente os fagos Ff que incluem as estripes f1, fd e M13, tornaram-se numa ferramenta importante para a identificação da interação entre biomoléculas bem como para a melhoria de abordagens mais evolucionárias.

Fagos filamentosos são vírus capazes de infectar uma grande variedade de bactérias gram negativas como a *Escherichia coli*, portadora de epissoma F⁷. Estes fagos são facilmente selecionados, manipulados e são veículos de clonagem de excelência pois o seu tamanho não fica prejudicado pelo DNA que possui. Se for necessária a inserção de novas sequências ao seu genoma, os fagos aumentam de tamanho (Willats, 2002).

Os fagos Ff consistem num genoma de DNA de cadeia simples empacotado num cilindro longo de 7nm de largura por 900-2000nm de comprimento. (Lowe, 1999) A cápside destes fagos apresenta proteínas de revestimento maior, por exemplo a pVIII que são codificadas pelos genes VIII e que têm cerca de 3000 cópias por partícula de fago, dependendo do tamanho do genoma do DNA do fago. (Stricker & Li, 2001) Estas proteínas dominam 87% da massa total da cápsula do fago e 98% do conteúdo da proteína (Petrenko, 2008). Em contraste, as proteínas de revestimento menor, por exemplo, a pIII, IV ou IX que são codificadas pelos genes III, IV e IX, têm cerca de 4-5 cópias cada uma, por partícula de fago, e desempenham um papel importante na interação fago-hospedeiro durante a infeção (Figura 9) (Stricker & Li, 2001). A proteína de revestimento pVI encontra-se localizada numa das extremidades do fago e é fundamental para a estabilidade das partículas e para a infecciosidade do fago (Horn, 2000).

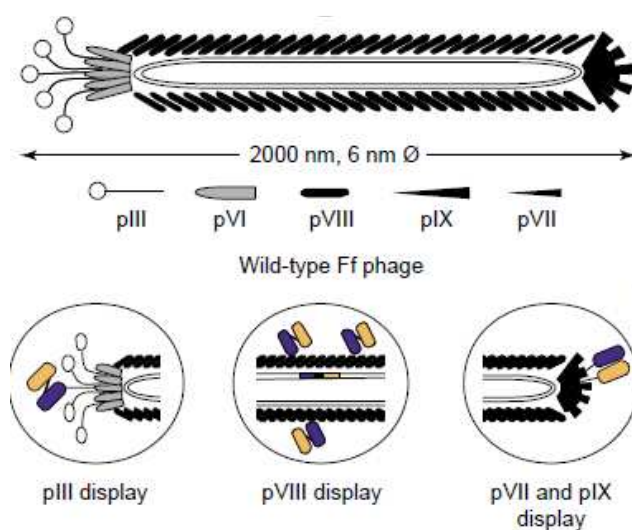


Figura 9- Esquema representativo de fagos filamentosos em «phage display». (Konthur & Walter, 2002)

3.4.2.1 Estirpes M13

O fago M13, da família dos fagos filamentosos, é flexível, tem cerca de 1 µm de comprimento e 6 nm de diâmetro, composto quase unicamente por um tubo helicoidal

⁷ Um epissoma é uma molécula de DNA circular com capacidade de replicação independente e estável; o fator F contém genes que são necessários à sua replicação. Assim, o fator F é um epissoma porque pode existir estando ou não integrado no cromossoma de uma célula.

formado por moléculas da proteína maior pVIII. Dentro deste tubo encontra-se o DNA viral em cadeia simples (apresenta 6407 nucleótidos de comprimento) (Brichta, Hnilova, & Viskovic, 2005; Petrenko, 2008). Estes fagos infetam hospedeiros como a *Escherichia coli*, por injeção do seu DNA, através de uma fibra proteica denominada *F-pili*, que permite à bactéria associar-se ao fago, através de conjugação sexual (Sinoga, 1998).

O ciclo de infecção inicia-se quando o fago se liga ao pilus sexual de uma célula, injetando o seu DNA. O DNA em cadeia simples, uma vez dentro da célula bacteriana, vai agir como um molde para a síntese de uma cadeia complementar, resultando numa cadeia dupla de DNA que é replicada até existir mais de 100 cópias presentes na célula. As bactérias ao dividirem-se em células filhas recebem cópia do genoma do fago que continua a replicar-se, mantendo o número total por célula (100 cópias). Por cada geração de uma célula infetada existem cerca de 1000 novos fagos (Sinoga, 1998).

À medida que a célula se replica, o fago M13 passa para os descendentes e assim é transmitido entre gerações. Como não ocorre lise celular, o fago M13, após infecção de uma bactéria, pode ser replicado indefinidamente e é por esta situação que se torna difícil a identificação das células infetadas (Sinoga, 1998). O ciclo de infecção por parte deste fago filamentoso é um ciclo não lítico, nem lisogénico, este vai ser libertado da célula hospedeira por secreção (Haq, Chaudhry, Akhtar, Andleeb, & Qadri, 2012).

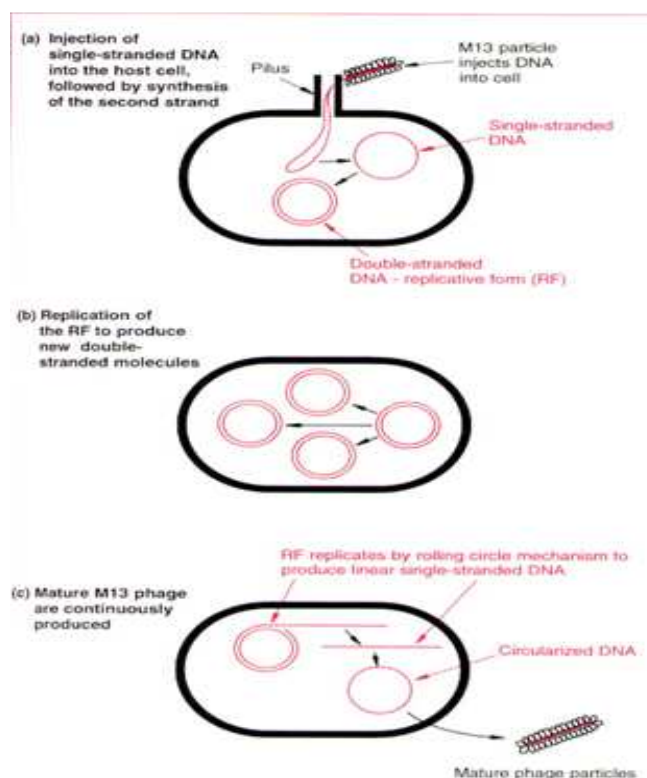


Figura 10- Representação esquemática do ciclo de infecção do fago M13, mostrando os diferentes tipos de replicação de DNA que ocorrem (Sinoga, 1998).

O fago filamentoso M13 tem as seguintes vantagens como vector de clonagem (Amorim, 2011): tem um genoma pequeno, uma grande variedade de genes ou combinação de genes podem ser inseridos no DNA do bacteriófago, uma forma replicativa em cadeia dupla que existe no interior da célula funciona como um plasmídeo, é facilmente preparado a partir de uma cultura de *Escherichia coli* infetadas, são facilmente reintroduzidos nas células e podem ser obtidos na forma de cadeia simples de DNA, útil para a sua sequenciação e mutagénese in vitro.

A clonagem em vetores do fago M13 é importante pois obtêm-se fragmentos de DNA de cadeia simples muito utilizadas para a sequenciação e mutagénese dirigida. O vetor M13mp7 é baseado no fago M13 (Sinoga, 1998).

3.5 Aplicação da Tecnologia «Phage Display»

A tecnologia «phage display» apresenta um vasto leque de aplicabilidade, mapeamento de epítomos, descoberta de epítomos, novas vacinas, criação de bibliotecas de anticorpos, identificação de novos receptores e ligandos, desenvolvimento de novos fármacos e seleção de órgãos-alvo.

Uma das áreas de maior interesse na área científica é o desenvolvimento de vacinas para tratamento ou profilaxia de doenças infecciosas ativas atualmente. Referente ao desenvolvimento de vacinas, esta metodologia pode ser utilizada em fagos que se comportam como transportadores imunogénicos, na identificação de peptídeos e de «mimotopes»⁸ e no estudo da especificidade das células T (Willats, 2002).

3.5.1 Fagos como transportadores imunogénicos

Os Fagos são considerados seres imunoestimulantes naturais que têm sido usados como veículos na administração de vacinas. O uso de fagos como transportadores imunogénicos oferece várias vantagens face aos tradicionais transportadores, ou seja, as proteínas, apresentando as seguintes vantagens (Kaur, et al., 2012; Zuhaida, et al., 2012):

- A resposta por parte dos Acs a este tipo de transportadores é mais restrita que qualquer resposta a outro tipo de transportadores;
- A fusão genética é mais fácil e mais uniforme que qualquer método químico de conjugação.
- Replicam no local de infecção;
- São estáveis e de fácil manipulação;

⁸ «Mimotopes» são macromoléculas e por vezes péptidos que emitam a estrutura de um epitopo.

- Produção rápida e económica;
- Conseguem manter uma ligação física entre o Ac e o seu DNA;
- São eficazes contra bactérias patogénicas multirresistentes;
- Os efeitos colaterais são muito raros em comparação por exemplo com os antibióticos;
- Respondem rapidamente ao aparecimento de bactérias mutantes resistentes;

Tabela 2- Exemplos de peptídeos e proteínas seleccionados usando a tecnologia «Phage Display» adaptado de (Rothe, Hosse, & Power, 2006).

Name	Format	Target	Indication	Stage	Company
Humira (adalimumab)	IgG1	TNF	Doenças autoimunes	Market	Abbott
DX-88 (Ecallantide)	Kunitz domain	Kallikrein	Angiodema	Market	Dyax
Nplate	Peptibody (Peptide-Fc)	Thrombopoietin	Imunidade Crónica	Market	Amgen
ABThrax (raxibacumab)	IgG1	B anthracis	Antrax	Pending approval	HGSi
ABT-874	IgG1	IL-12	Psoríase, Crohn's	Phase II, III	Abbott
LymphoStat-B (belimumab)	IgG1	Blys	Artrite Reumatóide, SLE	Phase II, III	GSK/HGSi
IMC-11F8 (necitumumab)	IgG1	EGFR	Tumores sólidos, cancro colorectal	Phase I, II, III	Eli Lilly & Co/BMS
HGS-ETR1 (mapatumumab)	IgG1	TRAIL-R1	Malignidades sólidas	Phase I, II	HGSi
IMC-1121B	IgG1	VEGFR2	Cancro	Phase II, III	Eli Lilly & Co
GC-1008	IgG	TGFβ	Fibrose pulmonar	Phase I, II	AZ
iCo-008 (CAT-213) (berilimumab)	IgG4	Eotaxin1	Conjuntivite alérgica	Phase II	iCo Therapeutics Inc
IMC-A12	IgG1	Insulin-like growth factor receptor	Cancro	Phase I, II	Eli Lilly & Co
MT201 (adecatumumab)	IgG	EpCAM	Cancro da mama e colorectal	PC, Phase I, II	Micromet/Merck Serono
MOR103	IgG	GM-CSF	Artrite Reumatóide	Phase II	Galapagos/Morphosys
Nanobody	VHH (camelid)	vWF	Trombofilia	Phase II	Ablynx
AMG-386	Peptibody (Peptide-Fc)	Angiopoietin-1 and -2	Cancro	PC, Phase I, II	Amgen
DX-890/EPI-hNE4	Kunitz domain	Neutrophil Elastase	Síndrome de stress respiratório agudo	Phase II	Debiopharm
MEDI-547	IgG	EphA2	Tumores sólidos	Phase I	MedImmune
MT203	IgG1	GM-CSF	Doenças autoimunes e inflamatórias	Phase I	Micromet
CAT-354	IgG4	IL-13	Asma	Phase I	MedImmune

Capítulo 4- Processo de Obtenção de V_{HHs}

4.1 Processo de Imunização

Os Nanoanticorpos são normalmente obtidos de bibliotecas de Ac's a partir do RNAm de animais (animais da família Camelidae neste caso) naïve ou imunizados, sendo esta a primeira parte. A segunda parte é a seleção de clones das sequências nucleótidas dos Nanoanticorpos por «phage display», a partir da biblioteca geral de todo o repertório de domínios variáveis dos HCABs do animal usado no estudo (Tillib, Ivanova, & Vasilev, 2010).

Estes animais podem ser imunizados seguindo um conjunto de procedimentos-padrão. A imunização é feita com uma quantia de cerca de 50 µg de imunogénio em adjuvantes Freund's, completo (CFA) ou incompleto (IFA)⁹, produzindo Ags específicos de HCABs de alta afinidade, passadas 5-6 semanas (Muyldermans, 2011). Após uma análise de vários estudos referentes ao processo de obtenção de V_{HHs}, foi possível concluir que normalmente o animal é imunizado com 1mg ou menos de imunogénio em adjuvantes, uma vez por semana, durante várias semanas consecutivas e que o adjuvante usado na primeira injeção é CFA, sendo que nas injeções seguintes usa-se IFA. (outros regimes podem ser adotados).

Existe a possibilidade de imunizar um animal simultaneamente com uma mistura de vários Ag's e assim originar uma resposta imune para cada Ag separadamente, tornando este processo mais económico. O reportório imunizado de HCABs exibe um reconhecimento padrão diferente do reportório dos Ac's convencionais.

Existem duas categorias de mecanismos de ação para o CFA que são (Nunes, et al., 2009):

- Prolongar a presença de Ag no local de injeção;
- Promover um transporte eficaz dos Ags para o sistema linfático e pulmões, onde o adjuvante promove a acumulação de células inflamatórias;

O IFA tem a característica de depósito, como a capacidade de induzir processos inflamatórios, aumentando o infiltrado de células inflamatórias e/ou a capacidade de estimular as funções das células apresentadoras de Ag's, potenciando a resposta das células T específicas (Nunes, et al., 2009).

O processo para a formação de bibliotecas imunizadas¹⁰, inicia-se com a recolha de aproximadamente 20-30mL de sangue periférico dos linfócitos, isolados de um animal da

⁹ O adjuvante completo de Freund (CFA) é uma mistura viscosa sem cor constituída de 85% de óleo mineral, 15% de emulsificante com 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* inativada por mililitro de emulsão. O adjuvante incompleto de Freund (IFA) não possui o constituinte bacteriano (Nunes, et al., 2009)

¹⁰ Bibliotecas imunizadas derivam de doadores imunes e portanto predispostos a reconhecer certos Ags (Ponsel, Neugebauer, Ladetzki-Baehs, & Tissot, 2011).

família Camelidae imunizado, dado os linfócitos serem a fonte do mRNA, de forma a preparar cDNA e assim obter Ags específicos para fragmentos V_{HH} (Muyldermans, 2011).

4.2 Preparação dos Antígenios específicos

Os Ag's específicos dos fragmentos em estudo, podem ser obtidos por digestão com proteases dos HCAB, através da clonagem direta dos genes de V_{HH} (provenientes dos linfócitos B) ou através de bibliotecas «naïve» ou sintéticas (Nunes, et al., 2009; Muyldermans, 2011)

4.3 Clonagem do Repertório dos Fragmentos V_{HH}

A clonagem do repertório dos fragmentos de ligação aos Ag's de um animal imunizado da família Camelidae, num vector «phage display» e a seleção de clones específicos por «panning», possibilitou a identificação de moléculas de Ag's específicos, tornando-se num método de rotina nas últimas décadas (Muyldermans, 2011).

Quando é obtida uma biblioteca de tamanho apropriado, os V_{HHs} podem ser selecionados por «phage display». Posteriormente, o cDNA vai ser amplificado, por codificar as regiões variáveis que estão expressas na superfície dos fagos filamentosos. Os fagos em que os fragmentos V_{HHs} se ligam aos Ag's, vão ser isolados através de um processo denominado «panning». A clonagem do repertório de Ac's convencionais e de HCABs envolve vários passos. Apesar das etapas serem as mesmas, existem algumas diferenças que são fulcrais neste processo.

Para os Ac's convencionais, o primeiro passo necessita de dois PCR's independentes, de maneira a amplificar os fragmentos V_H e o V_L . No entanto, este processo de PCR's independentes em ratos e em humanos é complicado, pois a existência de genes múltiplos da família V_H e V_L , requer o seu conjunto de primers (Muyldermans, 2011). “Assim, os 10^5 de V_H e os 10^5 de V_L amplificados das 10^5 células B, requer a clonagem dos 10^{10} clones para obter todas as combinações possíveis” (Muyldermans, 2011).

O segundo passo consiste na formação de um segmento por «splicing».

Os HCABs, pelas suas características (ausência de fragmentos V_L), apenas vão necessitar de uma etapa por PCR. Vão ser amplificados por um conjunto de primers, dado serem codificados por um único exão por pertencerem a uma única família de genes. Assim, é possível uma clonagem imediata. Estas diferenças em relação aos Ac's convencionais, retratam uma das suas vantagens.

Os HCABs, ao contrário dos Ac's convencionais, não apresentam o domínio CH na sua estrutura; assim, através de um gel de agarose, é possível separar ambos os fragmentos.

Os HCAbs, separados através do gel de agarose, vão ligar-se ao vector fagemídeo do bacteriófago filamentosos e incorporado numa bactéria como a *Escherichia coli*.

Após a clonagem dos genes de V_{HH} amplificados nos vectores de expressão adequados, a biblioteca de fragmentos V_{HH} contendo o repertório de locais de ligação aos Ag's é obtida (Muyldermans, 2011).

Em contraste com outras bibliotecas, por exemplo, de fragmentos de Ac's convencionais que são bibliotecas vastas, as bibliotecas provenientes dos fragmentos V_{HH} de clones individuais são bibliotecas mais pequenas na ordem dos 10^6 - 10^7 (Muyldermans, 2011).

4.4 Seleção de Ag específico do Fragmento V_{HH}

Bibliotecas de V_{HH} podem ser selecionadas para a presença de ligações de Ag's específicos quer por seleção ou diretamente por triagem de colónias.

Os clones obtidos do processo anterior vão ser submetidos a um método designado «panning» que consiste em vários ciclos de incubação da biblioteca de Ac's escolhida com o Ag alvo imobilizado. Neste método só as ligações fortes ou de alta afinidade, e que se expressam melhor em bactérias, são selecionadas.

Esta seleção pode ser dividida em seis passos (Figura 11): (i) cobertura de Ag; (ii) bloqueamento; (iii) incubação do fago com o Ag; (iv) lavagem para remover o fago com o Ag; (v) eluição; (vi) infeção de bactérias hospedeiras e posteriormente amplificação (Jermutus & Carmen, 2002). Após 3-4 ciclos de seleção, os clones são caracterizados por sequenciamento de DNA ou ELISA.

No método de «panning», o passo da lavagem, da eluição e da amplificação são passos de grande relevo.

O passo de lavagens sucessivas realiza-se após a incubação dos Ags com as bibliotecas de V_{HH} e tem como intuito remover os Ac's inespecíficos para o alvo em estudo, através de um detergente próprio, normalmente o Tween (Altshuler, Serebryanaya, & Katrukha, 2010; Horn, 2000). Este passo requer alguma consideração pois deve existir equilíbrio entre a especificidade e a avidéz dos clones selecionados. Muitas bibliotecas contêm clones que podem atuar como ligantes fortes, mas que apresentam baixa especificidade para o alvo e outros podem atuar como ligantes fracos, mas apresentam alta especificidade. Há que ter em conta que, se as lavagens forem muito rigorosas e as ligações fracas, mas altamente específicas, podem ser perdidas, mas, se, por sua vez, as lavagens não forem suficientemente rigorosas, então a população de clones selecionados pode ser dominada por ligações fortes com baixa especificidade (Willats, 2002).

Na prática, este balanço é conseguido por ajuste do tempo de lavagem, concentração dos detergentes e usando regimes de lavagens rigorosas progressivamente aumentadas. O aumento ou diminuição dramática do pH também é muito utilizado. Uma abordagem mais subtil é a clivagem enzimática, em que as enzimas podem ser incorporadas em proteínas, através de uma fusão (Willats, 2002).

O passo da eluição ocorre após o passo da lavagem e são as ligações mais fortes dos Ag's às partículas de fago que vão ser eluídas, sem que o seu grau de infecciosidade seja diminuído. O método de eluição mais usado é a eluição por choque de pH (exemplo: glicina-HCl, pH=2,2), resultando numa desnaturação do péptido alvo ou da perda da infecciosidade do fago. Um procedimento alternativo é a infeção de bactérias, dado ser um método simples que pode ser usado no caso de ausência de conhecimento de um método de eluição apropriada e retrata a adição de bactérias, como a *Escherichia coli*, a complexos imobilizados (Horn, 2000).

Os fagos eluídos, ainda viáveis biologicamente, podem reinfectar uma nova *Escherichia coli* no «panning» seguinte, sofrendo uma amplificação. No último «panning», os fagos são clonados e preparados para que apenas os Ac's específicos sejam apresentados individualmente (Petrenko, 2008). Os fagos podem ser purificados por meio, por exemplo, de uma cromatografia (Strokappe, et al., 2012).

Após 3 a 4 «pannings» a população de fagos selecionada contém uma grande especificidade para com o Ag de interesse.

4.5 Afinidade dos Clones obtidos

Após a seleção dos clones, executam-se testes de forma a ser avaliada a reatividade destes ao Ag alvo

Um método rápido e robusto de rastrear a afinidade e especificidade dos clones é, por exemplo, a técnica de ELIS com Ag's ligados ou adsorvidos e usando os fragmentos de Ac's solúveis produzidos na *Escherichia coli* (McCaffery, Griffiths, Winter, & Chiswell, 1990). Para além da técnica de ELISA existem outras técnicas como Western Blot (WB), a Imunofluorescência (IF), a Imunoprecipitação (IP) ou a deteção de Ags em células vivas através da expressão intracelular.

A afinidade das ligações vai ser processada em aparelhos com biossensores como «surface plasmon resonance» (SPR) ou «quartz crystal microbalance» (QCM) (Skerra, Pfitzinger, & Pluckthun, 1991).

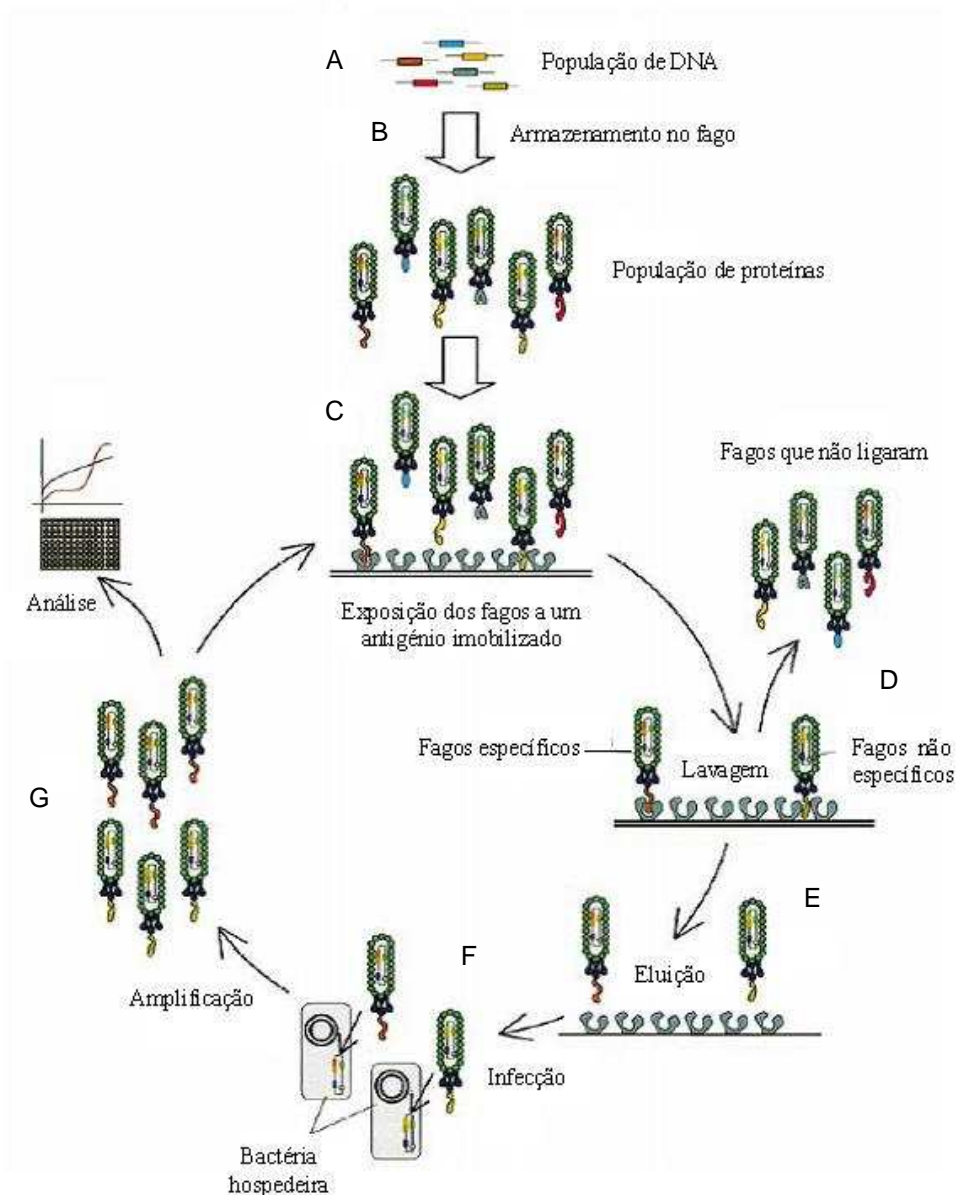


Figura 11-Ciclo de «phage display» (a). Biblioteca de sequências de DNA codificados para péptidos ou proteínas (b), clonados em fagos ou no genoma de fagemídeos por fusão com uma proteína de revestimento. A biblioteca é exposta a moléculas alvo e fagos com especificidade apropriada são capturados (c). Fagos não ligantes são removidos por lavagens consecutivas, no entanto algumas ligações não específicas podem ocorrer (d). Os fagos ligantes são eluídos por condições que quebra a interação entre o péptido ou a proteína e o alvo (e). Fagos eluídos são infetados em células bacterianas hospedeiras e posteriormente amplificados (g). Esta população de fagos amplificados é, na realidade, uma segunda biblioteca. Se o passo de seleção, do (c) ao (f) for repetido, a população de fagos torna-se cada vez menos diversificada, enquanto a população torna-se mais e mais enriquecida no número limitado de variantes com capacidade ligante (h). (Willats, 2002)

Capítulo 5- Vantagens/Desvantagens da Técnica «Phage Display»

As características da tecnologia «phage display» permitiram competir com a tecnologia «hybridoma display», oferecendo uma alternativa credível para a imunização. (Ponsel, Neugebauer, Ladetzi-Baehs, & Tissot, 2011) Várias são as vantagens da utilização deste sistema nos fragmentos de cadeia única:

- A pesquisa é livre de usar o repertório imunológico de um animal qualquer por imunização espontânea ou após imunização (Oliveira S. R., 2007);
- Permite a seleção de Ac's face a uma gama ilimitada de alvos biológicos e não biológicos, incluindo auto-antígenos (Christ, Lee, Iorno, & Sierro, 2007);
- Bom método na seleção de Ac's em bibliotecas de grandes dimensões (Oliveira S. R., 2007);
- Consegue manter uma ligação física entre o Ac que está a ser apresentado e o seu DNA (Mullen, Nair, Ward, Ryoft, & Henderson, 2006);
- Tem a habilidade de identificar ligações entre Ac-Ag, sem que seja conhecido previamente, o tipo de interação entre as 2 moléculas (Arap, 2005);
- Os fagos são mais estáveis e podem ser armazenados até vários anos a 4°C (Zuhaida, et al., 2012);
- Podem ser produzidos de forma rápida e económica, apenas por infeção da *Escherichia coli* (Zuhaida, et al., 2012);
- Fácil isolamento e expressão do gene clonado (Zuhaida, et al., 2012);
- Os genes dos fagos são facilmente manipuláveis (Zuhaida, et al., 2012);
- É necessário apenas um par de «primers», neste processo, para todo o repertório dos fragmentos clonados, em virtude de estes fragmentos serem constituídos por apenas cadeias pesadas, ao contrário do que acontece nos Ac's convencionais (Muyldermans & Lauwereys, 1999);
- Análise direta dos epítopos de Ac's (Willats, 2002);
- Todo o processo «phage display» pode ser realizado *in vitro*, não havendo necessidade de os Ag's alvo serem imunogénicos (Willats, 2002).

Todas as vantagens acima descritas apenas são aplicadas em repertórios limitados de Ac's, ou seja, 10^6 a 10^7 . (Muyldermans & Lauwereys, 1999)

Tal como em todas as tecnologias moleculares, existem vantagens e desvantagens e esta ciência não é diferente (Tabela 3). Apesar de se tratar de uma metodologia muito vantajosa, como já foi referenciado anteriormente, e de esta não necessitar de altas tecnologias para a sua execução, apresenta também algumas limitações como:

- Os genes dos Ac's da espécie envolvida no estudo deve poder ser amplificado por PCR (Oliveira S. R., 2007);
- Pode existir seleção de Ac's que não reconheçam Ags com elevada afinidade (Oliveira S. R., 2007);
- Os vários fagos usados nesta tecnologia podem ser perdidos, se a etapa de lavagem durante o ciclo de «phage display» for muito rigoroso;
- Uma das principais chaves da técnica phage display é a habilidade em selecionar clones com propriedades desejadas. Uma biblioteca de tamanho insuficiente ou inapropriado em diversidade é pouco provável que venha a ter sucesso (Hoogenboom, et al., 1998; Russel, Lowman, & Clackson, 2004);
- Algumas sequências de Ac's podem ser refractadas, encontrarem-se sub-representadas na biblioteca exibida, levando a que o clone principal nunca seja isolado e assim contribuindo para uma das limitações desta técnica (Hoogenboom, et al., 1998; Russel, Lowman, & Clackson, 2004);
- Sequências tóxicas podem interferir com este método (por exemplo na *Escherichia coli*) (Hoogenboom, et al., 1998; Russel, Lowman, & Clackson, 2004);
- As afinidades ou ligações que resultam do processo de seleção podem não funcionar *in vivo*.

Tabela 3- Vantagens e desvantagens de métodos para o estudo de anticorpos.

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Método dos Ovos ou Método Clássico (Organization, 2006)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Segurança e Eficácia bem estabelecida na produção de vacinas; ➤ Fabricação simples. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Necessidade de milhões de ovos; ➤ Seleção de estirpes que apresentem altas taxas de crescimento em ovos; ➤ Cada ovo produz 2-3 doses de vacina injetável; ➤ Presença de proteínas residuais do ovo na vacina; ➤ Contra-indicado em pessoas alérgicas a ovos; ➤ Tempo de consumo de produção.
Método de cultura de células (Oliveira S. R., 2007)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tempo de consumo de produção de vacinas é metade do processo do ovo embrionário; ➤ Melhor qualidade asséptica durante o fabrico; ➤ Eliminação da presença de proteínas residuais do ovo na vacina; ➤ Indicado para pessoas com alergia a vacinas feitas a partir de ovos de galinha; ➤ Evita a presença de retrovírus aviário; ➤ Maior capacidade de produção. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Alta tecnologia, logo, maior investimento e por isso vacinas mais caras; ➤ Maiores custos na produção de vacinas; ➤ Integridade das células; ➤ Processo mais recente que o método clássico, logo, menos dados em relação à segurança e a efeitos adversos.
«Ribosomal Display» (Oliveira S. R., 2007)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Obtenção de biblioteca de clones em alguns dias; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Estável só sob certas condições (baixas temperaturas e altas concentrações de sais); ➤ Os anticorpos têm de adquirir a sua conformação enquanto ligados aos ribossomas; ➤ O ribossoma pode parar antes do final do mRNA; ➤ Menor biblioteca de clones que a tecnologia «phage display». ➤ Como hospedeiro imunológico, esta tecnologia está restrita ao rato.

Conclusão

Este trabalho para a conclusão de ciclo de estudos teve como principal objetivo a abordagem do uso de Nanoanticorpos no design de vacinas através da tecnologia «phage display», realçando os benefícios de ambos para a saúde pública.

A técnica «phage display» é uma tecnologia molecular emergente com mais de duas décadas e que, em junção com a nanotecnologia, nos últimos anos tem provado o seu potencial na investigação científica. Apesar de ser um sistema promissor com diversas vantagens face às tecnologias já existentes, esta também apresenta limitações, residindo algumas das dificuldades mais preocupantes desta técnica no sistema vector de fagos e no hospedeiro biológico, por serem dois pontos fulcrais para o sucesso desta técnica.

O sistema vector de fagos é o mais usado em «phage display» e considerada uma mais-valia pelas vantagens que apresenta: têm um pequeno genoma, são muito específicos, não matam o hospedeiro durante a infeção, podem ser produzidos em grandes quantidades em laboratórios e, aparentemente e de forma geral, são inofensivos ao ser humano (Barbas III, Burton, Scott, & Silverman, 2001). No entanto, e contradizendo o que foi referido anteriormente, são poucos os estudos que provam a eficácia e segurança do uso de fagos em humanos (Kaur, et al., 2012).

Outra limitação que os fagos colocam a esta tecnologia é o poder transferir horizontalmente toxicidade de forma generalizada ou específica ao hospedeiro biológico usado nesta técnica, ocorrendo interferência com o seu modo de atuação (Kaur, et al., Immunocompatibility of Bacteriophages as Nanomedicines, 2012). Para além disso, o hospedeiro biológico pode criar resistência aos fagos.

Durante a pesquisa bibliográfica foram vários os artigos que relatavam o uso de Nanoanticorpos em diversas áreas científicas, havendo maior incidência na área da medicina. Estes pequenos fragmentos representam uma nova geração de anticorpos que consolidam a sua elevada afinidade e especificidade com a estabilidade e facilidade de produção. Uma das maravilhas destes anticorpos é poderem ser administrados por outros meios, sem ser a administração intravenosa (Chames, Regenmortel, Weiss, & Baty, 2009).

Os convencionais anticorpos têm uma natureza bivalente por serem constituídos por cadeias leves e cadeias pesadas, levando a possíveis reações cruzadas com o alvo em estudo, surgindo, deste modo, efeitos secundários indesejáveis. Os Nanoanticorpos, por outro lado, são de natureza monovalente, pois são constituídos unicamente por cadeias pesadas, não se esperando tais reações. No entanto, são muitos os estudos *in vitro* e poucos os estudos realizados *in vivo*, o que significa que mais pesquisas devem ser feitas para uma melhor avaliação da atuação destes anticorpos no organismo.

É à medida que as bibliotecas de anticorpos aumentam de qualidade que se tornam possíveis novas aplicações e, conseqüentemente, novas conquistas em diferentes campos da medicina e da biotecnologia, sendo um dos exemplos o desenvolvimento de vacinas mais eficazes, com maior segurança e com uma perspectiva terapêutica mais eficiente face a doenças crônicas que tantas pessoas afetam atualmente.

De uma forma geral, o «phage display» oferece mais vantagens face às suas desvantagens, tendo em conta as tecnologias anteriormente usadas, podendo estas limitações ser superadas futuramente. Quanto a esta nova geração de anticorpos, são múltiplas as suas possíveis aplicações, devendo por isso serem alvo de maior atenção por parte da indústria e do âmbito científico. Apesar de os Nanoanticorpos estarem a ser alvo de várias pesquisas na atualidade, continuam a ser negligenciados, tendo em conta o que já foi alcançado com o uso destes pequenos fragmentos.

Em termos de perspectivas futuras, seria relevante avaliar a longo prazo a segurança e eficácia dos fagos na tecnologia «phage display» e ultrapassar a barreira das pesquisas *in vitro* com Nanoanticorpos, para que, desta maneira, seja obtida uma possível vacina ainda não conseguida para o combate a determinados vírus infecciosos, assim como uma melhoria dos efeitos adversos de vacinas hoje em dia já produzidas face a tantas patologias crônicas, como a esclerose múltipla.

Bibliografia¹¹

Actor, J. K. (2007). *Imunologia e Microbiologia* (Vol. 3). (L. F. Pontes, Trad.) Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier Mosby.

Ahmadvand, D., Rasae, M., Rahbarzadeh, F., Kontermann, R., & Sheikholislami, F. (May de 2009). Cell selection and characterization of a novel human endothelial cell specific nanobody. *Journal Molecular Immunology*, 46(8-9), 1814-1823.

Altshuler, E. P., Serebryanaya, A. G., & Katrukha, A. G. (2010). Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity. *Journal Biochemistry (Moscow)*, 75(13), 1584-1605.

Amorim, I. (2011). *Engenharia Genética- Núcleo da Engenharia Biomédica do IST*. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=22&ved=0CDUQFjABOBQ&url=http%3A%2F%2Fnebm.ist.utl.pt%2Frepositorio%2Fdownload%2F2425&ei=L26ULKAZO6hAfosYH4Cg&usq=AFQjCNHx8EGnBxP6nVZCkR7ACfmH30d8lw&sig2=-RNaY2kvadEa5pboSwJ_g

Arap, M. A. (2005). *Phage Display Technology- Applications and Innovations*. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://www.scielo.br/pdf/gmb/v28n1/a01v28n1.pdf>

Bae, K., Choi, J., Jang, Y., Ahn, S., & Hur, B. (13 de March de 2009). Innovative Vaccine Production Technoloies: The Evolution and Value of Vaccine Production Technologies. *Journal Archives Pharmacal Research*, 32(4), 465-480.

Barbas III, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., & Silverman, G. J. (2001). *Phage display: A laboratory manual*. (T. Kuhlman, Editor) Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://books.google.pt/books?id=uCNAay6pVAgC&printsec=frontcover&dq=phage+display&hl=en&sa=X&ei=ElvKUPu0J8mQhQePhYHwCA&sqi=2&ved=0CDQQ6AEwAQ#v=onepage&q=phage%20display&f=false>

Bazan, J., Calkosinski, I., & Gamian, A. (21 de August de 2012). Phage Display- A Powerful Technique for Immunotherapy. *Journal Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(12), 1829-1835.

Bradbury, A. M., Waldo, S. G., & Zeytun, A. (2003). *Fluorobodies- Mixing antibodies an the green fluorescent protein to unravel the genomic revolution*. Obtido em 23 de Fevereiro de 2013, de <http://www.fas.org/sgp/othergov/doe/lanl/pubs/las28/bradbury.pdf>

Brichta, J., Hnilova, M., & Viskovic, T. (2005). Generation of hapten-specific recombinant antibodies: antibody phage display technology: a review. *Veterinary Medicine*, 6, 231-252.

Cardoso, F. M., Ibañez, L. I., Schepens, B., & Saelens, X. (2012). Single domain camelid antibodies that neutralize negative strand viruses. In P. Arbutnot, *Antiviral Drugs – Aspects of Clinical Use and Recent Advances* (pp. 151-170). InTech Europe.

Chames, P., Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. (March de 2009). Therapeutic antibodies: sucess, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, 157(2), 220-233.

Chaotropic agent. (s.d.). Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de Wikipedia- The free encyclopedia: http://en.wikipedia.org/wiki/Chaotropic_agent

Christ, D., Lee, C., Iorno, N., & Sierro, F. (2007). *Selection of human antibody fragments by phage display*. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://www.lifesciences.sourcebioscience.com/media/366060/DAb%20Protocol12-01-2009.pdf>

Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., Haard, H., Lauwereys, M., & Casteels, P. (2006). Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins deived from Camelids sho superior potency and targetng to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Journal Arthritis and Rheumatism*, 54(6), 1856-1866.

¹¹ Referências bibliográficas seguindo a norma da American Psychological Association (APA).

De Genst, E., Silence, K., Decanniene, K., Conrath, K., Loris, R., Kinne, J., . . . Wyns, L. (24 de March de 2006). Molecular Basis for the Preferential cleft Recognition by Dromedary Heavy-Chain Antibodies. *Journal Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103(12), 4586-4591.

Deffar, K., Shi, H., Li, L., Wang, X., & Zhu, X. (17 de June de 2009). Nanobodies- The New Concept in Antibody Engineering. *African Journal of Biotechnology*, 8(12), 2645-2652. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/60807/49020>

Desmyter, A., Transue, R. T., Ghahroundi, M. A., Thi, M.-H. D., Poortmans, F., Hamers, R., . . . Wyns, L. (1997). Crystal Structure of Camel Single-Domain VH Antibody Fragment in Complex with Lysozyme. *Journal Nature Structural Biology*, 3, 803-811. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://www.nature.com/nsmb/journal/v3/n9/abs/nsb0996-803.html>

Dolk, E. (2004). *Stability of llama heavy chain antibody fragments under extreme conditions*. Dissertation, Universiteit Utrecht, Biology, Nederlands. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2004-0419-094105/inhoud.htm>

Eyer, L., & Hruska, K. (2012). Single-domain Antibody fragments derived from heavy-chain antibodies: a review. *Agriculture Journal*, 57(9), 439-513. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://agriculturejournals.cz/publicFiles/75131.pdf>

Farzaneh, S., Mohammad, R., Mohamad, S., Manijeh, D., Fatemeh, R., & Davoud, A. (2010). *Isolation of a Novel Nanobody Against HER-2/Neu Using Phage Displays Technology* (Vol. 41). LABMEDICINE.

Gene, R. W. (2012). *VHH Antibody Fragments Against Internalin B, a Virulence Factor of Listeria Monocytogenes: Reagents for Biosensor Development*. Thesis, The University of Guelph, Department of Environmental Biology, Ontario, Canada. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://atrium.lib.uoguelph.ca:8080/xmlui/handle/10214/4051>

Goldsby, R. A., Kindt, T. J., & Osborne, A. B. (2002). *Kuby Imunologia* (4ª Edição ed., Vol. 2). Brasil: Revinter Ltda.

Groot, A., Khattabi, M., Sachs, N., Groep, P., Van der Walls, E., Diest, P., . . . Vooijs, M. (June de 2009). Reverse proteomic antibody screening identifies anti adhesive VHH targeting VLA-3. *Journal Molecular Immunology*, 46(10), 2022-2028.

Haq, I., Chaudhry, W., Akhtar, M., Andleeb, S., & Qadri, I. (January de 2012). Bacteriophages and their Implications on Future Biotechnology: a review. *Virology Journal*, 9(9), 1-6. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://www.virologyj.com/content/9/1/9>

Harmsen, M. M., & De Haard, H. J. (November de 2007). Properties, production and applications of camelid single-domain fragments. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 13-22.

Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Journal Natural Biotechnology*, 23(9), 1105-1116.

Hoogenboom, H. R., Bruine, A., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J.-W., & Roovers, R. C. (Jene de 1998). Antibody phage display technology and its applications. *Elsevier*, 4(Immunotechnology), 1-20.

Horn, N. V. (2000). *Isolation of High Affinity Ligands Against SH3 and EVH1 Domains Using the Phage Display Cosmix-Plexing Technology*. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://d-nb.info/96011582X/34>

Immunosensors. (16 de 03 de 2013). Obtido de Kartenfaehnrich: <http://www.karstenfaehnrich.de/Immunosensors/immunosensors.htm>

Jermutus, L., & Carmen, S. (July de 2002). Concepts in antibody phage display. *Oxford Journals*, 1(2), 189-203. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://bfg.oxfordjournals.org/content/1/2/189.abstract>

Júnior, J. M., Lima, K. d., Castelo, A. M., Martins, V. D., Faccioli, L. H., & Silva, C. L. (Agosto de 2004). É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? *Jornal Brasileiro Pneumologia*, 4, 468-477.

Kaur, T., Nafissi, N., Wasfi, O., Sheldon, K., Wettig, S., & Slavcev, R. (January de 2012). Immunocompatibility of Bacteriophages as Nanomedicines. *Journal of Nanotechnology*, 1-13.

- Kennedy**, R. B., Ovsyannikova, I., & Poland, G. A. (November de 2009). Smallpox Vaccines for Biodefense. *National Institute of Health*, 1-15.
- Koh**, W., Steffensens, S., Gonzalez-Pajuelo, M., Hoorelbeke, B., Gorlani, A., Szyndol, A., & Forsman, A. (June de 2010). Generation of a family- specific phage library of llama single chain antibody fragments that neutralize HIV-1. *Journal Biological Chemistry*, 285(25), 19116-19124.
- Konthur**, Z., & Walter, G. (July de 2002). Automation of phage display for high-throughput antibody development. *Journal Targets*, 1(1), 30-36. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1477362702021712>
- Kuby**, J. (2007). *Immunology*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Lee**, C., Iorno, N., Sierro, F., & Christ, D. (2007). Selection of Human Antibody Fragments by Phage Display. *Journal Nature Protocols*, 2(11), 3001-3008.
- Lowe**, J. (1999). *Phage Display to Identify Peptides Binding to or Penetrating the Mouse Zona Pellucida*. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-120199-164438/unrestricted/JLthesisETD.pdf>
- McCaffery**, J., Griffiths, A., Winter, G., & Chiswell, D. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Journal Nature*, 348(6301), 552-554.
- Moreira**, A. R. (2011). *Estabilização estrutural e funcional de bacteriófagos em biopolímeros para aplicação de um sistema de detecção bacteriana*. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://bdigital.ufp.pt/handle/10284/2848>
- Mullen**, L., Nair, S., Ward, J., Ryroft, A., & Henderson, B. (March de 2006). Phage Display in the study of infectious diseases. *Trends in Microbiology*, 14, 141-147.
- Muyldermans**, S. (June de 2011). Single domain camel antibodies: Current Status. (E. Science, Ed.) *Journal of Biotechnology*, 74(4), 277-302.
- Muyldermans**, S., & Lauwereys, M. (March de 1999). Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. *Journal of Molecular Recognition*, 12(2), 131-140. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199903/04\)12:2%3C131::AIDJMR454%3E3.0.CO;2M/abstract;jsessionid=25C7721432B4A240BC60646CF84DA1D3.d01t03](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-1352(199903/04)12:2%3C131::AIDJMR454%3E3.0.CO;2M/abstract;jsessionid=25C7721432B4A240BC60646CF84DA1D3.d01t03)
- Muyldermans**, S., Baral, T. N., Retamozzo, C. V., De Baetselier, P., De Gents, E., Kinne, J., . . . Saerens, D. (2009). Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Elsevier*, 178-183.
- Nunes**, M. V., Câmara, C. P., Crespo, A. C., Carvalhaes, M., Oliveira, C. R., & Silveira, L. A. (2009). *Comparação do perfil de anticorpos antiimunoglobulina IgG em murinos imunizados com IgG humana associada a diferentes adjuvantes*, <http://revistas.ufg.br/index.php/REF/article/viewFile/5860/4560>. Obtido em 23 de Janeiro de 2013
- Oliveira**, S. R. (2007). *Novo sistema Two-Hybrid bacteriano baseado na manipulação da degradação proteica*. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1352/1/19934_ulfc080523_tm.pdf
- Oliveira**, S., Schiffelens, R., Van der Veeken, J., Van der Meel, R., & Strom, G. (2010). Downregulation of EGFR by a novel multivalent nanobody-liposome platform. *Journal Controlled Release*, 145(2), 165-175.
- Petrenko**, V. (2008). Evolution of Phage Display: From Bioactive Peptides to Bioselective Nanomaterials. *Informa Healthcare*, 5, 1-12.
- Ponsel**, D., Neugebauer, J., Ladetzki-Baehs, K., & Tissot, K. (2011). High Affinity, Developability and Functional Size: The Holy Grail of Combinatorial Antibody Library Generation. *Journal Molecular*, 16(5), 3675-3700. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/5/3675>
- Rahbarizadeh**, F., Ahmadvand, D., & Sharifzadeh, Z. (2011). Nanobody: an old concept and new vehicle for immunotargeting. *Journal Immunological Investigations*, 40(3), 299-318. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/08820139.2010.542228>

Richard, G. (2009). *Isolation and Characterization of High Affinity VHH Antibody Fragments Against Alpha-Cobratoxin*. University of Guelph.

Riechmann, L., & Muyldermans, S. (December de 1999). Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *Immunological Methods*, 231(1-2), 25-38.

Rothe, A., Hosse, R., & Power, B. (August de 2006). In vitro display technologies reveal novel biopharmaceutics. *Journal FASEB*, 20(10), 599-610.

Russel, M., Lowman, H., & Clackson, T. (2004). Introduction to phage biology and phage display. In H. Lowman, & T. Clackson, *Phage Display: A practical approach* (pp. 1-26). Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.

Schirrmann, T., Meyer, T., Schutte, M., Frenzel, A., & Hust, M. (10 de January de 2011). Phage Display for the Generation of Antibodies for Proteome Research, Diagnostic and Therapy. *Molecules*, 16, 412-426.

Serruys, B., Van Houtte, F., Farhoudi-Moghadam, A., Leroux-Roels, G., & Vanlandschoot, P. (March de 2010). Production, characterization and in vitro testing of HBcAg specific VHH intrabodies. *Journal General Virology*, 91(Pt 3), 643-652.

Silva, C. L. (1997). *Vacinas Gênicas- Biotecnologia & Desenvolvimento*. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://www.angelfire.com/ak/edudantas/vacinas.html>

Silverton, E., Navia, M., & Davies, D. (November de 1977). Three-dimensional Structure of an Intact Human Immunoglobulin. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*, 74(11), 5140-5144.

Sinoga, C. (1998). *Universidade de Évora*. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de Vectores de Clonagem: www.dbio.uevora.pt/LBM/Foco/Vectores/vectores.html

Skerra, A., Pfitzinger, I., & Pluckthun, A. (March de 1991). The functional expression of antibody fv fragments in E.coli- improved vectors and generally purification technique. *Journal Nature Publishing Company*, 9(3), 273-278.

Smolarek, D., Bertrand, O., & Czerwinski, M. (June de 2012). Variable Fragments of Heavy Chain Antibodies (VHHs): A New Magic Bullet Molecule of Medicine? *Journal Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalnej*, 66, 348-358.

Soares, C., Bettencourt, H., Preto, J., Soares, P., & Lopes, J. (2010). Densidade microvascular e prognóstico de tumores neuro-endócrinos gastro-enteropancreáticos. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 13-30. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de http://www.spedm.org/media/5-Artigos_Originais-SPEDM_Vol-5_numero-2-20121111-171132.pdf

Sommavilla, R. (2010). *Antibody Engineering: advances in phage display technology and in the production of therapeutic immunocytokines*. Dissertation for the degree of Doctor of Sciences, Università degli studi di Padova, Biotecnologie Farmaceutiche, Italy. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:9iEGiMLEImoJ:e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:1694/eth-1694-02.pdf+&hl=pt-PT&gl=pt&pid=bl&srcid=ADGEESjHgH5TrpU_8sNFb1v9N0KCD-Ua8tWY7IYkcv1BFmF7C-1u4i1L0rMhiP6JirqlviEkzMDzOcEtuSKEgpENgBzVB-e-szxz0fPMFnvEA

Stricker, N., & Li, M. (2001). Phage Display Technologies. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-5.

Strokappe, N., Szyndl, A., Aasa-Chapman, M., Gorlani, A., Quigley, A., & Chen, L. (March de 2012). *Llama Antibody Fragments Recognizing Various Epitopes of the CD4bs Neutralize a Broad Range of HIV-1 Subtypes A, B and C*. (Z. Chen, Editor) Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0033298>

Tillib, S. V. (2011). "Camel Nanoantibody" is an Efficient Tool for Research, Diagnostics an Therapy. *Journal Molekuliarnaia Biologija*, 45(1), 77-85.

Tillib, S. V., Ivanova, T. I., & Vasilev, L. A. (2010). Fingerprint-like Analysis of "Nanoantibody" Selection by Phage Display Using Two Helper Phage Variants. *Journal Acta Naturae*, 2(3), 85-

Vaeck, Mark. (February de 2006). Innovation in Pharmaceutical Technology. *The Therapeutic Potential of Nanobodies*, 38-42. Belgium: Ablynx NV.

Vivi, J., Christien, L., Cees, H., & Punt, P. J. (2003). The Production of Antibody Fragments and Antibody Fusion Proteins by Yeast and Filamentous Fungi. *Journal Microbial Cell Factories*, 2(1), 1-15. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de <http://www.microbialcellfactories.com/content/2/1/1>

Vu, K. B., Ghahroudi, M. A., Wyns, L., & Muyldermans, S. (1997). Comparison of llama VH sequence from conventional and heavy chain antibodies. *Journal Molecular Immunology*, 34(16-17), 1121-1131.

Wang, L.-F., & Fu, M. (January de 2004). Epitope Identification and Discovery Using Phage Display Libraries: Applications in Vaccine Development and Diagnostics. *Journal Current Drug Targets*, 5(1), 1-15.

Wesolowski, J., Alzogaray, V., Unger, M., Reyelt, J., Juarez, K., Urrutia, M., . . . Schwarz, N. (August de 2009). Single domain antibodies: Promising therapeutic tools in infection and immunity. *Journal Medical Microbiology and Immunology*, 198(3), 157-174.

Willats, W. G. (20 de August de 2002). Phage Display: Practicalities and Prospects. *Journal Plant Molecular Biology*, 50(6), 837-854.

Woof, J. M., & Burton, R. D. (February de 2004). Human antibody- Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nature Reviews Immunology*, 4, 89-99.

Wu, T. T., Johnson, G., & Kabat, E. A. (May de 1993). Length Distribution of CDRH3 in Antibodies. *Journal Proteins*, 16(1), 1-7.

Zuhaida, A., Swee, Y., Abdul, A., Wan, Y. H., Noorjahan, A., & Muhajir, H. (2012). scFv Antibody: Principles and Clinical Application. (T. Nakayama, Ed.) *Hindawi Publishing Corporation- Clinical and Developmental Immunology*, 1-15. Obtido em 23 de Janeiro de 2013, de http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=2&sqi=2&ved=0CEAQFjAB&url=http%3A%2F%2Fmts.hindawi.com%2Futils%2Fgetacceptedmsfile.aspx%3Fmsid%3D980250%26vnum%3D2%26ftype%3Dmanuscript&ei=mqEBUayhAZSThgX7oGgCA&usg=AFQjCNFg92vBdRDN_Eiezdq