EDUARDO ALIPRANDINI

OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
HUMANOS ANTITETÂNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2015

EDUARDO ALIPRANDINI

OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
HUMANOS ANTITETÂNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Imunologia Aplicada

Orientadora: Dra. Ana Maria Moro

Co-Orientadora: Dra. Silvia Beatriz Boscardin

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Aliprandini, Eduardo.

Obtenção de anticorpos monoclonais humanos antitetânicos /
Eduardo Aliprandini. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Ana Maria Moro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Anticorpos monoclonais humanos recombinantes.

Versão do título para o inglês: Anti-tetanus human monoclonal antibodies.

1. Anticorpos monoclonais humanos 2. Tétano 3. Toxina tetânica 4. Separação single cell 5. Linfócitos B de memória 6. Plasmablastos
I. Moro, Profa. Dra. Ana Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB079/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Eduardo Aliprandini.

Título da Tese: Obtenção de anticorpos monoclonais humanos antitetânicos.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Maria Moro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 24 de novembro de 2011.

PARECER 1028/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 22.11.2011, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Obtenção de anticorpos monoclonais humanos contra toxóide tetânico* " sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. ANA MARIA MORO e o aluno EDUARDO ALIPRANDINI.

Cabe os pesquisadores executantes elaborarem e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **22.11.2012.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Obtenção de Anticorpos Monoclonais Humanos antitoxoide Tetânico", **protocolo nº 1306/14**, sob a responsabilidade de Ana Maria Moro e Eduardo Aliprandini - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 15/4/2015.

This is to certify that the proposal "Human Monoclonal Antibodies Anti-Tetanus Toxoid", **protocol nº 1306/14**, under the responsibility of Ana Maria Moro and Eduardo Aliprandini - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 4/15/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 10/2014 - 03/2016	Nº de animais/espécie	Observação
Laboratório de Biofármacos em células animais	Sem adição de animais	Renovação de vigência

São Paulo, 16 de abril de 2015

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biofármacos em Células Animais do Instituto Butantan, São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Bolsa de doutorado processo n.º 2011/22334-2 e Auxílio à Pesquisa processo n.º 2012/14127-0, e CAPES com a Bolsa de Doutorado – Cota Institucional.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Santo Expedito.

À minha família, meus pais, Paulo e Rosimar e minha irmã Paula, pelo constante apoio e incentivo.

À Prof. Dra. Ana Maria Moro pela confiança, orientação e ensinamentos.

À Prof. Dra. Silvia Beatriz Boscardin pelos ensinamentos e toda ajuda durante o trabalho.

Aos doadores que aceitaram solicitamente o convite para doação de sangue.

Ao Dr. Michel Nussenzweig pela abertura de seu laboratório para o valioso treinamento que fiz com sua equipe, em especial Johannes F. Scheid, Klara Velinzon, Natalia Freund e Anna Gazumyan.

À Daniela Yumi Takata, pela ajuda na execução dos experimentos.

À Dra. Luisa Lina Villa, coordenadora do Instituto de Pesquisa do HPV da Santa Casa pela disponibilização do Citômetro de Fluxo BD FACSAria II e à Prof. Dra. Ana Paula Lepique e Carla Sant Anna Côrrea pela ajuda nos experimentos.

Ao Dr. Sandro Almeida da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela disponibilização do Citômetro de Fluxo FACSCanto II, e à Renata Chaves Albuquerque, pela ajuda nos experimentos com o citômetro.

À médica Sandra Camargo Montebello e equipe da Fundação Pró-Sangue, onde a coleta da bolsa de sangue foi feita.

À equipe do Ambulatório do Instituto Butantan onde foram feitas coletas de sangue de menor volume.

Ao pessoal do laboratório de Biofármacos em Células Animais do Instituto do Butantan pela ajuda nos experimentos em especial ao André, José Marcelino e Mônica pelas purificações da toxina tetânica e anticorpos, e aos demais membros (atuais): Rose, Rosa, Mariana, Angélica, Wagner, Lilian, Mateus, Carla, Daniela, Ana Paula, Zezé, Priscila, Silmara, Cosminiana e Sônia pelas discussões, companhia nos cafés e almoços e/ou pela manutenção da rotina do laboratório, e aos que já passaram pelo laboratório: Maria Teresa, Mariana e Elisa.

À Dra Patricia dos Santos Carneiro por disponibilizar o Infectório onde foi realizado o teste de neutralização *in vivo*, e à Giulia E. de Oliveira Preto, que executou o teste com os animais.

Ao Leonardo S. Kobashi e Aline Cavalher pelos sequenciamentos das amostras de DNA.

Ao Setor de Vacinas Anaeróbias do Instituto Butantan pela disponibilização dos antígenos tetânicos e ao Setor de Soros pelo soro antitetânico.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro com a Bolsa de Doutorado.

"O maior problema do sucesso é que ele faz parecer que a missão foi fácil. Porém, sabemos que só com muito trabalho, dedicação e profissionais excelentes (...) conseguimos chegar aqui. O sucesso não vem do céu, vem do trabalho duro (...)."

Jean-Jacques Dordain, diretor-geral da Agência Espacial Europeia.

"Nenhum homem é uma ilha (...)."
John Donne, poeta.

"Não se preocupa que vai dar certo."

Rosimar Aliprandini
Rozelita Pereira dos Reis
Roselaine Campos Targino
Kelly Amorin
Cosminiana Silva Ferreira
Mateus D. Luchese
Daniela Takata
Ana Paula Lopes da Silva
Angelica Garbuio
Wagner Quintilio
Raquel Hoffman Panatieri
Andre Luis Inocência

...

RESUMO

ALIPRANDINI, E. **Obtenção de anticorpos monoclonais humanos antitetânicos**. 2015. 119 f. - Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Anticorpos monoclonais (AcMos) para uso terapêutico correspondem a uma grande área na indústria de biofármacos pela sua especificidade e segurança no tratamento de câncer, doenças autoimunes, infecciosas e outras condições. AcMos humanos em especial têm importância maior comparado aos murinos, quiméricos ou humanizados pela menor probabilidade de imunogenicidade. Este trabalho teve o objetivo de obter anticorpos monoclonais humanos antitetânicos através da captura de linfócitos B produtores de anticorpos específicos utilizando o antígeno ou pela separação de plasmablastos após vacinação. A separação das células coletada de doadores foi feita por equipamento de *cell sorter*, que depositou uma célula B específica em cada poço em placa de 96 poços. As regiões variáveis dos anticorpos foram amplificadas e clonadas em vetores de expressão, que foram usados para transfectar transitoriamente células HEK293-F. Para a captura dos linfócitos B específicos raros foram usadas estratégias diferentes de marcação e *sorting*. A marcação do receptor dos linfócitos B de memória com anatoxina tetânica biotinilada e estreptavidina-PerCP-CyTM5.5 não foi adequada pois selecionou células inespecíficas, cujos anticorpos não reconheceram a toxina tetânica. A utilização da toxina tetânica conjugada independentemente com dois marcadores diferentes, biotina e Alexa Fluor® 647, possibilitou a separação específica de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos, que foram avaliados por ELISA, *western blotting* e pela inibição da ligação da toxina ao gangliosídeo GT1b. O ensaio *in vivo* mostrou proteção total dos animais quando três anticorpos monoclonais foram usados em conjunto, neutralizando a toxina tetânica e protegendo os animais desafiados com o antígeno.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais humanos. Tétano. Toxina tetânica. Separação *single cell*. Linfócitos B de memória. Plasmablastos.

ABSTRACT

ALIPRANDINI, E. **Anti-tetanus human monoclonal antibodies**. 2015. 119 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Monoclonal antibodies (mAbs) for therapeutic use correspond to a great area of the biopharmaceutical industry based on its specificity and safety for the treatment of cancer, auto-immune, infectious diseases and other health conditions. Human mAbs are especially important compared to murine, chimeric or humanized antibodies because they are less prone to elicit immunogenicity. The objective of this work was to obtain anti-tetanus human monoclonal antibodies through the capture of memory B lymphocytes producing specific antibodies or plasmablasts after vaccination. B cells were collected from donors and separated by a cell sorter equipment that isolated one B cell in each well of a 96-well plate, based on the surface immunostaining. The variable regions of the antibodies variable regions were amplified and cloned in expression vectors which were used for transient transfection of HEK293-F cells. Along the work different labeling and sorting strategies were tested for the capture of the rare specific B cells. The staining of the memory B cell receptor with biotinylated tetanus toxoid and streptavidin-PerCP-CyTM5.5 was found to be not efficient since non-specific cells were selected, producing antibodies not targeted to the tetanus toxin. The staining of the cells with the tetanus toxin labeled independently with two different markers, biotin and Alexa Fluor[®] 647 allowed the separation of specific anti-tetanus antibody producing B lymphocytes. The antibodies expressed were evaluated by ELISA, western blotting and the inhibition of the binding of the tetanus toxin to the ganglioside GT1b. The *in vivo* neutralization assay showed that a pool of three different monoclonal antibodies were able to protect the animals by neutralization of the tetanus toxin when challenged with the antigen.

Keywords: Human monoclonal antibodies. Tetanus. Tetanus toxin. Single cell separation. Memory B cells. Plasmablasts

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura e função da toxina tetânica.....	20
Figura 2 - Representação esquemática de um anticorpo da classe IgG.....	24
Figura 3 - Classificação dos anticorpos terapêuticos quanto à origem do material genético que origina a proteína.....	28
Figura 4 - Maturação dos linfócitos B.....	34
Figura 5 - Estratégia experimental.....	39
Figura 6 - Vetores de expressão das cadeias pesada gama, leve kappa e leve lambda, respectivamente.....	49
Figura 7 - SDS-PAGE, gel redutor da anatoxina tetânica.....	59
Figura 8 - ELISA com avidina-peroxidase para confirmar a presença de biotina ligada à AnT.....	60
Figura 9 - ELISA da AnT com SAT.....	60
Figura 10 - Estratégia de seleção das populações para identificação das células produtoras de anticorpos antitetânicos.....	61
Figura 11 - Gel de agarose 2% representativo dos fragmentos obtidos a partir da RT-PCR dos linfócitos B únicos.....	62
Figura 12 - Titulação do antígeno no formato tetramérico.....	66
Figura 13 - Estratégia de seleção das populações para identificação das células produtoras de anticorpos antitetânicos através do antígeno tetramérico.....	67
Figura 14 - Cromatograma de purificação do anticorpo 307-03 por cromatografia de afinidade em proteína A.....	71
Figura 15 - SDS-PAGE dos anticorpos purificados.....	72
Figura 16 - ELISA qualitativo de ligação dos anticorpos à toxina tetânica.....	73
Figura 17 - Análise da marcação das células com tetrâmero durante o <i>sorting</i>	74
Figura 18 - Perfil eletroforético da toxina e anatoxina tetânicas.....	75
Figura 19 - Cromatograma representativo da amostra de toxina tetânica separada em coluna de SEC-HPLC.....	76
Figura 20 - SDS-PAGE das amostras de toxina tetânica purificadas por SEC-HPLC.....	77
Figura 21 - ELISA qualitativo com avidina-peroxidase de amostras da toxina tetânica biotiniladas.....	78
Figura 22 - Esquema da análise da detecção de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos com as toxinas tetânicas conjugadas.....	79
Figura 23 - Análise da estratégia de marcação de CMSP com toxinas tetânicas conjugadas com Alexa 647 e biotina.....	80
Figura 24 - Esquema de identificação de plasmablastos CD19 ⁺ CD27 ⁺⁺	82

Figura 25 - Esquema de identificação de plasmablastos CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁺	83
Figura 26 - Repertório V _H das sequências dos anticorpos obtidos e quantidade de mutações somáticas.....	88
Figura 27 - ELISA qualitativo de ligação dos anticorpos à toxina tetânica.....	89
Figura 28 - ELISA qualitativo de ligação dos anticorpos à anatoxina tetânica.....	90
Figura 29 - ELISA qualitativo de ligação dos anticorpos com fragmento C recombinante da toxina tetânica..	91
Figura 30 - ELISA qualitativo de ligação dos anticorpos à anatoxina diftérica.....	92
Figura 31 - SDS-PAGE das toxinas tetânicas para <i>western blotting</i>	93
Figura 32 - Filmes representativos dos resultados obtidos no <i>western blotting</i> dos anticorpos monoclonais humanos	94
Figura 33 - Ensaio de inibição da ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b pelos anticorpos monoclonais	96
Figura 34 - Ensaio de inibição da ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b pelo soro antitetânico equino	97
Figura 35 - Ensaio de neutralização da toxina tetânica <i>in vivo</i>	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência de tétano (exceto o neonatal).....	21
Tabela 2 - Esquema de condutas profiláticas de acordo com o tipo de ferimento e situação vacinal.....	22
Tabela 3 - Anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA.....	25
Tabela 4 - Relação dos dez produtos mais vendidos em 2014	27
Tabela 5 - Marcadores de superfície durante o desenvolvimento de linfócitos B	34
Tabela 6 - Concentrações dos componentes de cada reação de PCR	46
Tabela 7 - Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das regiões variáveis das cadeias de imunoglobulinas.....	47
Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados na PCR específica	51
Tabela 9 - Digestão dos produtos de PCR para clonagem.....	52
Tabela 10 - Oligonucleotídeos utilizados para verificação da presença do inserto no vetor de expressão.....	53
Tabela 11 - Valores obtidos na determinação da razão B:P.....	59
Tabela 12 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis obtidos no <i>sorting</i> #1: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas – separação com AnT e SAV.....	64
Tabela 13 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis da cadeia pesada obtidas no <i>sorting</i> #2: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas – separação com AnT e SAV	65
Tabela 14 - Pares de anticorpos obtidos nos <i>sortings</i> das células separadas com tetramero	68
Tabela 15 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis obtidas no <i>sorting</i> #3: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas - separação com antígeno no formato tetramérico	69
Tabela 16 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis obtidas no <i>sorting</i> #4: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas - separação com antígeno no formato tetramérico	70
Tabela 17 - Pares de anticorpos obtidos nos <i>sortings</i> das células separadas com toxina tetânica e dos plasmablastos.....	84
Tabela 18 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis do mesmo doador obtidas pelas estratégias descritas nos <i>sortings</i> #6, #7 e #9: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas - separação de células B de memória com TxT e de plasmablastos.....	85

Tabela 19 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis obtidas no <i>sorting</i> #8: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas - separação de células B de memória com TxT	86
Tabela 20 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis obtidas no <i>sorting</i> #10: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas - separação de plasmablastos	87
Tabela 21 - Resultados da ligação dos anticorpos monoclonais nos ensaios ELISA, inibição da ligação ao GT1b e <i>western blotting</i>	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo	Anticorpo monoclonal
AnD	Anatoxina diftérica
AnT	Anatoxina tetânica
AnT-B	Anatoxina tetânica biotinilada
Anti-TT	Antitetânico
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APC-Cy TM 7	<i>Allophycocyanin-Cyanine7</i>
B:P	Razão Biotina:Proteína
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDR	<i>Complementarity Determining Regions</i>
CMSP	Célula mononuclear de sangue periférico
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
HABA	Ácido 4-hidroxiazobenzeno-2-carboxílico
HAMA	Anticorpos humanos antianticorpos murinos
IgH	Cadeia pesada de imunoglobulina
IGHAT	Imunoglobulina humana hiperimune antitetânica
Ig γ	Cadeia pesada gama de imunoglobulina
Ig κ	Cadeia leve kappa de imunoglobulina
Ig λ	Cadeia leve lambda de imunoglobulina
kDa	kilo Dalton
LD ₅₀	Dose letal média
PB	Plasmablastos
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PEI	Polietilenimina
PerCP-Cy TM 5.5	<i>Peridinin-Chlorophyll-Cyanine 5.5</i>
SAT	Soro Antitetânico Equino [composto da fração F(ab') ₂]
SAv	Estreptavidina (<i>Streptavidin</i>)
SEC-HPLC	Cromatografia de exclusão molecular – Cromatografia líquida de alta desempenho
SEMS	Marcação Múltipla de Epítipo Único (<i>Single Epitope Multiple Staining</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TT	Toxoide tetânico
TT-B	Toxoide tetânico biotinilado
TxT/TTx	Toxina tetânica
TxT-B	Toxina tetânica biotinilada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Tétano	19
1.2	Anticorpos	23
<i>1.2.1</i>	<i>Anticorpos Monoclonais</i>	25
<i>1.2.1.1</i>	<i>Hibridomas</i>	28
<i>1.2.1.2</i>	<i>Hibridomas humanos</i>	29
<i>1.2.1.3</i>	<i>Imortalização de Linfócitos B</i>	29
<i>1.2.1.4</i>	<i>Humanização de anticorpos murinos</i>	30
<i>1.2.1.5</i>	<i>Phage display</i>	30
<i>1.2.1.6</i>	<i>Camundongos transgênicos</i>	31
<i>1.2.1.7</i>	<i>Anticorpos Monoclonais Recombinantes Humanos</i>	31
1.3	Linfócitos B	32
1.4	Justificativa para este trabalho	35
2	OBJETIVO	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Estratégia experimental	39
3.2	Materiais utilizados	39
3.3	Obtenção do antígeno conjugado	40
<i>3.3.1</i>	<i>Conjugação com biotina</i>	40
<i>3.3.1.1</i>	<i>Ensaio para detecção da biotina conjugada à proteína</i>	40
<i>3.3.1.2</i>	<i>Ensaio de ligação do soro antitetânico à AnT biotinilada</i>	41
<i>3.3.2</i>	<i>Conjugação com Alexa Fluor® 647</i>	41
3.4	Purificação da toxina tetânica	42
3.5	Dosagem de proteína – Método de Bradford	42
3.6	Amostras clínicas	42
3.7	Separação de células únicas	43
<i>3.7.1</i>	<i>Enriquecimento dos linfócitos B</i>	43
<i>3.7.2</i>	<i>Estratégias de marcação das células</i>	43

3.7.2.1 Detecção de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos por citometria de fluxo	44
3.7.3 Separação de células únicas - sorting.....	44
3.8 RT-PCR	45
3.9 Quantificação dos produtos de PCR.....	47
3.10 Sequenciamento e análise das sequências de DNA das imunoglobulinas	48
3.11 Clonagem das regiões variáveis.....	48
3.11.1 Bactérias <i>E. coli</i> DH5α quimiocompetentes	48
3.11.2 Vetores	49
3.11.3 Clonagem dos fragmentos da cadeia variável	50
3.11.4 Ligação	52
3.11.5 PCR das colônias	53
3.12 Expressão e purificação dos anticorpos.....	54
3.13 Ensaio de ligação dos anticorpos monoclonais a diferentes antígenos – ELISA.....	55
3.14 SDS-PAGE	55
3.15 Ensaio de ligação dos anticorpos monoclonais à toxina tetânica e suas frações - Western blotting	55
3.16 Ensaio de inibição da ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b pelos AcMos	56
3.17 Ensaio de neutralização <i>in vivo</i>.....	57
4 RESULTADOS.....	59
4.1 Estratégia 1: Separação dos linfócitos B com anatoxina tetânica	59
4.1.1 Conjugação da AnT com biotina	59
4.1.2 Marcação com AnT-B e Streptavidina	61
4.1.2.1 Separação de células B únicas	61
4.1.2.2 RT-PCR.....	61
4.1.2.3 Análise das sequências de DNA das imunoglobulinas	63
4.1.3 Marcação com antígeno em formato tetramérico	66
4.1.3.1 Separação de linfócitos B - antígeno em formato tetramérico.....	66
4.1.3.2 RT-PCR	68
4.1.3.3 Análise das sequências de DNA das imunoglobulinas	68
4.1.3.4 Clonagem, expressão e purificação dos anticorpos	71
4.1.3.5 Integridade dos anticorpos - SDS-PAGE.....	72

4.1.3.6	Ensaio de ligação ao antígeno - ELISA	72
4.1.3.7	Análise da especificidade da marcação dos anticorpos na etapa de <i>sorting</i> - <i>Backgating</i>	73
4.2	Estratégia 2: Separação dos linfócitos B com toxina tetânica e de plasmablastos...	75
4.2.1	<i>Toxina tetânica</i>	75
4.2.2	<i>Conjugação toxina tetânica com biotina e Alexa Fluor® 647</i>	77
4.2.3	<i>Determinação da população de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos</i> ..	78
4.2.4	<i>Separação de células B únicas</i>	81
4.2.4.1	Marcação com toxina tetânica	81
4.2.4.2	Marcação de plasmablastos.....	81
4.2.5	<i>RT-PCR</i>	84
4.2.6	<i>Análise das sequências de DNA das imunoglobulinas</i>	84
4.2.7	<i>Ensaio de ligação aos antígenos - ELISA</i>	89
4.2.8	<i>Western blotting</i>	93
4.2.9	<i>Ensaio de inibição da ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b pelos anticorpos monoclonais</i>	96
4.2.10	<i>Ensaio de neutralização in vivo</i>	97
5	DISCUSSÃO	101
6	CONCLUSÕES	109
7	PERSPECTIVAS	111
	REFERÊNCIAS	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tétano

O tétano é uma doença neurológica causada pela toxina da bactéria *Clostridium tetani*, um bacilo gram-positivo esporulado presente em grande quantidade no solo, instrumentos enferrujados e poeira (COLLINGRIDGE; DAVIES, 1982). A toxina tetânica (TxT) ativa é uma proteína composta por uma cadeia leve (cerca de 50 kDa) e uma pesada (100 kDa) ligadas por pontes dissulfeto. Sua síntese no citoplasma da bactéria ocorre como uma cadeia polipeptídica única. Quando transportada para o exterior, ocorre quebra da cadeia por enzimas presentes na parede celular do *C. tetani* gerando as cadeias pesada e leve mencionadas acima (BIZZINI, 1979; MATSUDA, MORIHIRO; YONEDA, 1974). A ação da TxT ocorre em neurônios medulares. Uma fração da cadeia pesada, conhecida como domínio C, é responsável pela ligação ao neurônio através da sua interação com gangliosídios presentes na membrana. Gangliosídios são glicoesfingolipídeos complexados com ácido siálico (CHEN et al., 2009). Outro domínio (domínio B) da cadeia pesada tem função na translocação, que ajuda a toxina a atravessar a membrana neuronal. Depois de internalizada a TxT é transportada de forma retrógrada até neurônios da medula espinhal. A cadeia leve (domínio A) contém motivo de ligação de zinco que é responsável pela ação proteolítica sobre um complexo presente nas vesículas sinápticas chamado VAMP/sinaptobrevina. VAMP, quando intacta, tem a função de favorecer a aproximação e fusão da vesícula à membrana pré-sináptica, garantindo a liberação dos neurotransmissores inibitórios na sinapse (SCHIAVO et al., 1992a, 1992b). Assim, a principal ação da TxT envolve o bloqueio da liberação de neurotransmissores inibitórios (glicina e GABA-ácido- γ -aminobutírico) em neurônios medulares (HUMEAU et al., 2000). Como resultado, causa hipertonia muscular mantida, hiperreflexia e espasmos. A Figura 1 esquematiza a estrutura da TxT.

A dose letal tóxica (LD₅₀) da toxina em camundongos é entre 0,1 e 1 ng/kg de peso corporal. A sensibilidade em humanos para essa toxina é similar à dos camundongos. É uma das substâncias mais tóxicas que se conhece (SCHIAVO; MATTEOLI; MONTECUCCO, 2000).

Figura 1 - Estrutura e função da toxina tetânica

Em (a): estrutura representativa de toxina tetânica e seus domínios. Toxina intracelular composta de uma única cadeia polipeptídica e toxina extracelular, com a cadeia clivada e as subunidades ligadas por ponte dissulfeto. A estrutura após tratamento com papaína mostra o sítio de clivagem para liberação do fragmento C. Em (b), estão representados os domínios e suas funções, mostrando que a atividade de metaloprotease zinco-dependente do fragmento A é vista após redução da ponte dissulfeto, que ocorre no citoplasma do neurônio. Em (c): esquema da ação da toxina sobre sinaptobrevina, impedindo a fusão das vesículas contendo neurotransmissores. SNAP-25, syntaxina e sinaptotagmina são proteínas envolvidas na fusão da vesícula à membrana.

Fonte: RAPPUOLI (1997)

A letalidade causada pelo tétano chega a 30% e atinge principalmente os menores de cinco anos e os idosos (Ministério da Saúde, 2005). Em indivíduos idosos, observa-se maior número de pessoas sem proteção vacinal. Um estudo publicado em 2006 avaliou a imunidade de 98 idosos de um asilo em São Paulo, SP, com média de idade de 84 anos através da dosagem de anticorpos antitetânicos (anti-TT). O resultado mostrou que 94% dos indivíduos

testados eram suscetíveis ao tétano e, após uma dose reforço da vacina do tétano, esse número diminuiu para 79%, ainda considerado preocupante (WECKX et al., 2006).

A Tabela 1 mostra dados dos casos confirmados de tétano no Brasil.

Tabela 1 - Incidência de tétano (exceto o neonatal)

Casos confirmados por região

Ano	Região Norte	Região Nordeste	Região Sudeste	Região Sul	Região Centro-Oeste	Total	Cura	Óbito	Ign/ Branco	Óbito por outra causa
2010	29	109	59	66	25	288	145	88	51	4
2011	44	133	72	54	32	335	188	101	39	7
2012	42	108	70	55	44	319	176	108	31	4
2013	37	60	64	59	62	282	152	92	32	6
2014	41	89	65	46	32	273	148	75	45	5
2015	10	24	26	16	7	83	31	22	28	2
TOTAL	203	523	356	296	202	1580				

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2015b)

1. Situação da base de dados de julho/2015
2. Excluídos casos não residentes no Brasil
3. Informações referentes a tétano acidental, apenas.

A incidência de tétano neonatal está diminuindo no Brasil. Em 2001 foram registrados 27 casos em todo o país, o que é considerado eliminação da doença, pois equivale a menos de um caso por 1000 nascidos vivos (FUNASA, 2001). Em 2012 (último registro encontrado) foram registrados dois casos no Brasil, um no Pará e outro em Minas Gerais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015a).

Um estudo feito em São Paulo mostrou que 3% da população não apresenta proteção contra o tétano (nível de anticorpo $< 0,01$ UI/mL) e em 18%, a quantidade de anticorpos circulantes no sangue está entre 0,01 e 0,1 U/mL, o que representa nível basal de proteção (DIVINO-GOES et al., 2007).

A imunidade contra a toxina é provida pela vacinação e a doença não confere imunidade ao paciente, já que a T_xT é um imunógeno fraco. O que garante a imunogenicidade do toxoide na vacina é a presença do adjuvante, que pode ser o gel de hidróxido de alumínio, como no caso da vacina produzida pelo Instituto Butantan (BRASIL, 2010; LINDLEY-JONES; LEWIS; SOUTHGATE, 2004). A toxina é obtida a partir do cultivo da bactéria, filtração tangencial e destoxificação por tratamento com formaldeído e glicina durante 30 dias, gerando a AnT, que passa então por cromatografia em gel filtração (PRADO, 2008). Há mais de uma apresentação da vacina contra tétano: a vacina tríplice bacteriana DTP contra difteria, tétano e coqueluche, a vacina dupla bacteriana contra difteria e tétano tipo infantil (DT) que contém a mesma quantidade de toxoide diftérico e tetânico, e dupla do tipo adulto (dT) que contém menor quantidade do toxoide diftérico, além da vacina contendo somente o toxoide tetânico (TT) que é usada na falta da dT. O esquema de vacinação básico é composto

de três doses após o nascimento com a vacina DTP, com doses um, quatro e seis meses após o nascimento, e outra 15 meses após o nascimento. Aos 10 anos de idade é aplicada a vacina dT que deve ser repetida a cada 10 anos. Em caso de gravidez ou ferimentos de alto risco para tétano (ver Tabela 2), deve-se aplicar dose de reforço se decorridos cinco anos ou mais da última dose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A perfuração da pele com objetos contaminados está entre as principais causas para a evolução para tétano. Dentre os procedimentos para a profilaxia nos casos de ferimentos com alto risco de tétano que incluem ferimentos profundos ou superficiais sujos, queimaduras, mordeduras, entre outras, está a utilização do soro antitetânico equino (SAT), ou a imunoglobulina humana hiperimune antitetânica (IGHAT). A Tabela 2 mostra o esquema de tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde em casos de acidentes com risco de tétano.

Tabela 2 - Esquema de condutas profiláticas de acordo com o tipo de ferimento e situação vacinal

História de vacinação prévia contra tétano	Ferimentos com risco mínimo de tétano*			Ferimentos com alto risco de tétano**		
	Vacina	SAT/IGHAT	Outras condutas	Vacina	SAT/IGHAT	Outras condutas
Incerta ou menos de 3 doses	Sim*	Não	Limpeza e desinfecção, lavar com soro fisiológico e substâncias oxidantes ou antissépticas e debridar o foco de infecção	Sim***	sim	Desinfecção, lavar com soro fisiológico e substâncias oxidantes ou antissépticas e remover corpos estranhos e tecidos desvitalizados. Debridar o ferimento e lavar com água oxigenada
3 doses ou mais, sendo a última dose há menos de 5 anos	Não	Não	-	Não	Não	-
3 ou mais doses, sendo a última dose há mais de 5 anos e menos de 10 anos	Não	Não	-	Sim (1 reforço)	Não****	-
3 ou mais doses, sendo a última dose há 10 ou mais anos	Sim	Não	-	Sim (1 reforço)	Não****	-

*Ferimentos superficiais, limpos, sem corpos estranhos ou tecidos desvitalizados.

**Ferimentos profundos ou superficiais sujos, com corpos estranhos ou tecidos desvitalizados; queimaduras; feridas puntiformes ou por armas brancas e de fogo; mordeduras; politraumatismos e fraturas expostas.

***Vacinar e aprazar as próximas doses, para complementar o esquema básico. Esta vacinação visa proteger contra o risco de tétano por outros ferimentos futuros. Se o profissional que presta o atendimento suspeita que os cuidados posteriores com o ferimento não serão adequados, deve considerar a indicação de imunização passiva com SAT ou IGHAT. Quando indicado o uso de vacina e SAT ou IGHAT, concomitantemente, devem ser aplicados em locais diferentes.

****Para paciente imunodeprimido, desnutrido grave ou idoso, além do reforço com a vacina está também indicada IGHAT ou SAT.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2005)

O SAT é obtido a partir da inoculação do toxoide tetânico em cavalos. Após a completa imunização dos animais, um volume de plasma é colhido por aférese, de onde é processado o soro que contém os anticorpos anti-TT. Os anticorpos são digeridos com pepsina

para geração da fração $F(ab')_2$, que compõe o produto final. A IGHAT corresponde a imunoglobulinas de cadeia completa obtidas a partir de uma mistura de plasma de doadores imunizados contra o tétano. Ambos os tratamentos podem ser administradas aos pacientes e têm a função de se ligar à toxina e neutralizá-la antes da internalização no neurônio. Nos casos em que o SAT é administrado, a proteção dura uma semana em média. A IGHAT é indicada em casos de hipersensibilidade ao soro heterólogo ou história pregressa de alergia ou reação de hipersensibilidade ao uso de outros soros heterólogos (FUNASA, 2001). O uso de imunoglobulinas humanas, ainda que devidamente testadas quanto à presença de vírus contaminantes, não é completamente isento de riscos devido ao potencial de conter vírus emergentes ou ainda não detectáveis.

Não existe opção disponível de tratamento de tétano com anticorpos monoclonais. Uma característica importante destes é a reprodutibilidade entre os diferentes lotes, já que sua produção não depende da resposta humoral do doador, como no caso do soro equino e humano, além da especificidade da ligação ao alvo.

Além do tratamento com anticorpos, o paciente recebe antibióticos para combater a infecção da bactéria que pode permanecer no local do ferimento. São utilizados medicamentos miorrelaxantes como diazepam e outros agonistas GABAérgicos para controlar espasmos, permitir ventilação e reduzir dores. É também recomendada a vacinação com toxoide tetânico (LISBOA et al., 2011)

1.2 Anticorpos

Os anticorpos são moléculas secretadas por linfócitos B cuja região de reconhecimento do antígeno é igual à do receptor expresso na membrana. São formados por dois dímeros, cada um formado por uma cadeia pesada e uma leve. Ambas as cadeias são divididas em duas regiões, uma variável que é diferente em cada anticorpo e uma região constante. A região constante determina a classe e subclasse a qual o anticorpo pertence. As classes, conhecidas como isotipos podem ser IgM (cadeia constante μ), IgG (γ), IgA (α), IgE (ϵ) e IgD (δ), sendo que cada cadeia confere funções efetoras distintas. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve formam, em conjunto, o sítio de ligação ao antígeno. Cada cadeia leve contém três regiões chamadas de Regiões Determinantes de Complementaridade – CDRs (do inglês, *Complementarity Determining Regions*). São segmentos hipervariáveis que interagem com o antígeno quando o anticorpo está na conformação nativa. As regiões que flanqueiam os CDRs são chamadas de *frameworks*, que são arcabouços envolvidos na

conformação e exposição dos CDRs para interação com o antígeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A cadeia pesada de uma IgG (50 kDa) é formada por quatro regiões, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} que correspondem à região constante e V_H , que corresponde à região variável. A cadeia leve (25 kDa) é composta de uma região constante, C_L , e uma variável, V_L . A Figura 2 mostra a estrutura esquematizada de um anticorpo da classe IgG.

Figura 2 - Representação esquemática de um anticorpo da classe IgG

Em a, estrutura do anticorpo. Composta de dois dímeros, cada um composto de uma cadeia pesada (em azul) e uma leve (em laranja). A estrutura é mantida por pontes dissulfeto (linhas pontilhadas). As regiões constantes formam a região Fc que confere funções para o anticorpo como fixação de complemento ou ligação em receptores de Fc. A região Fab compreende as regiões variáveis e C_{H1} da cadeia pesada ou C_L da cadeia leve. É o local de ligação ao antígeno (Fab – *Fragment antigen-binding*) onde estão as CDR (*Complementarity Determining Regions* – Regiões Determinantes de Complementaridade). São as regiões de interação direta com o antígeno, e são sustentadas pelas regiões do arcabouço (*framework*). Em b, fragmentos obtidos a partir de digestão enzimática com pepsina [$F(ab')_2$], papaína (Fab') ou por técnicas de engenharia genética (ScFv, em que as cadeias variáveis são expressas como uma cadeia única).

Fonte: HANSEL et al. (2010) e PEER et al. (2007)

Existem dois tipos de cadeia leve: cadeia kappa (κ – gene localizado no cromossomo 2) e lambda (λ – gene localizado no cromossomo 22) que são diferenciadas pela região C_L . Em seres humanos, a relação entre cadeias kappa e lambda no repertório geral de anticorpos é de cerca de 60% kappa e 40% lambda (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; MCBRIDE et al., 1982).

1.2.1 Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais (AcMos) são ferramentas importantes para tratamento e diagnóstico por sua especificidade de ligação ao antígeno e produção homogênea em grandes quantidades. Os estudos com anticorpos ganharam grande incentivo na década de 70 quando foi desenvolvida a técnica de produção de hibridomas (KÖHLER; MILSTEIN, 1976). Através dessa técnica é possível imortalizar uma célula produtora de um anticorpo de interesse pela sua fusão com uma célula de mieloma de origem murina. O produto dessa fusão chama-se hibridoma, passível de ser cultivado *in vitro* e produzir os AcMos selecionados. A tecnologia dos hibridomas trouxe avanços importantes nas pesquisas relacionadas ao tratamento e diagnóstico de diversas patologias. A área de diagnóstico tem uma linha divisória antes e após a introdução de AcMos, de forma isolada ou em kits. A abordagem terapêutica dirigida ao alvo, proporcionada pelos AcMos, necessitou de outra onda de inovação em pesquisa, criando os anticorpos quiméricos ou humanizados. Há mais de quarenta AcMos aprovados pelo FDA para o tratamento de rejeição aos transplantes, câncer de mama, colorretal, linfoma, leucemia, esclerose múltipla, entre outras (Tabela 3) (DEFFAR et al., 2009; FDA, 2015; REICHERT, 2012).

Tabela 3 - Anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA

Nome Comercial	Nome Genérico	Alvo	Origem	Ano de aprovação (FDA)	Indicação
Orthoclone	Muromonab	CD3	Murino	1986	Rejeição a transplantes
Reopror	Abciximab	GPIIb, IIIa	Quimérico/ fragmento Fab	1994	Angioplastia de alto risco
Prostascint	Capromab Pendetide	Antígeno prostático específico de membrana	Murino	1996	Diagnóstico por imagem de câncer de próstata
Rituxan	Rituximab	CD20	Quimérico	1997	Linfoma não-Hodgkins e artrite reumatoide
Zenapax	Daclizumab	CD25	Humanizado	1997	Rejeição a transplantes
Herceptin	Trastuzumab	HER-2	Humanizado	1998	Câncer de mama
Remicade	Infliximab	TNF- α	Quimérico	1998	Doença de Crohn's
Simulect	Basiliximab	CD25	Quimérico	1998	Rejeição a transplantes
Synagis	Palivizumab	Proteína F do RSV	Humanizado	1998	Infecção por RSV
Mylotarg	Gemtuzumab	CD33	Humanizado	2000	Leucemia mieloide aguda
Campath	Alemtuzumab	CD52	Humanizado	2001	Leucemia linfocítica crônica, linfoma de células T

Tabela 3, continuação.

Humira	Adalimumab	TNF- α	Humano	2002	Inflamações, principalmente autoimunes (AR, artrite psoriática, artrite Morbus Crohn)
Zevalin	Ibritumomab tiuxetan	CD20	Murino	2002	Linfoma não-Hodgkin's
Bexxar	Tositumomab	CD20	Murino	2003	Linfoma não-Hodgkin's
Xolair	Omalizumab	IgE	Humanizado	2003	Asma alérgica severa
Avastin	Bevacizumab	VEGF	Humanizado	2004	Cânceres colorretal e mamário metastáticos, câncer de pulmão <i>non-small cell</i>
Erbix	Cetuximab	EGFR	Quimérico	2004	Câncer colorretal, de cabeça e pescoço
Tysabri	Natalizumab	Subunidade $\alpha 4$ de $\alpha 4\beta 1$	Humanizado	2004	Esclerose múltipla, doença de Crohn's
Lymphacide	Epratuzumab	CD22	Humanizado	2005	Linfoma não-Hodgkin's
Orencia	Abatacept	CTLA-4	Fragmento humanizado	2005	Artrite reumatoide
Lucentis Tm	Ranibizumab	VEGF-A	Fab humanizado	2006	Degeneração macular
Vectibix	Panitumumab	EGFR	Humano	2006	Carcinoma metastático colorretal
Soliris	Eculizimab	CD59	Humanizado	2007	Hemoglobinúria paroxística noturna
Benlysta	Bertilimumab	Proteína eotaxin 1	Humano	2008	Alergia
CAT-192	Metelimumab	TGF $\beta 1$	Humano	2008	Dye-sensitized solar cell
Cimzia	Certolizumab	TNF- α	Fab humanizado	2008	Morbus Crohn, artrite reumatoide
Humax CD4	Zanolimumab	CD4	Humano	2008	Linfoma de células T cutâneo e não-cutâneo
Arzerra	Ofatumumab	CD20	Humano	2009	Leucemia linfocítica crônica
Ilaris	Canakinumab	IL- $\beta 1$	Humano	2009	CAPS (Síndromes Periódicas Associadas à Criopirina)
Simponi	Golimumab	TNF- α	Humano	2009	Artrite reumatoide e psoriática
Stelara	Usteninumab	Subunidade p40 de IL-12 e IL-23	Humano	2009	Psoríase
Actemra	Tocilizumab	Receptor de IL-6	Humanizado	2010	Artrite reumatoide
Prolia	Denosumab	RANK-L	Humano	2010	Mieloma múltiplo, osteoporose pós-menopausa
Adcetris	Brentoximab vedotin	CD30	Humano	2011	Linfoma Hodgkin
Yervoy	Ipilimumab	CTLA-4	Humano	2011	Melanoma
Perjeta	Pertuzumab	HER2	Humanizado	2012	Câncer de mama
Raxibacumab	Raxibacumab	Toxina do antrax	Humano	2012	Profilaxia do antrax inalado
Gazyva	Obinutuzumab	CD20	Humanizado	2013	Leucemia linfocítica crônica
Kadcyla	Ado-trastuzumab emtansine	Receptor HER2/neu	Humanizado	2013	Câncer de mama
Blinicyto	Blinatumomab	CD19	Murino	2014	Leucemia linfoblástica aguda
Cyramza	Ramucirumab	Receptor 2 de VEGF	Humano	2014	Tumores sólidos (adenocarcinoma gástrico, carcinoma pulmonar de não células pequenas)
Entyvio	Vedolizumab	Integrina $\alpha 4\beta 7$	Humanizado	2014	Colite ulcerativa e doença de Crohn
Keytruda	Pembrolizumab	Receptor PD-1	Humanizado	2014	Melanoma metastático
Sylvant	Siltuximab	IL-6	Quimérico (camundongo/humano)	2014	Câncer metastático renal, câncer de próstata
Cosentyx	Secukinumab	IL17A	Humano	2015	Psoríase
Opdivo	Ado-trastuzumab emtansine	Receptor HER2/neu	Humanizado	2015	Câncer de mama
Unituxin	Dinutuximab	GD2 (glicolipídio disialogangliosídeo)	Quimérico	2015	Neuroblastoma

Fonte: Adaptado de DEFFAR et al (2009); REICHERT (2012) e FDA (2015)

O mercado de anticorpos monoclonais atrai muitos investimentos para pesquisa e desenvolvimento dessas moléculas para terapia de diversas doenças. Em 2014, metade dos 10 medicamentos de maior venda eram anticorpos monoclonais (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação dos dez produtos mais vendidos em 2014

10 produtos mais vendidos em 2014					
Rank	Produto	Companhia	Subcategoria terapêutica	Tecnologia	Vendas mundiais (milhões dólares)
1	Avastin (bevacizumabe)	Roche	AcMo antineoplásico	AcMo	9.232
2	Humira (adalimumab)	Abbott + Eisai	Antirreumático	AcMo	9.134
3	Rituxan (rituximab)	Roche	AcMo antineoplásico	AcMo	7.815
4	Enbrel (etanercept)	Wyeth + Amgen + Takeda	Antirreumático	Produto recombinante	6.583
5	Latinos (insulina glargina)	Sanofi-Aventis	Antidiabético	Produto recombinante	6.386
6	Herceptin (trastuzumab mtansine)	Roche	AcMo antineoplásico	AcMo	5.796
7	Crestor (rosuvastatina)	AstraZeneca	Anti-hiperlipidêmico	Química de moléculas pequenas	5.739
8	Spiriva (brometo de tiotrópio)	Boehringer Ingelheim	Anticolinérgico	Química de moléculas pequenas	5.552
9	Remicade (infliximab)	SGP + J&J + Mitsubishi Tanabe	Antirreumático	AcMo	5.220
10	Gleevec/Glivec (imatinib)	Novartis	Citostático	Química de moléculas pequenas	5.136

Fonte: EVALUATE (2015)

A imunoterapia é comprovadamente eficiente quando se conhece o antígeno e se dispõe de anticorpos que o reconhecem e exercem alguma função, seja citotóxica, bloqueio de vias de sinalização, adjuvante ou neutralizante. Devido ao interesse e potencial terapêutico comprovado dos anticorpos, há um investimento contínuo para torná-los mais eficazes e seguros. Um desafio consiste na produção de moléculas terapêuticas bem toleradas pelos pacientes, principalmente no que diz respeito à imunogenicidade da molécula. A Tabela 3 mostra que existem anticorpos monoclonais oriundos de diferentes tecnologias ou organismos, sendo que isso reflete no reconhecimento da molécula terapêutica pelo paciente. Além de reações de hipersensibilidade à proteína de origem heteróloga, a geração de anticorpos contra a imunoglobulina pode influenciar na farmacocinética e comprometer o tratamento. A Figura 3 mostra a evolução dos anticorpos quanto à origem do material genético usado na expressão da proteína, com a correlação com o potencial imunogênico.

Figura 3 - Classificação dos anticorpos terapêuticos quanto à origem do material genético que origina a proteína.

As técnicas originais de obtenção de anticorpos monoclonais geravam anticorpos com toda a estrutura proteica oriunda de DNA murino. Com o progresso nas técnicas de engenharia genética, foi possível o desenvolvimento de anticorpos com a estrutura mais próxima aos dos anticorpos humanos, com consequente diminuição da imunogenicidade. Anticorpos quiméricos são gerados com a substituição das regiões constantes murinas pelas humanas. Os anticorpos humanizados contêm somente as regiões determinantes de complementaridade de origem murina. Os termos descritos nos quadros indicam a nomenclatura de acordo com a origem do anticorpo.

Fonte: RUULS et al., 2008

A seguir, estão descritas as tentativas principais de obtenção de anticorpos monoclonais:

1.2.1.1 Hibridomas

A tecnologia de hibridomas, descrita acima, possibilitou a produção de AcMos, porém permanece o fato de serem heterólogos, de origem murina. Na tentativa de evitar a formação de anticorpos antianticorpos murinos (HAMA, do inglês *Human anti-murine antibody*), foram desenvolvidas técnicas para produzir AcMos menos imunogênicos. A primeira alternativa tecnológica consistiu na geração de anticorpos quiméricos, formados pela junção da região constante humana com a região variável murina, para cada cadeia, leve e pesada, do anticorpo. Através de engenharia genética, transferiram-se os genes responsáveis pela expressão da região variável oriundos de um hibridoma murino para um vetor que codificava a região constante de uma imunoglobulina humana (MORRISON et al., 1984). A

técnica é bastante satisfatória, com a geração de uma molécula menos imunogênica que a imunoglobulina murina (SWANN et al., 2008).

1.2.1.2 Hibridomas humanos

Mesmo com a limitação da fonte de linfócitos e impossibilidade de imunizar humanos com qualquer molécula, houve tentativas de produzir hibridomas humanos, sem o mesmo sucesso obtido com hibridomas murinos. Um dos motivos metodológicos deveu-se ao fato de que não se obteve uma célula de mieloma humano adequada para a fusão com o linfócito B de interesse (JESSUP et al., 2000). As células de mieloma mostraram-se difíceis de serem estabelecidas para cultivo nas condições necessárias para a fusão. As células linfoblastoides, obtidas pela immortalização dos linfócitos B pelo vírus Epstein-Barr, são mais fáceis de cultivar, e são uma opção para realizar a fusão. Porém, a dificuldade na geração de híbridos com mutação passível de seleção e com produção constante de anticorpos são desvantagens dos hibridomas formados a partir das células linfoblastoides (COLE et al., 1984).

1.2.1.3 Imortalização de Linfócitos B

Surgiu com intuito de manter a célula em cultivo por períodos prolongados e a produção de AcMos humanos. A obtenção dessas células é feita pela transformação de linfócitos com vírus Epstein-Barr, que induz ativação metabólica, transformações morfológicas, proliferação e imortalização (YENAMANDRA et al., 2009). Os resultados dessa técnica mostraram-se insatisfatórios, pois as células transformadas mostram crescimento instável, baixa secreção de anticorpos, além de perder a capacidade de produzir o anticorpo específico após períodos em cultivo (JESSUP et al., 2000; RODER; COLE; KOZBOR, 1986). Verificou-se que a proteína LMP1 do vírus Epstein-Barr inativa o fator de transcrição BLIMP1 α que é necessário para diferenciação para plasmócitos, que são as células secretoras de anticorpos (VRZALIKOVA et al., 2011). Ao mesmo tempo, a expressão de BLIMP1 α pode promover a indução do ciclo lítico do vírus (REUSCH et al., 2015). Assim, a instabilidade dessas células imortalizadas pode ser explicada pela incompatibilidade dos dois eventos: infecção e maturação da célula.

1.2.1.4 Humanização de anticorpos murinos

Para diminuir a imunogenicidade dos AcMos murinos, uma abordagem de sucesso é a metodologia de humanização dos mesmos. Esta técnica pode ser feita com a transferência de CDRs (do inglês, *Complementarity Determining Regions*) de um anticorpo murino para as porções intercaladas do arcabouço das regiões variáveis das cadeias pesada e leve de origem humana. Nesse processo, conhecido como Transplante de CDR, as regiões variáveis contendo arcabouço humano e CDRs murinos são ligadas a regiões constantes de origem humana. Dessa forma, obtêm-se AcMos humanizados formados pela região constante de uma imunoglobulina humana e uma região variável desenhada de forma que sua sequência seja a mais próxima possível da região variável da imunoglobulina humana (STUDNICKA et al., 1994). Trata-se de técnica complexa, que frequentemente leva à obtenção de anticorpos que perdem a afinidade pelo antígeno pela desestruturação do arcabouço que sustenta as CDRs. Nesse caso são necessários estudos estruturais para a conservação da ligação com o antígeno. Grande parte dos anticorpos monoclonais aprovados para uso em seres humanos é obtido em forma humanizada (ver Tabela 3).

1.2.1.5 *Phage display*

Essa técnica gera uma biblioteca de sequências a partir da amplificação das regiões variáveis dos anticorpos de linfócitos B humanos ou de hibridomas. As sequências são clonadas em vetores específicos que podem expressar as regiões variáveis na forma de fragmentos scFv ou Fab fusionados à proteína de um bacteriófago de *Escherichia coli*. São construídas bibliotecas com diversas sequências que podem ser triadas de acordo com a interação do fragmento do anticorpo expresso com o antígeno de interesse em um processo chamado de *panning*, em que os bacteriófagos gerados são incubados em placas de ELISA com o antígeno imobilizado, por exemplo (McCAFFERTY et al., 1990; HAMMERS; STANLEY, 2013; MURATA et al., 2013).

O primeiro AcMo humano terapêutico aprovado para uso humano, Adalimumab, contra TNF α , foi obtido utilizando esta técnica, em um processo conhecido como humanização por seleção guiada. A partir de uma biblioteca de fagos, uma sequência da cadeia pesada e uma da leve de anticorpos humanos foram escolhidas para formar o anticorpo humano. A escolha foi baseada no pareamento das cadeias humanas da biblioteca com as do anticorpo murino anti-TNF α e seleção contra o antígeno (OSBOURN; GROVES; VAUGHAN, 2005). Posteriormente, as sequências do anticorpo humano escolhidas foram

transfectados em células de mamífero para obtenção de linhagem estável produtora do AcMo humano (ABBVIE CORPORATION, 2004).

1.2.1.6 Camundongos transgênicos

Outra tentativa de obtenção de AcMos “mais humanos” deveu-se à geração de camundongos transgênicos, nos quais os genes das cadeias IgH e Igk foram substituídos no genoma dos animais, através de recombinação homóloga, por genes humanos codificantes das cadeias leve e pesada. Dessa forma, o camundongo produz anticorpos humanos quando exposto a um antígeno. Assim, é possível imunizar camundongos e gerar hibridomas produtores de imunoglobulinas com sequências humanas. (GREEN, 1999). A desvantagem dessa técnica está na obtenção e manutenção dos camundongos. Alguns dos AcMos descritos na Tabela 3 foram obtidos a partir desta tecnologia, como Denosumab e Panitumumab, que foram gerados a partir do XenoMouse (Amgen British Columbia, Inc, Burnaby, BC, Canadá) ou Zanolimumab, a partir da tecnologia UltiMab (Medarex, Inc, Princeton, NJ, EUA), que também utiliza camundongo transgênico. Este último foi produzido por imunização dos camundongos, obtenção do hibridoma, clonagem das sequências do anticorpo e geração de uma linhagem produtora do anticorpo em células CHO (células de ovário de hamster chinês) (KIM et al., 2007).

1.2.1.7 Anticorpos Monoclonais Recombinantes Humanos

Mais recentemente, uma estratégia inovadora para a obtenção de AcMos humanos funcionais foi desenvolvida por um grupo de pesquisa da Universidade Rockefeller, em Nova York, liderado pelo Dr. Michel Nussenzweig (MOUQUET et al., 2010, 2011; SCHEID et al., 2009a, 2009b; TILLER et al., 2008; WARDEMANN et al., 2003; WARDEMANN; KOFER, 2013). Essa estratégia baseia-se na clonagem e expressão dos genes produtores de imunoglobulinas obtidos diretamente de linfócitos B humanos. Por essa técnica, linfócitos B são identificados de acordo com a ligação com o antígeno e separados individualmente, por exemplo, em placas de 96 poços. A partir do mRNA de cada célula, as cadeias variáveis dos anticorpos são amplificadas, clonadas em vetores contendo genes de regiões constantes de cadeias leve e pesada humanas. Dessa forma, após transfecção com esses vetores, as células eucariotas produzirão uma molécula de anticorpo inteiro, com estrutura idêntica à humana. Para a produção de anticorpos por essa metodologia são necessários: a coleta de sangue de doadores que tenham células B de memória circulantes contra um determinado antígeno e o

antígeno purificado para a identificação dessas células por imunofenotipagem. Essa estratégia também foi utilizada para a obtenção de outros AcMos, como contra *Plasmodium falciparum*, com a utilização do antígeno GMZ2 (específico do parasita) para identificação das células de memória de doadores infectados (MUELLENBECK et al., 2013). Outra estratégia utilizada é a separação de plasmablastos a partir do sangue de doadores vacinados, neste caso sem a necessidade de marcação com antígeno específico. AcMos contra o vírus Varicella-Zoster (BIRLEA et al., 2013), *Bacillus anthracis*, o agente causador do antraz (SMITH et al., 2012) e vírus Influenza (KAUR et al., 2015) foram obtidos a partir de plasmablastos.

1.3 Linfócitos B

Os linfócitos B são as células produtoras das imunoglobulinas. São originados das células tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea. O primeiro estágio reconhecido é chamado de pró-linfócito B e já ocorre a expressão de alguns marcadores específicos da linhagem das células B, como CD19. A sequência de DNA da imunoglobulina que a célula produzirá em sua linhagem não está definida nessa etapa. É nesse momento em que se inicia o rearranjo dos genes V, D e J no *locus* da cadeia pesada germinativa através de recombinação somática pela ação de enzimas conhecidas como RAG-1 e RAG-2 (*Recombination activating genes*), que geram quebras no DNA em regiões específicas (OETTINGER et al., 1990; SCHATZ; OETTINGER; BALTIMORE, 1989). Existem cerca de 100 segmentos V, 23 D e 6 J para a cadeia pesada, com combinação aleatória. Considerando a presença de vários segmentos possíveis de escolha, a variabilidade de sequências previstas é alta. Além disso, uma enzima específica dos tecidos linfoides chamada desoxinucleotidiltransferase terminal (TdT) adiciona nucleotídeos nas regiões 3' das junções de forma aleatória (ALT; BALTIMORE, 1982). Essa etapa contribui para aumentar a diversidade das sequências dos anticorpos, sendo na região das junções que se localiza o segmento CDR3, considerada a porção mais importante do anticorpo na determinação da especificidade da ligação ao antígeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Com o rearranjo produtivo (com a fase de leitura correta do mRNA) a célula expressa a cadeia pesada μ rearranjada juntamente com uma cadeia leve substituta, ainda não rearranjada, formando o pré-BCR. Nesta etapa, a célula passa a ser chamada de pré-linfócito B. Sinalizações do receptor pré-BCR geram um fenômeno chamado de exclusão alélica, que corresponde à inibição do rearranjo do segundo *locus* da cadeia pesada no outro cromossomo. Caso o receptor não seja formado adequadamente, o segundo *locus* é rearranjado para geração de outra cadeia μ . Outra sinalização gerada pelo receptor é em relação ao rearranjo dos *locus* da cadeia leve.

Primeiramente, o *locus* da cadeia leve kappa é rearranjado, sendo que o *locus* da cadeia leve lambda sofre rearranjo caso o primeiro não seja produtivo. Para a cadeia leve não existe o gene D, sendo a recombinação feita entre os genes V e J. O rearranjo produtivo da cadeia leve produzirá a cadeia que se associará à pesada μ para formar a molécula de IgM. Com isso, a célula passa a ser chamada de linfócitos imaturo. Ocorre uma avaliação importante nessa etapa com a verificação do reconhecimento do anticorpo produzido contra antígenos próprios. Se isso ocorrer, o linfócito pode sofrer o processo de edição do receptor em que os genes das enzimas Rag são reativados para rearranjar novas cadeias leves e expressar um novo receptor que será testado novamente. Se não ocorrer reconhecimento de antígenos próprios, o linfócito sairá da medula óssea e completará sua maturação no baço.

Linfócitos B maduros expressão IgM e IgD que circulam por órgãos linfoides secundários a procura do antígeno reconhecido pela imunoglobulina ancorada em sua membrana. Células apresentadoras de antígeno nos órgãos linfoides exibem o antígeno na sua conformação nativa a linfócitos B. No caso de haver ligação do antígeno ao receptor de imunoglobulina, esses linfócitos serão ativados. A ativação promove a interação entre linfócitos B e T (ambos ativados) para culminar com a geração de plasmócitos secretores de anticorpos de vida curta. Isso ocorre em regiões extrafoliculares dos órgãos linfoides. Alguns linfócitos B ativados migram para o folículo onde interagem com linfócitos T *helper* foliculares, formando o centro germinativo, que é o local onde ocorre proliferação dos linfócitos B, conhecida como expansão clonal. É também nesse momento que ocorre a maturação da afinidade dos anticorpos através de troca de isotipo e hipermutação somática. Nesta etapa também são gerados os linfócitos B de memória e plasmócitos de vida longa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; KÜPPERS, 2005). A Figura 4 esquematiza o processo de desenvolvimento dos linfócitos B.

Os linfócitos B de memória são células que permanecem em estado de repouso e são reativados em um segundo encontro com o antígeno, sofrendo o mesmo processo descrito na figura acima, com a possibilidade de sofrer mais mutações que poderão aumentar ainda mais a afinidade ao antígeno. Os plasmócitos, citados como produto da diferenciação das células de memória, encontram-se na medula óssea. Um intermediário conhecido como plasmablasto é encontrado na corrente sanguínea por um período curto (pico de detecção 6-7 dias após exposição ao antígeno) antes de ser recrutado para a medula óssea ou tonsilas, onde se instalam em nichos que propiciam sua sobrevivência e diferenciação para plasmócitos de vida longa secretores de anticorpos (ARCE et al., 2004).

Figura 4 - Maturação dos linfócitos B

Linfócitos B maduros (*naíve*) são direcionados aos folículos primários nos órgãos linfoides secundários como nódulos linfáticos, onde estabelecem os centros germinativos (CG). É possível distinguir duas regiões nos CG: a zona escura e clara (lado esquerdo e direito da figura, respectivamente). A zona escura contém principalmente células B em proliferação, enquanto que as células na zona clara estão principalmente em repouso. Nos linfócitos em proliferação, o processo de hipermutação somática é ativado, o que leva à indução de taxas elevadas de mutações, que na maioria dos casos não é benéfica, pois reduz a afinidade do receptor (BCR) ao antígeno, e as células são eliminadas por apoptose. Algumas mutações são benéficas e aumentam a afinidade do BCR, selecionando as células positivamente (na zona clara, com interação com células T CD4⁺ e células dendríticas foliculares (FDCs). Algumas células sofrerão recombinação para mudança da classe das imunoglobulinas. Por fim, os linfócitos B do CG diferenciam-se em linfócitos B de memória ou plasmócitos.

Fonte: KÜPPERS (2005).

A diferenciação das células durante o desenvolvimento dos linfócitos pode ser avaliada pela expressão de alguns marcadores de superfície, que estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Marcadores de superfície durante o desenvolvimento de linfócitos B

Nome	Fenótipo	Função
Transicional	IgD ⁺ CD27 ^{neg} CD10 ⁺ CD24 ⁺⁺ CD38 ^{+/low}	Transição entre medula óssea e órgãos linfoides secundários.
Linf. B maduro/naíve	IgD ⁺ CD27 ^{neg} CD10 ^{neg} CD24 ^{+/low} CD38 ^{+/low}	Precursor das células do centro germinativo, linf. B de memória e secretoras de anticorpos.
Linf. B de memória (após troca de classe)	IgM ^{neg} IgD ^{neg} CD27 ⁺ CD38 ^{neg}	Resposta rápida após reencontro com antígeno
Plasmablastos	IgD ^{neg} CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺ CD138 ^{neg}	Secreção de anticorpos
Plasmócitos	IgD ^{neg} CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺ CD138 ⁺	Secreção de anticorpos.

As células descritas na tabela são CD19⁺.

Fonte: Adaptado de CARAUX et al. (2010); KAMINSKI et al., (2012)

1.4 Justificativa para este trabalho

A persistência de casos de tétano, quando já existe uma vacina eficiente, demanda alternativas para o tratamento. Em casos suspeitos, utiliza-se o soro antitetânico obtido de animais, em geral cavalos, composto de anticorpos policlonais. Sabe-se, porém, que o uso de proteínas heterólogas pode induzir a formação de anticorpos contra essas imunoglobulinas, o que limita sua utilização em uma dose e inviabiliza o possível tratamento em outras situações em que anticorpos heterólogos estão disponíveis. O uso da imunoglobulina humana hiperimune obtida de doadores humanos, apesar de ser uma alternativa eficaz, apresenta riscos em casos de transmissão de doenças e a produção dos lotes não é homogênea.

Portanto, torna-se importante a tentativa de obtenção de anticorpos antitetânicos monoclonais humanos como uma tendência atual de oferta de biológicos com consistência de lotes de produção e imunogenicidade nula ou baixa. O presente projeto representa inovação no uso de soroterapia contra doenças infecciosas (CASADEVALL; SCHARFF, 1994), que foi iniciada há mais de um século com o uso de soros hiperimunes de animais vacinados, e hoje pode contar com métodos de biotecnologia para a obtenção de imunobiológicos mais consistentes e seguros. A implantação da tecnologia para anticorpos monoclonais humanos demonstrada neste trabalho abrirá um caminho para o tratamento do tétano, e também de outras doenças infecciosas.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O trabalho teve como objetivo obter anticorpos monoclonais humanos antitetânicos a partir da clonagem das regiões variáveis dos genes das cadeias leve e pesada de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos.

2.2 Objetivos específicos

- Separação de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos de sangue de voluntários humanos vacinados contra o tétano;
- Amplificação das regiões variáveis dos anticorpos das células separadas por *cell sorting*;
- Clonagem das sequências em vetores de expressão de células de mamíferos;
- Expressão dos anticorpos recombinantes de forma transitória;
- Avaliação da ligação dos anticorpos *in vitro* e *in vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estratégia experimental

A Figura 5 mostra a estratégia experimental seguida nesse trabalho e está detalhada nas próximas etapas.

Figura 5 - Estratégia experimental

3.2 Materiais utilizados

A TxT e a AnT foram gentilmente cedidas pelo Setor de Vacinas Anaeróbias e o SAT pelo Setor de Soros, ambos do Instituto Butantan. Os vetores usados para clonagem das regiões variáveis dos anticorpos foram gentilmente cedidos pela Dra. Hedda Wardemann, do Instituto Max Plank, Heidelberg, Alemanha. O fragmento C recombinante da toxina tetânica foi doado pelas Dra. Elizabeth A. L. Martins e Dra. Patricia A. E. Abreu de Aniz do Instituto Butantan. Os oligonucleotídeos foram adquiridos da empresa IDT (Iowa, EUA). Os anticorpos e estreptavidina-PerCP-CyTM 5.5 para citometria de fluxo (descritos na seção 3.7.2) foram adquiridos da empresa BD Biosciences (San Jose, CA, EUA): anti CD19 humano-FITC (clone HIB19), anti IgG humana-APC (clone G18-145), anti CD19 humano-PE (clone HIB19), anti IgG humana-FITC (clone G18-145), anti CD19 humano-ACP-CyTM 7 (clone SJ25C1), anti CD38 humano (clone HIT2) e anti CD27 humano-PerCP-CyTM 5.5

(clone M-T271). O kit de conjugação de biotina ImmunoProbe™ Biotinylation Kit foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) e o de conjugação Alexa Fluor® 647 Microscale Protein Labeling, da Molecular Probes (Waltham, Massachusetts, EUA).

3.3 Obtenção do antígeno conjugado

3.3.1 Conjugação com biotina

A conjugação da anatoxina tetânica com biotina foi feita com o kit ImmunoProbe™ Biotinylation Kit (Sigma-Aldrich). Foram preparadas três alíquotas de AnT na concentração de 10 mg/mL e em cada uma adicionou-se o reagente de biotinilação para a obtenção de três razões biotina:proteína (B:P) teóricas diferentes: 1:1 (B:P), 4:1 e 10:1. As razões teóricas calculadas consideram a massa molecular do reativo de biotinilação, sendo que a quantidade de biotina transferida para a proteína depende de sua estrutura química e disponibilidade de sítios de conjugação (grupos amino). O reagente de biotinilação foi preparado no momento do uso e foi misturado com as amostras de AnT, seguido de incubação por 30 min em temperatura ambiente sob agitação leve. A purificação foi feita em coluna de gel-filtração com Sephadex G-25M após equilíbrio com PBS 0,01 mol/L, pH 7,4. Cada amostra foi aplicada sobre a coluna e eluída com nove frações de 1 mL de PBS 0,01 mol/L, pH 7,4 em alíquotas separadas. Cada alíquota foi avaliada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm. Misturaram-se as alíquotas que apresentaram maior absorbância e determinou-se a concentração de proteínas pelo método de Bradford.

A razão B:P foi determinada usando ácido 4-hidroxiazobenzeno-2-carboxílico (HABA) e avidina, de acordo com o manual do kit. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro em 500 nm e, através do coeficiente de extinção molar, calculou-se a concentração de biotina presente na amostra.

Para a biotinilação da TxT purificada seguiu-se o mesmo protocolo com razão teórica de 3:1 (ver seção 3.4 para purificação da TxT por SEC-HPLC).

3.3.1.1 Ensaio para detecção da biotina conjugada à proteína

Para este ensaio, fez-se um ELISA com avidina-peroxidase. Sensibilizou-se a placa com 100 µL das proteínas biotinilada e controle (sem biotina) a 310 ng/mL por 14 - 16 horas a 4° C. Após três lavagem com Tween 20 (Sigma-Aldrich) 0,05% em PBS, bloqueou-se com albumina bovina (BSA) 1% em PBS durante duas horas a temperatura ambiente (20-23° C).

Lavou-se novamente três vezes com Tween 20 0,05% em PBS. Incubou-se com 100 µL avidina-peroxidase 1:200.000 em BSA 1% em PBS por 60 minutos a 37° C. A revelação foi feita com 100 µL de TMB 100 µg/mL em tampão acetato/ácido cítrico 0,1 M pH 6 e peróxido de hidrogênio a 0,0045% durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-23° C) e leitura a 450 nm após interrupção da reação com 50 µL de ácido sulfúrico 4,7 N.

3.3.1.2 Ensaio de ligação do soro antitetânico à AnT biotinilada

Placas de ELISA foram sensibilizadas com AnT-controle (sem biotina) e anatoxina tetânica biotinilada (AnT-B) usando 100 µL de uma solução a 5 µg/mL em PBS com incubação por 14 - 16 horas a 4 °C. Lavou-se com Tween 20 0,05% em PBS por três vezes e bloqueou-se com 100 µL de leite desnatado 10% em PBS por duas horas a temperatura ambiente (20-23° C). Lavou-se novamente como descrito anteriormente. Como fonte de anticorpos usou-se o Soro antitetânico (SAT) obtido de plasma de equinos hiperimunizados cedido pelo Setor de Produção do Instituto Butantan composto da fração F(ab')₂ das imunoglobulinas, diluído 1:8.000, no volume de 100 µL por poço, com incubação por 60 minutos a 37° C. Após lavagem como descrito anteriormente, seguiu-se com a incubação com 100 µL de anticorpo anti-IgG de cavalo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:50.000 durante 60 minutos a 37° C, e revelou-se com 100 µL de TMB 100 µg/mL em tampão acetato/ácido cítrico 0,1 M pH 6 e peróxido de hidrogênio a 0,0045% durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-23° C) e leitura a 450 nm após interrupção da reação com 50 µL de ácido sulfúrico 4,7 N. Análise estatística foi feita usando o teste t de Student com significância de 95% ($p < 0,05$) usando o programa SigmaStat 3.5.

3.3.2 Conjugação com Alexa Fluor® 647

A TxT purificada (ver seção 3.4) foi conjugada com o kit Alexa Fluor® 647 Microscale Protein Labeling (Molecular Probes) seguindo as instruções do fabricante. Três razões teóricas foram testadas: 3:1 (Alexa Fluor® 647:toxina), 6:1 e 20:1. A reação foi feita com 200 µL solução a 1 mg/mL da TxT para a razão teórica 3:1 e 100 µL para razões 6:1 e 20:1. Adicionou-se 1/10 do volume da solução de TxT de bicarbonato de sódio 1 M (20 µL para razão 3:1 e 10 µL para razões 6:1 e 20:1) e quantidades variáveis do reativo de conjugação reconstituído com 10 µL de água ultrapura no momento do uso (0,5 µL do reativo de conjugação para razões 3:1 e 6:1 e 1,7 µL para razão 20:1). Incubou-se por 15 min a temperatura ambiente protegido da luz e cada amostra foi purificada com concentrador

Spin-X-UF 10k MWCO (Corning) com duas lavagens com PBS. O volume final foi de 200 μ L. A quantificação da razão obtida foi feita por espectrofotometria com leituras a 280 e 650 nm e cálculo usando o coeficiente de absorvidade da AnT a 1 mg/mL: A_{280} 1,24 (LIST BIOLOGICAL LABORATORIES INC, 2014) e coeficiente de extinção molar do Alexa Fluor® 647: $\epsilon = 239.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ de acordo com o manual do fabricante.

3.4 Purificação da toxina tetânica

A toxina tetânica recebida do setor de Vacinas Anaeróbias do Instituto Butantan estava liofilizada e foi reconstituída com 1 mL de água tipo 1. Alíquotas de 100 μ L foram purificadas por cromatografia de exclusão molecular (SEC-HPLC) utilizando o sistema Äkta Purifier (GE Healthcare, Suécia) com coluna TSK gel G3000 SWxL (Tosoh Bioscience, EUA) com volume de coluna de 14,3 mL. Inicialmente a coluna foi equilibrada com três volumes de coluna de PBS, seguido de injeção da amostra e eluição com dois volumes de coluna de PBS. As frações desejadas foram coletadas em microtubos de 1,5 mL.

3.5 Dosagem de proteína – Método de Bradford

A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad). Misturaram-se 20 μ L das amostras com 200 μ L do reagente diluído 1:5 e incubou-se por 5 min. A leitura foi feita em leitor de microplaca a 595 nm, e a concentração determinada a partir de curva padrão com BSA.

3.6 Amostras clínicas

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de doadores adultos, de ambos os sexos, foram isoladas após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do ICB da USP e pela Fundação Pró-Sangue, onde foram coletadas as bolsas de sangue. Foram coletados 10 mL de sangue periférico para testes de triagem, além de até 450 mL, equivalente a uma bolsa de sangue. As CMSP foram separadas por gradiente de densidade usando Ficoll-Paque e congeladas em nitrogênio líquido até sua utilização ou utilizadas em seguida. Alguns doadores receberam vacinação de reforço dT, 6 ou 14 dias antes da coleta de sangue.

3.7 Separação de células únicas

3.7.1 Enriquecimento dos linfócitos B

Para a etapa de separação de um linfócito B produtor de anticorpos anti-TT por poço de uma placa de 96 poços, os linfócitos B da amostra de CMSP foram enriquecidos utilizando *beads* magnéticas para seleção negativa (Miltenyi) de acordo com instruções do fabricante. Cerca de 10×10^7 CMSPs foram usadas e ressuspendidas em tampão MACS (0,5% BSA, 2 mM EDTA em PBS) na proporção de 40 μ L para cada 10^7 células. Adicionaram-se 10 μ L/ 10^7 células de um coquetel de anticorpos biotinilados reativos a antígenos de células não-B e incubou-se por 10 minutos na geladeira. Após, adicionaram-se 30 μ L de tampão MACS/ 10^7 CMSP e 20 μ L/ 10^7 células de *microbeads* conjugados com anticorpos antibiotina. Incubou-se na geladeira por 15 minutos, lavou-se com cerca de 1 mL de tampão MACS/ 10^7 células, centrifugou-se por 10 minutos a 300 g, e as células foram ressuspendidas em 500 μ L de tampão MACS que foram aplicadas na coluna magnética LS lavada com tampão. As células foram eluídas com três lavagens de 3 mL de tampão MACS. As células eluídas correspondiam aos linfócitos B de interesse que foram centrifugados e marcados conforme descrito abaixo.

3.7.2 Estratégias de marcação das células

Todas as incubações foram feitas no gelo, ao abrigo da luz. Incubações e lavagens foram feitas com tampão MACS. As lavagens foram feitas com 5 mL de tampão MACS e centrifugação a 300 g por 10 min. As células foram marcadas com uma das seguintes estratégias:

Para detecção de células B de memória:

a) 100 μ g/mL (*sorting* #1) e 5 μ g/mL (*sorting* #2) de AnT-B por 30 min, seguido de lavagem e incubação com anti-CD19-FITC 1:10, anti-IgG-APC 1:20 e estreptavidina (SAv)-PerCP-CyTM5.5 1:1600 por 20 min. Incubações em 200 μ L. A diminuição da concentração de AnT-B foi sugestão do Dr. Michel Nussenzweig durante treinamento em seu laboratório, na Universidade Rockefeller, Nova York, EUA.

b) 3,6 μ g/mL de AnT-B previamente misturado com SAv-PerCP-CyTM5.5 (chamado de agora em diante de 'tetrâmero' ou 'antígeno em formato tetramérico') durante 30 min, seguido de lavagem e incubação com anti-CD19-FITC 1:10, anti-IgG-APC 1:20 por 20 min (FRANZ et al., 2011). Incubações em 200 μ L. O tetrâmero foi formado pela incubação de

50 μ L de AnT-B a 0,1 mg/mL com 6,7 μ L de SAv-PerCP-CyTM5.5 0,2 mg/mL durante 20 min no gelo e centrifugado a velocidade máxima por 10 min.

c) 12,5 μ g/mL TxT-Alexa Fluor® 647 e 12,5 μ g/mL TxT-B durante 60 min, seguido de lavagem e incubação com anti-CD19-PE 1:5, anti-IgG-FITC 1:20 e SAv-PerCP-CyTM5.5 1:500 (AMANNA; SLIFKA, 2006). Incubações em 50 μ L para os linfócitos enriquecidos e 400 μ L para CMSP totais, sem enriquecimento.

Para detecção de plasmablastos (neste caso, a marcação foi feita diretamente com as CMSP, sem enriquecimento):

d) anti-CD19-FITC 1:10, anti-CD27-PerCP-CyTM5.5 1:20 durante 20 min (FRANZ et al., 2011). Incubações em 200 μ L (cerca de 10×10^6 células).

e) anti-CD19-APC-CyTM7 1:20, anti-CD27-PerCP-CyTM5.5 1:20, anti-CD38-PE 1:5 durante 60 min (SMITH et al., 2009). Incubações em 250 μ L (cerca de 25×10^6 células).

Em alguns casos, utilizou-se DAPI como corante vital para eliminação das células mortas na concentração de 50 ng/mL, com incubação por 15 min antes da análise.

3.7.2.1 Detecção de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos por citometria de fluxo

Avaliações de algumas das estratégias de detecção dos linfócitos B produtores de anticorpos anti-TT foram feitas a partir da marcação de CMSP de acordo com os procedimentos descritos no item anterior. A leitura foi feita em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Análises dos dados obtidos durante esta etapa ou durante os *sortings* foram feitas no *software* FlowJo (TreeStar, EUA).

3.7.3 Separação de células únicas - sorting

O enriquecimento (quando feito) e a marcação das células foram feitas no Laboratório de Biofármacos em Células Animais no Instituto Butantan. Em seguida eram transportadas em gelo até o Instituto do HPV da Santa Casa, onde foram feitas as separações usando o citômetro de fluxo BD FACSAria II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) no modo *single cell* de alta pureza, utilizando o *nozzle* de 100 μ m e fluxo de células mantido entre 500 e 1000 eventos/segundo. As células foram coletadas em placa de 96 poços contendo 4 μ L por poço de PBS 0,5x gelado contendo 10 mM de DTT e 8 U de RNAsin® (Promega)

com separação de uma células por poço. Não foram separadas células nos poços A1, B1, C1 e D1, que serviram para reações controle na etapa de RT-PCR. Imediatamente após a separação, as placas foram seladas com filme de alumínio (Bio-Rad) e acondicionadas em gelo seco até o transporte ao laboratório no Instituto Butantan, onde ficaram armazenadas em freezer -80 °C até o momento de realização da RT-PCR.

3.8 RT-PCR

A transcrição reversa foi realizada na mesma placa onde as células foram separadas. Os controles realizados nos poços onde não havia célula foram: dois controles negativos com adição de 1 µL de água (poços A1 e D1), um controle da transcrição reversa com RNA de célula HeLa purificado (poço B1) e um controle da PCR das regiões variáveis com o conteúdo correspondente a 1000 linfócitos B que haviam sido separados previamente (poço C1).

Em cada poço foram adicionados 3,5 µL de solução contendo 0,5 µL de oligonucleotídeos hexaméricos randômicos a 300 ng/µL (150 ng), 0,5 µL de Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) a 10% em água, 6 U de RNAsin® (Promega) (0,15 µL a 40 U/µL) e 2,35 µL de água tipo 1 esterilizada. A solução foi preparada para a placa inteira, com excesso de 20% devido à viscosidade do Igepal CA-630. O volume de 3,5 µL foi distribuído em cada poço usando micropipetador multicanal com homogeneização e troca de ponteiros a cada coluna. A placa foi selada, centrifugada rapidamente, incubada a 68 °C por 60 segundos no termociclador Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e imediatamente colocada e mantida no gelo. Adicionaram-se em cada poço 7 µL de solução contendo 3 µL do tampão da enzima transcriptase reversa SuperScript® III (Invitrogen) 5 vezes concentrado com 15 mM MgCl₂, 12,5 nmols de cada dNTP (0,5 µL da solução a 25 mM de cada dNTP), 100 nmols DTT (1 µL DTT 100 mM), 8 U RNAsin® (Promega) (0,2 µL a 40 U/µL), 50 U da enzima transcriptase reversa SuperScript® III (Invitrogen) (0,25 µL a 200 U/µL) e 2,05 µL de água tipo 1 esterilizada. A solução foi preparada em volume suficiente para a placa inteira, com excesso de 5%. O volume de 7 µL foi distribuído em cada poço usando micropipetador multicanal com homogeneização e troca de ponteiros a cada coluna. A placa foi selada e centrifugada rapidamente. A reação ocorreu a 42 °C por 5 min, 25 °C por 10 min, 50 °C por 60 min e 94 °C por 5 min e finalmente mantida a 4° C. O cDNA obtido foi aliqotado em quatro placas de 96 poços novas (3 µL por poço), respeitando o endereço inicial de cada poço na placa. Cada placa foi utilizada para amplificação

independente das regiões variáveis das cadeias pesada, leve kappa, leve lambda, além do controle β -actina.

As reações foram feitas com um protocolo de *nested* PCR, sendo que a primeira reação com o cDNA aliquoteado em cada placa. Os componentes descritos na Tabela 6 foram adicionados em cada poço (em volume final de 40 μ L), a placa foi selada e a reação feita com ativação da enzima por 5 min a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C (Ig γ /Ig κ / β -actina) ou 60 °C (Ig λ) por 30 s, 72 °C por 55 s, e extensão final a 72 °C por 10 min. A segunda reação (*nested*) foi feita em outra placa com 3,5 μ L do produto da primeira PCR transferido com micropipetador multicanal respeitando a posição inicial de cada poço e com os componentes descritos na Tabela 6, em volume final de 40 μ L. A condição foi: 5 min a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C (IgH/Ig κ) ou 60 °C (Ig λ) por 30 s, 72 °C por 45 s, e extensão final a 72 °C por 10 min. As reações foram feitas nos termocicladores GeneAmp® PCR 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os oligonucleotídeos usados estão descritos na Tabela 7.

O controle com β -actina foi feito em uma reação única com oligonucleotídeos 5' h β -actina 5'GAACCCCAAGGCCAACCGCGA e 3' h β -actina 5'CACGCACGATTTCCTCGCTC.

Todas as amostras foram analisadas em gel de agarose 2% com SyBr Safe (Invitrogen) e visualizadas utilizando o transiluminador Safe Imager™ (Invitrogen) e sistema de fotodocumentação Gel Logic 112 (Carestream). O tamanho esperado dos fragmentos era de: 450 pb para Ig γ , 510 pb para Ig κ , 405 pb para Ig λ e 302 pb para β -actina.

Tabela 6 - Concentrações dos componentes de cada reação de PCR

	Cadeia Pesada γ		Cadeia Leve κ		Cadeia Leve λ		β -actina
	Reação 1	Reação 2	Reação 1	Reação 2	Reação 1	Reação 2	Reação 1
Oligonucleotídeo 5' / Mistura oligonucleotídeos 5' 50 μ M*	0,52 μ L	0,13 μ L	0,13 μ L	0,13 μ L	0,13 μ L	0,13 μ L	0,13 μ L
Oligonucleotídeo 3' 50 μ M	0,26 μ L	0,13 μ L	0,13 μ L	0,13 μ L	0,13 μ L	0,13 μ L	0,13 μ L
MgCl ₂	2,9 mM	2,9 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
dNTP	250 μ M	250 μ M	250 μ M	250 μ M	250 μ M	250 μ M	250 μ M
HotStarTaq® Plus DNA polimerase	0,9 U	0,9 U	0,9 U	0,9 U	0,9 U	0,9 U	0,9 U
Água tipo 1 esterilizada qsp	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L

* A mistura de oligonucleotídeos 5' foi feita juntando-se quantidades iguais de cada oligonucleotídeo da mistura na concentração de 50 μ M.

Tabela 7 - Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das regiões variáveis das cadeias de imunoglobulinas

Etapa PCR	Nome do oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo 5'-3'
1ª Reação – Cadeia pesada gama	5' L-VH 1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG
	5' L-VH 3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG
	5' L-VH 4/6	CCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
	5' L-VH 5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG
	5' IGHV1,7-X1	ATGGACTGGACCTGGAG
	5' IGHV1-X1-041	TCCTCTTTGTGGTGGCAGCAGC
	5' IGHV2-X1-036	TCCACGCTCCTGCTRCTGAC
	5' VH3 Leader-A	TAAAAGGTGTCCAGTGT
	5' RM-IGHV4-X1	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCC
	3' C γ CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC
2ª Reação – Cadeia pesada gama	5' RMX2-A	AGGTGCAGCTGCTGGAGTCKGG
	3' IgG Internal	GTTCGGGGAAGTAGTCCTTGAC
1ª Reação – Cadeia leve kappa	5' L V κ 1/2	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG
	5' L V κ 3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG
	5' L V κ 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG
	3' C κ 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA
2ª Reação – Cadeia leve kappa	5' Pan V κ	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG
	3' C κ 494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT
1ª Reação – Cadeia leve lambda	5' L V λ 1	GGTCCTGGGCCCAGTCTGTGCTG
	5' L V λ 2	GGTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTG
	5' L V λ 3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG
	5' L V λ 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG
	5' L V λ 6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG
	5' L V λ 7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG
	5' L V λ 8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG
	3' C λ	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG
2ª Reação – Cadeia leve lambda	5' AgeI V λ 1	CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG
	5' AgeI V λ 2	CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG
	5' AgeI V λ 3	CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG
	5' AgeI V λ 4/5	CTGCTACCGGTTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA
	5' AgeI V λ 6	CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG
	5' AgeI V λ 7/8	CTGCTACCGGTTCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG
	3' XhoI C λ	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG

Fonte: BOSCARDIN (2013); WARDEMANN; KOFER (2013)

3.9 Quantificação dos produtos de PCR

A quantificação dos produtos de PCR foi feita em gel de agarose 2% contendo SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen) com corrida em paralelo com marcador de massas quantitativo Low DNA Mass (Invitrogen). A análise foi feita no *software* Carestream

Molecular Imaging de acordo com manual do fabricante, com identificação das bandas do marcador de massas quantitativo, geração da curva-padrão e determinação da massa de DNA das bandas de cada amostra aplicada.

3.10 Sequenciamento e análise das sequências de DNA das imunoglobulinas

O sequenciamento foi realizado em todos os fragmentos amplificados da cadeia pesada e os das cadeias leves em cujo poço houve amplificação do par cadeia pesada/leve. As amostras foram purificadas com ExoSAP-IT® (Affymetrix) misturando-se 5 µL dos produtos de PCR e 2 µL de ExoSAP-IT e incubando-se por 15 min a 37 °C, seguido de 15 min a 80°C.

O sequenciamento foi feito usando o kit BigDye (Applied Biosystems) em sequenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com cerca de 20 ng de DNA, juntamente com 1,6 pmol do oligonucleotídeo 3' da reação *nested* da respectiva cadeia. Para a cadeia lambda foi sintetizado um oligonucleotídeo específico para sequenciamento, 3'λSeq -5' ACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG. A condição da reação foi: 40 ciclos a 96° C por 10 s, 52 °C por 20 s e 60 °C por 4 min.

A análise das sequências foi feita usando o banco de dados IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>), com o sistema Kabat de delineamento do domínio V. Essa análise fornece a classificação dos segmentos V(D)J de acordo com a maior identidade com as sequências germinativas, além do número e localização das mutações somáticas. A sequência da CDR3 foi determinada pela contagem dos resíduos de aminoácidos posteriores à região do *framework* 3 até o motivo triptofano-glicina (WG) conservado nas sequências de cadeia pesada ou o motivo fenilalanina-glicina (FG) nas sequências das cadeias leves (WARDEMANN; KOFER, 2013).

Duas sequências foram consideradas clonalmente relacionadas quando eram classificadas com os mesmos segmentos V(D)J e quando as regiões da CDR3 tinham o mesmo tamanho e sequência semelhantes. Isso foi avaliado para as cadeias pesadas e leves que formaram o par correspondente.

3.11 Clonagem das regiões variáveis

3.11.1 Bactérias *E. coli* DH5α quimiocompetentes

Uma alíquota de bactérias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes (Invitrogen) foi plaqueada em meio LB/ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, ágar 1,5%) e incubada a 37 °C por 16-18 horas. Uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB

líquido durante 16-18 horas a 37 °C sob agitação de 200 RPM. Volume de 0,4 mL da suspensão foi inoculado em 200 mL de meio LB líquido contendo 40 mM de glucose e 10 mM de MgCl₂ e incubou-se a 37 °C sob agitação de 200 RPM até DO₆₀₀ atingir 0,8-0,9. A cultura foi subdividida em tubos que foram mantidos em gelo por 20 min e em seguida centrifugados a 2500 xg por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a células ressuspensas em 50 mL de MgCl₂ 0,1 M estéril e gelado. Incubou-se em gelo por 20 min e centrifugou-se como indicado acima. O sedimento foi ressuspendido em 25 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril e gelado, incubado em gelo por 20 min e centrifugado como descrito. Finalmente, as bactérias foram ressuspensas em 2,4 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril e gelado e adição de 0,6 mL de glicerol. Após homogeneizada, a suspensão foi aliquoteada em microtubos em banho de gelo/etanol e armazenados no freezer -80 °C. A eficiência de transformação foi determinada usando um plasmídeo controle.

3.11.2 Vetores

Os vetores utilizados para clonagem e expressão dos anticorpos foram gentilmente cedidos pela Dra. Hedda Wardemann do Instituto Max Plank (Figura 6). Cada vetor contém a sequência que codifica para a região constante de uma das cadeias de imunoglobulina humana: pesada $\gamma 1$, κ ou λ . À montante da região constante está o sítio de clonagem para inserção da cadeia variável amplificada na PCR específica (ver seção 3.10.3)

Figura 6 - Vetores de expressão das cadeias pesada gama, leve kappa e leve lambda, respectivamente.

Cada vetor contém a região constante respectiva.

Fonte: TILLER et. al (2008).

Os vetores foram transformados em bactérias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes misturando-se 2 ng de cada vetor (em volume de 1 μ L) independentemente em 10 μ L da suspensão de bactérias. As suspensões foram incubadas em gelo por 30 min, seguido de choque térmico a 42 °C por 45 s e novamente incubação em gelo por 5 min. Adicionaram-se 100 μ L de meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 500 mg/L,

KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM e glucose 20 mM) à suspensão de bactérias e incubou-se por uma hora a 37 °C sob agitação de 180 RPM. Inoculou-se toda a suspensão em uma placa de LB/ágar/ampicilina (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, ágar 1,5%, ampicilina 100 µg/mL) e incubou-se a 37 °C por 16-18 horas. Uma colônia de cada vetor foi inoculada individualmente em 4 mL de meio TB/ampicilina (*Terrific Broth* – triptona 12 g/L, extrato de levedura 24 g/L, glicerol 4 mL/L, KH₂PO₄ 17 mM, K₂HPO₄ 72 mM, ampicilina 75 µg/mL) e incubada a 37 °C por 16-18 horas sob agitação de 200 RPM. Cada suspensão foi dividida em duas alíquotas de 2 mL e foram usadas para isolamento dos vetores utilizando o kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). A determinação da concentração e pureza dos vetores foi feita por espectrofotometria a 260/280 nm.

Os vetores foram digeridos com as respectivas enzimas para serem linearizados:

pIgγ - enzimas *SalI*-HF e *AgeI*-HF (NEB - New England Biolabs)

pIgκ - enzimas *AgeI*-HF e *BsiWI* (NEB)

pIgλ - enzimas *XhoI*-HF e *AgeI* (NEB).

As digestões foram sequenciais, na ordem descrita acima com cada enzima na proporção de 2 U/µg de DNA para as enzimas *AgeI* e *BsiWI* e 10 U/µg para as enzimas *SalI* e *XhoI*. A digestão procedeu por quatro horas a 37 °C para *AgeI*, *SalI* e *XhoI* e 55 °C para *BsiWI*. Os vetores digeridos foram purificados por eletroforese em gel de agarose e kit Wizard® SV Gel and PCR *Clean-Up System* (Promega). A linearização foi testada por ligação e transformação dos vetores sem inserto (ver seção 3.11.4).

3.11.3 Clonagem dos fragmentos da cadeia variável

As amostras da RT-PCR provenientes dos poços selecionados após análise das sequências das cadeias variáveis foram submetidas à PCR com oligonucleotídeos específicos. Essa etapa serviu para amplificar o fragmento com um oligonucleotídeo em cada extremidade, evitando a inserção de mutações, além de adicionar sítios de restrição para clonagem nos vetores de expressão. O produto da primeira PCR foi usado como molde, com oligonucleotídeos 5' e 3' específicos para os genes V e J, respectivamente, contendo sítio de restrição específicos (Tabela 8). Os oligonucleotídeos 5' para essa etapa contêm os primeiros 18 nucleotídeos específicos da sequência germinativa do gene V obtido no sequenciamento (região marcada como FRW1).

Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados na PCR específica

Cadeia amplificada	Nome de oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo 5'-3'
Cadeia pesada gama	5' AgeI VH 1/4/6	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCC[FRW1]
	5' AgeI VH 3/7	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCT[FRW1]
	3' SalI JH 1/2/4/5	TGCGAAGT <u>CGAC</u> GCTGAGGAGACGGTGACCAG
	3' SalI JH 3	TGCGAAGT <u>CGAC</u> GCTGAAGAGACGGTGACCATTG
	3' SalI JH 6	TGCGAAGT <u>CGAC</u> GCTGAGGAGACGGTGACCGTG
Cadeia leve kappa	5' AgeI Vκ específico	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACAT[FRW1]
	3' BsiWI Jk 1/4	GCCACCGT <u>ACG</u> TTTGATYTCCACCTTGGTC
	3' BsiWI Jk 2	GCCACCGT <u>ACG</u> TTTGATCTCCAGCTTGGTC
	3' BsiWI Jk 3	GCCACCGT <u>ACG</u> TTTGATATCCACTTTGGTC
	3' BsiWI Jk 5	GCCACCGT <u>ACG</u> TTTAATCTCCAGTCGTGTC
Cadeia leve lambda	5' AgeI Vλ 1	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCCTGGGCCCAGTCTGTGCTGACKCAG
	5' AgeI Vλ 2	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCCTGGGCCCAGTCTGCCCTGACTCAG
	5' AgeI Vλ 3	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG
	5' AgeI Vλ 4/5	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA
	5' AgeI Vλ 6	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG
	5' AgeI Vλ 7/8	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG
	3' XhoI Cλ	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG

Regiões sublinhadas correspondem aos sítios de restrição.

Fonte: WARDEMANN & KOFFER (2013).

Após a PCR específica, a amplificação das amostras foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2%. Os fragmentos obtidos foram purificados com kit QIAquick® 96 PCR Purification (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, eluídos com 60 µL de água tipo 1 esterilizada, digeridos com as enzimas de restrição cujos sítios foram inseridos durante a PCR específica, e clonados nos vetores de expressão que contêm as regiões constantes de cada cadeia do anticorpo.

As enzimas de restrição utilizadas foram:

- Para cadeia pesada γ: *AgeI*-HF e *SalI*-HF (NEB)
- Para cadeia leve κ: *AgeI*-HF e *BsiWI* (NEB)
- Para cadeia leve λ: *AgeI*-HF e *XhoI* (NEB)

A digestão foi feita de acordo com a Tabela 9. Os volumes são indicados para cada reação, sendo que foram preparadas soluções-mãe para todas as amostras da mesma cadeia.

Tabela 9 - Digestão dos produtos de PCR para clonagem

	Ig γ	Ig κ	Ig λ
Prod. PCR purificado	35 μ L	35 μ L	35 μ L
NEBuffer 1 10x	-	4 μ L	-
NEBuffer 4 10x	4 μ L	-	4 μ L
BSA 100x	0,4 μ L	0,4 μ L	0,4 μ L
AgeI-HF 20 U/ μ L	1 U	1 U	1 U
Sall-HF	1 U	-	-
XhoI	-	-	1U
Água qsp	40 μ L	40 μ L	40 μ L
Incubação 2 horas a 37 °C / 20 min a 65 °C			
BsiWI	-	1 U	-
NEBuffer1	-	0,2 μ L	-
Água qsp	-	2 μ L	-
Incubação 2 horas a 55 °C / 20 min a 80 °C*			

* a reação foi feita somente com os produtos de PCR da cadeia kappa.

Fonte: WARDEMANN & KOFFER (2013).

Caso o fragmento amplificado contivesse sequência do sítio de restrição das enzimas utilizadas (verificado anteriormente à digestão através do *site* <http://www.restrictionmapper.org/index.html>), a digestão com a referida enzima era feita parcialmente, com diluições seriadas da enzima e incubação por 2 min na temperatura específica da enzima (CAMPEAU, 2009).

Após digestão, os produtos de PCR foram novamente purificados com QIAquick® 96 PCR Purification (Qiagen) e eluídos com 60 μ L de água tipo 1 esterilizada.

3.11.4 Ligação

A ligação do fragmento ao vetor foi feita em volume total de 10 μ L com 8 μ L do produto da PCR específica digerido e purificado, 0,5 μ L do respectivo vetor linearizado a 50 ng/ μ L, 1 μ L do tampão da enzima T4 DNA ligase (NEB) e 0,5 μ L da enzima T4 DNA ligase 400 U/ μ L (NEB). A incubação foi de duas horas a 23 °C. Procedeu-se à transformação como descrito em 3.11.2, utilizando 10 μ L da suspensão de bactérias quimiocompetentes e 4,5 μ L do produto de ligação. As colônias obtidas foram triadas por PCR (ver próxima seção).

3.11.5 PCR das colônias

Três colônias de cada placa obtidas na seção 3.11.4 foram testadas para verificar a presença do inserto. A triagem foi feita por PCR utilizando oligonucleotídeos que se anelam na região líder à montante do sítio de clonagem e na região constante da respectiva cadeia.

A mistura da PCR utilizado continha para cada reação: 125 μ M de cada dNTP, 400 nM do oligonucleotídeo 5', 400 nM do oligonucleotídeo 3' (Tabela 10), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 1 U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen) em 25 μ L de reação.

Tabela 10 - Oligonucleotídeos utilizados para verificação da presença do inserto no vetor de expressão

Nome do oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo 5'-3'
5' Ab sense	GGTTCGTTAGAACGCGGCTAC
3' IgG (<i>internal</i>) - para cadeia γ	GTTCGGGGAAGTAGTCCTTGAC
3' C κ 494 - para cadeia κ	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT
3' C λ - para cadeia λ	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG

Fonte: WARDEMANN & KOFFER (2013).

A mistura foi distribuída em poços de uma placa de 96 poços para PCR. Usando uma ponteira de micropipeta estéril, retirou-se com a ponta uma colônia isolada que foi transferida para uma placa de petri com LB/água/ampicilina sobressalente. Em seguida, a ponteira foi mergulhada na mistura da PCR aliquoteada na placa de 96 poços. A placa de petri foi incubada a 37° C por 16-18 horas e armazenada na geladeira. A reação da PCR foi na seguinte condição: 5 min 94° C; 27 ciclos de 94° C por 30 s, 58° C por 30 s, 72° C por 60 s; e extensão final a 72° C por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em agarose 2%, cujos tamanhos esperados eram: 650 pb para Ig γ 1, 700 pb para Ig κ e 590 pb para Ig λ . Os fragmentos considerados positivos foram purificados com ExoSAP-IT (Affymetrix) e sequenciados de acordo como descrito em 3.10. O oligonucleotídeo utilizado para sequenciamento foi o 5' Absense (ver Tabela 10).

As sequências obtidas da PCR de colônias foram comparadas com as obtidas na RT-PCR utilizando a ferramenta de alinhamento de duas ou mais sequências do BLAST (*bl2seq - Align Sequence Nucleotide BLAST*). Verificou-se a identidade das sequências, desconsiderando as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos e determinou-se a colônia que continha o vetor com a sequência variável idêntica àquela obtida na RT-PCR.

Uma parte da colônia selecionada foi coletada da placa sobressalente e inoculada em 4 mL de meio TB como descrito em 3.11.2. O vetor foi isolado de uma das alíquotas de 2 mL

da suspensão das bactérias e a outra foi congelada após centrifugação a 10.000 xg por 5 min e remoção do sobrenadante. O isolamento foi feito com kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega) e determinação da concentração e pureza por espectrofotometria a 260/280 nm.

3.12 Expressão e purificação dos anticorpos

A expressão dos anticorpos foi feita com cotransfecção transitória do vetor da cadeia pesada e da leve correspondente ao par obtido do mesmo poço na RT-PCR.

Células FreeStyle™ 293-F HEK 293f (Invitrogen) foram cultivadas em suspensão em FreeStyle™ 293 Expression Medium (Invitrogen) em estufa a 37° C com 8% CO₂ e agitação de 120 RPM. No dia anterior à transfecção, a suspensão foi preparada no volume de 30 mL de suspensão para cada anticorpo a ser transfectado na concentração de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/mL. No dia da transfecção, a suspensão foi aliquoteada em volume de 30 mL em erlenmeyers de 125 mL na concentração entre $0,9$ e $1,1 \times 10^6$ células/mL para cada anticorpo a ser transfectado.

A solução de DNA para transfecção foi preparada em volume final de 1,5 mL de PBS. Inicialmente, 30 µg dos vetores [15 µg de cada um (cadeia pesada e leve)] foram adicionados a volume de PBS e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionaram-se 103 µL de solução de Polietilenimina - PEI (Sigma-Aldrich) a 0,45 mg/mL e agitou-se em vortex por 15 segundos, sendo incubada novamente por mais 10 min a temperatura ambiente protegida da luz antes de ser gotejada sobre a suspensão das células que foi mantida em cultivo por 72 horas. O sobrenadante foi coletado após centrifugação a 800 xg por 10 min em centrífuga de tubos (Sorval Legend RT, Newtown, CT, EUA).

Os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade com proteína A utilizando o sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Suécia). O sobrenadante filtrado foi aplicado na coluna de proteína A-sefarose (GE Healthcare, Suécia) equilibrada com tampão fosfato 20 mM pH 7. A coluna foi lavada com o mesmo tampão. A primeira eluição foi feita com tampão citrato de sódio 100 mM pH 6 e a segunda com tampão citrato de sódio 100 mM pH 3,2, para recuperação dos AcMos. A amostra coletada foi neutralizada com quantidade suficiente de solução de Tris 1 M. O anticorpo purificado e neutralizado foi dialisado contra PBS e esterilizado por filtração.

A concentração foi determinada por absorbância em 280 nm usando o coeficiente $A_{0,1\%} = 1,4$.

3.13 Ensaio de ligação dos anticorpos monoclonais a diferentes antígenos - ELISA

A ligação dos anticorpos foi testada por ELISA. A sensibilização foi feita com 100 µL de uma solução de anatoxina ou toxina tetânicas a 5 µg/mL em PBS (DOKMETJIAN et al., 2000), de anatoxina diftérica a 2 µg/mL em tampão carbonato 50 mM (MIYAJI et al., 2001) ou de fragmento C da toxina tetânica recombinante a 2 µg/mL em tampão carbonato 50 mM (RIBAS et al., 2000) em geladeira por 14-16 horas. As placas foram lavadas com Tween 20 0,05% em PBS por três vezes e bloqueadas com BSA 1% em PBS por duas horas a 20-23° C.

Os anticorpos testados foram diluídos seriadamente em BSA 1% em PBS e incubados durante uma hora a 37 °C em câmara úmida em volume de 100 µL. Para o controle positivo utilizou-se soro humano obtido de sangue de um doador, diluído inicialmente a 1:50. Três lavagens foram feitas com Tween 20 0,05% em PBS seguidas de incubação por uma hora a 37 °C em câmara úmida com 100 µL de anti-IgG humana produzida em cabra conjugada a peroxidase diluída 1:8000 (Southern Biotech) em BSA 1% em PBS. A revelação foi feita com 100 µL de TMB 100 µg/mL em tampão acetato/ácido cítrico 0,1 M pH 6 e peróxido de hidrogênio a 0,0045% por 20 minutos a 20-23° C e leitura a 450 nm após interrupção da reação com 50 µL de ácido sulfúrico 4,7 N.

3.14 SDS-PAGE

A integridade dos anticorpos foi avaliada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% em condição redutora, utilizando β-mercaptoetanol. O perfil da AnT foi avaliado em condição redutora em gel de 7,5% de poliacrilamida, e o da TxT em gel de 10%, em condição redutora e não-redutora. Os géis foram corados com Azul de Coomassie ou com nitrato de prata.

3.15 Ensaio de ligação dos anticorpos monoclonais à toxina tetânica e suas frações - *Western blotting*

A ligação dos anticorpos foi testada por *western blotting*. Amostras de toxina tetânica reduzida e não reduzida e BSA foram aplicadas em géis de 10% na quantidade de 1 µg de acordo com protocolo tradicional de SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas do gel para membrana de PVDF (GE Lifesciences) utilizando sistema de transferência semi-seca (Bio-Rad) que foi bloqueada com BSA 3% em PBS-T (PBS-T - PBS com

Tween 20 0,1%) por duas horas a temperatura ambiente ou por 16-18 horas na geladeira, sob agitação em ambos os casos. Incubações com anticorpo primário e secundário foram feitas por 1 hora a temperatura ambiente (20-23° C) em BSA 1% em PBS-T com lavagens intermediárias com PBS-T. Os AcMos humanos recombinantes foram diluídos a 50 ng/mL em BSA 1% em PBS-T e as membranas incubadas por uma hora sob agitação a temperatura ambiente (20-23° C). A lavagem foi feita durante 15 minutos com volume de PBS-T maior que 4 mL/cm² da membrana, seguida de três lavagens de 5 minutos com trocas de PBS-T. A detecção foi feita com anticorpo anti-IgG humana produzido em cabra e conjugado com peroxidase (Southern Biotech) diluído a 1:5000 por uma hora a temperatura ambiente (20-23° C) sob agitação. Após lavagem como descrita anteriormente, a revelação foi feita com kit quimioluminescente ECL plus (GE Lifesciences) de acordo com o fabricante e exposição em filmes fotográficos Amersham Hyperfilm ELC (GE Healthcare) por cerca de 30 segundos.

3.16 Ensaio de inibição da ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b pelos AcMos

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL do gangliosídeo GT1b (Sigma-Aldrich) dissolvido em metanol a 1 µg/mL. As placas foram deixadas a temperatura ambiente (21-23° C) durante a noite para sensibilização através da evaporação do metanol e bloqueadas com 200 µL de BSA 1% em PBS por duas horas a temperatura ambiente (20-23° C). Esta condição de incubação foi idêntica para as demais. Em outra placa bloqueada com BSA 1% em PBS, 60 µL de diluições seriadas dos anticorpos foram misturadas com mesmo volume de TxT a 40 µg/mL. Um grupo controle positivo foi feito com soro antitetânico equino na concentração inicial de 50 UI/mL. Em três poços, 60 µL da toxina tetânica foram incubados juntamente com 60 µL de BSA 1% em PBS. Essa quantidade de TxT não satura os sítios de ligação do GT1b. Após incubação, transferiram-se 100 µL para a placa sensibilizada com GT1b e incubou-se como indicado. A revelação foi feita com 100 µL de soro antitetânico equino conjugado com peroxidase diluído 1:1000. A revelação foi feita com 100 µL de TMB 100 µg/mL em tampão acetato/ácido cítrico 0,1 M pH 6 e peróxido de hidrogênio a 0,0045% por 20 minutos a 20-23° C e leitura a 450 nm após interrupção da reação com 50 µL de ácido sulfúrico 4,7 N. A absorbância média obtida nos três poços somente com a TxT foi considerada 100% de ligação e utilizada para cálculo da inibição de ligação pelos anticorpos (FITZSIMMONS et al., 2001; YOUSEFI et al., 2014).

3.17 Ensaio de neutralização *in vivo*

O teste de neutralização *in vivo* foi feito de acordo com o método utilizado pelo Controle de Qualidade do Instituto Butantan, com base na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), em projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan. Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss de ambos os sexos, entre 17 e 22 gramas. Ao todo, 250 animais procedentes do Biotério do Instituto Butantan foram divididos em cinco grupos experimentais com 50 animais: um controle com soro antitetânico de referência e quatro grupos teste para os anticorpos monoclonais. Cada anticorpo foi testado em cinco diluições, sendo 10 animais para cada diluição. Os anticorpos foram testados isoladamente ou em mistura.

Os anticorpos foram misturados em diferentes quantidades a uma dose fixa da TxT. Essa dose foi previamente determinada pelo serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan, e corresponde a L+10/50. Representa a menor quantidade de TxT que, quando misturada a 0,1 UI da antitoxina de referência, causa a morte de 50% dos camundongos. Preparou-se uma solução com toxina tetânica e quantidades variáveis dos anticorpos (a solução mais concentrada do anticorpo foi preparada com 1 mL da solução do anticorpo na maior concentração obtida após transfecção transitória e purificação, 12 L+10/50 da TxT e solução salina peptonada 1% para completar o volume de 2,4 mL). A diluição dos anticorpos foi de 1:2. Cinco diluições foram testadas por grupo. As quantidades de anticorpo testadas foram semelhantes às testadas em outro trabalho (YOUSEFI et al., 2014).

As misturas foram incubadas em estufa a 37° C por uma hora. A inoculação subcutânea de 0,2 mL da mistura foi feita por pessoal treinado. Os animais foram observados por quatro dias, sendo registrado diariamente o número de mortes, quando houve.

O resultado foi expresso em um gráfico de sobrevivência durante os quatro dias do experimento. A potência dos anticorpos que neutralizaram a toxina foi calculada pelo método Spearman-Kaerber pelo programa CombiStats, versão 5.0, usando a antitoxina tetânica de referência como comparação. A estimativa da potência dos anticorpos que não neutralizaram a toxina foi feita pelo cálculo $(1/ED_{50}) \div dose (mL) \times 1 UI/mL$, em que ED_{50} é a dose média eficaz da antitoxina controle, calculada pelo programa de estatística descrito acima, dose é a quantidade máxima recebida do anticorpo por animal em mililitros e 1 UI/mL é a concentração da antitoxina de referência usada.

4 RESULTADOS

4.1 Estratégia 1: Separação dos linfócitos B com anatoxina tetânica

4.1.1 Conjugação da AnT com biotina

A AnT obtida do Setor de Produção de Vacinas Anaeróbias do Instituto Butantan foi analisada por SDS-PAGE (Figura 7). Assim como descrito por Thaysen-Andersen et al, 2007, as amostras de AnT analisadas são observadas como uma banda na região de 150 kD.

Figura 7 - SDS-PAGE, gel redutor da anatoxina tetânica

M, marcador de massa (kDa), 1, 5, 10 e 20 correspondem às quantidades de AnT em microgramas aplicadas em cada coluna. Gel corado com azul de Coomassie. Gel de 7,5% de poliacrilamida.

Prepararam-se três reações para biotinilação em diferentes razões biotina:proteína (B:P). A Tabela 11 mostra os valores obtidos.

Tabela 11 - Valores obtidos na determinação da razão B:P

Razão teórica	A ₅₀₀ obtida	ΔA ₅₀₀ *	Conc. Biotina nmol/mL [#]	Conc. Proteína nmol/mL	Razão calculada B:P
1:1	0,819	-0,003	---	15,00	---
4:1	0,788	0,028	8,24	14,53	0,6:1
10:1	0,762	0,054	15,88	13,13	1,2:1

*Absorbância corrigida em relação ao controle com PBS: A₅₀₀ 0,816. ΔA₅₀₀ = A₅₀₀ PBS – A₅₀₀ AMOSTRA

[#] Concentração calculada a partir da fórmula: Biotina (nmol/mL) = (ΔA / ε₅₀₀) x 10⁷; sendo ε₅₀₀ o coeficiente de extinção molar de HABA/avidina = 34.000.

Determinou-se que para os testes subsequentes seria utilizada a amostra de AnT biotinilada na razão 1,2:1, indicando que, em média, todas as moléculas de anatoxina continham uma molécula de biotina. A comprovação da biotinilação da AnT-B foi avaliada por ELISA usando avidina-peroxidase (Sigma-Aldrich). O gráfico da Figura 8 mostra a distinção entre as proteínas com e sem biotina.

Figura 8 - ELISA com avidina-peroxidase para confirmar a presença de biotina ligada à AnT

Placa sensibilizada com anatoxina tetânica sem biotina (controle) e conjugada com biotina na razão molar de 1,2:1 (biotina:AnT). Avidina-peroxidase incubada na diluição de 1:200.000. Resultado da absorbância expresso em unidades arbitrárias, com valor 1 para anatoxina tetânica controle (sem biotina). Resultado de três testes independentes em triplicata.

Para avaliar se a biotinilação causou interferência no(s) epítipo(s) da AnT reconhecido(s) por anticorpos policlonais foi realizado ensaio de ELISA. Os resultados podem ser vistos na Figura 9.

Figura 9 - ELISA da AnT com SAT

Placa sensibilizada com anatoxina tetânica sem biotina (controle) e conjugada com biotina na razão molar de 1,2:1 (biotina:AnT). Soro antitetânico equino diluído a 1:8000 foi testado e revelado com anticorpos anti-imunoglobulina equina. Teste indica a ligação dos anticorpos presentes no SAT tanto à AnT-controle como à AnT-B. A ligação à AnT-controle representa 100% de interação. A ligação com a AnT-B foi de 93,2% em relação ao controle. Resultado de três testes independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$, teste t-student.

4.1.2 Marcação com AnT-B e Estreptavidina

4.1.2.1 Separação de células B únicas

Dois *sortings* foram feitos com linfócitos B enriquecidos marcados com AnT-B e estreptavidina-PerCP-CyTM5.5. A escolha dos doadores foi baseada na maior quantidade de células obtidas no isolamento com Ficoll-Paque, já que o título dos anticorpos era similar, entre 12 e 16 UI/mL. Nível de proteção basal corresponde a títulos acima de 0,01 UI/mL de anticorpos antitetânicos.

A separação das células foi feita com base na estratégia de seleção das populações representada na Figura 10.

Figura 10 - Estratégia de seleção das populações para identificação das células produtoras de anticorpos antitetânicos

CMSP foram incubadas com AnT-B seguido de lavagem e de incubação com anti-CD19-FITC, anti-IgG-APC e SAv-PerCP-CyTM5.5. Esquema representando as populações analisadas: em A, células mononucleares totais no gráfico FSC-A vs. SSC-A. A região demarcada refere-se à população dos linfócitos. B, *singlets* (partícula detectada como um evento único – discriminação de células grudadas). C, linfócitos distribuídos conforme a marcação com CD19 e IgG de superfície. Neste gráfico está selecionada a população referente aos linfócitos B de memória (CD19+/IgG+ - 0,167%). Em D, linfócitos B de memória quanto à marcação com antígeno. Essa foi a população separada nas placas de 96 poços.

4.1.2.2 RT-PCR

A RT-PCR foi feita com a placa inteira. Em quatro poços da placa não foram separadas células para que fossem utilizados controles das reações que foram dois controles negativos (sem material genético), RNA purificado de célula HeLA (controle positivo da transcrição reversa) e mistura equivalente a 1000 linfócitos B separados por *cell sorting* (controle positivo da RT-PCR das cadeias variáveis das imunoglobulinas).

A seguir estão resumidos os resultados obtidos de cada *sorting*.

- *Sorting* #1 – Células coletadas sem reforço vacinal.

Enriquecimento dos linfócitos B a partir de cerca de 50×10^6 CMSP, e separação de 95 poços contendo uma célula. Amplificou-se o par cadeia pesada/leve da mesma célula em 41 poços (25 anticorpos IgG κ e 16, IgG λ) a partir de todos os poços obtidos com uma célula.

- *Sorting* #2 - Células coletadas sem reforço vacinal. Neste *sorting*, o fluoróforo APC conjugado ao anticorpo anti-IgG não foi detectado, sendo que as células foram separadas com o fenótipo CD19+/Estreptavidina+.

Enriquecimento de linfócitos B a partir de cerca de 100×10^6 CMSP, e separação de 144 poços contendo uma célula (uma placa com 92 poços com uma célula e outra com 52). A RT-PCR foi feita a partir de uma das placas. A cadeia pesada Ig γ foi amplificada em 10 poços. O controle de β -actina em 70 poços. As reações das cadeias leves não foram feitas.

A Figura 11 mostra um gel representativo do resultado obtido do processamento das amostras do *sorting* #1.

Figura 11 - Gel de agarose 2% representativo dos fragmentos obtidos a partir da RT-PCR dos linfócitos B únicos

M – marcador de massa

CN1 – controle negativo 1

CP1 – controle positivo – RNA HeLa

CP2 – controle positivo – poço com 1000 linf. B

CN2 – controle negativo 2

Os produtos das PCRs de cada reação foram analisados individualmente em géis de agarose 2%. A figura mostra os géis de cada fragmento amplificado dispostos de forma que cada coluna representa o resultado do mesmo poço da placa original onde as células foram separadas. Os controles negativos CN1 e CN2 foram feitos sem material genético, o controle positivo CP1 foi feito com RNA de célula HeLa como controle positivo da reação da transcrição reversa e o controle positivo CP2 com 1000 linfócitos B separados, como controle positivo da RT-PCR. IgH, cadeia pesada gama, Ig κ , cadeia leve kappa e Ig λ , lambda.

4.1.2.3 Análise das sequências de DNA das imunoglobulinas

- *Sorting* #1:

A Tabela 12 mostra a classificação das sequências dos segmentos V(D)J das regiões variáveis amplificadas e sequenciadas da cadeia pesada Ig γ , e seus respectivos pares de cadeia leve, kappa ou lambda, além da sequência codificada de aminoácidos de suas CDR3.

Das amostras sequenciadas e analisadas, todas mostravam diferenças nos segmentos V(D)J e nas sequências da CDR3 entre elas, indicando a ausência de seleção clonal resultante da estratégia de *sorting*.

- *Sorting* #2:

As sequências da cadeia Ig γ obtidas no *sorting* #2 que foi comprometido pela não detecção da marcação com anti-IgG estão demonstradas na Tabela 13. Não foram amplificadas sequências clonalmente relacionadas.

[illegible]

Tabela 12, continuação.

Anticorpo	VH	DH	JH	CDR3 (aminoácidos)	Mutações	κ/λ	Vκ/λ	Jκ/λ	CDR3 (aa)	Mutações
171-01	S-DS	E-M	B	&& § ∅ * ∅ & ≈ * † + § § % Π Æ	2	κ	D-HG	E/S	\$ \$ † & * ∅ Æ ≈ ∅	8
176-01	D-P	H-HE/D-D	C	& § Π Æ % † † † † † † & @ Π ∆	6	κ	E-EH	D/S/E	\$ \$ ∆ * ∅ % Æ % ∅	8
177-01	S-DP	E-M	C	\$ ∅ ∅ & ∅ ∅ ≈ & † † † † † † & @ Π ∆	1	κ	E-B	E/S	\$ \$ † * ∅ † Æ ≈ ∅	0
180-01	D-MD	S-HD	S/B	Æ § § % Π † † & & * ∅ & Π †	4	κ	D-HG	E/S	\$ \$ † & ∅ ∅ Æ ∅	6
182-01	S-DS	H-H	D	# = & † ∅ ∅ ∅ ∅ ∅ ∅ † ∅ § * ∅ ∅ ∆ % Π >	16	κ	N	P	\$ \$ † † † ∅ † Æ + ∅	9
183-01	S-DS	C-ED	H/E/B	& Æ @ = \$ \$ + ∅ + Æ ∅ + § * ≈ † % Π +	5	λ	D-E/D-P	H/D	\$ ∆ ≈ Π ∅ ∅ ∅ ∅ ∆	5
194-01	S-DS	C-ED	C	& § † Π ∅ ∅ ∅ ≈ † ≈ ∆ Π ∅ ∆ ≈ ∅ † † † † † † & @ Π ∆	4	κ	E-DP/ED-DP	D/S/E	\$ ∅ † † ∅ ∅ + % ∅	3

As sequências de aminoácidos das CDR3 estão codificadas por motivo de potencial patenteamento.

Tabela 13 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis da cadeia pesada obtidas no *sorting* #2: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas – separação com AnT e SAV

Anticorpo	VH	DH	JH	CDR3 (aminoácidos)	Tamanho CDR3 (aa)	Mutações
108-02	S-DE	H-H	B	Π § & † ∅ † ∅ § ∅ ∅ † ∅ § ≈ % Π Æ	17	6
118-02	D-DG	D-HH	B/S	& ∅ † § Π & & ∅ & % + ∅	14	25
121-02	D-MS	B-B/B-EI	S	& & † ∅ † & † ∅ ∅ †	10	11
128-02	S-BP	B-B/B-EI	S	∅ § ≈ + ∅ Π %	8	12
147-02	S-DG-H	D-EC	S	& ∅ Π • Æ & ∆ > ∅ Π †	11	24
153-02	S-DS	C-EP	S	∅ § & ∅ ∅ & ≈ † @ § Π †	12	21
158-02	S-BP	E-HC	S	& ∅ & ∆ ∅ Π	6	4
164-02	S-DS	B-EH	S	& † ∅ & † Π = § Π %	10	21
176-02	S-S	C-EP/D-EG	S	∅ ∆ > ∆ & § Æ % Π †	10	43
193-02	S-DS	H-H/H-EB/D-EG	S	∅ § Π - & † ∅ ∆ & % § § § = # ∅ % @ Π %	21	37

As sequências de aminoácidos das CDR3 estão codificadas por motivo de potencial patenteamento.

4.1.3 Marcação com antígeno em formato tetramérico

4.1.3.1 Separação de linfócitos B - antígeno em formato tetramérico

A separação das células com antígeno em formato tetramérico usando AnT-B e SAv-PerCP-CyTM5.5 foi feita de acordo com Franz (2011). A concentração de AnT-B utilizada foi determinada com marcação com diferentes concentrações do tetrâmero em uma mistura de CMSP dos doadores vacinados (Figura 12).

Figura 12 - Titulação do antígeno no formato tetramérico

CMSP foram incubadas com diferentes concentrações do tetrâmero e com os anticorpos anti-CD19-FITC e anti-IgG-APC como descrito na seção 3.7.2 – marcação com tetrâmero. A análise das populações foi feita como descrito na Figura 13, e os valores estão representados na tabela e gráfico acima. Os valores de CMSP, Linfócitos e Linf. B de memória foram obtidos da contagem de eventos dos gráficos. Os valores da população "Triplo +" (CD19⁺IgG⁺Tetrâmero⁺) foram calculados com base nas porcentagens da coluna "Triplo + (%)" em relação aos Linf. B memória. Resultado expresso em número de eventos triplo positivos normalizado por 10⁶ CMSPs com as diferentes concentrações do tetrâmero (0,4; 1,2 e 3,6 µg/mL). Foram adquiridos cerca de 5x10⁶ CMSPs durante a análise. A condição 'Marcação usual' corresponde à marcação independente da AnT-B 5µg/mL e da SAv-PerCP-CyTM5.5 1:1600. Detectaram-se 2,2 eventos positivos a cada 10⁶ CMSPs. Resultados de um único teste.

A partir deste resultado, decidiu-se usar o tetrâmero na concentração equivalente a 3,6 µg/mL do TT biotilado pela maior detecção dos eventos positivos.

A Figura 13 mostra o esquema de identificação e separação dos linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos, que foi idêntica à estratégia anterior no que diz

respeito à identificação das populações (Figura 10). As células tinham o fenótipo $CD19^+IgG^+Tetrâmero^+$ e foram separadas de três doadores diferentes.

Figura 13 - Estratégia de seleção das populações para identificação das células produtoras de anticorpos antitetânicos através do antígeno tetramérico

CMSP foram incubadas com antígeno tetramérico seguido de lavagem e de incubação com anti-CD19-FITC, anti-IgG-APC e SAv-PerCP-CyTM5.5, Esquema representando as populações analisadas: em A, linfócitos enriquecidos no gráfico FSC-A vs. SSC-A. B, *singlets*; C, linfócitos distribuídos de acordo com a marcação com anti-CD19 e anti-IgG de superfície. Neste gráfico está selecionada a população referente aos linfócitos B de memória ($CD19^+/IgG^+$ - 4,93%). Em D, população dos linfócitos B de memória positivos para o antígeno tetramérico. A população selecionada nesse gráfico indicada como 'Tetrâmero +' foi a população separada nas placas de 96 poços.

- *Sorting* #3: Células coletadas sem reforço vacinal. Os linfócitos B foram enriquecidos a partir de cerca de 100×10^6 CMSP. Foram obtidas três placas, duas completas com 92 poços com uma célula e a terceira com 45 poços com uma célula.

- *Sorting* #4: para este *sorting*, as células foram coletadas seis dias após reforço da vacina dT.

A quantidade de células processada foi a mesma descrita para o *sorting* #3, sendo que foram obtidas duas placas com 92 poços com uma célula e uma terceira com 20 poços com uma célula separada.

- *Sorting* #5: este *sorting* foi realizado com células coletadas após 14 dias do reforço da vacina dT.

Obtiveram-se sete placas com 92 poços com uma célula separada a partir da mesma quantidade de células descritas no *sorting* #3.

4.1.3.2 RT-PCR

Uma placa de cada *sorting* foi processada para síntese do cDNA e amplificação das regiões variáveis das cadeias pesada e leves. Para cada teste, a quantidade de pares de cadeia pesada+leve (H+L, *Heavy+Light*) amplificada no mesmo poço está representada na Tabela 14.

Tabela 14 - Pares de anticorpos obtidos nos *sortings* das células separadas com tetrâmero

<i>Sorting</i>	Reforço da vacina dT	Pares H+L	
		Kappa	Lambda
#3	Não	61	
		47	14
#4	Sim	62	
		42	20
#5	Sim	73	
		44	29

Os resultados foram obtidos a partir da RT-PCR de uma placa. Os pares correspondem à amplificação da cadeia pesada (H) e da cadeia leve (L) no mesmo poço. Estão identificadas as quantidades de anticorpos amplificados com a cadeia leve kappa ou lambda

4.1.3.3 Análise das sequências de DNA das imunoglobulinas

Algumas sequências clonalmente relacionadas foram identificadas na comparação das amostras obtidas nos *sortings* #3 e #4., individualmente. As Tabelas 15 e 16 mostram estas sequências. Não foram obtidas sequências clonalmente relacionadas no *sorting* #5 (resultado não mostrado).

Tabela 15 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis obtidas no *sorting* #3: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas - separação com antígeno no formato tetramérico

Anticorpo	VH	DH	JH	CDR3 (aminoácidos)	Tamanho CDR3 (aa)	Mutações	κ/λ	Vκ/λ	Jκ/λ	CDR3 (aa)	Tamanho CDR3 (aa)	Mutações
321-03	D-DG-D	D-EC	D	=>>&∅∅Æ‡ΠΔ%Π>	13	8	κ	S-E	H	\$‡‡‡∅∅Æ‡∅	9	2
394-03	D-DG-D	D-EC	D	=∅>&∅∅Æ‡ΠΔ%Π>	13	10	κ	S-E	H	\$‡‡‡∅∅Æ‡∅	9	4
326-03	S-DS	D-D	S	&∅ΔÆΠΠΠ%≈∅&‡‡‡∅‡‡%Π‡	18	23	κ	H-HI/HDHI	S	@\$∅+&&Æ+∅	9	10
386-03	S-DS	D-D	B/S	&&>ÆΠΠΠ%≈∅&‡‡‡∅‡‡%Π∅	18	23	κ	H-HI/HDHI	S	@\$∅+&&Æ+∅	9	11
374-03	S-DS	S-EE/ E-M/S-S	C	&Δ‡‡\$‡‡\$‡‡>‡‡∅‡‡&@ΠΔ	17	29	λ	E-BE	D	&∅≈Π∅∅+∅∅≈∅	11	10
307-03	S-DS	S-EE/ E-M/S-S	C	&Δ‡‡\$‡‡\$‡‡>‡‡∅‡‡&@ΠΔ	17	28	λ	E-BE	D	&∅≈Π∅∅+∅∅≈∅	11	7
377-03	S-DS	H-H	D	#=&%Θ∅∅Δ&Θ‡‡∅\$‡‡∅%Π>	21	14	κ	E-B	S	\$‡‡‡>∅‡Æ+∅	9	13
182-01*	S-DS	H-H	D	#=&‡Θ∅∅∅∅Θ‡‡∅\$‡‡∅%Π>	21	16	κ	E-B	S	\$‡‡‡∅‡‡Æ+∅	9	9

* sequência proveniente do *sorting* #1.

Os quatro grupos clonalmente relacionados obtidos estão indicados na tabela (representados no mesmo campo). Os segmentos V(D)J e as sequências de aminoácidos do CDR3 estão codificados por motivo de potencial patenteamento.

Anticorpo	VH	DH	JH	CDR 3 (aminoácidos)	Tamanho CDR3 (aa)	Mutações	κ/λ	Vκ/λ	Jκ/λ	CDR3 (aa)	Tamanho CDR3 (aa)	Mutações
145-04	E-EI	H-H/H-EB/H-HE	B/S	Π§ÆÆ#‡	6	23	λ	E-SG	E	\$◊‡Π§◊+◊&◊&Δ	12	17
112-04	E-EI	H-H/H-EB/H-HE	B/S	Π§ÆÆÆ#‡	6	23	λ	E-SG	E	\$◊‡Π§◊+◊&◊&Δ	12	17
184-04	E-EI	H-H/H-EB/H-HE	B/S	Π§ÆÆÆ#‡	6	23	λ	E-SG	E	\$◊‡Π§◊+◊&◊&Δ	12	17
103-04	S-DP	D-D	B/S/E	&Δ+◊&§§&Æ‡≈◊&Æ§Π◊%Π+	19	59	κ	E-DP/ ED-DP	H	\$\$&◊◊‡Æ≈◊	9	35
106-04	S-DP	D-D	S	@>Æ◊&=&\$%/<◊&Æ§*◊%Π•	19	48	κ	E-DP/ ED-DP	E	\$\$◊*§ΔÆ≈◊	9	39
109-04	S-DP	D-D	S	Δ>Æ◊&=&\$‡≈◊&Æ=Π‡◊%ΠΔ	19	53	κ	E-DP ED-DP	E	\$\$◊‡◊ΔÆ≈◊	9	50
133-04	S-BP	C-EP/B-EH	S	>+≈◊•&◊&‡◊%Π‡	12	25	κ	D-HG	D	\$\$‡&◊◊ÆÆ%◊	10	13
181-04	S-BP	C-EP/B-EH	S	>+≈◊§§&◊&‡◊%Π‡	12	26	κ	D-HG	D	\$\$‡&◊◊ÆÆ%◊	10	8
121-02 ^s	D-MS	B-B/B-EI	S	&&‡◊◊‡&‡◊Δ‡	10	11	κ	D-HG	E	\$\$‡&§◊◊≈◊	9	10
138-04	D-MS	B-B/B-EI	S	&&‡◊◊‡&‡◊Δ‡	10	10	κ	D-HG	E	\$\$‡&§◊◊≈◊	9	11
107-04	S-DS	S-EE/E-M/S-S	C	&Δ‡§**‡§§>‡◊‡‡&@ΠΔ	17	28	κ	E-DP/ ED-DP	E	\$\$◊‡◊+‡&≈◊	10	26
191-04	S-DS	S-EE/E-M/S-S	C	&Δ‡§**‡§§>‡◊‡‡&@ΠΔ	17	28	κ	D-HG	H	\$\$‡&◊◊Æ◊◊	9	18
172-04	S-DS	S-EE/E-M/S-S	C	&Δ‡§**‡§§>‡◊‡‡&@ΠΔ	17	27				Cadeia leve não foi amplificada*		
142-04	D-DD	C-EP/C-HB/C-ED	S	&&ÆΔΔ§◊‡&#**◊◊◊%+§&◊%Π‡	22	7	λ	H-B	H/D	Códon de parada#		
156-04	D-DD	C-EP/C-HB/C-ED	S	&&ÆΔΔ§◊‡&#**◊◊◊%+§&◊%Π‡	22	8	λ	H-B	D	Códon de parada#		

* A cadeia leve deste anticorpo não foi amplificada. Porém a cadeia pesada *γ* amplificada foi classificada como clonalmente relacionada com os anticorpos 107-04 e 191-04.

A região da cadeia leve variável continha um códon de parada nas duas seqüências amplificadas.

\$ Sequência do *sorting* #2.

As amostras deste *sorting* foram obtidas após o reforço da vacina antitetânica. Os grupos clonalmente relacionados obtidos estão indicados na tabela (representados no mesmo campo). Os segmentos V(D)J e as seqüências de aminoácidos do CDR3 estão codificados por motivo de potencial patenteamento.

4.1.3.4 Clonagem, expressão e purificação dos anticorpos

Os vetores para a expressão dos anticorpos foram obtidos após clonagem das regiões variáveis amplificadas com oligonucleotídeos contendo os sítios de restrição correspondentes ao sítio de clonagem do vetor (ver Figura 6). Para cada anticorpo foram obtidos dois vetores, um contendo a sequência da cadeia pesada Ig γ 1 e outro com a da cadeia leve correspondente, Ig κ ou Ig λ . A expressão transitória dos anticorpos foi feita em células HEK-293-F após cotransfecção dos dois vetores usando polietilenimina (PEI), que é um polímero catiônico que, quando complexado ao DNA, permite sua internalização por endocitose (GODBEY; WU; MIKOS, 1999). A transfecção dos anticorpos foi transitória, e a expressão foi mantida por três dias, quando o sobrenadante foi purificado por cromatografia de afinidade em proteína A usando o sistema ÄKTA purifier (GE, Suécia). A Figura 14 mostra um cromatograma representativo da purificação.

Figura 14 - Cromatograma de purificação do anticorpo 307-03 por cromatografia de afinidade em proteína A

O carregamento da coluna foi feito com sobrenadante do cultivo de três dias das células HEK293F transfectadas com os vetores contendo as sequências da cadeia pesada e leve das imunoglobulinas. O pico após a eluição 2 (pH 3,2) corresponde ao anticorpo purificado que foi coletado. O pico após a eluição 1 com pH 6 corresponde a contaminantes presentes na amostra.

4.1.3.5 Integridade dos anticorpos - SDS-PAGE

A integridade dos anticorpos foi verificada por SDS-PAGE a 12% em gel redutor. A Figura 15 mostra os anticorpos expressos pelas sequências obtidas no *sorting* #3.

Figura 15 - SDS-PAGE dos anticorpos purificados

Amostras aplicadas em condição redutora em gel de poliacrilamida a 12%. Coloração com Coomassie coloidal. Aplicação de 1 µg de proteína em cada coluna. M corresponde ao marcador de baixa massa molecular (LMW, *Low Molecular Weight*), e os números acima do gel indicam os anticorpos aplicados.

4.1.3.6 Ensaio de ligação ao antígeno - ELISA

A ligação dos anticorpos foi testada com ELISA usando a toxina tetânica. Este antígeno foi testado já que representa a molécula a ser neutralizada pelo anticorpo. Os anticorpos testados estavam na concentração de 60 µg/mL (com exceção de três deles que foram testados na concentração inicial de 30 µg/mL – 326-03, 377-03 e 191E-03) e foram diluídos seriadamente 1:2.

Observa-se na Figura 16 que na condição testada, a curva de ligação dos anticorpos não mostra etapa de saturação da ligação (como a observada no controle do soro do doador) e a maioria tende a valores de absorbância próximos a zero.

Figura 16 - ELISA qualitativo de ligação dos anticorpos à toxina tetânica

Anticorpos testados nas concentrações de 7,5 a 60 µg/mL, em quatro diluições seriadas 1:2. Soro policlonal humano foi usado como controle positivo na diluição inicial de 1:50 e diluições seriadas 1:2. Placa sensibilizada com 100 µL de toxina tetânica a 5 µg/mL.

4.1.3.7 Análise da especificidade da marcação dos anticorpos na etapa de *sorting* - *Backgating*

A avaliação da marcação feita pela análise *backgating* foi capaz de indicar a especificidade das marcações. A análise foi feita com a busca de eventos nas populações com as características das células separadas nas placas. O resultado gerado pelo *software* FlowJo mostra em vermelho onde estão os eventos com as características escolhidas nas populações anteriores, e está demonstrado na Figura 17. Observa-se que há maior quantidade de eventos CD19⁺Tetrâmero⁺ na região dos linfócitos B IgG negativos indicada pela seta em 3B. Considerando que os doadores foram vacinados mais de uma vez para o tétano, esperava-se que a maioria das células marcadas com o tetrâmero fossem IgG positivas, e não parece ser o caso. Isso sugere que a estreptavidina pode estar ligando-se de forma inespecífica nas células.

Figura 17 - Análise da marcação das células com tetrâmero durante o *sorting*

Em A, esquema das populações selecionadas. A seleção das populações é hierárquica. Isso quer dizer que a população total mostrada no gráfico A4 está posicionada na população selecionada no gráfico A3 (Linf. B memória), assim como todos os eventos mostrados em A3 correspondem aos eventos da seleção em A2 (*Single Cells*), e assim sucessivamente. O gráfico A4 mostra as células separadas (Tetrâmero+) com as características desejadas: linfócitos B que expressam IgG antitetânica. Em B, análise backgating feita no software FlowJo. Para essa análise, selecionou-se a população dos eventos que foram separados na placa (B4). Nesse gráfico, os fluoróforos representados são FITC (CD19) e PerCP-CyTM5.5 (estreptavidina - tetrâmero com anatoxina). Em vermelho estão representados todos os eventos identificados pelo software que são positivos para esses dois fluoróforos (mesmo que estejam fora das populações previamente selecionadas). O resultado indica que há maior quantidade de eventos positivos no gráfico B3 na população que corresponde aos linfócitos B que não expressam IgG na superfície (seta).

4.2 Estratégia 2: Separação dos linfócitos B com toxina tetânica e de plasmablastos

4.2.1 Toxina tetânica

Uma amostra de toxina tetânica foi gentilmente cedida pelo Setor de Vacinas Anaeróbias do Instituto Butantan. A observação do perfil eletroforético da toxina mostrou a presença de diversas proteínas na amostra além das bandas esperadas (Figura 18). Observam-se duas bandas mais intensas próximas a 150 kDa correspondentes a TxT, que representam a cadeia polipeptídica íntegra e a clivada por proteases (MATSUDA, MORIHIRO; YONEDA, 1974).

Figura 18 - Perfil eletroforético da toxina e anatoxina tetânicas

SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10% em condição não redutora. As quantidades das proteínas aplicadas estão demonstradas na figura: 5 e 1 µg/coluna. M, marcado de massa de alta massa molecular. Coloração com Azul de Coomassie. São observadas as bandas características da toxina tetânica próximas de 150 kDa, uma correspondente à TxT como um peptídeo único e a outra como o peptídeo clivado por proteases durante o transporte da toxina pela parede celular da bactéria. Há a presença de proteínas de menor massa molecular na amostra de TxT. O perfil da AnT não é definido, o que sugere a conjugação das proteínas de menor massa molecular nas cadeias da TxT durante o tratamento com formaldeído e glicina para destoxificação da toxina tetânica.

A purificação da TxT foi necessária para eliminar a maior parte das proteínas contaminantes para evitar que fossem conjugadas com os fluoróforos. O procedimento foi feito por cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão de tamanho (SEC-HPLC) usando uma coluna GS3000 SWxL (Tosoh Biosciences) com resolução para proteínas

globulares de 10 a 500 kDa, com eluição com PBS. A Figura 19 mostra o cromatograma obtido da toxina tetânica na composição inicial fornecida pelo Instituto Butantan.

Figura 19 - Cromatograma representativo da amostra de toxina tetânica separada em coluna de SEC-HPLC

Uma amostra de toxina tetânica obtida após reconstituição foi aplicada em coluna TSK gel GS3000SWxL (capacidade de separação de proteínas globulares de 10 a 500 kDa). O pico indicado pela seta corresponde à toxina tetânica, cujo volume de retenção foi determinado por um padrão de massa molecular. Coletou-se uma amostra de 1 mL correspondente ao volume de retenção entre 8,4 e 9,4 mL em fluxo de 1 mL/min de PBS. Eixo das abscissas: volume de retenção em mililitros. Marcações em vermelho anteriores a 10 mL indicam início e fim do fracionamento. Eixo das ordenadas: absorbância em 280 nm (mAU).

A amostra obtida foi aplicada em outra coluna de maior resolução (5 a 150 kDa - TSK gel GS2000SW) na tentativa de aumentar a pureza, porém não houve acréscimo significativo. A Figura 20 mostra um gel de SDS-PAGE das amostras purificadas. Portanto, a purificação foi feita somente com a coluna TSK gel GS3000SWxL.

Figura 20 - SDS-PAGE das amostras de toxina tetânica purificadas por SEC-HPLC

Gel de poliacrilamida a 10% na condição não redutora. M- marcador de alta massa molecular 1- Toxina tetânica inicial, 2 e 3- duas frações da toxina tetânica purificada em coluna GS3000SWxL, 4 e 5- duas frações da toxina tetânica purificada primeiramente na coluna GS3000SWxL e em seguida na coluna GS2000SW. Coloração com nitrato de prata. As bandas mais intensas indicadas pela seta correspondem à toxina tetânica. Aplicação de 1 µg de cada amostra. Uma etapa de purificação (colunas 2 e 3) foi considerada adequada para a conjugação da toxina. A segunda etapa de purificação com coluna GS2000SW não alterou de forma significativa o perfil da amostra.

4.2.2 Conjugação toxina tetânica com biotina e Alexa Fluor® 647

A conjugação da fração da toxina tetânica separada por SEC-HPLC foi feita com biotina da mesma maneira que a anatoxina tetânica. A razão biotina:proteína obtida foi 2:1. A detecção da conjugação da biotina foi feita através de ELISA com avidina-peroxidase. O resultado representado na Figura 21 mostra a detecção da biotina conjugada à toxina.

A detecção da conjugação com Alexa Fluor® 647 foi feita por espectrofotometria a 650 nm usando o coeficiente de extinção molar. A razão molar obtida de conjugação foi de 2:1 a partir da razão molar teórica de 3:1 (Alexa Fluor® 647:toxina).

Figura 21 - ELISA qualitativo com avidina-peroxidase de amostras da toxina tetânica biotiniladas

Placa sensibilizada com toxina tetânica sem biotina (controle) e conjugada com biotina na razão molar de 2:1 (biotina:TxT). Avidina-peroxidase incubada na diluição de 1:200.000. Resultado da absorbância expresso em unidades arbitrárias, com valor 1 para toxina tetânica controle (sem biotina). Observa-se a ligação da avidina nas moléculas conjugadas. Resultado de independentes em triplicata.

4.2.3 Determinação da população de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos

A marcação com a toxina tetânica conjugada independentemente com Alexa Fluor® 647 e biotina foi testada em um *pool* de CMSP de dois doadores vacinados contra tétano cujas células foram coletadas seis ou 14 dias após a vacinação. Foi possível identificar uma população de linfócitos B de memória duplo positiva para as toxinas (Figura 22).

Figura 22 - Esquema da análise da detecção de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos com as toxinas tetânicas conjugadas

CMSP totais foram marcadas com anti-CD19-PE, anti-IgG-FITC, toxina tetânica conjugada com Alexa Fluor® 647 e toxina tetânica conjugada com biotina, seguido de lavagem e incubação com estreptavidina-PerCP-CyTM5.5. Esquema representando as populações analisadas: Em A, CMSP totais; B, *singlets*; C, linfócitos B de memória; e D, linfócitos positivos para ambas as toxinas tetânicas (população oval). Essa foi a população separada nas placas de 96 poços.

A análise *backgating* foi feita e mostrou que a referida população concentra-se na população dos linfócitos de memória, sugerindo que a marcação foi específica com esta estratégia de marcação (Figura 23).

Figura 23 - Análise da estratégia de marcação de CMSP com toxinas tetânicas conjugadas com Alexa 647 e biotina

Análise feita como descrito na Figura 17. Os eventos em vermelho em B correspondentes aos eventos marcados com as duas toxinas (TTx) estão concentrados na população de linfócitos B produtores de IgG (seta em B3).

4.2.4 Separação de células B únicas

4.2.4.1 Marcação com toxina tetânica

A estratégia de dupla marcação do mesmo antígeno utilizando a toxina tetânica conjugada com Alexa Fluor® 647 e biotina foi testada em três *sortings*:

- *Sorting* #6: células coletadas após seis dias da vacinação reforço. Linfócitos B enriquecidos a partir de cerca de 100×10^6 CMSP. Obtiveram 59 poços com uma célula com o fenótipo $CD19^+IgG^+TxT^{Duplo+}$.

- *Sorting* #7: mesma condição do *sorting* #6. Obtiveram-se 44 poços com uma célula.

- *Sorting* #8: células coletadas 14 dias após vacinação de reforço. A marcação foi feita diretamente com cerca de 100×10^6 CMSPs sem enriquecimento prévio. Enriquecimento feito no *cell sorter* com separação em tubo das células $CD19^+/IgG^+$ e posterior separação *single cell*. Obtiveram-se cinco placas com 92 poços com uma célula com o fenótipo descrito acima.

4.2.4.2 Marcação de plasmablastos

A separação de plasmablastos foi realizada com células coletadas seis dias após a vacinação de reforço.

- *Sorting* #9: As células com o fenótipo $CD19^+CD27^{++}$ foram separadas nos poços. Não foi utilizado o antígeno tetânico na marcação. Separaram-se duas placas com 92 poços com uma célula.

O esquema de identificação dos plasmablastos com essa estratégia de marcação está representado na Figura 24.

Figura 24 - Esquema de identificação de plasmablastos CD19⁺CD27⁺⁺

A marcação de CMSP com CD19-FITC, CD27-PerCP-CyTM5.5 e DAPI permitiu a identificação das células com fenótipo CD27⁺⁺ descritas por Franz (2011). Em A, CMSPs totais; B, *singlets*; C, células vivas (DAPI^{neg}); e D, linfócitos CD19⁺CD27⁺⁺.

- *Sorting* #10: A separação no *cell sorter* das células foi feita no mesmo dia da coleta do sangue, 6 dias após o reforço da vacina dT.

Foram separadas seis placas com 92 poços com uma célula.

Neste *sorting*, o esquema de identificação dos plasmablastos foi diferente do anterior, e está representado na Figura 25.

Figura 25 - Esquema de identificação de plasmablastos $CD19^+CD27^+CD38^+$

A marcação de CMSP (no gráfico *PBMC* – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) com $CD19\text{-APC-Cy}^{\text{TM}}7$, $CD27\text{-PerCP-Cy}^{\text{TM}}5.5$, $CD38\text{-PE}$ e DAPI. Em A, CMSPs totais. B, *singlets*; C, células vivas (DAPI neg); D, linfócitos B $CD19^+$ e, E, plasmablastos $CD27^+CD38^+$.

4.2.5 RT-PCR

A síntese do cDNA e amplificação das cadeias variáveis foi feita em uma placa de cada *sorting*, com exceção do #8, em que duas placas foram processadas. A Tabela 17 mostra a amplificação dos pares das cadeias pesada e leve do mesmo poço, correspondente ao anticorpo completo.

Tabela 17 - Pares de anticorpos obtidos nos *sortings* das células separadas com toxina tetânica e dos plasmablastos

<i>Sorting</i>	Células separadas	Pares H+L amplificados	
		Kappa	Lambda
#6	Linf. B memória	20*	
		17	3
#7	Linf. B memória	26[#]	
		18	8
#8	Linf. B memória	59[@]	
		55	4
#9	Plasmablastos	28[@]	
		15	13
#10	Plasmablastos	84^s	
		65	19

*Rendimento do *sorting*: 59 poços

#Rendimento do *sorting*: 44 poços

@Rendimento do *sorting*: 92 poços

^sRT-PCR de duas placas

Os resultados foram obtidos a partir da RT-PCR de uma placa, com exceção do *sorting* #8 em que foram processadas duas placas. Os pares correspondem à amplificação da cadeia pesada (H) e da cadeia leve (L) no mesmo poço. Estão identificados os números de pares amplificados com a cadeia leve kappa ou lambda.

4.2.6 Análise das sequências de DNA das imunoglobulinas

As amostras obtidas com a separação de linfócitos B de memória ou plasmablastos foram analisadas e foram detectadas sequências clonalmente relacionadas, que estão representadas nas Tabelas 18, 19 e 20.

Tabela 18 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis do mesmo doador obtidas pelas estratégias descritas nos *sortings* #6, #7 e #9: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas - separação de células B de memória com TxT e de plasmablastos

	Cadeia pesada						Cadeia leve					
	VH	DH	JH	CDR3(aa)	Tamanho CDR3 (aa)	Mutações	κ/λ	Vκ/λ	Jκ/λ	CDR3(aa)	Tamanho CDR3 (aa)	Mutações
Anticorpo	B-H*GH B-H*GH	D-HH D-HH	C*GH C*GH	Δ+>+*%Δ&@ΠΔ Δ+>+*%Δ&@ΠΔ	12 12	28 34	κ κ	D-HG*GE D-HG*GE	B*GE B*GE	\$\$\$&*%Δ&>○ \$\$\$&*%ΔΔ>○	10 10	23 19
169PB-09	D-HD*B*GB/D-HDD*GB	B-M/B-HG/B-B	S*GH	Π§&#≅+*%Π*	11	25	λ	H-ES*GE	H*GE/D*GE	○○*+>○○ΠΔ§	11	25
141PB-09	D-HD*GB*GS/D-HDD*GB	B-M/B-HG/B-B	S*GH	Π§&#≅+*%Π*	11	25	λ	H-ES*GE	H*GE/D*GE	○○*+>○○ΠΔ§	11	25
145PB-09	D-HD*GB*GS/D-HDD*GB	B-M/B-HG/B-B	S*GH	Π§&#≅+*%Π*	11	26	λ	H-ES*GE	H*GE/D*GE	○○*+>○○ΠΔ§	11	25
153PB-09	D-HD*GB*GH/D-HDD*GB	B-M/B-HG/B-B	S*GH	Π§&#≅+*%Π*	11	25	λ	H-ES*GE	H*GE/D*GE	○○*+>○○ΠΔ§	11	27
127PB-09	D-HD*GB*GS/D-HDD*GB	B-M/B-HG/B-HS	S*GH	Π§&#○≅+*%Π*	11	13	λ	H-ES*GE	H*GE/D*GE	○○*+>○○ΠΔ§	11	17
167PB-09	D-HD*GB*GS/D-HDD*GB	B-M/B-HG/B-B	S*GH	Π§&#≅+*%Π*	11	26	λ	H-ES*GE	H*GE/D*GE	○○*+>○○ΠΔ§	11	21
121PB-09	D-HD*GB*GS/D-HDD*GB	D-BG/D-BC/B-M	S*GH	Π§&#○≅+*%Π*	11	36	λ	H-ES*GE	H*GE/D*GE	○○*+>○○ΠΔ§	11	26
194PB-09	D-HD*GB*GS/D-HDD*GB	D-BG/D-BC/B-M	S*GH	Π§&#○≅+*%Π*	11	25	λ	H-ES*GE	H*GE/D*GE	○○*+>○○ΠΔ§	11	26
110TTx-06	D-HD*GB*GS/D-HDD*GB	D-BC	S*GH	&§&#§>○*%Π*	12	30	κ	D-HG*GE	S*GE	\$\$\$#>○Δ+○	9	17
129TTx-06	D-HD*GS	D-BC	S*GH	&§&#§>○*%Π*	12	30	κ	D-HG*GE	S*GE	\$\$\$#>○Δ+○	9	17
216TTx-07	D-HD*GB*GS/D-HDD*GB	D-BC	S*GH	&§&#§>○*%Π*	12	33	κ	D-HG*GE	S*GE	\$\$\$#>○Δ+○	9	17
209TTx-07	D-SI*GH	D-D	S*GH	*@&@>○>○%Δ&@>#§Δ\$>○%ΠΔ	20	24	κ	ED-DD*GE/E-DD*GE	S*GE	\$\$\$ΠΔ+ΔΠΔ	9	11
219TTx-07	D-SI*GH	D-D	S*GH	*@&@>○>○%Δ&@>#§Δ\$>○%ΠΔ	20	25	κ	ED-DD*GE/E-DD*GE	S*GE	\$\$\$ΠΔ+ΔΠΔ	9	15
112TTx-06	S-DB*GD	D-D	B*GH	&*ΔΔ§>○+>○%Δ&Π>>○§Δ\$*§%ΠΔ	21	37	κ	ED-DD*GE/E-DD*GE	H*GE*GH	\$\$\$ΠΔ+ΔΠΔ	9	21
242TTx-07	S-DB*GD	D-D	B*GH	&*ΔΔ\$>○>○%Δ&@>+>○§Δ\$*§%ΠΔ	21	23	κ	ED-DD*GE/E-DD*GE	H*GE*GH	\$\$\$ΠΠΠ+ΔΠΔ	9	9
105PB-09	S-DB*GD	D-D	B*GH	&*ΔΔ§>○>○%Δ&@>+>○§Δ\$*§%ΠΔ	21	24	κ	ED-DD*GE/E-DD*GE	H*GE*GH	\$\$\$ΠΠΠ+ΔΠΔ	9	12
161PB-09	S-DB*GD	D-D	B*GH	&*ΔΔ§>○+>○%Δ&Π>>Δ§Δ\$*§%ΠΔ	21	34	κ	ED-DP*GE/E-DP*GE	E*GE	\$\$\$+*+Δ\$>○	9	39

Os anticorpos nomeados com ‘TTx’ foram obtidos pela seleção com a toxina tetânica e os nomeados ‘PB’, a partir de plasmablastos. Os grupos clonalmente relacionados obtidos estão indicados na tabela (representados no mesmo campo). Os segmentos V(D)J e as sequências de aminoácidos do CDR3 estão codificados por motivo de potencial patenteamento.

Tabela 19 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis obtidas no *sorting* #8: segmentos V(D)J, seqüências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas - separação de células B de memória com TxT

[illegible]

Os grupos clonalmente relacionados obtidos estão indicados na tabela (representados no mesmo campo). Os segmentos V(D)J e as seqüências de aminoácidos do CDR3 estão codificados por motivo de potencial patenteamento.

Tabela 20 - Classificação dos fragmentos das cadeias variáveis obtidas no *sorting* #10: segmentos V(D)J, sequências de aminoácidos das CDR3 e mutações somáticas - separação de plasmablastos

	Cadeia pesada						Cadeia leve					
	VH	DH	JH	CDR3 (aa)	Tamanho CDR3 (aa)	Mutações	κ/λ	Vκ/λ	Jκ/λ	CDR3 (aa)	Tamanho CDR3 (aa)	Mutações
Anticorpo												
187PB-10	E-EI*GE	D-D	S*GH	>&Π%≈&&\$\$\$++%Π†	14	20	κ	E-B*GD	H*GE	\$\$\$*0†0†0	9	11
155PB-10	E-EI*GE	D-D	S*GH	>&Π%≈&&\$\$\$+++%Π†	14	22	κ	E-B*GD	H*GE	\$\$\$*0†0†0	9	11
141PB-10	E-CP*GC	H-H	B*GH	\$ΔΔ\$≈%ΠΔE	8	39	κ	D-EE*GE	S*GE	\$\$\$0&0ΔE+0	10	13
243PB-10	E-CP*GC	H-HE/B-HS	B*GH	Δ+Δ\$≈+ΠΔE	8	42	κ	D-EE*GE	S*GE	\$#0&0ΔEΔ+0	10	20
139PB-10	D-EE*GC	C-EP	S*GH	\$ΔΠ0Δ≈\$Δ††%Π*	14	28	λ	H-ES*GE	E*GE	0Δ†0Δ0\$&0+ΠΔ	11	21
123PB-10	D-EE*GC	C-EP	S*GH	\$ΔΠ0Δ≈\$Δ††%Π*	14	22	λ	H-ES*GE	E*GE	0Δ†0Δ0%\$0+ΠΔ	11	18
171PB-10	D-EE*GC	C-EP/B-EH/B-HS	S*GH	&≈+ΔΔE>Π	7	47	κ	D-EB*GE	H*GE	\$*†>≈ΔE*0	9	34
287PB-10	D-EE*GC	D-D/D-EG/C-C	S*GE*GH	&≈+ΔΔEΔΠ	7	22	κ	D-EB*GE	H*GE	\$\$\$*≈ΔE*0	9	18
126PB-10	D-HD*GE*GS/D-HDD*GE	E-M/E-HG	S*GH	&\$\$\$≈≈ΔE*%Π†	11	26	κ	D-EE*GE	D*GE	\$\$\$0*≈ΔEΔ0	9	12
106PB-10	D-HD*GE*GS/D-HDD*GE	S-EE/S-S-HD	S*GH	&\$\$\$%ΔE0%Π†	11	25	-----			não amplificou		
149PB-10	D-DG*GH	D-EC	D	ΔΔΔΔ\$Δ†ΔΔ%Π*	13	23	κ	D-HG*GE	S*GE	\$\$\$&≈0ΔE+0	9	31
143PB-10	D-DG*GH	D-EC	D*GE	ΔΔΔΔ\$Δ†ΔΔ%ΠΔ	13	28	κ	D-HG*GE	S*GH*GE	\$\$\$&*0ΔE+0	9	30
142PB-10	D-CS*GB/D-CSD*GC	C-EP/E-M/B-EH	B*GH	0ΔE0\$≈++\$=0Δ≈%Δ+	16	35	κ	E-DP*GE/ED-DP*GE	H*GE	\$\$\$0†Δ0ΔE†0	9	22
160PB-10	D-CS*GB/D-CSD*GC	H-EB	B*GH	0ΔE0ΔE≈++\$=0Δ†%Π+	16	24	κ	E-DP*GE/ED-DP*GE	H*GE	\$\$\$0†0Δ0ΔE†0	9	32
163PB-10	S-DG-S*GE	D-D	D*GE	\$&�\$Π\$>%ΠΔ	12	27	κ	E-B*GD	S*GE	\$\$\$00†0+0	9	17
226PB-10	S-DG-S*GE	D-D	D*GE	\$&�\$Π\$>%ΠΔ	12	27	κ	E-B*GD	S*GE	\$\$\$00†0+0	9	20
162PB-10	S-DP*GM	D-EG	S*GH	&>\$8%0&#++Δ%Π†	13	24	κ	D-HG*GE	D*GE	\$\$\$+0Δ0+0%0	9	14
120PB-10	S-DP*GM	D-EG	S*GH	&>\$8%0ΔΔ0++Δ%Π†	13	27	κ	D-HG*GE	D*GE	\$\$\$&00++0%0	9	10
272PB-10	B-BE*GE	H-EB	S*GH	+Π00&0Δ0††%Π†	13	24	κ	D-EE*GE	D*GE	\$\$\$≈*%00	7	13
291PB-10	B-BE*GE	H-EB	S*GH	+Π00&0Δ0††%Π†	13	24				não amplificou		

Os grupos clonalmente relacionados obtidos estão indicados na tabela (representados no mesmo campo). Os segmentos V(D)J e as sequências de aminoácidos do CDR3 estão codificados por motivo de potencial patenteamento.

Analisou-se o repertório dos fragmentos V_H dos anticorpos obtidos e as mutações somáticas (Figura 26). Os segmentos mais representados nos *sortings* são da família V_H3 , seguido da V_H1 e V_H4 .

Figura 26 - Repertório V_H das sequências dos anticorpos obtidos e quantidade de mutações somáticas

Em A: Repertório dos segmentos V_H das sequências obtidas da separação de células B de memória com TxT e de plasmablastos obtidos nas estratégias de *sortings* #6, #7, #8, #9 e #10. As sequências dos *sortings* #6, #7 e #9 são do mesmo doador. Os números no centro dos gráficos representam a quantidade de sequências analisadas quanto à escolha do segmento V_H . Foi considerada uma sequência por grupo, independente das mutações ou da quantidade de sequências clonalmente relacionadas. Em B: quantidade de mutações somáticas detectadas em relação à sequência germinal da cadeia pesada. Análise de todas as sequências obtidas.

4.2.7 Ensaio de ligação aos antígenos - ELISA

Os anticorpos foram testados quanto à ligação às seguintes proteínas: toxina e anatoxina tetânicas e fragmento C recombinante da toxina tetânica.

As Figuras 27 e 28 mostram as curvas de ligação dos anticorpos contra a TxT e AnT que foram testados nas concentrações entre 0,4 e 50 ng/mL (concentração 1000 vezes menor que os anticorpos testados na seção 4.1.3.6 obtidos com o antígeno no formato tetramérico).

Figura 27 - ELISA qualitativo de ligação dos anticorpos à toxina tetânica

Anticorpos testados nas concentrações de 0,4 a 50 ng/mL em quatro diluições seriadas 1:5. Soro policlonal humano foi usado como controle positivo na diluição inicial de 1:50 e diluições seriadas 1:5. Placa sensibilizada com 100 µL de toxina tetânica a 5 µg/mL.

Figura 28 - ELISA qualitativo de ligação dos anticorpos à anatoxina tetânica

Anticorpos testados nas concentrações de 0,4 a 50 ng/mL em quatro diluições seriadas 1:5. Soro policlonal humano foi usado como controle positivo na diluição inicial de 1:50 e diluições seriadas 1:5. Placa sensibilizada com 100 µL de anatoxina tetânica a 5 µg/mL.

As curvas de titulação de alguns dos anticorpos testados apresentaram o perfil sigmoide característico de interação específica com antígeno neste ensaio. Os anticorpos testados mostraram perfil semelhante de ligação entre a toxina e anatoxina tetânicas.

Além da molécula inteira, os anticorpos foram testados quanto à ligação a uma das frações da toxina, o fragmento C recombinante (Figura 29), que corresponde à região da toxina onde ocorre a ligação ao neurônio.

Figura 29 - ELISA qualitativo de ligação dos anticorpos com fragmento C recombinante da toxina tetânica

Anticorpos testados nas concentrações de 0,4 a 50 ng/mL em quatro diluições seriadas 1:5. Soro policlonal humano foi usado como controle positivo na diluição inicial de 1:50 e diluições seriadas 1:5. Placa sensibilizada com 100 μ L de fragmento C recombinante da toxina tetânica a 2 μ g/mL. Somente os anticorpos 117TTX-08 e 140TTx-08 interagiram com o fragmento C recombinante.

Os anticorpos também foram testados contra a anatoxina diftérica, pois alguns foram obtidos a partir de plasmablastos sem seleção com antígeno. O sangue desses doadores foi coletado seis dias após o reforço da vacina dT, que é composta pelos toxoides tetânico e diftérico. Além disso, esse antígeno serviu como teste de ligação a uma proteína não relacionada à toxina tetânica. O anticorpo 187PB-10 reconheceu a AnD (Figura 30) e não interagiu com os antígenos tetânicos mostrados nos gráficos anteriores.

Figura 30 - ELISA qualitativo de ligação dos anticorpos à anatoxina diftérica

Anticorpos testados nas concentrações de 0,4 a 50 ng/mL em quatro diluições seriadas 1:5. Soro policlonal humano foi usado como controle positivo na diluição inicial de 1:50 e diluições seriadas 1:5. Placa sensibilizada com 100 µL de anatoxina diftérica a 2 µg/mL. O anticorpo que interagiu com a anatoxina diftérica foi o 187PB-10 e não interagiu com os antígenos tetânicos nos ensaios das Figuras 27, 28 e 29.

4.2.8 Western blotting

A interação dos anticorpos foi testada por *western blotting* com a toxina tetânica na forma reduzida e não reduzida, como mostra o gel de SDS-PAGE da Figura 31.

Figura 31 - SDS-PAGE das toxinas tetânicas para *western blotting*

Gel idêntico aos transferidos para membranas de PVDF. Em um gel foram aplicadas amostras para testar dois anticorpos monoclonais diferentes. M: marcador de massa molecular. Em 1, toxina tetânica não reduzida. Observam-se as duas bandas próximas de 150 kDa (a). Em 2, BSA, usada como controle negativo da ligação. Em 3, toxina tetânica reduzida, com a cadeia inteira não clivada pelas proteases bacterianas (a); a cadeia pesada (b) com cerca de 100 kDa; e a cadeia leve (c) com cerca de 50 kDa. Amostras de toxina pré-purificadas por SEC-HPLC (ver seção 4.2.1). Foi aplicado 1 µg de proteína por coluna. Gel corado com nitrato de prata.

Após transferência, a membrana de PVDF foi recortada em duas para teste independente de dois anticorpos monoclonais diferentes. A Figura 32 mostra exemplos dos resultados obtidos.

Figura 32 - Filmes representativos dos resultados obtidos no *western blotting* dos anticorpos monoclonais humanos

Em A, anticorpo 129TTx-06 não interagiu com toxina tetânica, resultado que concorda com ELISA (Fig. 27); 209TTx-07, ligação difusa, com banda mais intensa na região correspondente à cadeia pesada. Em B, anticorpo 139PB-10, ligação difusa; anticorpo 120PB-08, ligação na cadeia leve da toxina tetânica reduzida (c). A ligação em 'a' na coluna 3 é esperada pois corresponde à toxina inteira não clivada. Em C, anticorpo 159TTx-08, ligação na região da cadeia pesada; e 128TTx-08, ligação somente nas moléculas inteiras da toxina tetânica. A ligação difusa observada em alguns anticorpos pode ser resultado do reconhecimento de epítomos em fragmentos da toxina tetânica de massa molecular menor que 150 kDa.

Os resultados do *western blotting*, juntamente com os do ELISA e do ensaio de inibição da ligação da toxina ao GT1b (ver seção 4.2.9) foram compilados na Tabela 21.

Tabela 21 - Resultados da ligação dos anticorpos monoclonais nos ensaios ELISA, inibição da ligação ao GT1b e *western blotting*

Anticorpo	ELISA				Inibição da ligação ao GT1b*	<i>Western Blotting</i>
	TxT	AnT	Frag. C - TxT	AnD		
104TTx-06	+	+	-	-	-	Cadeia Leve
110TTx-06	-	-	-	-	Não testado	Não testado
129TTx-06	-	-	-	-	Não testado	-
216TTx-07	-	-	-	-	Não testado	Não testado
105PB-09	+-	+-	-	-	-	Cadeia Pesada
112TTx-06	+-	+-	-	-	-	Ligação difusa
242TTx-07	+-	-	-	-	-	Não testado
121PB-09	-	-	-	-	Não testado	-
194PB-09	-	-	-	-	Não testado	Não testado
209TTx-07	+-	+-	-	-	-	Cadeia Pesada
219TTx-07	+-	+-	-	-	-	Ligação difusa
127TTx-08	+	+	-	-	-	Cadeia Pesada
159TTx-08	+	+	-	-	-	Cadeia Pesada
130TTx-08#	-	-	-	-	Não testado	-
144TTx-08	+	+	-	-	-	Ligação difusa
167TTx-08	+	+	-	-	-	Cadeia leve
128TTx-08	+	+	-	-	-	Toxina inteira
142TTx-08	+	+	-	-	-	Cadeia leve
170TTx-08	+	+	-	-	-	Toxina inteira
177TTx-08	+	+	-	-	-	Toxina inteira
156TTx-08	+	+	-	-	-	Cadeia leve
117TTx-08	+	+	+	-	Inibição parcial	Cadeia pesada
140TTx-08	+	+	+	-	Inibição parcial	cadeia pesada
148TTx-08	+	+	-	-	-	Cadeia pesada
187PB-10	-	-	-	+	Não testado	-
141PB-10	+	+	-	-	-	Cadeia pesada
243PB-10	+	+	-	-	-	Cadeia pesada
139PB-10	+	+	-	-	-	Ligação difusa
123PB-10	+	+	-	-	-	Ligação difusa
171PB-10	+	+	-	-	-	Cadeia leve
287PB-10#	-	-	-	-	Não testado	-
126PB-10	+	+	-	-	-	Ligação difusa
143PB-10	+	+	-	-	-	Toxina inteira
149PB-10#	-	-	-	-	Não testado	Não testado
142PB-10	-	-	-	-	Não testado	-
160PB-10	-	-	-	-	Não testado	-
163PB-10	-	-	-	-	Não testado	Não testado
226PB-10	-	-	-	-	Não testado	Não testado
162PB-10	+	+	-	-	-	Cadeia leve
120PB-10	+	+	-	-	-	Cadeia Leve
272PB-10	+	+	-	-	-	Cadeia pesada

Avaliação qualitativa da ligação nas condições testadas: +: ligação ao antígeno; -: não ligação ao antígeno; +-: ligação menor que os outros anticorpos testados.

*Resultados GT1b (ver seção 4.2.9).

Baixa expressão do anticorpo.

As sequências estão divididas de acordo com as sequências clonalmente relacionadas.

4.2.9 Ensaio de inibição da ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b pelos anticorpos monoclonais

Esse teste foi feito com a incubação dos anticorpos monoclonais com a toxina tetânica, seguida da detecção da capacidade de ligação da T_xT nas moléculas de gangliosídeo GT1b sensibilizadas em placa de ELISA. A ligação *in vivo* entre T_xT e GT1b é necessária para a internalização da T_xT no neurônio e geração dos efeitos tóxicos.

Cada anticorpo foi testado na concentração original. A Figura 33 mostra o resultado expresso em porcentagem de inibição da ligação em relação às concentrações testadas. Observa-se que somente os anticorpos que interagiram com o fragmento C no ensaio de ligação (Figura 29) mostraram algum nível de inibição da ligação da toxina.

Figura 33 - Ensaio de inibição da ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b pelos anticorpos monoclonais

O teste foi feito com os anticorpos que mostraram alguma interação com a toxina tetânica no ELISA da Figura 27. As concentrações iniciais dos anticorpos variaram de 10 a 50 µg/mL, com diluições seriadas de 1:2. Seis diluições de cada anticorpo foram testadas. Somente os anticorpos 117TTx-08 e 140TTx-08 inibiram parcialmente a ligação da toxina nas condições do ensaio (concentrações iniciais 14 e 34 µg/mL, respectivamente). Os anticorpos foram testados em duplicata, com um controle positivo por placa.

Um controle do ensaio foi feito com soro antitetânico equino, na concentração inicial de 50 UI/mL. As condições do teste foram as mesmas para os anticorpos monoclonais. O resultado indicado na Figura 34 mostra 100% de inibição da ligação nas maiores concentrações utilizadas do soro. Por se tratar de um soro policlonal, esse resultado deve ser interpretado com cautela, já que a inibição da ligação da toxina ao GT1b pode ter ocorrido por ligação de um anticorpo no local da interação, por impedimento estérico devido ao recobrimento da TxT com diversos anticorpos que reconhecem outros epítomos ou ambos.

Figura 34 - Ensaio de inibição da ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b pelo soro antitetânico equino

Controle positivo do teste de inibição da ligação da toxina ao GT1b pelo soro antitetânico. Observa-se inibição de 100% da ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b nas concentrações testadas acima de 6,2 UI/mL nas condições testadas.

4.2.10 Ensaio de neutralização *in vivo*

O teste de neutralização *in vivo* foi feito no Infectório do Instituto Butantan, com autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, segundo o protocolo descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Foram testados quatro grupos de anticorpos:

- 117TTx-08 - anticorpo que interagiu com o fragmento C recombinante e inibiu parcialmente a ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b (Figuras 29 e 33, respectivamente) e ligou com a cadeia pesada no teste de *western blotting*. Concentração inicial testada: 14 µg/mL.

- 140TTx-08 - anticorpo que interagiu com o fragmento C recombinante e inibiu parcialmente a ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b (Figuras 29 e 33,

respectivamente) e ligou com a cadeia pesada no teste de *western blotting*. Concentração inicial testada: 28 µg/mL.

- Mistura dos anticorpos 117TTx-08 e 140TTx-08. A mistura foi feita com a mesma quantidade de cada anticorpo. Concentração inicial testada: 14 µg/mL (concentração de anticorpos totais)

- Mistura dos anticorpos 243PB-10, 143PB-10 e 120PB-10. Os três anticorpos interagiram com a toxina tetânica no ELISA, e no ensaio de *western blotting* tiveram respostas diferentes: ligação na cadeia pesada, toxina inteira e cadeia leve, respectivamente. Foi preparada mistura com mesma quantidade de cada anticorpo. Concentração inicial testada: 28 µg/mL (concentração de anticorpos totais).

Para cada anticorpo ou mistura de anticorpos, 50 animais foram utilizados em cinco grupos de 10 camundongos para teste de cinco diluições.

Foram preparadas cinco misturas compostas da toxina tetânica na mesma concentração e quantidades diferentes dos anticorpos testados. Após incubação a 37° C por uma hora, aplicaram-se 200 µL de cada mistura subcutaneamente em 10 animais, que foram mantidos em observação por 96 horas, período em que foi verificado o número de camundongos saudáveis, mortos ou com sintomas de tétano. A Figura 35 mostra as curvas de sobrevivência dos anticorpos testados no ensaio de neutralização *in vivo*. Somente a mistura com três anticorpos foi capaz de neutralizar a ação tóxica da toxina tetânica, garantindo a sobrevivência de todos os animais nos grupos com 28 e 14 µg de anticorpo. A partir da curva de sobrevivência dessa mistura e da antitoxina tetânica controle foi possível calcular a potência da mistura dos anticorpos 243PB-10, 143PB-10 e 120PB-10, que na concentração de 28 µg/mL equivale a 4,72 UI/mL em relação à antitoxina controle. Através da relação da ED₅₀ da antitoxina de referência (9,30 UI/mL) e da concentração de cada anticorpo, é possível estimar que, nas condições testadas, a potência dos anticorpos 117TTx-08, 140TTx-08 e a mistura dos dois, é menor que 1,3 UI/mL nas maiores concentrações testadas.

Outras misturas de anticorpos reconhecendo diferentes epítomos da toxina tetânica e que poderiam levar a resultado semelhante, ainda não foram testadas.

Figura 35 - Ensaio de neutralização da toxina tetânica *in vivo*

Curvas de sobrevivência dos grupos testados. Valores indicados nas legendas de cada curva indicam a quantidade de anticorpo (em microgramas) misturada à quantidade total de toxina tetânica (12 L+10/50) e entre parênteses, a dose recebida por cada camundongo. Em A, anticorpo 117TTx-08. No dia 2 (48 horas após inoculação), todos os animais dos grupos testados haviam morrido. Em B, 140TTx-08, idem anticorpo 117TTx-08. Em C, mistura dos anticorpos 117 e 140TTx-08. Na maior quantidade de anticorpo testada, 14 µg, dois animais sobreviveram ao final do teste, porém apresentavam sintomas de tétano, que, segundo a experiência da operadora, são irreversíveis. Em D, mistura dos anticorpos 243+143+120PB-10. A mistura dos AcMos garantiu a sobrevivência de 100% dos animais quando utilizados 28 e 14 µg dos anticorpos. Para essa mistura de anticorpos, a potência calculada foi de 4,72 UI/mL. Em E, antitoxina controle, correspondente ao soro antitetânico policlonal padronizado que garante a sobrevivência dos camundongos com quantidade igual e acima de 1,4 UI (dose individual de 0,12 UI).

5 DISCUSSÃO

A obtenção de anticorpos monoclonais humanos tem grande importância biotecnológica, sendo biofármacos com potencial terapêutico valioso pela baixa probabilidade de resposta imunogênica.

Um desafio inicial do projeto foi adaptar o protocolo de separação de linfócitos B de memória antitetânicos baseado nos trabalhos descritos pelo Dr. Michel Nussenzweig que liderou a obtenção de AcMos humanos anti-HIV. A estratégia de marcação envolvendo somente estreptavidina foi usada em duas tentativas de separação com marcação das células por incubação da AnT-B seguida de SAV e não foram eficientes pois não foram separadas sequências clonalmente relacionadas. A presença destas na análise das sequências amplificadas é um indicativo que as células foram selecionadas pelo antígeno (no caso de marcação específica). A aparente inespecificidade da seleção obtida no *sorting* #1 parece ter sido confirmada no segundo teste em que não ocorreu a detecção do fluoróforo APC conjugado ao anti-IgG. Considerando a marcação dupla com anti-IgG e AnT-B nos linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos, e, considerando também a hipótese de ligação específica da SAV somente na biotina conjugada à AnT, esperava-se que houvesse seleção específica de linfócitos B produtores de IgG antitetânicas mesmo sem a detecção do APC (anti-IgG). No entanto, em 10 poços foram amplificados fragmentos da cadeia variável γ (controle β -actina em 70 poços), comparado com 53 poços positivos para cadeia pesada no *sorting* #1 (41 formaram par com cadeia leve; amplificação em 66 poços do controle da β -actina), em que houve seleção de células IgG positivas. Sugeriu-se, portanto, que a marcação com SAV estivesse sendo inespecífica, causando a separação de células não produtores de IgG. De fato, alguns autores mostraram a capacidade da SAV em ligar-se a receptores de fibronectina presentes em diversas células. A ligação ocorre em uma região da SAV (diferente daquela onde a biotina se liga) que contém um tripeptídeo RYD (Arg-Tyr-Asp) que é semelhante à região da fibronectina (RGD – Arg-Gly-Asp) que interage com o receptor da superfície de células (ALON et al., 1992, 1993) , presente também em linfócitos B (STUPACK et al., 1991)

Para tanto, testou-se a marcação dos linfócitos B enriquecidos usando uma abordagem que utiliza o antígeno no formato tetramérico que sugere melhorar a sensibilidade da identificação de linfócitos B (FRANZ et al., 2011). A SAV possui quatro sítios de ligação para biotina e é capaz de ligar quatro moléculas de AnT-B. Assim, primeiramente incubou-se

a AnT-B com a SAV na proporção molar de 4:1 (AnT-B:SAV), e posteriormente o complexo foi usado para marcação das células. Sequências clonalmente relacionadas foram separadas com essa estratégia. Apesar disso, os anticorpos obtidos não eram específicos para os antígenos tetânicos. Os dados obtidos durante as separações das células com esse antígeno mostraram que houve marcação com SAV-PerCP-CyTM5.5 em linfócitos B não produtores de IgG (*backgating*). Tendo em vista que os doadores selecionados já haviam sido vacinados mais de uma vez contra tétano, e que a produção de IgG tende a ser mais alta nesses doadores (KIM et al., 1989; SCHAUER et al., 2003), estranhou-se a detecção de mais células IgG negativas marcadas com estreptavidina (Figura 17) em uma situação que deveria evidenciar principalmente as células produtoras de IgG, especificamente antitetânicas. Isso pareceu confirmar que a utilização da estreptavidina isoladamente como forma de marcação não era ideal para identificação de células produtoras de anticorpos antitetânicos.

Com a obtenção da toxina tetânica, foi possível verificar sua composição através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Observou-se a presença de bandas de proteínas de tamanho menor que a toxina tetânica, possivelmente remanescentes de contaminantes do cultivo bacteriano. O processamento para produção da anatoxina tetânica inclui passos de purificação, o que não elimina completamente os componentes do processo de obtenção da toxina (RAPPUOLI, 1997). Considerando que o tratamento com formaldeído promove ligação cruzada das proteínas pelos grupos amino, pode-se imaginar que todas as proteínas e outras substâncias presentes na amostra do sobrenadante da toxina tetânica tenham sido conjugadas a ela durante o processo de destoxificação, o que pode explicar a característica eletroforética da anatoxina tetânica onde não aparece uma banda definida. Visto que a anatoxina é usada na vacinação, supõe-se que haja formação de anticorpos contra epítomos que não façam parte da molécula da toxina tetânica. Assim sendo, o uso da AnT na captura dos linfócitos B de memória poderia selecionar anticorpos contra epítomos não específicos da toxina tetânica, e sim que reconheçam moléculas contaminantes que tenham sido conjugadas em sua superfície. Dessa forma, considerou-se essencial trabalhar com a toxina tetânica desde a etapa de *sorting* para garantir a seleção de linfócitos produtores de anticorpos específicos contra epítomos do antígeno a ser neutralizado.

Além disso, outra modificação proposta foi a conjugação da toxina tetânica com dois marcadores diferentes. Essa estratégia, conhecida como marcação múltipla de epítomo único – SEMS (do inglês, *Single Epitope Multiple Staining*) é descrita para a detecção de células presentes em baixa frequência em uma população mista. O uso do mesmo antígeno conjugado

com dois marcadores minimiza o *background* já que as chances de haver marcação inespecífica nas mesmas células por dois reagentes diferentes são baixas. Além disso, a população duplo-negativa presente em maior quantidade tende a ficar menos esparsa pelo gráfico, facilitando a observação da população positiva rara. A ligação das células a ambas as toxinas conjugadas (que foram utilizadas na mesma concentração) foi demonstrada pela presença da população distribuída em ângulo de 45° no gráfico bidimensional (Figura 22) (TOWNSEND; GOODNOW; CORNALL, 2001). A proposta da estratégia de separação com toxina tetânica e conjugação com dois marcadores teve dois objetivos: selecionar os linfócitos produtores de anticorpos relevantes contra epítomos da toxina (por usar o antígeno adequado) e aumentar a especificidade da identificação de células produtoras de anticorpos antitetânicos (por diminuir o *background* da identificação da população rara de linfócitos específicos). A estratégia garantiu a obtenção de sequências clonalmente relacionadas, sugestivo da seleção pelo antígeno. Além disso, um indicativo da especificidade da marcação foi a menor quantidade de poços com uma célula obtida quando da marcação com as toxinas conjugadas, comparado com os *sortings* feitos com o antígeno no formato tetramérico (que, como já foi discutido, selecionou células não específicas). Foram feitos três *sortings* com as toxinas conjugadas com células dos doadores que receberam a vacina reforço seis dias antes da coleta de sangue (*sorting* #6 e #7) e 14 dias antes da coleta (*sorting* #8). Obtiveram-se 59 poços com uma célula no *sorting* #6 e 44 no *sorting* #7; 460 poços com uma célula no *sorting* #8. As células desses doadores haviam sido previamente usadas para o *sorting* com o antígeno tetânico no formato tetramérico, quando foram obtidos 204 poços com uma célula no *sorting* #4, e 644 poços no *sorting* #5. Em todas as ocasiões, a marcação foi feita a partir de cerca de 10×10^6 CMSP.

Em relação aos diferentes doadores, observou-se variação na quantidade de células obtidas com a mesma estratégia de marcação. É sabido que existem diferenças na resposta imunológica individual, porém é preciso considerar que a coleta de sangue dos dois doadores foi feita em períodos diferentes após receberem a vacina. Frölich et al. (2010) verificaram que havia diferença na cinética de aparecimento de diferentes células após vacinação contra tétano. Apesar de evidenciar diferença na intensidade da resposta entre os doadores, foi detectado que por volta de seis dias após a vacinação ocorre pico de detecção de plasmablastos específicos para tétano ($CD19^+$, $CD27^{++}$, $CD3^-$, $CD14^-$, $AnT-PE^+$), enquanto que as células B de memória específicas para tétano ($CD19^+$, $CD27^+$, $CD3^-$, $CD14^-$, $AnT-PE^+$) são detectadas em maior quantidade 14 dias após vacinação (FRÖLICH et al., 2010). Outro

fator importante da análise do rendimento das células é em relação à expressão dos marcadores de superfície em células B de memória e plasmablastos. Foi demonstrado que durante a diferenciação *in vitro* dos linfócitos B de memória ($CD19^+CD27^+$) para linfócitos B ativados ($CD20^+CD38^-$), plasmablastos ($CD20^-CD38^+CD138^-$) até plasmócitos ($CD20^-CD38^+CD138^+$), a expressão de IgG de superfície diminui, enquanto aumenta a de IgG citoplasmática (JOURDAN et al., 2009). Considerando que a toxina tetânica interage com a imunoglobulina ancorada na superfície, imagina-se que a sensibilidade para detecção das células utilizando o antígeno sem permeabilização da membrana diminua à medida que os linfócitos se tornam mais diferenciados.

Tendo em vista essa diferença, foram feitos dois *sortings* com separação de plasmablastos a partir de sangue coletado de doadores após seis dias da vacinação de reforço (pico de plasmablastos) sem utilizar o antígeno como marcador. No *sorting* #9 utilizou-se a estratégia de separação pelo fenótipo $CD19^+CD27^{++}$ e no *sorting* #10 como $CD19^+CD27^+CD38^+$.

De um modo geral, os anticorpos obtidos a partir da marcação com a toxina tetânica ou a partir de plasmablastos reconheceram o antígeno nos ensaios realizados. A escolha de separação de linfócitos B de memória e plasmablastos pode ser feita de acordo com a condição do doador e da doença ou vacina estudadas. Os plasmablastos são células encontradas no sangue periférico após estímulo da vacinação como nos casos descritos anteriormente ou na fase aguda da doença, como demonstrado em um estudo de infecção com vírus da dengue, em que foi observado aumento do número de plasmablastos no sangue durante o início da doença (WRAMMERT et al., 2012). As células B de memória são encontradas mais tardiamente após estímulo (FRÖLICH et al., 2010) ou em pacientes infectados, sem sintomatologia (SCHEID, et al., 2009).

O repertório de segmentos V_H detectado nas sequências obtidas parece concordar com o observado em outros doadores imunizados contra tétano (DE KRUIF et al., 2009), além de outras doenças, como AIDS (SCHEID et al., 2009a) e febre do Nilo Ocidental (THROSBY et al., 2006), em que a classificação da sequência V_H da maior parte dos anticorpos eram das famílias 1, 3 e 4, que correspondem às famílias com maior número de representantes no locus do cromossomo 14 [17 segmentos da família V_{H1} , 4 da V_{H2} , 51 da V_{H3} , 13 da V_{H4} , 3 da V_{H5} , 1 da V_{H6} e 6 da V_{H7} , de um total de 95 segmentos (COOK; TOMLINSON, 1995)]. A quantidade de mutações somáticas detectadas nas regiões variáveis também foi semelhante à observada em AcMos humanos anti-HIV (SCHEID et al., 2009a).

Houve concordância quanto à interação dos anticorpos nos ELISAs, sendo que aqueles que interagiram com a TxT também o fizeram com AnT.

O anticorpo 187PB-10 que reconheceu a anatoxina diftérica (e não os antígenos tetânicos) foi obtido na separação de plasmablastos sem a seleção com a toxina tetânica.

Dois anticorpos, 117TTx-08 e 140TTx-08 interagiram com o fragmento C recombinante da toxina tetânica. Esta porção da toxina corresponde à região de ligação com o neurônio, e sugere-se que seja um local ideal para neutralização da ação da TxT pela ligação do anticorpo. De fato, os referidos anticorpos foram os únicos a interferir na ligação da toxina com o gangliosídio GT1b. A inibição foi parcial nas concentrações testadas do anticorpo (concentrações máximas obtidas pela transfecção transitória em pequeno volume). É possível que as quantidades de anticorpo testadas não tenham sido equivalentes ao número de epítomos da toxina que deveriam ser bloqueados. Com isso, algumas moléculas da toxina poderiam estar livres para interagir com GT1b. Além disso, um estudo de cristalografia feito com GT1b e fragmento C recombinante mostrou que existem dois sítios de interação tanto no gangliosídio quanto no fragmento C (FOTINO et al., 2001). Os autores sugerem que existe a possibilidade de haver ligação de mais de uma molécula da TxT no gangliosídio. Essa observação pode explicar o bloqueio parcial dos anticorpos testados, considerando a hipótese de que o anticorpo interaja com um epítopo no fragmento C que não impeça estericamente a interação do outro domínio com o gangliosídio.

Outro trabalho que testou a capacidade neutralizante de anticorpos monoclonais murinos (VOLK et al., 1984) obteve oito AcMos a partir de hibridoma com células de baço após imunização de camundongos com fragmento C. Quando avaliados individualmente, somente um deles foi capaz de neutralizar a toxina tetânica. Quando misturados, os anticorpos mostraram ação sinérgica. Esse resultado sugeriu que existem mais de um epítopo na região do fragmento C envolvidos na neutralização. Yousefi et al. (2014) também observaram que AcMos que reconhecem o fragmento C por ELISA podem não neutralizar a TxT *in vivo*. Essas hipóteses podem justificar a incapacidade de neutralização *in vivo* da toxina pelos anticorpos 117TTx- e 140TTx-08 isoladamente ou em conjunto.

Os três AcMos obtidos neste trabalho (243PB-, 143PB- e 120PB-10) e que misturados protegeram os camundongos da linhagem Swiss contra a ação da TxT interagiram em locais diferentes na toxina, de acordo com o resultado de *western blotting*: cadeia pesada (243PB-10), cadeia leve (120PB-10) e a toxina inteira, não reduzida (143PB-10). Apesar da neutralização, essa mistura de anticorpos não foi capaz de impedir a ligação da toxina ao

GT1b *in vitro* (resultado não mostrado). Isso sugere que o bloqueio da ligação no neurônio não seja a única maneira de neutralizar a toxina. Já foi demonstrado que um AcMo dirigido à cadeia leve da TxT (que tem atividade proteolítica sobre a sinaptobrevina) pode ser neutralizante *in vivo* quando testado em camundongos da linhagem OF1 (modelo de uso geral para toxicologia) (MATSUDA et al., 1992).

Parece ser um consenso de outros trabalhos mostrar que a mistura de mais de um anticorpo monoclonal tem efeito neutralizante, mesmo se individualmente não o tenham, ou que seja necessária uma quantidade maior do AcMo para obter o mesmo efeito. Volk et al. (1984) mostraram que a combinação de anticorpos monoclonais eram cerca de duas ordens de magnitude mais eficientes na capacidade de neutralização da toxina do que os AcMos testados individualmente em concentração equivalente (concentração total de anticorpos). Propõe-se que, para manter a toxina neutralizada, o anticorpo monoclonal deva estar em quantidade elevada para evitar a dissociação entre o AcMo e a TxT. De acordo com a lei de ação de massas, quando em equilíbrio, ocorre associação e dissociação entre antígeno e anticorpo, sendo que, no caso de uma molécula de toxina ficar livre, ela estará disponível para exercer sua função tóxica. Assim, quando misturados, dois ou mais anticorpos monoclonais podem ter efeito sinérgico e prevenir a liberação da toxina livre para exercer sua função tóxica. É possível que a quantidade dos dois anticorpos testados em nosso trabalho (117TTx- e 140TTx-08) individualmente ou misturados, não tenha sido suficiente para garantir a neutralização da TxT. Dessa forma, os resultados *in vivo* obtidos são preliminares, sendo possível testar maiores quantidades dos AcMo individuais (com transfecção em maior volume) além de diversas combinação de anticorpos. Adicionalmente, a afinidade dos anticorpos deve ser analisada, já que as sequências dos anticorpos clonalmente relacionados contêm mutações pontuais que podem conferir diferentes características de ligação em relação ao antígeno.

De qualquer maneira, é necessário considerar que grande parte dos estudos citados obtiveram os anticorpos monoclonais antitetânicos a partir de hibridomas murinos, após imunização e coleta de células de baço. Os anticorpos do nosso trabalho foram obtidos de células do sangue periférico humano após imunização. Já foi demonstrado que, em seres humanos, a frequência de células de memória produtoras de anticorpos antitetânicos é maior em órgãos linfoides secundários, como as tonsilas, e não no sangue periférico (CAO et al., 2010). Além disso, um estudo recente mostrou que, dos plasmablastos detectados após estímulo da vacina antitetânica, menos de 5% correspondiam a linfócitos produtores de

anticorpos detectados no soro por espectrometria de massas nove meses após a vacinação. Com isso, os autores sugerem que poucos linfócitos que surgem na circulação após o reforço dão origem aos plasmócitos residentes na medula óssea que secretarão os anticorpos protetores (LAVINDER et al., 2014). Isso demonstra a necessidade de avaliar uma quantidade grande de anticorpos diferentes pois as células utilizadas provenientes de sangue periférico podem não representar a fonte mais adequada de células produtoras de anticorpos contra antígenos relevantes.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nos permitem concluir que:

- os anticorpos monoclonais humanos antitetânicos foram obtidos com sucesso e foram capazes de reconhecer os antígenos tetânicos.
- a estratégia de marcação e separação dos linfócitos B deve ser adaptada para cada doença/vacina estudada para a obtenção dos anticorpos específicos.
- a situação vacinal do doador pode influenciar a obtenção das células B específicas.
- a combinação de anticorpos que ligam em diferentes epítomos da toxina foi capaz de neutralizar a toxina tetânica *in vivo*, atingindo o mesmo resultado do soro policlonal heterólogo. É esperado que misturas de anticorpos monoclonais neutralizem toxinas ou microorganismos de forma mais eficaz que AcMos isoladamente.

7 PERSPECTIVAS

- Este trabalho representa o primeiro passo para a obtenção de um produto de origem humana para o tratamento de acidentes potencialmente capazes de evoluir para tétano. Os anticorpos que se mostraram efetivos na proteção dos camundongos contra a toxina tetânica não puderam ser testados individualmente ou em pares pela necessidade de solicitação adicional de camundongos ao Comitê de Ética, o que será realizado posteriormente.

- As sequências dos anticorpos selecionados serão utilizadas para síntese dos genes de cadeia leve e pesada visando a transfecção e geração de linhagens celulares estáveis para a produção de anticorpos monoclonais antitetânicos humanos.

- A implantação e racional deste trabalho serão utilizados para outros projetos de inovação, para outros alvos de interesse terapêutico.

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier, 2012. 545 p.
- ABBVIE CORPORATION. **Humira - Product Monograph**: 132 p. 2004. Disponível em: http://www.abbvie.ca/content/dam/abbviecorp/ca/english/docs/HUMIRA_PM_EN.pdf. Acesso em 19/maio/2015.
- ALON, R.; BAYER, E.; WILCHEK, M. Cell-adhesive properties of streptavidin are mediated by the exposure of an RGD-like RYD site. **European Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 271-279, 1992.
- _____. Cell adhesion to streptavidin via RGD-dependent integrins. **European Journal of Cell Biology**, v. 60, n. 1, p. 1-11, 1993.
- ALT, F. W.; BALTIMORE, D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 79, n. 13, p. 4118-4122, 1982.
- AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K. Quantitation of rare memory B cell population by two independent and complementary approaches. **Journal of Immunological Methods**, v. 317, p. 175-185, 2006.
- ARCE, S. et al. CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 6, p. 1022-1028, 2004.
- BIRLEA, M. et al. Human Anti-Varicella-Zoster Virus (VZV) Recombinant Monoclonal Antibody Produced after Zostavax Immunization Recognizes the gH/gL Complex and Neutralizes VZV Infection. **Journal of Virology**, v. 87, n. 1, p. 415-421, 2013.
- BIZZINI, B. Tetanus Toxin. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 224-240, 1979.
- BOSCARDIN, S. B. **Lista de Primers**: [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <eduardo.aliprandini@butantan.gov.br> em 18/set/2013. p. 2013.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Vol. 2. Brasília: Fiocruz, 2010. 904 p.
- CAMPEAU, E. Partial digestion protocol. 2009. Disponível em: <http://ericcampeau.com/images/Partial%20digestion%20protocol%20V1_0.pdf>. Acesso em 15/fev/2014.
- CAO, Y. et al. An optimized assay for the enumeration of antigen-specific memory B cells in different compartments of the human body. **Journal of Immunological Methods**, v. 358, n. 1-2, p. 56-65, 2010.
- CARAU, A. et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138⁻ and CD138⁺ plasma cells. **Haematologica**, v. 95, n. 6, p. 1016-1020, 2010.
- CASADEVALL, A.; SCHARFF, M. D. Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 8, p. 1695-1702, 1994.

¹ De acordo com Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT). Disponível em <http://www.icb.usp.br/~sbibicb/images/diretrizesABNT2012sbibPDF/Manual%20ABNT%20Compacto.pdf>. Acesso em 10/06/2015.

CHEN, C. et al. Gangliosides as High Affinity Receptors for Tetanus Neurotoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26569-26577, 2009.

COLE, S. P. C. et al. Human monoclonal antibodies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 62, p. 109-120, 1984.

COLLINGRIDGE, G. L.; DAVIES, J. The *in vitro* inhibition of GABA release by tetanus toxin. **Neuropharmacology**, v. 21, n. 9, p. 851-855, 1982.

COOK, G. P.; TOMLINSON, I. M. The human immunoglobulin VH repertoire. **Immunology Today**, v. 16, n. 5, p. 237-242, 1995.

DE KRUIF, J. et al. Human Immunoglobulin Repertoires against Tetanus Toxoid Contain a Large and Diverse Fraction of High-Affinity Promiscuous VH Genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 387, n. 3, p. 548-558, 2009.

DEFFAR, K. et al. Nanobodies - the new concept in antibody engineering. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 12, p. 2645-2652, 2009.

DIVINO-GOES, K. G. et al. Prevalence of diphtheria and tetanus antibodies and circulation of *Corynebacterium diphtheriae* in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 1681-1687, 2007.

DOKMETJIAN, J. et al. A possible explanation for the discrepancy between ELISA and neutralising antibodies to tetanus toxin. **Vaccine**, v. 18, p. 2698-2703, 2000.

EVALUATE. Biotech set to dominate drug industry growth. 2015. Disponível em: <<http://www.evaluategroup.com/Universal/View.aspx?type=Story&id=188700§ionID=&isEPVantage=yes>>. Acesso em: 12/maio/2015.

FDA. **Drugs@FDA**. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Addlsearch_drug_name. Data de acesso: 05/05/2015. Palavra chave: mab - entre jan/2010 e abr/2015.

FITZSIMMONS, S. P. et al. Inhibition of tetanus toxin fragment C binding to ganglioside GT1b by monoclonal antibodies recognizing different epitopes. **Vaccine**, v. 19, p. 114-121, 2001.

FOTINOU, C. et al. The Crystal Structure of Tetanus Toxin Hc Fragment Complexed with a Synthetic GT1b Analogue Suggests Cross-linking between Ganglioside Receptors and the Toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 34, p. 32274-32281, 2001.

FRANZ, B. et al. Ex vivo characterization and isolation of rare memory B cells with antigen tetramers. **Blood**, v. 118, n. 2, p. 348-357, 2011.

FRÖLICH, D. et al. Secondary Immunization Generates Clonally Related Antigen-Specific Plasma Cells and Memory B Cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 5, p. 3103-3110, 2010.

FUNASA. Procedimentos para Administração de Soros. p. pag. 201-231, 2001. Disponível em: <http://xa.yimg.com/kq/groups/13844166/698847955/name/procedimentos_soros.pdf>. Acesso em: 26/maio/2015.

GODBEY, W. T.; WU, K. K.; MIKOS, A. G. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 27, n. 9, p. 5177-5181, 1999.

GREEN, L. L. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 231, n. 1-2, p. 11-23, 1999.

HAMMERS, C. M.; STANLEY, J. R. Antibody Phage Display: Technique and Applications. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, p. e17.

HANSEL, T. T. et al. The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 4, p. 325-338, 2010.

HUMEAU, Y. et al. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. **Biochimie**, v. 82, n. 5, p. 427-446, 2000.

JESSUP, C. F. et al. Preparation of human-mouse heterohybridomas against an immunising antigen. **Journal of Immunological Methods**, v. 246, p. 187-202, 2000.

JOURDAN, M. et al. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. **Blood**, v. 114, n. 25, p. 5173-5181, 2009.

KAMINSKI, D. A. et al. Advances in human B cell phenotypic profiling. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 302, 2012.

KAUR, K. et al. High Affinity Antibodies against Influenza Characterize the Plasmablast Response in SLE Patients After Vaccination. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125618, 2015.

KIM, J. S. et al. Changes of Tetanus Specific IgG, IgM and IgG Subclasses after DPT Vaccination. **Yonsei Medical Journal**, v. 30, n. 2, p. 158-163, 1989.

KIM, Y. H. et al. Clinical efficacy of zanolimumab (HuMax-CD4): two phase 2 studies in refractory cutaneous T-cell lymphoma. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 4655-4662, 2007.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. **European Journal of Immunology**, v. 6, n. 7, p. 511-519, 1976.

KÜPPERS, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. **Nature Reviews**, v. 5, p. 251-262, 2005.

LAVINDER, J. J. et al. Identification and characterization of the constituent human serum antibodies elicited by vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 111, n. 6, p. 2259-2264, 2014.

LINDLEY-JONES, M.; LEWIS, D.; SOUTHGATE, J. L. Recurrent tetanus. **The Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2048-2048, 2004.

LISBOA, T. et al. Guidelines for the management of accidental tetanus in adult patients. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 4, p. 394-409, 2011.

LIST BIOLOGICAL LABORATORIES INC. Certificate of Analysis - Tetanus Toxoid. 2014. Disponível em: < http://www.listlabs.com/mediafiles/c_of_a/19122A1A-812.pdf >. Acesso em: 09/abril/2015.

MATSUDA, M. et al. Characteristics of Toxin-Neutralization by Anti-Tetanus Human Monoclonal Antibodies Directed Against the Three Functional Domains [A], [B] and [C] of the Tetanus Toxin Molecule and a Reliable Method for Evaluating the Protective Effects of Monoclonal Antibodies. . **European Journal of Epidemiology**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 1992.

MATSUDA, M.; YONEDA, M. Dissociation of tetanus neurotoxin into two polypeptide fragments. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 57, n. 4, p. 1257-1262, 1974.

MCBRIDE, O. W. et al. Chromosomal Location of Human Kappa and Lambda Immunoglobulin Light Chain Constant Region Genes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 155, p. 1480-1490, 1982.

MCCAFFERTY, J. et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v. 348, n. 6301, p. 552-554, 1990.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Normas de Vacinação**. 3 ed. Vol. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional da Saúde, 2001. 72 p Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_normas_vac.pdf>. Acesso em 21/ago/2015 >.

_____. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 696-707 p. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3463ca004745920f9a61de3fbc4c6735/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em 10/junho/2015 >.

_____. **Incidência de tétano neonatal**. Rede Interagencial de Informações para a Saúde - RIPSa. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/tetanoacid/bases/tetacidbrnet.def>. Data de acesso: 19/maio/2015, 2015a.

_____. **Tétano Acidental**. Rede Interagencial de Informações para a Saúde - RIPSa. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/tetanoacid/bases/tetacidbrnet.def>. Data de acesso: 30/julho/2015, 2015b.

MIYAJI, E. N. et al. Induction of Neutralizing Antibodies against Diphtheria Toxin by Priming with Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG Expressing CRM₁₉₇, a Mutant Diphtheria Toxin. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 869-874, 2001.

MORRISON, S. L. et al. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 81, n. 21, p. 6851-6855, 1984.

MOUQUET, H. et al. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 591-595, 2010.

_____. Memory B Cell Antibodies to HIV-1 gp140 Cloned from Individuals Infected with Clade A and B Viruses. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e24078, 2011.

MUELLENBECK, M. F. et al. Atypical and classical memory B cells produce *Plasmodium falciparum* neutralizing antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 2, p. 389-399, 2013.

MURATA, V. M. et al. Anti-Digoxin Fab Variants Generated by Phage Display. **Molecular Biotechnology**, v. 54, p. 269-277, 2013.

OETTINGER, M. A. et al. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. **Science**, v. 248, n. 4962, p. 1517-1523, 1990.

OSBOURN, J.; GROVES, M.; VAUGHAN, T. From rodent reagents to human therapeutics using antibody guided selection. **Methods**, v. 36, p. 61-68, 2005.

PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751-760, 2007.

PRADO, S. M. A. **Aplicabilidade do Antígeno Tetânico Conjugado com Derivados do Monometoxi-polietilenoglicol**. 2008. 142 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RAPPUOLI, R. New and Improved Vaccines Against Diphtheria and Tetanus. In: LEVINE, M. M.; WOODROW, G. C., et al (Ed.). **New Generation Vaccines**. 2 rev e expandida. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997.

REICHERT, J. M. Marketed therapeutic antibodies compendium. **mAbs**, v. 4, n. 3, p. 413-415, 2012.

REUSCH, J. A. et al. Cellular Differentiation Regulator BLIMP1 Induces Epstein-Barr Virus Lytic Reactivation in Epithelial and B Cells by Activating Transcription from both the R and Z Promoters. **Journal of Virology**, v. 89, n. 3, p. 1731-1743, 2015.

RIBAS, A. V. et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C–thioredoxin fusion protein in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 91-94, 2000.

RODER, J. C.; COLE, S. P. C.; KOZBOR, D. The EBV - Hybridoma Technique. **Methods in Enzymology**, v. 121, p. 140-167, 1986.

RUULS, S. R. et al. Novel human antibody therapeutics: The age of the Umabs. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 1157-1171, 2008.

SCHATZ, D. G.; OETTINGER, M. A.; BALTIMORE, D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. **Cell**, v. 59, n. 6, p. 1035-1048, 1989.

SCHAUER, U. et al. Levels of Antibodies Specific to Tetanus Toxoid, Haemophilus influenzae Type b, and Pneumococcal Capsular Polysaccharide in Healthy Children and Adults **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, n. 2, p. 202-207, 2003.

SCHEID, J. F. et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. **Nature**, v. 458, n. 7238, p. 636-640, 2009a.

_____. A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 343, n. 2, p. 65-67, 2009b.

SCHIAVO, G. et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. **Nature** v. 359, p. 832-835, 1992a.

SCHIAVO, G. et al. Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 10, p. 3577-3583, 1992b.

SCHIAVO, G.; MATTEOLI, M.; MONTECUCCO, C. Neurotoxins Affecting Neuroexocytosis. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 717-766, 2000.

SMITH, K. et al. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccination antigen. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 372-384, 2009.

_____. Human monoclonal antibodies generated following vaccination with AVA provide neutralization by blocking furin cleavage but not by preventing oligomerization. **Vaccine**, v. 30, n. 28, p. 4276-4283, 2012.

STUDNICKA, G. M. et al. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. **Protein Engineering**, v. 7, n. 6, p. 805-814, 1994.

STUPACK, D. et al. B lymphocyte fibronectin receptors: expression and utilization. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 34, n. 6, p. 761-9, 1991.

SWANN, P. G. et al. Considerations for the development of therapeutic monoclonal antibodies. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 4, p. 493-499, 2008.

THROSBY, M. et al. Isolation and Characterization of Human Monoclonal Antibodies from Individuals Infected with West Nile Virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 6982-6992, 2006.

THAYSEN-ANDERSEN, M. et al. Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated toxin. **Vaccine**, v. 25, p. 2213-2227, 2007.

TILLER, T. et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. **Journal of Immunological Methods**, v. 329, p. 112-124, 2008.

TOWNSEND, S. E.; GOODNOW, C. C.; CORNALL, R. J. Single epitope multiple staining to detect ultralow frequency B cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 249, n. 1-2, p. 137-146, 2001.

VOLK, W. A. et al. Neutralization of Tetanus Toxin by Distinct Monoclonal Antibodies Binding to Multiple Epitopes on the Toxin Molecule. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 3, p. 604-609, 1984.

VRZALIKOVA, K. et al. Down-regulation of BLIMP1 α by the EBV oncogene, LMP-1, disrupts the plasma cell differentiation program and prevents viral replication in B cells: implications for the pathogenesis of EBV-associated B-cell lymphomas. **Blood**, v. 117, n. 22, p. 5907-5917, 2011.

WARDEMANN, H. et al. Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1374-1377, 2003.

WARDEMANN, H.; KOFER, J. Expression Cloning of Human B Cell Immunoglobulins. In: KÜPPERS, R. (Ed.). **Lymphoma**. New York City: Humana Press, 2013. (Methods in Molecular Biology, v. 971, p. 93-111).

WECKX, L. Y. et al. Effect of a single tetanus-diphtheria vaccine dose on the immunity of elderly people in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 519-523, 2006.

WRAMMERT, J. et al. Rapid and Massive Virus-Specific Plasmablast Responses during Acute Dengue Virus Infection in Humans. **Journal of Virology**, v. 86, n. 6, p. 2911-2918, 2012.

YENAMANDRA, S. P. et al. Expression Profile of Nuclear Receptors upon Epstein-Barr Virus Induced B Cell Transformation. **Experimental Oncology**, v. 31, n. 2, p. 92-96, 2009.

YOUSEFI, M. et al. Comparative in vitro and in vivo assessment of toxin neutralization by anti-tetanus toxin monoclonal antibodies. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 2, p. 344-351, 2014.