UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Construção e expressão de anticorpo humanizado a partir do anticorpo monoclonal contra proteína de 70 kDa de *Sporotrix schenckii* (P6E7).

Karla Letícia Santiago

Tese apresentada para obtenção
de grau de DOUTOR
Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2013

Karla Letícia Santiago

Construção e expressão de anticorpo humanizado a partir do anticorpo monoclonal contra proteína de 70 kDa de *Sporotrix schenckii* (P6E7).

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor.

_____

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

Orientador/Presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

_____

3º examinador

_____

4º examinador

São Paulo, _____ de 2013.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Eu dedico este trabalho aos meus pais Carlos Fabrício Santiago e Maria Clara Santiago, que me permitiram viver e sonhar; que me ampararam e me ensinaram a caminhar. Meu grande orgulho é ser fruto de vocês.

A Deus, minha prece de agradecimento.

Nem sempre a jornada foi fácil, agradeço a Deus por estar ao meu lado todas as vezes que achei que não seria mais capaz de seguir em frente. Muito Obrigada Senhor pelo dom de amar e ser amada, pela família maravilhosa que me deste, pelos Amigos e oportunidades que colocaste em meu caminho.

"Guardá-me, ó Deus, porque em ti confio." (Salmo 16:1)

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. DR. Sandro Rogério de Almeida minha profunda gratidão pelas oportunidades concedidas, pela confiança e ensinamentos ministrados.

A professora Andrea Maranhão sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Seu amor pela ciência me inspirou e me motivou. Obrigada pela acolhida em Brasília e por toda energia investida neste trabalho.

À minha família, minha vida, base de tudo, meu alicerce e meu porto seguro. Obrigada por vocês existirem.

Em especial à minha mãe Maria Clara Santiago, pelo exemplo de ser humano que tu és, pelo amor incondicional dedicado aos teus filhos, pela amizade que nos une mais e mais a cada dia, pelo incentivo e apoio, pelos sonhos que tu abriste mão em troca dos nossos. E ao meu pai Carlos Fabrício Santiago, meu grande amigo, que sempre me apoiou, enxugou minhas lágrimas e me ensinou a não ter medo de correr atrás dos meus sonhos. Pai obrigada pelo amor e por ter me criado livre e forte para enfrentar o mundo.

Aos meus queridos irmãos Andréa Santiago Agertt, Pablo Santiago e Laura Santiago que se fizeram sempre presentes na distância. O que nos une não são apenas os laços de sangue, mas a amizade, o respeito, a admiração e o amor que sentimos. Que Deus nos conserve sempre unidos.

Aos meus queridos cunhados Márcio Menezes Agertt e Letícia Palma de Azevedo pelo apoio, carinho e amizade.

Aos meus sobrinhos amados Guilherme, Isabela e Martin a existência de vocês ilumina meus dias. Meu amor por vocês é gigante.

Ao meu amor Daniel Ferrara, que apesar de estar ao meu lado há tão pouco tempo, parece que nos conhecemos desde sempre. Dan obrigada por todo apoio, companheirismo e por entender a importância desde trabalho e ter aceitado todas as ausências.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UnB que abriram as portas de seus laboratórios para que eu pudesse desenvolver meu trabalho.

Aos queridos amigos de Brasília: Rafael Burtet, Marciano Régis Rubini e Maria Paula Carneiro, por todo apoio, amizade e carinho. Vocês são maravilhosos e vou leva-los para sempre no meu coração.

À Gisele Facholi Bomfim minha amiga amada, nossa amizade começou na faculdade e se fortaleceu ao longo dos anos. Gi você é meu exemplo de dedicação e amor à profissão, muito obrigada por fazer parte desta conquista. Sem teu incentivo, apoio, acolhida e amizade eu não teria chegado até aqui.

Ao Douglas Antoniassi meu amigão do coração por aguentar todas as chatices e intriguinhas.

A minha querida Sônia Burato, que me acolheu com amor maternal e esteve ao meu lado em todos os momentos. Que me levantou todas as vezes que as forças me faltavam. Aos queridos Beto e Fê pelo amor e carinho.

À Tatiane Siqueira, Robson Brasile e a linda Heloisa, apesar de não convivermos diariamente a amizade e o carinho permanecem.

As minhas amadas amigas Simone Sartoretto e Renee Oliveira, pela amizade, companheirismo, irmandade e carinho. Vocês são essenciais na minha vida.

As minhas conterrâneas, amigas e companheiras de chimarrão Franciele Knebel e Luziane Bellé obrigada pelo companheirismo e carinho de sempre.

A Franciele Vasconcellos e Tainara Sartoretto pelo apoio e amizade.

As amigas "de almoço" Fabiana Teixeira e Silene Milleorini, minhas queridas vocês tornaram meu dia a dia mais alegre. Obrigada pelo carinho e amizade.

A Carmem Lúcia Antunes pela preocupação e cuidado que teve comigo, obrigada!

Aos colegas Suelen Silvana dos Santos, Fábio Seiti Yamada Yoshikawa, Lucas Ferreira, José Roberto Fogaça, Pollyana Martins, Lavínia Romero, Grasielli Jannuzi e a profª. Karen Spadari Ferreira; pelo companheirismo, pelos ensinamentos, por tornarem a rotina mais divertida e pela ajuda que cada um de um de vocês deram de uma forma ou de outra para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas que passaram pelo laboratório e que foram essenciais para minha formação Rosana Cícero Nascimento, Maria da Glória Souza, Telma Kimura, Viviane Gimenes, Eliver Eid Bou Ghosn e Vanessa Noal.

Em especial ao colega e amigo Gilberto Kahimi sem sua ajuda, ensinamentos, dicas e discussões esse trabalho não teria saído do papel. Japinha obrigada por todo opoio!!!!

A querida Fabiana dos Anjos pela ajuda e ensinamentos na produção e purificação dos anticorpos.

A querida Luciana Thomaz que apesar do pouco tempo de convivência estreitamos nossos laços. Muito obrigada por todas as dicas e colaboração para a finalização deste trabalho.

À companhia e troca de experiências com os colegas do laboratório de hematologia, parasitologia, microbiologia, patologia e em especial ao pessoal da bioquímica.

Aos amigos que Deus colocou em meu caminho ao longo da vida, muito obrigada por não deixarem nossa amizade se perder no tempo, obrigada por se fazerem presentes através de visitas, recadinhos e emails.

A todos os funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, que direta ou indiretamente participaram deste trabalho. Em especial a Ana Dantas, Claudinha, Rose e Dona Márcia.

À FAPESP pelo apoio científico e financeiro.

"Olhando daqui, percebo que pessoas e circunstâncias tiveram um propósito maior na minha vida do que muitas vezes, no momento de cada uma, eu soube, pude, aceitei, ler. Parece-me, agora, que cada uma, no seu próprio tempo, do seu próprio modo, veio somar para que eu chegasse até aqui, embora algumas vezes, no calor da emoção da vez, eu tenha me rendido à enganosa impressão de que veio subtrair. A vida tem uma sabedoria que nem sempre alcanço, mas que eu tenho aprendido a respeitar, cada vez com mais fé e liberdade.

O tempo, de vento em vento, desmanchou o penteado arrumadinho de várias certezas que eu tinha, e algumas vezes descabelou completamente a minha alma. Mesmo que isso tenha me assustado muito aqui e ali, no somatório de tudo, foi graça, alívio e abertura. A gente não precisa de certezas estáticas. A gente precisa é aprender a manha de saber se reinventar. De se tornar manhã novíssima depois de cada longa noite escura. De duvidar até acreditar com o coração isento das crenças alheias. A gente precisa é saber criar espaço, não importa o tamanho dos apertos. A gente precisa é de um olhar fresco, que não envelhece, apesar de tudo o que já viu. É de um amor que não enruga, apesar das memórias todas na pele da alma. A gente precisa é deixar de ser sobrevivente para, finalmente, viver. A gente precisa mesmo é aprender a ser feliz a partir do único lugar onde a felicidade pode começar florir, esparramar seus ramos, compartilhar seus frutos.

Tudo o que eu vivi me trouxe até aqui e sou grata a tudo, invariavelmente. Curvo meu coração em reverência a todos os mestres, espalhados pelos meus caminhos todos, vestidos de tantos jeitos, algumas vezes disfarçados de dor.

Eu mudei muito nos últimos anos, mais até do que já consigo notar, mas ainda não passei a acreditar em acaso."

(Ana Jacomo)

Resumo

Santiago, K.L. **Construção e expressão de anticorpo humanizado a partir do anticorpo monoclonal contra a proteína de 70 kDa de *Sporotrix schenckii* (P6E7).** 2013. 117 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Sporothrix shenckii é o agente etiológico da esporotricose, micose de carater crônico e de ampla distribuição mundial. No Brasil, vem crescendo o número de casos da doença, bem como a incidência de formas clínicas graves ou atípicas. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um anticorpo monoclonal contra o componente antigênico proteíco de 70 kDa, secretado pelas células leveduriformes de *S. schenckii,* denominado anticorpo monoclonal (AcMo) P6E7. Este AcMo apresentou atividade profilática e terapêutica na esporotricose experimental, no entanto, este anticorpo possui origem murina, o que pode gerar uma resposta imunogênica quando administrado em humanos, impossibilitando sua utilização por tempo prolongado. Visando sua possível utilização no tratamento da esporotricose humana, a nossa proposta foi a humanização do AcMo P6E7 na forma de FvFc (Fv-*linker*-Fc) através de engenharia genética. Inicialmente construimos duas versões uma humanizada e outra quimérica do AcMo contra a fração de 70 kDa do antigeno de *S. schenckii.* Os anticorpos foram expressos em vetores de expressão dicistrônicos e produzidos com eficiência e estabilidade estrutural em células de mamíferos da linhagem CHO. Posteriormente, esses anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade e analisados quanto a sua capacidade de ligação ao fungo e função efetora. Verificamos que os FvFcs construídos foram capazes de se ligar a porção de 70 kDa do antígeno de *S. schenckii*. Através de ensaios de fagocitose, constatamos que os fragmentos FvFc do P6E7 humanizado e quimérico foram capazes de opsonizar as leveduras de *S. schenckii* aumentando, assim, o índice fagocítico em macrófagos humanos. Esses dados em conjunto, sugerem a possível utilização do anticorpo construído no tratamento da esporotricose humana.

Palavras-chaves: Esporotricose, *Sporotrix schenchii*, gp 70 kDa, anticorpo monoclonal, humanização.

ABSTRACT

Santiago, K.L. **Construction and expression of humanized antibody from the monoclonal antibody against the protein of 70 kDa *Sporotrix schenckii* (P6E7**).2013. 117 p. Thesis (Ph.D.) - School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2013.

Sporothrix shenckii is the etiological agent of sporotrichosis, a chronical fungal infection that shows a worldwide distribution. In Brazil, there is a growing number of cases of sporotrichosis, as well as the incidence of severe or atypical clinical forms. Our research group developed a monoclonal antibody (mAb) against the fungal antigenic component a protein of 70 kDa, secreted by *S. schenckii* yeasts called P6E7. This mAb showed prophylactic and therapeutic activity in experimental sporotrichosis, however, this antibody has murine origin, which can generate an immune response when administered to humans, precluding their use for prolonged time. For its possible use in the treatment of human sporotrichosis, our proposal is the humanization of mAb P6E7 through genetic engineering. Initially, we built two versions of the original antibody: an humanized version and a chimeric antibody both against the 70 kDa fraction from *S. schenckii* antigen. The antibodies were expressed in dicistronic expression vectors and were efficiently produced in mammalian cells CHO strain, showing good structural stability. Subsequently, these antibodies were purified by affinity chromatography and assayed for their binding ability to the fungus and effector function. We found that the built os FvFcs (Fv-linker-Fc) fragments were capable of binding to the 70 kDa portion of *S.schenckii* antigen. Through phagocytosis assays, we found that the FvFc fragments from the humanized and chimeric P6E7 were able to opsonize *S. schenckii* yeasts, thus increasing the phagocytic index in human macrophages. Together, These data suggest the potential use of the antibodies constructed in the treatment of human sporotrichosis.

Key words: Sporotrichosis, *Sporotrix schenchii*, gp 70 kDa monoclonal antibody humanization.

LISTA DE FIGURAS

Figura Assunto Página

Figura 1: Distribuição geográfica da esporotricose no século XXI.....25
Figura 2: Fenômeno denominado “corpúsculos asteroides”.....29
Figura 3: Morfologia de *Sporotrix schenckii*.....30
Figura 4: Estrutura de uma molécula de anticorpo.....37
Figura 5: Representação esquemática de uma molécula de IgG.....38
Figura 6: As regiões hipervariáveis posicionam-se em alças separadas da estrutura dobrada.....39
Figura 7: Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante.....41
Figura 8: Representação esquemática de anticorpos quiméricos e humanizados...47
Figura 9: Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy 64
Figura 10: Gel de agarose desnaturante mostrando integridade do RNA.....80
Figura 11: Amplificação dos cDNAs que codificam para o fragmento VH murino....81
Figura 12: Amplificação dos cDNAs que codificam para o fragmento VL murino.....81
Figura 13: Sequência nucleotídica obtida e polipeptídica predita para VH do anti-P6E7 murino.....83
Figura 14: Digestão do vetor p-GEM T Easy com enzina PVU II para confirmar ligação da VH do hibridoma P6E7.....84
Figura15: Digestão dos vetores pGEM/VH P6E7 e pIg16.....85
Figura16: Representação esquemática da estratégia utilizada para clonagem da VH para a clonagem do anti-P6E7 no vetor pIg16 Z22.....86
Figura 17: Estratégia para síntese e retirada do sítio de Bgl II interno da sequencia de VL.....88
Figura 18: Estratégia para retirada e síntese do sítio de Bgl II interno da sequencia de VL.....88
Figura 19: Digestão dos vetores pIg16VHMU e pGEM/VL P6E7.....89
Figura 20: Esquema de estratégia utilizada para clonagem da VL anti-P6E7 no vetor pIgP6E7VHMU.....90
Figura 21: Alinhamento das sequências de aminoáciods do do anti-P6E7 murino.91
Figura 22: Representação esquemática do gene scFV sintetizado.....92

Figura 23: Digestão dos vetores pMIRES e pIg16scFv P6E7.....92
Figura 24: Análise da amplificação das cadeias VH e VL do scFV P6E7 inseridas no vetor pMIRES.....93
Figura 25: Digestão dos vetores pBluescript II (contendo o scFV P6E7 humanizado) e pMIRES.....94
Figura 26: Morfologia das células CHO-K1.....94
Figura 27: Análise das frações purificação por Dot Blot dos FvFc quimérico e humanizado.....95
Figura 28: Análise da purificação por cromatografia de afinidade dos FvFc quimérico e humanizado.....96
Figura 29: Ensaio de fagocitose.....96
Figura 30: Fotos ensaios de fagocitose.....97

LISTA DE TABELAS

Tabela Assunto Página

Tabela 1: Classificação taxonômica do gênero *Sporotrix*..... 23
Tabela 2: Formas clínicas da esporotricose.....27
Tabela 3: Anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA até fevereiro de 2013.....50
Tabela 4: Oligonucleotídeos sintéticos utilizados em diferentes etapas do trabalho.....54
Tabela 5: Biblioteca de oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de RT-PCR.....54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico Assunto Página

Gráfico 1: Percentual de quatro tipos de mAbs em desenvolvimento clínico durante 1990-1999 e 2000-2008.....48

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo	Anticorpo monoclonal
Amp ^{R}	Gene de resistência à ampiciliana (β- lactamase)
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina Bovina Sérica
ºC	Grau Celcius
CD	Marcador de Supercífie
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CDR	Região determinante de complementariedade
CFU	Unidade Formadoras de colônia
CH	Cadeia constante pesada do anticorpo
CHO	Células de ovário de *hamster* chinês
CL	Cadeia constante leve do anticorpo
C-Terminal	Extremidade Carboxi-terminal
Da	Dalton
dH_2O	Água destilada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMA	*European Medicines Agency*
Fab	Fragmento (de anticorpo) de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento (de anticorpo) cristalizável (porção constante)
FcR	Receptor de Fc
FCɣR	Receptor FC gamma
FDA	*Food and Drug Administration* (EUA)
FR	Arcabouço (*Framework*)
Fv	Fragmento (do anticorpo) variável
g	Grama
g	Força gravitacional
gp 70	Glicoproteína de 70 kDa
h	Hora
Ig	Imunoglobulina
IPTG	Sopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampère
mAb	Monoclonal antibody
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Marcador de massa molecular
mRNA	RNA mensageiro
NBT	Nitro Blue Tetrazole
Ng	Nanograma
OD	Densidade ótica
Ori	Origem de replicação
ORF	Fase aberta de leitura (*Open Reading Frame*)
pb	Pares de base
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão salina fosfato
PBS T	Tampão salina fosfato + Tween 20
PCR	Reação polimerásica em cadeia
PDB	*Protein Data Bank*
pH	Potencial hidrogeniônico
pMOL	Picomol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonato
ptn A	Proteína A de *Staphylococcus aureus*
RE	Retículo endoplasmático
rpm	Rotações por minuto
p/v	Razão peso/volume
RNA	Ácido ribonucleico
RNAase	Ribonuclease
scFv	Fragmento variável (de anticorpo) de cadeia única
SDS	Sódio Duodecil Sulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS

SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-borate-EDTA
TEMED	N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina
Tm	Temperatura média
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
U	Unidade enzimática
UV	Raios ultrvioleta
V	Volume
v/v	Razão volume/volume
VH	Domínio variável de cadeia pesada do anticorpo
VL	Domínio variável de cadeia leve do anticorpo
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
YCG	Yeast nitrogen Casamino accids glucose
YNB	*Yeast Nitrogen Base*
mg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromol

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....23

1. Esporotricose.....23
2. Componentes antigênicos de *S. Schenckii*.....32
3. Regulação da resposta imunológica na esporotricose.....33
4. Anticorpos.....36
5. Manipulação de fragmentos de anticorpos.....41
6. Anticorpos monoclonais e humanização.....45

OBJETIVOS.....52

1. Objetivo geral.....52
2. Objetivos específicos.....52

MATERIAIS E MÉTODOS.....53

1. Células.....53
   1.1. Hibridoma.....53
   1.2. Linhagem bacteriana.....53
   1.3. Células mononucleares do sangue periférico de voluntários.....53
   1.4. Fungo.....53
2. Plasmídeos.....53
3. Oligonucleotídeos Sintéticos Específicos.....54
4. Soluções e meio de cultura.....56
   4.1. Meios de Cultura e soluções para bactéria e fungo.....56
   4.2. Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos.....58
   4.3. Soluções e tampões para uso geral.....59
   4.4. Soluções para preparo de células competentes e transformação bacteriana.....60
   4.5. Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida.....60
   4.6. Soluções para cromatografia de afinidade.....62
   4.7. Solução estoque de Inibidore de Proteases.....63
5. Extração de RNA total.....63
6. Síntese de cDNA.....63
7. PCR para amplificação dos genes codificadores das cadeias variáveis leve (VL) e pesada (VH).....63
8. Análise de DNA em Gel de Agarose.....63
9. Clonagem dos fragmentos VL e VH no vetor pGEM-T.....65
10. Obtenção de células competentes para eletroporação.....66
11. Transformação bacteriana por eletroporação.....66

12. Obtenção de células competentes com $CaCl_2$ 67
13. Transformação bacteriana por Choque térmico.....67
14. Purificação de DNA plasmidial por cromatografia de troca iônica.....67
15. Digestão do DNA plasmidial com Enzimas de Restrição.....67
16. PCR para sequenciamento de DNA plasmidial.....68
16.1. Hibridização, elongação e terminação do oligonucleotídeo ao DNA dupla fita.....68
16.2. Precipitação da reação de seqüenciamento usando glicogênio.....69
17. Amplificação do DNA do gene da VH e da VL.....69
18. Análise e proposição da sequencia humanizada.....70
19. Clonagem dos genes dos FvFcs humanizado.....70
20. Cultura de células de mamíferos.....71
21. Congelamento de células CHO.....71
22. Descongelamento de células CHO.....72
23. Tripsinização, passagem das células e formação de monocama celular.....72
24. Estimativa do número de células por contagem em câmara de Neubauer.....72
25. Determinação Viabilidade celular.....72
26. Transfecção de células CHO.....73
27. Seleção de células transfectadas utilizando Geneticina® (G418-Sulfato).....73
28. Propagação das células transfectadas selecionadas para aumento da expressão.....74
29. Concentração do sobrenadante.....74
30. Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade.....75
31. Obtenção de exoantígeno de S. schenckii.....75
32. Dosagem proteica.....76
33. Análise de proteínas por *Dot Blotting*.....*76*
34. Quantificação proteica por BCA.....77
35. Análise dos produtos recombinantes por *imunoblotting*.....*78*
36. Coloração de Géis SDS-PAGE com prata.....78
37. Separação de células mononucleares do sangue periférico.....79
38. Tratamento das células leveduriformes de S. schenckii com AcMo anti-fração de 70 kDa P6E7, fragmento FvFc humanizado e quimérico.....79

39. Fagocitose.....80
RESULTADOS.....81
1. Isolamento de RNA total.....81
2. Obtenção de cDNA por RT-PCR.....81
3. Obtenção da cadeia VH.....81
4. Obtenção da cadeia VL.....82
5. Purificação, ligação em vetor, clonagem e sequenciamento das amostras....82
6. Expressão do scFv murino anti-P6E7.....84
7. Proposição e síntese de gene que codifica para versão humanizada do scFV do anti-P6E7.....91
8. Clonagem das sequencias codificadoras de anticorpos recombinantes quimérico e humanizado no vetor pMIRES.....93
9. Transfecção das células de ovário de *hamster* chinês (CHO) com os plasmídios pMIRES FvFc P6E7 humanizado e pMIRES P6E7 quimérico.....95
10. Purificação dos FvFcs humanizados e quiméricos.....96
11. Pureza das amostras dos FvFcs humanizados e quiméricos.....96
12. Teste dos FvFc humanizados e quiméricos anti-P6E7 quanto a capacidade de ligação.....97
DISCUSSÃO.....99
CONCLUSÕES.....105
BIBLIOGRAFIAS.....106
ANEXOS.....116

INTRODUÇÃO

1. Esporotricose

A esporotricose é uma micose subaguda ou crônica caracterizada por lesões nodulares que afetam o tecido subcutâneo e, com frequência, tecidos linfáticos. Na maior parte dos casos a doença ocorre mediante implantação traumática na pele por uma das espécies do complexo fúngico *Sporotrix schenckii*. Mais de seis espécies de *Sporotrix* foram identificadas por técnicas moleculares. Além de *Sporotrix schenckii sensu stricto,* temos: *Sporotrix brasiliensis, Sporotrix globosa, Sporotrix mexicana* e *Sporotrix albicans* (VÁSQUEZ-DEL-MERCADO et al., 2012).

O primeiro caso de esporotricose foi relatado por Benjamim Schenck em 1898, no Johns Hopkins Hospital, em Baltimore, EUA. Após isolar o agente etiológico, Schenck enviou uma amostra ao micologista Erwin Smith, que identificou o micro-organismo como pertencente ao gênero *Sporotrichum* (SCHENCK, 1898). Em 1900, a doença foi relatada pela segunda vez, também nos EUA, em Chicago, por Hekton e Perkins, que classificaram o agente etiológico como *Sporotrix schenckii.* O uso de iodeto de potássio no tratamento da esporotricose foi sugerido por Sabourand e Gougerot em 1903 (KWON-CHUNG; BENNETT; 1992). Em 1908, a doença foi descrita na França por De Beurmann e Ramond, e vários outros casos foram relatados na Europa no mesmo período (RIPPON, 1988). O primeiro episódio de esporotricose no Brasil foi reportado, em 1907, por Lutz e Splendore, isolaram o patógeno na mucosa oral de ratos e caracterizaram o corpo asteroide (LUTZ; ESPLENDORE, 1907). Em 1912, De Beurmann e Gougerot publicaram um completo tratado da doença (RAMOS-E-SILVA et al., 2007). A intradermorreação produzida por polissacarídeo da fase micelial do fungo foi usada pela primeira vez, para o diagnóstico e estudos epidemiológicos, em 1947, por González-Ochoa e Soto-Figueroa (ARENAS, 2008; VÁSQUEZ-DEL-MERCADOETA et al., 2012). A transição dimórfica do fungo foi descrita por Howard em 1961 (LOPES-BEZERRA et al., 2006). Cepas de fungos isolados de seres humanos na França e na América foram estudadas por Davis em 1921. Ele concluiu que as cepas eram idênticas e chamou o agente etiológico de *Sporotrichum schenckii*. No entanto, Carmichael, em 1962, apontou as diferenças na esporulação dos conídios entre os gêneros *Sporotrichum* e

S*porotrix* e determinou que a denominação correta do micro-organismo fosse *Sporotrix schenckii* (RIPPON, 1988).

A classificação taxonômica atual do micro-organismo é feita de acordo com a Tabela 1 (GUARRO et al, 1999). Em 2007, Marimon e colaboradores relataram três novas espécies: *Sporotrix brasiliensis, Sporotrix globosa e Sporotrix mexicana.* Recentemente, De Meyer e colaboradores descreveram três outras espécies de *Sporothrix* ambientais: *S. estilita*, *S. humicola* e *S. lignivora*. As duas primeiras diferem do *S. schenckii* pela incapacidade de produzir conídios não melanizados e consequentemente pelo não escurecimento das colônias no decorrer do tempo. Já a espécie *S. lignivora* possui conídios que não coincidem, em forma e tamanho, com os de outras espécies de *Sporothrix* ou da espécie *Ophiostoma*. É interessante observar que isolados como *S. humicola* foram anteriormente classificados como isolados ambientais de *S. schenckii*. Em seu estudo, os autores acima mencionados concluíram que a análise da sequência β-tubulina é fortemente recomendada para estudos taxonômicos das espécies de *Sporothrix* isoladas a partir do ambiente (de MEYER, et al., 2008).

Tabela 1: Classificação taxonômica do gênero *Sporotrix*

Reino	*Fungi*
Divisão	*Ascomycota*
Classe	*Sordariomycetes*
Ordem	*Ophiostomatales*
Família	*Ophiostomataceae*
Gênero	*Sporotrix*
Espécies	*S. schenckii; S. brasiliensis; S. globosa; S. mexicana; S. albicans; S. luriei*

(Adaptado de GUARRO et al, 1988)

O *S. schenckii* é um fungo dimórfico térmico que apresenta fases de micélio e levedura (HOWARD, 1961). Na natureza ou em laboratório, à temperatura ambiente, entre 25ºC e 30ºC, *S. schenckii* é um fungo filamentoso. Em contrapartida, no tecido do hospedeiro e/ou em cultura *in vitro,* a 37ºC, é encontrado sob a forma de levedura (KAUFFMAN, 1999).

O *Sporotrix schenckii* existe, normalmente, como saprófito amplamente distribuído na natureza. Já foi isolado nos mais diversos sítios, como: palha, folhas, grãos de trigo, frutas, cascas de árvores, madeira, espinhos de arbustos, terra arada, insetos mortos e larvas, aranhas, moscas vivas, roseiras, no solo dos EUA e do Brasil, poeira, excretas de animais, algas, animais marinhos e até na atmosfera (TRABULSI, ALTERTHUM, 2005).

A esporotricose é uma doença de distribuição universal, mas é encontrada principalmente em áreas temperadas, quentes e tropicais (KWON-CHUNG; BENNET, 1992). Até o início do século XX, a doença tinha grande prevalência na França e nos EUA, com alguns casos na América do Sul, no restante da Europa, na Rússia e no Extremo Oriente (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; RAMOS-E-SILVA et al., 2007). A doença diminuiu nas últimas décadas e foi considerada uma micose rara ou esporádica na França, aparecendo de forma intermitente em alguns países europeus. Porém, em 2009, um caso autóctone foi relatado na França, e vários outros foram descritos na Itália, na Espanha, em Portugal, no Reino Unido e na Turquia. Esses dados indicam que a esporotricose vem se difundido em países europeus e, ao contrário do que se pensava anteriormente, o *S. schenckii* pode ser considerado um patógeno reemergente. Há pouco tempo, a doença tem-se tornado comum nas Américas do Sul e Central, especialmente em países como Brasil, Peru, Colômbia, Uruguai e México. África do Sul, Índia e Japão são considerados regiões endêmicas no que se refere à esporotricose. Além disso, uma região no Centro-Sul peruano chamada Abangacay mostrou uma prevalência relativamente alta dessa doença, sendo considerada área hiperendêmica, com uma incidência estimada de aproximadamente 50-60 casos por 100.000 habitantes a cada ano (ROMEO; CRISEO, 2013). O maior surto relatado de esporotricose ocorreu na África do Sul, em uma mina de ouro de Transvaal, onde 3.000 casos foram confirmados (RAMOS-E-SILVA et al., 2007).

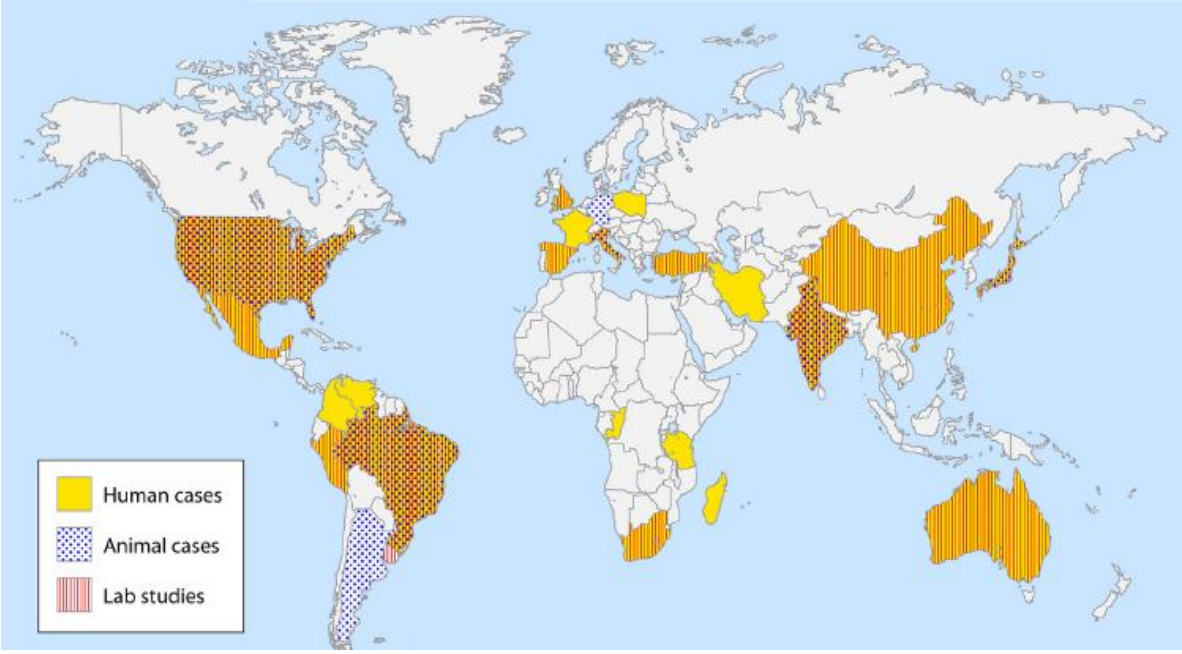

Figura 1. Distribuição geográfica da esporotricose no século XXI (adaptado de BARROS et al. 2011).

Durante muito tempo, a esporotricose foi descrita como uma doença de baixa incidência no Brasil; entretanto, relatos recentes mostram que não só o número de casos descritos vem aumentando, mas também a incidência de formas clínicas mais graves ou atípicas da doença vem ocorrendo com maior frequência (LOPEZ-BEZERRA et al., 2006). Nos últimos anos a moléstia vem se tornando um caso de saúde pública no Estado do Rio de Janeiro (da SILVA et al., 2012).

Além de afetar o homem, a esporotricose tem sido isolada em vários animais, como jumentos, cavalos, gatos, camelos, ratos, camundongos, coelhos, cães, papagaios, bovinos e tatus (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Geralmente a infecção cutânea resulta da inoculação do fungo através de pequenos traumas, como arranhões causados por espinhos ou lascas de material contaminado (KAUFFMAN,1999; LOPEZ-BEZERRA et al., 2006). Pessoas de qualquer idade, raça ou sexo podem ser afetadas, mas a doença é mais comum em homens adultos, principalmente em decorrência de sua maior exposição ao fungo, associada às atividades ou ocupações por eles exercidas. Entre os profissionais predispostos à infecção por esporotricose, estão: agricultores, produtores de hortaliças, jardineiros, floristas, trabalhadores florestais, de mineração e extração de madeira, bem como trabalhadores que exerçam atividades nas quais ocorra exposição ao solo ou à vegetação contaminada, particularmente na área rural

(KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; SCHECHTMAN, 2010; da SILVA, 2012). Atualmente, veterinários, técnicos de laboratório, cuidadores e proprietários de gatos com esporotricose são considerados como uma nova categoria de risco para a aquisição da doença (BARROS et al., 2011).

A doença raramente é transmitida de pessoa para pessoa. Na literatura científica, a esporotricose esteve associada, durante anos, a profissionais que manuseiam a terra, local onde o fungo causador se aloja. Recentemente, em áreas urbanas tem sido registrada a ocorrência relacionada à transmissão zoonótica da doença. Neste início de século, a ocorrência vem sendo relacionada também à arranhadura, à mordedura ou, ainda, por solução de continuidade cutânea preexistente em gatos infectados, levando a surtos domiciliares, além de casos em profissionais que lidam com esses animais, como veterinários e auxiliares. (RIPPON, 1988; SHUBACH et al, 2008; da SILVA et al., 2012).

A esporotricose felina vem sendo diagnosticada com maior frequência, adquirindo importância zoonótica pelo elevado risco de transmissão inter e intraespécie, em consequência da riqueza de fungos presentes nessa espécie de animal (LACAZ et al., 2002). Marquês e colaboradores (1997), em Botucatu (SP), observaram a crescente incidência de esporotricose humana pós-contato com gatos domésticos infectados por *Sporotrix schenckii*. Desde 1998, a Fundação Oswaldo Cruz vem diagnosticando um número crescente de casos de esporotricose humana e felina na cidade do Rio de Janeiro (BARROS et al., 2008). Entre 1998 e 2004, foram diagnosticados, na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, 759 casos de esporotricose em humanos e 1.503 casos em gatos (revisado por LOPES-BEZERRA, 2006). Em um estudo mais abrangente, entre 1997 e 2007, foram diagnosticados e tratados 1.848 casos de esporotricose no Estado do Rio do Janeiro, dos quais 1.289 foram registrados no último quadriênio. Em 65% dos 1.848 casos, verificou-se a referência a gatos e, dentre eles, 80,3% tiveram como fonte de infecção declarada o gato no ambiente domiciliar (da SILVA et al., 2012). Tais estudos demonstram que a esporotricose pode ser considerada a maior epidemia por transmissão zoonótica no estado do Rio de Janeiro.

A esporotricose se manifesta principalmente como uma infecção subaguda cutânea e subcutânea crônica. O *S. schenckii* é um patógeno que afeta tanto hospedeiros saudáveis quanto imunossuprimidos. Entretanto, a extensão da doença varia de acordo com as condições de imunidade do hospedeiro, o tamanho e a

profundidade da inoculação e a virulência do fungo. As manifestações extracutâneas da micose, como nas esporotricoses disseminada visceral, osteoarticular, meningite e pulmonar, são mais frequentes em pacientes que apresentam fatores de risco subjacentes. Há ainda uma forte associação com o alcoolismo, mas as razões dessa predisposição ainda não foram esclarecidas. Não se verifica relação entre a doença e a atividade ocupacional, mas há conexão com fatores predisponentes, como alcoolismo, transplante de órgãos, diabetes *mellitus,* doença pulmonar obstrutiva crônica e soropositividade para HIV e outras imunodeficiências (VIEIRA-DIAS et al., 2007; VILELA et al., 2007; RAMOS-E-SILVA, 2007; KAUFFMAN, 1999).

A esporotricose apresenta diversas manifestações clínicas, e pesquisadores discordam quanto à classificação da doença em termos clínicos (LACAZ et al., 2002). Sampaio e Lacaz propuseram quatro formas clínicas da doença: (1) Linfocutânea; (2) Fixa cutânea; (3) Multifocal ou disseminada; (4) Extracutânea (RAMOS-E-SILVA, et al., 2007; SAMPAIO, LACAZ; 1959). Na Tabela 2, está exposto o esquema da classificação clínica proposta por Lopez-Bezerra (2006).

TABELA 2: Formas clínicas da esporotricose

Cutânea

- Linfocutânea
- Fixa
- Disseminada ou múltipla

Mucosa

- Ocular
- Oral
- Outras

Extracutânea

- Pulmonar
- Osteoarticular
- Meningite
- Generalizada

Lopez-Bezerra et al (2006)

A forma clínica mais frequente é a forma linfocutânea, que ocorre em cerca de 80% dos casos (RIPPON, 1988; SCHECHTMAN, 2010). A lesão começa com uma pápula que lentamente se dilata para tornar-se nodular e muitas vezes pode progredir para necrose, liquefação de seu conteúdo e eventual ulceração, mostrando um aspecto esporotricoide. Erupções cutâneas verrucosas, infiltrados ou placas eritromatosas também podem ocorrer. A progressão da infecção é caracterizada por nódulos que aparecem ao longo da distribuição linfática próxima à lesão inicial e por linfangite entre os nódulos (WATANAKUNAKORN, 1996). Alguns pacientes não manifestam propagação e linfangite, mas apenas lesões fixas cutâneas que persistem no local da inoculação. Embora se caracterizem pela transitoriedade, as lesões, em geral, retornam e não raro persistem por anos, até serem tratadas (RIPPON, 1988). A forma cutânea disseminada tem sido observada em pacientes imunossuprimidos, especialmente em indivíduos com HIV (CARLOS et al, 2009). O desenvolvimento da esporotricose em mucosas não é muito comum e acomete preferencialmente a mucosa ocular (VIEIRA DIAS et al, 2007). A forma extracutânea é ainda mais rara e difícil de diagnosticar, devido à ausência de lesões na pele. A forma extracutânea é causada pela inalação de esporos ou por disseminação hematogênica decorrente de uma inoculação profunda na pele (RAMOS-E-SILVA et al., 2007). Ocorrendo propagação para outros órgãos, a esporotricose pode apresentar-se sob diversas formas clínicas, conforme a área atingida. A forma osteoarticular, em cerca de 80% dos casos de esporotricose disseminada, e a esporotricose pulmonar constituem os casos mais comuns. Também há relatos de sinusite, meningite, endoftalmite, laringite e fungimia por *S. schenckii* (RAMOS-E-SILVA, 2007; ALMEIDA, 2008; SCHECHTMAN, 2010).

A suspeita clinica é essencial para o diagnóstico da esporotricose. O padrão ouro para detecção de esporotricose é a cultura. Porém, alguns autores defendem o exame direto com hidróxido de potássio, fundamentado nas características peculiares dos corpúsculos asteroides para identificação (RAMOS-E-SILVA et al., 2007). Demonstrou-se que o exame direto no que se refere à esporotricose apresenta 85% de positividade, enquanto a confirmação por cultura apresenta uma positividade de 95% (CIVILA et al., 2004). O teste cutâneo com esporotriquina é muito utilizado em estudos epidemiológicos e pode ser útil, exceto em casos de doença disseminada em que há anergia (LACAZ et al., 2002; SÁNCHEZ-ALEMÁN et al, 2004). Os testes sorológicos, como imunodifusão, soroaglutinação,

imunoeletroforese, ELISA e imunofluorescência não são empregados como rotina no diagnóstico da esporotricose, pois não são confiáveis para a determinação da doença. Entretanto, as abordagens sorológicas, histopatológicas e moleculares têm sido, recentemente, adotadas como ferramentas auxiliares para o diagnóstico dessa infecção (KWON-CHUNG; BENNET,1992; AZULAY, 2004; HAY, 2005).

Achados histopatológicos são inespecíficos, geralmente porque o organismo não é facilmente visualizado em hematoxilina-eosina, devido à presença do polissacarídeo que reveste o fungo. As formas fúngicas também não são vistas com facilidade por meio do emprego da coloração padrão ácido periódico de Schiff (PAS) ou de Grocott. A esporotricose produz inflamação granulomatosa associada à hiperplasia epitelial e infiltrado histiocitário de células plasmáticas. Granulomas com células gigantes são visualizados; corpúsculos asteroides podem ser vistos e constituem células de leveduras isoladas ovais em forma de charuto, cercadas por um material eosinófilo resultante da deposição de proteína da reação antígeno/anticorpo (Figura 2) (RAMOS-E-SILVA et al., 2007; SCHECHTMAN, 2010).

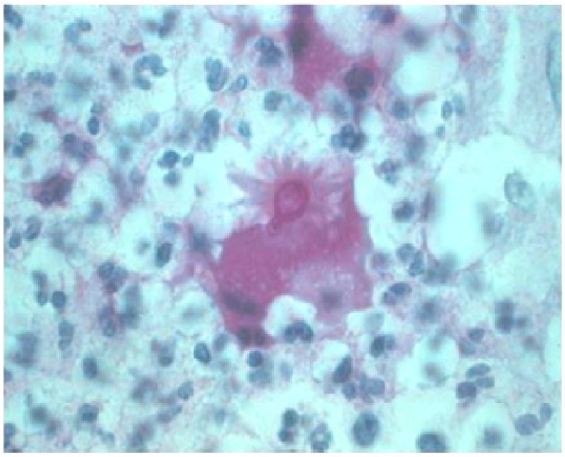

Figura 2. Fenômeno denominado "corpúsculos asteroides". Biopsia corada por HE (40X). Abscessos ou zonas necróticas, células epitelioides e células gigantes do tipo Langhans. Formações asteroides e/ou células leveduriformes em forma de "charuto" ou "naveta" (BARROS et al, 2011).

Uma vez que os organismos não são normalmente vistos mediante o uso de hidróxido de potássio ou por exame histopatológico, culturas são necessárias para diagnóstico definitivo da esporotricose (SCHECHTMAN, 2010). O padrão ouro para o diagnóstico é o isolamento do fungo em ágar Sabouraud. Pus, líquido sinovial, escarro, sangue ou fragmentos de tecidos são os materiais apropriados para a cultura. A incubação é realizada a 25ºC; as colônias geralmente aparecem no

período de 3 a 5 dias e apresentam cor branco-amarelada. Em poucos dias, convertem-se em colônias marrom-escuras membranosas (Figura 3A), (RAMOS-E-SILVA et al., 2007; VALVEZ-DEL-MERCADO et al., 2012). A colônia apresenta dimorfismo fúngico, isto é, uma fase micelial e uma de levedura. A fase saprofítica do micélio é caracterizada por hifas delgadas, hialinas, septadas e ramificadas, com finos conidióforos cujo ápice forma uma pequena vesícula com conídios dispostos em forma de dentículos, cada um com cerca de 2 a 4mm de comprimento, e os aspectos microscópicos característicos lembram flores parecidas com margaridas (Figura 3B) (SCHECHTMAN, 2010). Embora a fase leveduriforme, obtida a 37ºC, apresente características morfológicas úteis na identificação do fungo, a demonstração do dimorfismo é importante (Figura 3C) (RIPPON, 1988).

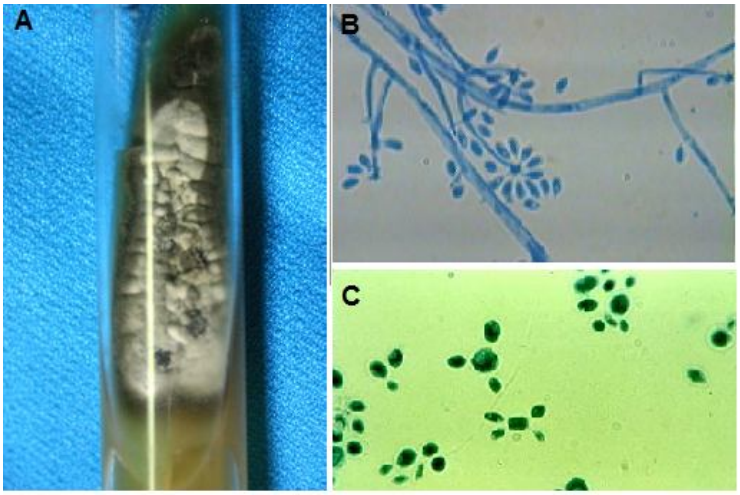

Figura 3. Morfologia de *Sporotrix schenckii*. A: Fase filamentosa, em ágar Sabourand dextrose. B: Aspecto microscópico (40X) dos conídios de *S. schenckii* (os quais têm forma de margaridas). C: Fase leveduriforme. Adaptado de Barros et al, 2011.

Diferentes esquemas terapêuticos são usados para o tratamento da esporotricose, tais como: tratamento com iodeto de potássio, itraconazol, terbinafina, fluconazol e anfotericina B. A escolha é baseada nas características da condição clínica do indivíduo como extensão das lesões cutâneas, avaliação das interações medicamentosas, eventos adversos e envolvimento sistêmico (LOPES-BEZERRA, 2006).

2. Componentes antigênicos de *S. Schenckii*

A parede celular é o envelope da superfície do fungo e desempenha um papel central na interação patógeno-hospedeiro, mediando vários processos associados à patogenia desses micro-organismos. A parede celular do *S. schenckii* é composta de glucanas solúveis e insolúveis encontradas em ambas as fases morfológicas desse fungo (LOPEZ-BEZERRA, 2006). Os principais constituintes de superfície dos antígenos de *S. schenckii* são raminomananas e galactomananas (TRAVASSOS, 1989). A fração glicoproteica, que contém manose, ramanose e uma proteína chamada peptidioramanose, foi isolada a partir da parede da célula da fase leveduriforme o fungo (LLOYD; BITOON, 1971). Paralelamente, um glicoconjugado com raminomanose e manose foi detectado em uma seção isolada do filtrado de cultura de *S. schenckii* (ISHZAKI, 1970).

O mecanismo ou mecanismos de resistência e susceptibilidade à infecção por *S. schenckii* são pouco conhecidos. Não se sabe se determinadas proteínas ou enzimas produzidas por *S. schenckii* contribuem para seu potencial patogênico (CARLOS et al., 2009). Poucos componentes de proteína ou glicoproteína foram identificados, até agora, na parede celular do fungo.

O perfil eletroforético do sobrenadante de culturas de células leveduriformes revela certa complexidade em sua composição, com bandas proteicas que variam de 22 kDa a 70 kDa. Scott e Muchmore (1989), utilizando técnicas de *immunoblotting*, demonstraram que soros de pacientes com esporotricose reagiram a antígenos de 40 e 70 kDa. Esses autores mostraram que a reação era específica, uma vez que nenhuma reação em indivíduos saudáveis ou pacientes com outras doenças fúngicas foi observada. Em culturas de conídios, a complexidade é maior, e as bandas variam de 29 kDa a 200 kDa (MENDOZA et al., 2002).

A camada mais externa da parede celular de *S. schenckii* é composta por material microfibrilar amorfo, antes chamado de material capsular, que se destaca da parede celular e é lançado no meio (GARRISSON et al., 1983). Estudos recentes têm mostrado que tal camada microfibrilar está associada à adesão do fungo às células hospedeiras (FIGUEIREDO et al., 2004).

De particular interesse é a glicoproteína de 70 kDa, isolada a partir da parede celular da fase de levedura de *S. schenckii*. É um glicopeptídeo purificado e tem cerca de 5,7% da sua massa molecular composta por N-glicanos ligados. Essa

glicoproteína tem uma distribuição uniforme sobre a superfície da célula fúngica e participa da adesão à matriz extracelular (NASCIMENTO, 2008; RUIZ-BACA, 2009). Em nosso laboratório foi observada a participação desse componente antigênico proteico de 70 kDa secretado pelas células leveduriformes de *S. schenckii* no potencial patogênico desse fungo (NASCIMENTO et al., 2005).

Ambas as fases morfológicas de *S. schenckii* têm a capacidade de sintetizar melanina. Macroscopicamente, apenas a fase do micélio do fungo é melanizada. No entanto, a produção de melanina em células de levedura foi demonstrada *in vitro* durante a infecção (MORRIS-JONES et al, 2003). A presença de melanina na parede celular pode exercer um papel protetor para o patógeno. Ela é um composto altamente insolúvel e funciona como um pigmento sequestrador de radicais livres. A melanina também torna o fungo menos suscetível à fagocitose por macrófagos do que células não melanizadas. Estudos sugerem que a melanina confere tolerância e proteção contra os oxidantes que são produzidos durante a resposta de defesa do hospedeiro (ROMERO-MARTINEZ et al. 2000; MORRIS-JONES et al., 2002).

Embora várias estruturas antigênicas de superfície do fungo tenham sido identificadas em *S. schenckii*, outros constituintes estão presentes na parede celular e podem ser importantes como imunógenos e como fatores de virulência (TRAVASSOS, 1989; CARDOSO, 1987).

3. Regulação da resposta imunológica na esporotricose

Sabe-se que os mecanismos de defesa do hospedeiro influenciam na manifestação e na severidade das infecções fúngicas, a ponto de as formas clínicas da doença dependerem da resposta imune do paciente. Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra fungos são numerosos e vão de mecanismos de proteção presentes no início da evolução dos organismos multicelulares (imunidade inata) a sofisticados mecanismos adaptativos, que são especificamente induzidos durante a evolução da doença (imunidade adaptativa) (ROMANI, 2004). Em estudos sobre as respostas imunes anti-*Candida* e anti-*Cryptococcus,* foi demonstrado que tanto as respostas adaptativas humorais quanto a imunidade inata se associam contra esses patógenos e, de modo relacionado, com a imunidade celular (CASADEVALL, 1995).

A imunidade celular específica (células T) e a imunidade celular inespecífica, tais como macrófagos, neutrófilos e células NK, fornecem, geralmente, as principais

linhas de defesa contra fungos. A importância dos mecanismos de defesa celular para proteção contra fungos é apoiada pela observação clínica, segundo a qual a maioria das infecções invasivas por fungos ocorre em indivíduos com deficiências na imunidade celular (CASADEVALL, 1995; LEVITZ, 1992).

O mecanismo imunológico vinculado à prevenção e ao controle da esporotricose sugere que a imunidade mediada por células tem um importante papel na proteção do hospedeiro contra a esporotricose (PLOUFFE, 1979; NASCIMENTO, 2008). O fato de a esporotricose ser mais grave e geralmente disseminada em camundongos nude e em pacientes soropositivos para HIV confere credibilidade ao conceito de que a imunidade mediada por células T é importante para limitar a extensão da infecção por *S. schenckii* (KAUFFMAN, 1999). Yupin investigou a resposta imune na esporotricose experimental em hamsters e demonstrou que a imunização ativa e a transferência de células linfoides resultaram em uma melhora da imunidade contra o fungo. Ainda nesse estudo, o aumento da resistência à infecção fúngica pela imunização ativa foi demonstrado em ratos e observou-se que células T e macrófagos contribuíam para a resistência (YUPIN, 1976). Em outro estudo, realizado por Shiraishi e colaboradores, a carragenina, um inibidor de macrófagos, foi usado e os resultados obtidos indicaram que os macrófagos desempenham um papel importante na resistência à infecção por *S. schenckii* em camundongos (SHIRAISHI, 1992). A imunidade celular aos antígenos de *S. schenckii* é essencial aos mecanismos imunológicos de defesa que controlam a infecção. Ambos, células T $CD4^+$ e macrófagos são necessários para o desenvolvimento do granuloma, o qual é um componente crítico e essencial na defesa do hospedeiro contra patógenos (TACHIBANA et al., 1999; UENOTSUCHI, 2006).

Entre as funções dos anticorpos em infecções fúngicas, estão a prevenção de adesão, a neutralização de toxinas, opsonização e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ROMANI, 2004). A importância da resposta imune humoral na defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas tem sido descrita em diversos modelos, tais como: aspergilose, criptococose, candidíase e paracoccidioidomicose (DICKERSON, et al., 1983; MUKHERJEE et al., 1993; SINGER-VERMES et al., 1994; de BERNARDES et al., 1997). Todavia, são poucos os relatos que discorrem sobre a importância da resposta humoral na esporotricose, e alguns autores têm afirmado

que anticorpos contra *S. schenckii* não participam da defesa contra a infecção (TACHIBANA et al., 1999).

A dificuldade em estabelecer o papel da imunidade do anticorpo na maioria das infecções fúngicas pode estar ligada à resistência, à evasão ou a efeitos neutralizantes do fungo ao anticorpo. Em contraste com bactérias, os fungos parecem ser resistentes à lise mediada pelo complemento, presumivelmente por causa da parede celular espessa. Muitos fungos, até mesmo *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans,* produzem proteases que podem degradar a imunoglobulina. Uma vez que hifas e leveduras são antigenicamente diferentes, essa variação da composição das diferentes formas fúngicas pode facilitar o escape do fungo à imunidade do anticorpo. No entanto, estudos recentes mostraram que os anticorpos com especificidades definidas exibem diferentes graus de proteção contra micoses. A administração de anticorpos monoclonais (AcMo) cria proteção contra a *Paracoccidioides brasiliensis* e a *Candida albicans,* além de modificar o curso da infecção de *Cryptococcus neoformans* em camundongos (CASADEVALL, 1995).

Em nosso laboratório, Nascimento et al. (2005) estudaram a regulação da resposta imune na esporotricose experimental. Por meio da técnica de *immunoblotting,* os autores observaram que o soro de animais infectados com *S. schenckii* reagiu apenas com uma molécula antigênica de 70 kDa secretada pelo fungo. O teste de ELISA foi utilizado para quantificar a produção de imunoglobulina (Ig) total contra o exoantígeno e contra a molécula de 70 kDa, previamente purificada por eletroeluição. Os resultados revelaram que os níveis de Ig total contra ambos os antígenos testados apresentavam-se elevados na segunda semana da infecção, mas mantiveram-se estáveis durante a contaminação. Foi observado que o aumento na produção de Ig contra o exoantígeno e a molécula de 70 kDa estava diretamente relacionado com a diminuição da carga fúngica nos órgãos dos animais infectados. Dessa forma, sugeriu-se que altos índices de anticorpos poderiam estar associados à proteção contra esporotricose experimental. Ao realizar-se a isotipagem de imunoglobulina, verificou-se que houve uma predominância na produção de IgG1 e IgG3. Os altos níveis de IgG1 poderiam estar relacionados ao mecanismo de neutralização de antígenos, já que esse isótipo está envolvido na opsonização e, logo, nos mecanismos de fagocitose. Desse modo, os altos níveis de Ig contra a molécula de 70 kDa poderiam atuar na neutralização desse componente, aumentando a fagocitose e consequentemente diminuindo o número de unidades

formadoras de colônias nos órgãos dos animais. Esses resultados denotaram que os antígenos de *S. shenckii* são capazes de provocar uma resposta imune humoral específica contra o fungo em animais experimentalmente infectados (NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005).

Posteriormente, nosso grupo, com o objetivo de caracterizar a atividade biológica da glicoproteína de 70 kDa (gp70), produziu um anticorpo monoclonal contra essa molécula, denominado AcMo P6E7. Por meio de ensaios de imunização passiva, constatou-se que a administração do AcMo P6E7 em camundongos BALB/c foi capaz de modificar o curso da infecção experimental por *S. schenckii.* Houve uma diminuição da carga fúngica nos órgãos desses animais, indicando atividade profilática e terapêutica na esporotricose experimental. Também foi verificado, mediante ensaios de imunofluorescência, que a gp70 está presente na superfície das células leveduriformes de *S. schenckii* e é uma provável adesina para fibronectina e laminina (NASCIMENTO et al., 2008).

4. Anticorpos

A resposta imunológica humoral prevê uma proteção imediata e de longa duração contra uma variedade de agentes infecciosos, constituindo um elemento vital do sistema imune adaptativo. Os anticorpos são glicoproteínas sintetizadas pelos linfócitos B responsáveis pelas funções efetoras dessas células e que iniciam seus efeitos biológicos ligando-se aos antígenos tanto na fase de reconhecimento como na fase efetora da imunidade humoral (JANEWAY, 2007).

A molécula de anticorpo possui duas funções distintas: ligar-se especificamente às moléculas do patógeno e recrutar outras células e moléculas. Essas funções são estruturalmente separadas na molécula do anticorpo, em que uma das partes reconhece especificamente patógenos ou antígenos e se liga a eles, enquanto a outra desencadeia diferentes mecanismos efetores. A região de ligação do antígeno varia enormemente entre as moléculas dos anticorpos e é conhecida como região variável ou região V. Essa variabilidade das moléculas do anticorpo permite que cada um reconheça determinado antígeno. A região da molécula do anticorpo que está relacionada à função efetora do sistema imune não varia da mesma forma e é conhecida como região constante ou região C (JANEWAY, 2007).

Todas as moléculas de anticorpo são semelhantes quanto à estrutura global, o que lhes confere certas características físico-químicas comuns, como carga e solubilidade. Todos os anticorpos têm uma estrutura central comum de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas também idênticas (H) (ABBAS, 2005). Existem dois tipos de cadeia leve encontrados nos anticorpos, denominados “lambda” (λ) e “kapa” (κ). Por outro lado, a classe de um anticorpo e, consequentemente, sua função, são definidas pela estrutura de sua cadeia pesada. Há cinco principais classes ou isótipos de cadeia pesada, os quais determinam a atividade funcional da molécula de anticorpo. Assim, a cadeia pesada se subdivide em: *α, δ, ε, γ* e *μ*, que diferenciam as cinco classes de imunoglobulinas em IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Em humanos, os isótipos IgA e IgG ainda podem ser subdivididos em subclasses relacionadas, ou subtipos, chamados de IgA1 e IgA2; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (JANEWAY, 2007). O principal e mais abundante anticorpo do soro é o IgG, o qual também é o mais utilizado para fins terapêuticos (NEUBERGER et al., 2000).

Os anticorpos IgG são moléculas grandes, com peso molecular de aproximadamente 150 kDa, e formadas por quatro cadeias polipeptídicas: duas leves idênticas, normalmente não glicosiladas, e duas pesadas idênticas, glicosiladas (WRIGHT; MORRISON, 1997). Cada cadeia leve fica presa à pesada, e as duas séries pesadas são unidas por pontes dissulfídricas. Toda cadeia consiste em uma fileira de aminoácidos similares (cerca de 110), cada uma dessas repetições corresponde a uma discreta região compacta dobrada na estrutura da proteína, denominada “domínio proteico” (Figura 4). A cadeia leve apresenta dois desses domínios, ao passo que a pesada possui quatro (BRANDEN; TOOZE, 1991; JANEWAY, 2007; MUYLDERMANS, 2013).

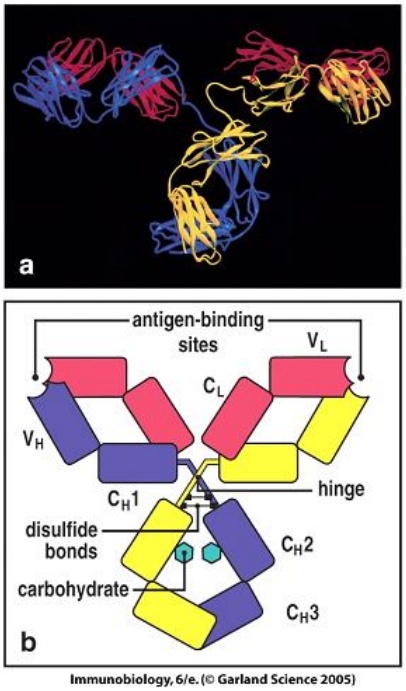

Figura 4- Estrutura de uma molécula de anticorpo. O quadro *a* ilustra um diagrama de fita baseado na cristalografia de raios X de uma IgG. É mostrada a disposição da cadeia polipeptídica central. Em *b*, vê-se a representação esquemática da estrutura apresentada no quadro *a*, ilustrando a composição das quatro cadeias e os domínios distintos que compõem cada cadeia. Adaptada de Janeway et al., 2007.

Os domínios proteicos se associam para formar grandes domínios globulares. Assim, o anticorpo compõe-se de regiões aminoterminais variáveis chamadas VL e VH, assim como de regiões carboxiterminais constantes (C). A cadeia leve possui um único domínio constante (CL), enquanto a pesada é composta de 3 ou 4 domínios constantes, conforme a classe da imunoglobulina, denominados CH1, CH2 e CH3. Os domínios VH e VL formam o fragmento variável (Fv), o qual é responsável pela ligação ao antígeno. A porção Fc dos anticorpos, composto da dobradiça e dos domínios constantes (CH2 e CH3), desempenha duas funções básicas. Quanto à primeira, pode-se afirmar que ela se comunica com o sistema imunológico, uma vez que o anticorpo se encontre vinculado ao seu alvo. A comunicação ocorre mediante atividades efetoras diretamente envolvidas no recrutamento de células do sistema imune que irão mediar a ativação de mecanismos efetores, como a degranulação, a fagocitose, a citotoxicidade celular dependente de anticorpo, a expressão de citocinas e a liberação de mediadores inflamatórios. Já a segunda função da Fc consiste na interação com o receptor neonato (FcRn), expresso em uma grande variedade de células. Essa interação

controla a meia-vida das imunoglobulinas (JANEWAY et al., 2007; PRESTA, 2008, MUYLDERMANS, 2013).

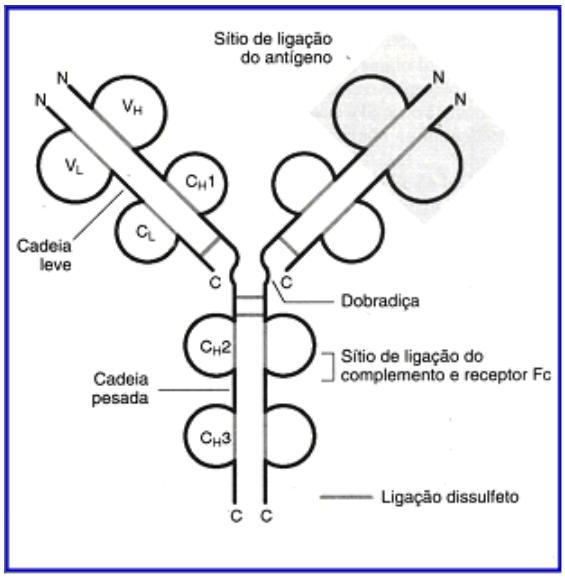

Figura 5- Representação esquemática de uma molécula de IgG. São enfocados aqui os domínios variáveis pesado (VH) e leve (VL), os domínios constantes (CL, CH1, CH2 e CH3) e os fragmentos FV (fragmentos variáveis), Fab (ligação ao antígeno) e Fc (porção cristalizável). (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A variabilidade dos anticorpos é codificada no fragmento variável ou região Fv, constituído por dois domínios variáveis da proteína das cadeias pesada e leve, respectivamente (ABHINANDAN; MARTIN, 2010). Porém, a variabilidade dos domínios VH e VL não se distribui igualmente por toda a região V, mas se concentra em determinados segmentos. Esses segmentos são designados regiões hipervariáveis ou CDRs (regiões determinantes de complementaridade). Existem três CDRs para cada cadeia pesada e leve, denominadas CDR1, CDR2 e CDR3. As porções localizadas entre as regiões hipervariáveis, o que abrange o restante do domínio V, apresentam uma menor variabilidade e são denominadas regiões estruturais. Há quatro dessas regiões em cada domínio V, chamadas FR1, FR2, FR3 e FR4 (JANEWAY et al., 2007).

As regiões estruturais compõem as folhas β, que proporcionam suporte básico ao domínio; as três sequências hipervariáveis correspondem a três alças ("*LOOPS*") nas bordas do cilindro β, as quais estão justapostas nos domínios dobrados (JANEWAY et al., 2007). Modelos tridimensionais explicam como a variabilidade encontrada na região aminoterminal da imunoglobulina coexiste com uma estrutura bastante conservada. O domínio variável exibe uma estrutura

estendida alternada com alças. Seis dessas alças (três em cada cadeia) projetam-se para o solvente nos pontos de contato com o antígeno. Tais alças localizam-se juntamente com as CDRs, onde está concentrada a diversidade entre as moléculas de imunoglobulinas. É nessa área que se encontra o paratopo, região complementar ao determinante antigênico (epítopo), responsável pela formação do complexo antígeno-anticorpo (Figura 6) (MARANHÃO, BRÍGIDO, 2001).

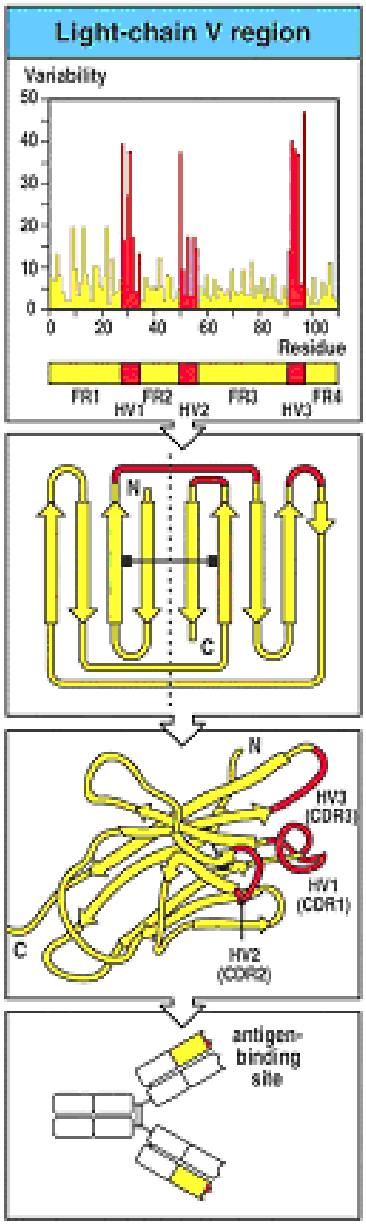

Figura 6- As regiões hipervariáveis posicionam-se em alças separadas da estrutura dobrada. Quando as regiões hipervariáveis estão posicionadas na estrutura de um domínio V, pode-se observar que elas estão em alças que se aproximam na estrutura dobrada. Na molécula do anticorpo, o paremento das cadeias pesadas e leves aproxima as alças hipervariáveis da cada cadeia, criando uma única superfície hipervariável, que forma o sítio de ligação com o antígeno na extremidade de cada braço (JANEWAY et al, 2007).

Os anticorpos IgG apresentam uma característica bivalente, ou seja, possuem a capacidade de ligar-se a dois antígenos ao mesmo tempo, o que aumenta a sua afinidade funcional e concede elevados tempos de retenção (também chamada “avidez”) em diversos receptores da superfície celular e antígenos polivalentes (HOLLIGER; HUDSON, 2005).

5. Manipulação de fragmentos de anticorpos

Os anticorpos intactos (IgG, IgM, IgA, IgE) são altamente específicos e proporcionam ao nosso organismo defesa fundamental contra patógenos e toxinas (KRACKER, 2011).

O principal anticorpo do soro é a IgG, e a sua forma intacta é, quase exclusivamente, empregada em anticorpos terapêuticos. É uma proteína multidomínio em forma de “Y”, com sítios de ligação aos antígenos localizados nas duas pontas Fab e um sítio de recrutamento de funções efetoras mediado pelo domínio Fc. As moléculas de imunoglobulinas intactas têm uma vasta gama de aplicações; porém, existem várias limitações práticas: IgG apresenta transporte extravascular fraco e seu tamanho grande (aproximadamente 150 kDa) leva à lenta depuração no sangue (MOLNÁR et al., 2003). Muitas vezes, também, os efeitos mediados por Fc não são necessários e até mesmo indesejáveis; por exemplo, uma longa meia-vida no soro ou uma inapropriada ativação do receptor Fc, que podem levar à liberação maciça de citocinas pelo recrutamento de células efetoras do sistema imune e associados a efeitos tóxicos (HOLLIGER; HUDSON, 2005). Outro problema vinculado ao uso dos anticorpos intactos é a administração de grandes doses, que são frequentemente necessárias para fins terapêuticos. Essas necessidades têm impulsionado o desenvolvimento de uma variedade de sistemas para a produção dessas moléculas de maneira eficiente e econômica (ANDERSEN; REILLY, 2004).

Atualmente, o procedimento mais comum para minimizar a persistência dos anticorpos na circulação é a redução do seu tamanho pela exclusão de domínios (KENANOVA et al., 2005). Para remover o domínio Fc (e efeitos associados), IgGs podem ser dissecadas em seus domínios constituintes, inicialmente por intermédio de proteólise (com enzimas como a papaína e a pepsina). O tratamento proteolítico com papaína cliva a molécula de imunoglobulina em três fragmentos de tamanhos

aproximadamente iguais. Dois fragmentos Fab (frações ligadoras de antígeno) são chamados monovalentes, pois cada um possui um local de ligação e são completamente idênticos. A outra fração resultante da clivagem é o fragmento Fc (segmento cristalizável). Quando o anticorpo é quebrado pela pepsina, ocorre a clivagem no lado C-terminal da ponte de enxofre, dando origem a um fragmento bivalente chamado $F(ab')_2$, que se compõe de duas frações Fab unidas pela ligação dissulfídica e vários fragmentos Fc.

Além desses fragmentos, é possível, mediante a técnica do DNA recombinante, a obtenção de qualquer fração monovalente. O formato mais popular, com aproximadamente 30 kDa, denominado scFv (Figura 7), constitui-se de cadeia simples Fv recombinante gerada por meio da ligação de genes que codificam regiões das cadeias pesada e leve variáveis ligadas por um polipeptídio flexível, por exemplo $(Gly_4Ser)_3$ (MOLNÁR et al., 2003).

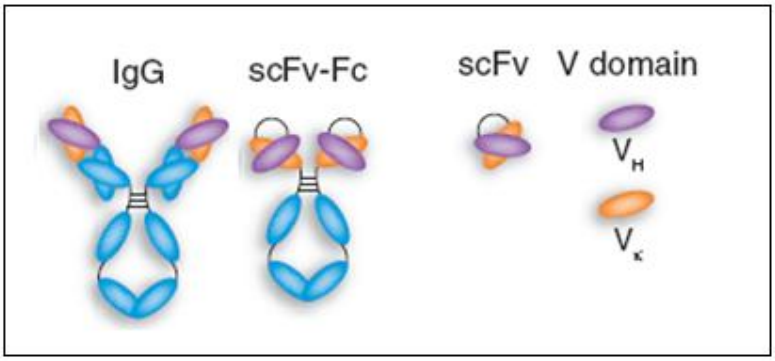

Figura 7. Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante. Adaptada de Holliger e Hudson, 2005.

Os fragmentos de anticorpo Fab e scFv, os quais compreendem os domínios VH e VL, geralmente retêm a especificidade monovalente e a afinidade de ligação ao antígeno do anticorpo a partir do qual foram gerados. Esses fragmentos podem ter algumas aplicações, em que as funções efetoras mediadas por Fc, deletérias ou não, são necessárias (HOLLIGER, HUDSON, 2005).

Os fragmentos menores de anticorpos possuem algumas vantagens em relação ao anticorpo inteiro, como uma menor circulação de meia-vida e uma eficiente biodistribuição, em decorrência de seu tamanho menor, que pode torná-los mais adequados para aplicações como a penetração em tumores e a detecção de

imagens. Outra vantagem é a diminuição da imunogenicidade (EVAN et al., 2006). Muitos desses produtos já estão em fase de testes clínicos e pré-clínicos.

Outro fragmento de anticorpo recombinante é a cadeia única de scFv-Fc, na qual a fração scFv (VL-*linker*-VH) se junta à região Fc intacta (domínios CH2 e CH3) da IgG1 humana via uma região da dobradiça, formando o fragmento FvFc (Figura 7). Essa fração de anticorpo se comporta de forma semelhante à do anticorpo intacto. O segmento de anticorpo FvFc engloba uma região Fc intacta, o que é fundamental para prolongar a meia-vida de anticorpos e de suas seções. Isso também possibilita o recrutamento das funções efetoras do sistema imune via Fc (VAZ DE ANDRADE et al., 2000; KENANOVA et al., 2005).

Os fragmentos de anticorpos têm uma variedade de uso que vai de simples ferramentas para pesquisa e reagentes de diagnóstico a drogas altamente refinadas de interesse biofarmacêutico (HOLLIGER, HUDSON, 2005). Atualmente, a expressão de anticorpos recombinantes e seus fragmentos é de grande relevância biotecnológica. O uso de anticorpos recombinantes vem emergindo como alternativa clínica e aumentando a busca de novas metodologias alternativas para produção em grande escala (VAZ DE ANDRADE et al., 2000). Uma multiplicidade de sistemas de expressão foi desenvolvida para atender a essas necessidades crescentes e diversificadas.

O uso do sistema de expressão de *Escherichia coli* para produção de fragmentos de anticorpos é limitado. O motivo é o fato de que a fermentação bacteriana da *E. coli* produz frações de anticorpos sem função efetora ou com atividade farmacocinética limitada, por não possuírem o maquinário celular necessário para glicosilar proteínas. Embora o custo do processo seja baixo, o nível de expressão alcançado nos sistemas bacterianos pode ser alto (CHAD; CHAMOW, 2001).

Um sistema de expressão que se tem mostrado eficiente para a produção de anticorpos e seus fragmentos é a expressão em leveduras. As leveduras já são utilizadas na síntese de diversas proteínas recombinantes para uso terapêutico, como a insulina, o glucagon, o antígeno de superfície da hepatite B e outros (GERNGROSS, 2004). Esse sistema combina o rápido crescimento e a facilidade de manipulação genética dos procariotos com características típicas de sistemas eucarióticos, como a presença da maquinaria eucariótica de síntese de proteínas (CEREGHINO, CREGG, 2000). Apesar da grande vantagem dos níveis expressos

de proteína, quando comparados com os de células de mamíferos, as leveduras apresentam uma desvantagem: são capazes de glicosilar proteínas, mas de forma diferente da realizada por mamíferos (MISTRY et al., 1996).

Em razão dos problemas enfrentados na fabricação de glicoproteínas em bactérias e leveduras, atualmente o processo de produção de mAbs tem usado células de mamíferos, em decorrência de sua capacidade de promover um correto dobramento e processamento pós-traducional (WURM, 2004).

Durante os últimos dez anos, uma variedade de abordagens tem sido desenvolvida e avaliada para permitir o controle do crescimento da dissociação e da produção de proteínas recombinantes (ANDERSEN; REILLY, 2004). Atualmente as células de mamíferos têm sido amplamente utilizadas para a produção comercial de proteínas terapêuticas, incluindo AcMo. Elas apresentam a capacidade de realizar modificações corretas pós-traducionais, o que torna o sistema mais adequado (DEMAIN, VAISHNAV, 2009).

A produção de AcMo nessas células necessariamente começa com o desenvolvimento de uma linhagem celular apropriada, determinada por meio de seleção para que a linhagem escolhida para a produção de determinada proteína esteja apta para a aplicação biofarmacêutica. As células devem ter as seguintes características: (i) suportar alto nível de expressão do produto durante longos períodos de tempo, mantendo alta e viável a densidade celular, bem como estabilidade genética, (ii) ser escalonável, (iii) ter capacidades adequadas para o processamento pós-translacional e (iv) permitir a caracterização adequada para a segurança humana (ANDERSEN; REILLY, 2004). Além dessas características, não existe nenhuma restrição quanto ao tipo de célula utilizada, e várias linhagens celulares de mamíferos têm sido apontadas no que se refere à obtenção de bons resultados (níveis de expressão da ordem de 10-100 pg/células/dia) (OZTURK; HU, 2006).

Se o objetivo da expressão proteica é a produção em grande escala, as células mais utilizadas atualmente para essa aplicação são as de ovário de hamster chinês (CHO), que assumiram uma importância crescente, tanto em laboratório quanto para produção em larga escala pela indústria farmacêutica. Sua adequação para a produção estável em grande escala está relacionada a suas vantagens de segurança para uso em seres humanos, à semelhança entre a estrutura de glicosilação do seu produto com o AcMo natural humano, à facilidade de

transfecção, à presença de um poderoso gene com sistema de amplificação, à facilidade de adaptação para crescimento em suspensão e em meio isento de soro, e à capacidade de crescer em altas densidades (COSTA et al, 2010).

Outras células normalmente utilizadas para a produção em larga escala são as de mieloma, tais como SP-2/0, 2 YB / 0, NS0 e P3X63.Ag8.653 (BARNES et al, 2000). Similares a células CHO, com capacidade de crescer em altas densidades, em suspensão e em meio isento de soro, e também são facilmente transfectadas. Embora seu uso seja menos frequente, existem pelo menos quatro mAb aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) produzidos por essas células (especificamente linhas de células "Sp2/0-*derived*"): Remicade, ReoPro, Simulect e Erbitux (YANG et al, 2007).

O interesse em outras linhagens de células para a produção de AcMo tem aumentado. Alguns exemplos são: rim embrionário de hamster (BHK), rim embrionário humano (HEK-293) e células da retina derivadas PER-C6 humanos. Foi demonstrado recentemente que essa última linhagem produziu níveis significativos de produtos recombinantes, AcMo inclusive, em condições de estabilidade, sendo facilmente adaptada para diferentes condições de crescimento, não necessitando de amplificação do gene, o que possibilita, assim, a geração rápida de clones (COSTA et al, 2010).

Como demonstrado, uma variedade de linhagens de células pode ser usada para a produção de AcMo, embora nem todas tenham a capacidade de atingir altos níveis de expressão (COSTA et al, 2010).

6. Anticorpos monoclonais e humanização

Os anticorpos produzidos durante uma resposta imune natural ou após imunização são compostos de uma mistura de moléculas com variadas especificidades e afinidades, em virtude do reconhecimento de diferentes epítopos do antígeno. Com frequência, um hospedeiro produz uma grande quantidade de anticorpos que reconhecem independentes epítopos antigênicos. Cada anticorpo específico é produzido por um diferente clone de linfócito B e é chamado de anticorpo monoclonal (AcMo), aqueles gerados por diversos clones de linfócitos B são denominados anticorpos policlonais. Assim, os soros são excelentes fontes destes últimos. Em contraste com preparações policlonais, os anticorpos

monoclonais são homogêneos quanto ao isótipo, à especificidade, à afinidade e ao epítopo. Há, dessa maneira, maior propensão à obtenção de resultados consistentes e reprodutíveis (CASADEVALL, 1995). Ambos os produtos apresentam relevantes aplicações nos diversos campos da pesquisa, bem como na clínica médica.

O desenvolvimento da tecnologia de hibridomas (MILSTEIN, KÖHLER, 1975) para produção de anticorpos monoclonais a partir de um único linfócito B, que é clonado e imortalizado, produzindo sempre os mesmos anticorpos, em resposta a um agente patogênico, revolucionou o uso terapêutico dessas moléculas, pois tornou possível a produção de anticorpos monoespecíficos contra qualquer antígeno (MOUNTAIN, ADAIR, 1992).

Com desenvolvimento da tecnologia para obtenção de hibridomas, o potencial terapêutico de mAbs foi imediatamente reconhecido. Desde então, os anticorpos monoclonais têm sido produzidos, e a sua utilização tornou-se um dos grandes avanços na medicina (WANG, 2011). Várias aplicações para esses anticorpos vêm sendo descritas, como: purificação e/ou detecção de antígenos específicos, estudo das doenças autoimunes, diagnóstico e terapia de tumores e de doenças infecciosas, bem como terapia dos transplantes (STEINMAN et al., 1981; WANG et al., 2007; YANG et al., 2007).

Em 1986, foi aprovado pelo FDA o primeiro anticorpo monoclonal murino para uso terapêutico: a IgG2a anti-CD3, Orthoclone OKT3, droga específica contra a rejeição de transplantes cardíacos e hepáticos (LI et al., 2005). Depois dessa descoberta, centenas de terapias estão passando por testes clínicos, a maioria voltadas para fins oncológicos e imunológicos.

Em vários sistemas, há evidências consideráveis de que a administração de anticorpos monoclonais pode modificar o curso da doença em camundongos infectados com fungos, como *Cryptococcus neoformans* (MUKHERJEE et al., 1993), *Candida albicans* (MORAGUES et al, 2003), *Histoplasma capsulatum* (NOSANCHUK et al., 2003), *Pneumocystis spp.* (WELLS e tal, 2006), *Fonsecaea pedrosoi* (ALVIANO et al, 2004), *Aspergillus spp.* (CHATURVEDI et al, 2005), *Paracoccidioides brasiliensis* (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991; de MATTOS GROSSO, 2003; BUISSA-FILHO et al, 2008) e, mais recentemente, *Sporotrix schenckii* (NASCIMENTO et al, 2008).

Nesses aspectos, a produção de anticorpos monoclonais contra antígenos fúngicos tornou-se uma ferramenta indispensável para estudos que buscam a

caracterização dos antígenos, o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais rápidos e específicos, novas estratégias terapêuticas antifúngicas e a elucidação da resposta imune contra fungos patogênicos. Há, contudo, algumas limitações associadas ao uso de anticorpos monoclonais murinos na terapia, como meia-vida curta no soro e recrutamento imune fraco. Também se observou a perda de eficácia e de função após pequenas mudanças no epítopo, principalmente em vírus altamente mutagênicos, muitas vezes levando à resistência aos medicamentos e à necessidade de maiores e repetidas doses, particularmente em doenças crônicas, com aumento do risco de efeitos colaterais (ELBAKRI et al, 2010).

Outra importante limitação no uso de AcMo é o desenvolvimento de uma resposta antiglobulina ou resposta de anticorpos humanos antirrato denominada HAMA, que restringe a administração de anticorpos murinos (PRESTA, 2006). A resposta HAMA pode resultar em uma remoção (*clearance*) rápida do anticorpo do soro, bloqueando sua eficácia terapêutica, além de causar reações de hipersensibilidade que levam, em casos mais severos, ao choque anafilático (WINTER; HARRIS, 1993).

Em meados da década de 1980, vários caminhos foram explorados a fim de melhorar as características dos AcMo para uso terapêutico, baseadas em parte na hipótese de que, reduzindo ou eliminando o grau de sequências derivadas de camundongos, haveria a redução da imunogenicidade dos AcMo produzidos até então (NELSON et al, 2010). Atualmente, com o desenvolvimento das técnicas para manipulação de fragmentos de anticorpos mediante engenharia genética, é possível minimizar alguns dos problemas descritos acima (WINTER; MILSTEIN, 1991). Uma das estratégias usadas para reduzir a imunogenicidade de anticorpos é a chamada quimerização (MORRISON et al, 1984). Anticorpos quiméricos possuem a região variável (FV) inteira de camundongo ligada às regiões constantes humanas (Figura 8). Não obstante mAbs quiméricos apresentem menor imunogenicidade do que um anticorpo totalmente murino, essas construções continuam a exigir uma reposta imune contra porção variável murina (PRESTA, 2006; BENJAMIN et al, 1986; BRÜGGEMAN, 1989).

Uma alternativa que visa à redução da imunogenicidade é a humanização de anticorpos. De acordo com tal abordagem, são feitas alterações nas porções variáveis dos anticorpos, com o objetivo de torná-las semelhantes às partes variáveis de anticorpos humanos. A humanização pode ser feita por meio do

transplante de CDRs (regiões hipervariáveis da VH e VL) murinos para arcabouços humanos (Figura 8) ou pelo processo de *ressurfacing* (JONES et al., 1986; CO; QUEEN, 1991). Até 2010 dois terços dos 24 AcMo no mercado dos Estados Unidos ou eram quiméricos, ou eram produtos humanizados (NELSON et al, 2010).

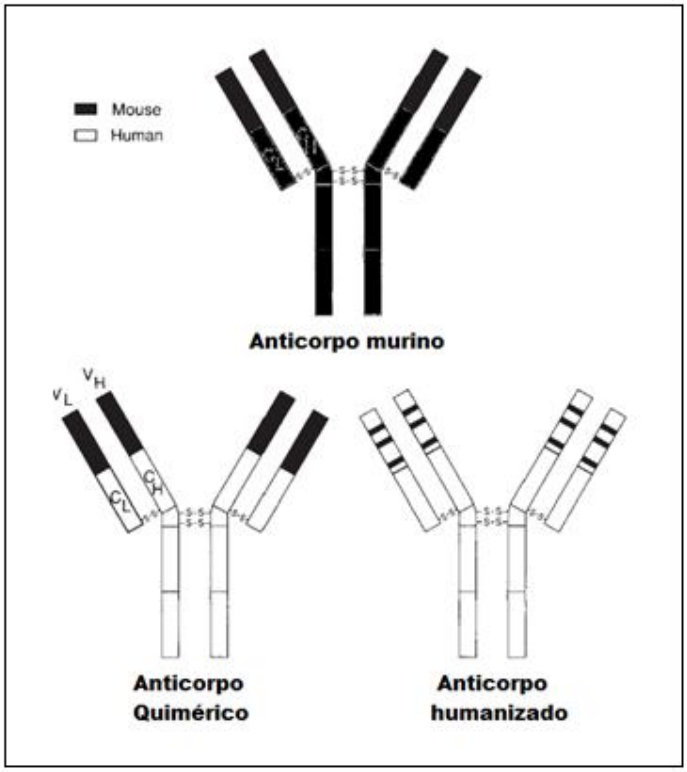

Figura 8- Representação esquemática de anticorpos quiméricos e humanizados. Anticorpos quiméricos mantêm os domínios V inteiros do anticorpo murino e as porções constantes humanas, enquanto o anticorpo humanizado conserva apenas as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo murino em um arcabouço humano. Adaptado de Co; Queen, 1991.

Os anticorpos monoclonais totalmente humanos são uma crescente e promissora categoria de agentes terapêuticos-alvo. Os primeiros desses agentes foram desenvolvidos durante a década de 1980, mas nenhum alcançou o sucesso clínico ou comercial (JAMES; BELL, 1987, NELSON et al, 2010).

Avanços na tecnologia de produção das moléculas para o estudo, em particular com o emprego de camundongos transgênicos e leveduras, ou de apresentação de fagos, renovaram o interesse no desenvolvimento de AcMo humanos. Em 2002, o adalimumab se tornou o primeiro AcMo humano a ser aprovado pelo FDA. Desde então, mais seis AcMo humanos receberam a aprovação

da mencionada organização internacional: panitumumab, golimumab, canakinumab, ustekinumab, ofatumumab e denosumab (NELSON et al, 2010).

Embora as tecnologias desenvolvidas na década de 1970 e no início dos anos 1980, com a finalidade de produzir AcMo, poucos AcMo humanos encontraram desenvolvimento clínico em razão dos diversos desafios de produção. Anticorpos murinos são mais facilmente produzidos, mas estão limitados por questões de segurança e de eficácia reduzida, devido à imunogenicidade das sequências de proteínas derivadas de camundongos. Dados demonstram um aumento substancial no estudo clínico de AcMo humanos na década de 2000 e uma tendência para o uso reduzido da humanização e de candidatos quiméricos, além de uma redução dramática no número de AcMo murinos em desenvolvimento clínico (Gráfico 1) (NELSON et al, 2010).

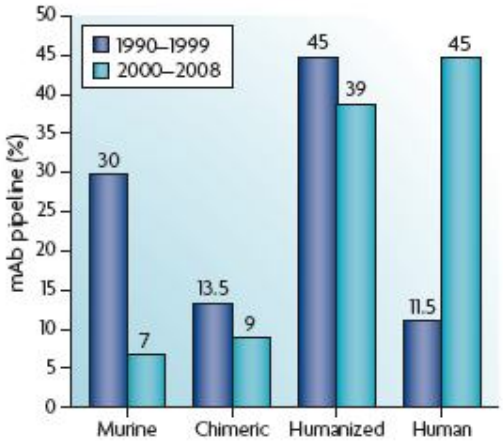

Gráfico 1. Percentual de quatro tipos de mAbs em desenvolvimento clínico durante 1990-1999 e 2000-2008. Os anticorpos monoclonais (mAbs) que entraram em estudo clínico patrocinado por firmas comerciais, entre 1990 e 1999 e entre 2000 e 2008, foram classificados de acordo com a sua fonte de sequência: apenas murina, quiméricos (regiões variáveis murinas), humanizado e apenas humano. Nelson et al, 2010.

Atualmente os anticorpos monoclonais compreendem a maioria dos candidatos proteicos em desenvolvimento clínico, em virtude de sua versatilidade, como agentes terapêuticos. Embora tradicionalmente associados à indústria de biotecnologia, AcMo terapêuticos já estão sendo desenvolvidos e comercializados pela maioria das grandes empresas farmacêuticas (REICHERT, 2008).

O sucesso de proteínas recombinantes, por meio das terapêuticas de anticorpos monoclonais, representa a segunda onda de inovação criada pela indústria de biotecnologia durante os últimos 20 anos. Desde 2000, o mercado para

os anticorpos monoclonais terapêuticos vem crescendo exponencialmente. Entre 2001 e 2002, o mercado de anticorpos monoclonais terapêuticos cresceu 37% nos EUA, chegando ao patamar de US$ 5,4 bilhões. Até 2004, haviam sido aprovados pela FDA-EUA 17 AcMo terapêuticos, os quais incluem quatro tipos diferentes de anticorpos: três murinos, cinco quiméricos, oito humanizados e um humano (REICHERT; PAVLOU, 2004). Já em 2009 as vendas globais envolvendo AcMo chegaram a US$93 bilhões. Cerca de 30% da pesquisa e desenvolvimento da indústria farmacêutica/biotecnologia é composta de biológicos e 1/3 destes são AcMo (McCAMISH, WOOLLETT, 2011).

Em 2006, 80% das receitas emitidas foram de anticorpos monoclonais. Em 2007, oito dos 20 medicamentos mais vendidos em biotecnologia nos EUA foram AcMo terapêuticos (SCOLNIK, 2009). Recentemente, anticorpos biespecíficos, uma nova classe de anticorpos terapêuticos, têm demonstrado resultados promissores em ensaios clínicos. Em abril de 2009, o ocatumaxomab (um anticorpo biespecífico) foi aprovado na União Europeia (KELLEY, 2009).

As transições de anticorpos terapêuticos para o desenvolvimento clínico de fase final, revisão regulatória e de mercado estão em ritmo acelerado em 2013. Desde o final de 2012, dois AcMo terapêuticos (itolizumab e emtansine trastuzumab) receberam suas primeiras aprovações. Estratégias de marketing para três mAbs (vedolizumab, ramucirumab e obinutuzumab) foram submetidas às agências reguladoras, e cinco AcMo (brodalumab, MABp1, moxetumomab pasudotox, tildrakizumab e rilotumumab) entraram na fase de estudo 3. Atualmente existem 30 anticorpos terapêuticos submetidos à avaliação em estudos de fase final (REICHERT, 2013).

Tendo em vista o sucesso do uso de proteínas recombinantes, por meio das terapêuticas de anticorpos monoclonais em diversas doenças, e os resultados desenvolvidos em nosso laboratório, onde a administração do AcMo P6E7 em camundongos foi capaz de modificar o curso da infecção por *S. schenckii,* apresentando atividade profilática e terapêutica na esporotricose experimental, pretendemos humanizar o anticorpo monoclonal contra a fração de 70 kDa, visando a sua utilização no tratamento da esporotricose humana.

Tabela 3: Anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA até fevereiro de 2013

International non-proprietary name	Trade name	Type	Indication first approved	First EU (US) approval year
Muromonab-CD3	Orthoclone Okt3	Anti-CD3; Murine IgG2a	Reversal of kidney transplant rejection	1986* (1986#)
Abciximab	Reopro	Anti-GPIIb/IIIa; Chimeric IgG1 Fab	Prevention of blood clots in angioplasty	1995* (1994)
Rituximab	MabThera, Rituxan	Anti-CD20; Chimeric IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma	1998 (1997)
Basiliximab	Simulect	Anti-IL2R; Chimeric IgG1	Prevention of kidney transplant rejection	1998 (1998)
Daclizumab	Zenapax	Anti-IL2R; Humanized IgG1	Prevention of kidney transplant rejection	1999 (1997); #
Palivizumab	Synagis	Anti-RSV; Humanized IgG1	Prevention of respiratory syncytial virus infection	1999 (1998)
Infliximab	Remicade	Anti-TNF; Chimeric IgG1	Crohn disease	1999 (1998)
Trastuzumab	Herceptin	Anti-HER2; Humanized IgG1	Breast cancer	2000 (1998)
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Anti-CD33; Humanized IgG4	Acute myeloid leukemia	NA (2000#)
Alemtuzumab	MabCampath, Campath-1H	Anti-CD52; Humanized IgG1	Chronic myeloid leukemia	2001 (2001)
Adalimumab	Humira	Anti-TNF; Human IgG1	Rheumatoid arthritis	2003 (2002)
Tositumomab-I131	Bexxar	Anti-CD20; Murine IgG2a	Non-Hodgkin lymphoma	NA (2003)
Efalizumab	Raptiva	Anti-CD11a; Humanized IgG1	Psoriasis	2004 (2003); #
Cetuximab	Erbitux	Anti-EGFR; Chimeric IgG1	Colorectal cancer	2004 (2004)
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	Anti-CD20; Murine IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma	2004 (2002)
Omalizumab	Xolair	Anti-IgE; Humanized IgG1	Asthma	2005 (2003)
Bevacizumab	Avastin	Anti-VEGF; Humanized IgG1	Colorectal cancer	2005 (2004)
Natalizumab	Tysabri	Anti-a4 integrin; Humanized IgG4	Multiple sclerosis	2006 (2004)
Ranibizumab	Lucentis	Anti-VEGF; Humanized IgG1 Fab	Macular degeneration	2007 (2006)
Panitumumab	Vectibix	Anti-EGFR; Human IgG2	Colorectal cancer	2007 (2006)
Eculizumab	Soliris	Anti-C5; Humanized IgG2/4	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	2007 (2007)
Certolizumab pegol	Cimzia	Anti-TNF; Humanized Fab, pegylated	Crohn disease	2009 (2008)
Golimumab	Simponi	Anti-TNF; Human IgG1	Rheumatoid and psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis	2009 (2009)
Canakinumab	Ilaris	Anti-IL1b; Human IgG1	Muckle-Wells syndrome	2009 (2009)
Catumaxomab	Removab	Anti-EPCAM/CD3;Rat/mouse bispecific mAb	Malignant ascites	2009 (NA)
Ustekinumab	Stelara	Anti-IL12/23; Human IgG1	Psoriasis	2009 (2009)
Tocilizumab	RoActemra, Actemra	Anti-IL6R; Humanized IgG1	Rheumatoid arthritis	2009 (2010)
Ofatumumab	Arzerra	Anti-CD20; Human IgG1	Chronic lymphocytic leukemia	2010 (2009)
Denosumab	Prolia	Anti-RANK-L; Human IgG2	Bone Loss	2010 (2010)
Belimumab	Benlysta	Anti-BLyS; Human IgG1	Systemic lupus erythematosus	2011 (2011)
Ipilimumab	Yervoy	Anti-CTLA-4; Human IgG1	Metastatic melanoma	2011 (2011)
Brentuximab vedotin	Adcetris	Anti-CD30; Chimeric IgG1; immunoconjugate	Hodgkin lymphoma	2012 (2011)
Pertuzumab	Perjeta	Anti-HER2; humanized IgG1	Breast Cancer	2013 (2012)
Raxibacumab	(Pending)	Anti-*B. anthrasis* PA; Human IgG1	Anthrax infection	NA (2012)
Trastuzumab emtansine	Kadcyla	Anti-HER2; humanized IgG1; immunoconjugate	Breast cancer	In review (2013)
Vedolizumab	(Pending)	Anti-alpha4beta7 integrin; humanized IgG1	Ulcerative colitis, Crohn disease	In review (NA)

Fonte: <http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php>

*Aprovação específica do País. #Voluntariamente retirado do mercado

OBJETIVOS

Geral

Este trabalho tem como objetivo geral a construção, expressão e caracterização de versões humanizadas do anticorpo monoclonal anti-proteína de 70 kDa de *Sporotrix schenckii* (P6E7).

Específicos

- Obtenção, purificação e caracterização dos cDNAs que codificam para as cadeias variáveis leve e pesada do anticorpo AcMo murino anti-gp70**.**
- Proposição e síntese dos genes que codificam para as versões humanizadas da VH e VL do anticorpo AcMo anti-gp70.
- Clonagem das cadeias leve (VL) e pesada (VH), fusionadas por meio de um peptídeo conector e contendo os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana em vetor de expressão na forma de FvFc.
- Clonagem e expressão do FvFc humanizado e quimérico em células CHO.
- Produção e purificação das proteínas recombinantes a partir do sobrenadante de transfectomas estáveis e transientes.
- Caracterização imunológica das proteínas recombinantes quanto ao potencial de ligação e opsonização.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Células

1.1. Hibridoma

O hibridoma utilizado para a realização deste trabalho foi o hibridoma secretor de anticorpo monoclonal contra a fração de 70 kDa, denominado AcMo P6E7 (NASCIMENTO et al, 2008).

1.2. Linhagem bacteriana

- DH5α- supE44**,** ∆lacU169, (Ø80lacZ∆M15), **hsdR**17, **rec**A1, **end**A1**, gyr**A96, **thi**-1**, rel**A1 (HANAHAN, 1983). Tal linhagem foi utilizada para amplificação de plasmídeos.

1.3. Células mononucleares do sangue periférico de voluntários

Foram coletados, uma única vez, 60 mL de sangue de voluntários mediante o emprego de material novo, estéril e descartável.

Foram incluídos na pesquisa cinco indivíduos saudáveis de ambos os gêneros, com idades entre 25 e 35 anos. Foram excluídos os indivíduos que apresentaram doenças crônicas (diabetes, hipertensão, SIDA e hepatite B) ou que fizessem uso de glicocorticoides. Também se excluíram gestantes e, deficientes mentais.

Os participantes da pesquisa foram recrutados no departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e adotaram-se cuidados especiais para evitar que indivíduos subordinados ou diretamente ligados ao pesquisador se sentissem obrigados a participar do estudo.

1.4. Fungo

Foi utilizado o isolado M-64 de *S. schenckii*, obtido de material clínico de paciente com esporotricose linfocutânea.

Esse material isolado é mantido na micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, na fase filamentosa, em Ágar Sabouraund, à temperatura ambiente (em torno de 25 ºC). O citado MC-64 foi revertido para fase leveduriforme, em ágar BHI, a 37 ºC, e assim mantido por meio de repiques a cada 15 dias.

2. Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados para este trabalho foram:

-pGEM-T Easy (Promega, catálogo A1360) - 3,199 Kb, derivado do pGEM 5Z f(+) (Promega); promotores T7 e SP6 RNA polimerase flanqueiam uma região de clonagem múltipla na região de codificação para o peptideo-α- β- galactosidase. A inativação de inserção da α-peptideo permite clones recombinantes que podem ser diretamente identificados pela triagem da cor em placas indicadoras. O sítio múltiplo de clonagem é flanqueado por locais de enzimas de restrição para BstZI, NotI e EcoRI, permitindo três opções para remover a inserção de uma única análise. Possui origem f1 de replicação, que permite a preparação de DNA de fita simples para clonagem de produtos de PCR;

- pIg16 Z22 - esse vetor de 4,1 kb possui o gene que codifica o fragmento de anticorpo na forma scFv Z22, fusionado ao domínio B da proteína A de *Staphylococcus aureus*. Sob controle do promotor do gene 10 do fago T7, ori ColE1, ApR, derivado do pGEMEX-1 (Promega®) por Brigido et al, 1993. (www.unb.br/ib/cel/imol). Tal vetor de expressão possibilita a produção de proteínas recombinantes em cassete de expressão monocistrônico e com dobramento tridimensional correto. Também possui gene da β-lactamase, que confere resistência à ampicilina;

- pMIRES 6,2 kb, Amp^R, ori ColE1, múltiplos sítios de clonagem, promotor pCMV, peptídeo sinal de imunoglobulina, sítio de entrada ribossomal interno (IRES), NEO, sinal de poliadenilação SV40polyA, origem de replicação ORI e gene da β-lactamase (bla). Utilizado para clonagem dos FvFcs recombinantes e expressão em células de mamíferos.

3. Oligonucleotídeos sintéticos específicos

A síntese dos oligos utilizados foi feita segundo Coloma et al. (1991), que elaboraram um conjunto de oligos universais com base em sequências conservadas de anticorpos murinos (Tabela 3 e Tabela 4).

Nome	Sequência	Utilização
γ 1	5'TGGACAGGGATCCAGAGTTCCAGGTCACT3'	Para síntese de cDNA e amplificação da VH murina a partir da extremidade 3'.
K18	5'TACAGTTGGTGCAGCATC3'	Para síntese de cDNA e amplificação da V_L murina a partir da extremidade 3' .
Xma I VH	5'CCCGGGTGAAGCTGGTGGGTCTG3'	Com a finalidade de criação de sítio, na extremidade 5' VH, para enzima de restrição Xma I.
Xba I VH	5'TCTAGAGGAGACTGTGAGAGTG 3'	Com o objetivo de criação de sítio, na extremidade 3' VH, para enzima de restrição Xba I.
***Primer* T7**	5'TAATACGACTCATATAGGG3'	Para sequenciamento da extremidade 5' dos FVs recombinantes
***Primer* SP6**	5'GATTTAGGTGACACTATAG3'	Para sequenciamento da extremidade 3' dos FVs recombinantes

Tabela 3 – Oligonucleotídeos sintéticos utilizados em diferentes etapas do trabalho.

	Sequência
VH	
307	5'ATG(GA)A(GC)TT(GC)(TG)GG(TC)T(AC)A(AG)CT(GT)G(GA)TT3'
308	5'ATG(GA)AATG(GC)A(GC)CTGGGT(CT)(TA)T(TC)CTCT3'
309	5'GATGTGAAGCTTCAGGAGTC3'
310	5'CAGGTGCAGCTGAAGGAGTC3'

311	5’CAGGTGCAGCTGAAGCAGTC3’
312	5’CAGGTTACTCTGAAAGAGTC3’
319	5’GAGGTCCAGCTGCAACAATCT3’
320	5’GAGGTCCAGCTGCAGCAGTC3’
321	5’CAGGTCCAACTGCAGCAGCCT3’
322	5’GAGGTGAAGCTGGTGGAGTC3’
324	5’GATGTGAACTTGGAAGTGTC3’
VL	
353	5’GACATTGTGATGACCCAGTCT3’
362	5’GATGTTTTGATGACCCAAACT3’
364	5’GATATTGTGATAACCCAG3’
365	5’GACATTGTGCTGACCCAATCT3’
390	5’GATATTGTGCTAACTCAGTCT3’
391	5’GATATCCAGATGACACAGACT3’
392	5’GACATCCAGCTGACTCAGTCT3’
393	5’CAAATTGTTCTCACCCAGTCT3’
394	5’CAGGCTGTTGTGACTCAGGAA3’

Tabela 4- Biblioteca de oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de RT-PCR. Esses oligonucleotídeos foram utilizados para amplificação dos cDNAs codificadores para VH e VL murinas a partir da extremidade 5’.

4. Soluções e meio de cultura

4.1. Meios de cultura e soluções

Ágar Sabouraud

Ágar Sabouraud a 4% de glicose (MERCK) 65g

Água destilada q.s.p 100mL

Ágar BHI

Ágar infusão cérebro coração 47 g

Água destilada q. s. p 1000 mL

Caldo BHI

Meio infusão cérebro coração 46g

Água destilada q. s. p 1.000 mL

Meio “yeast nitrogen – casamino Accids glucose” (YCG)

Yeast nitrogen base 6,7 g

Ácido casamino 2,5 g

Dextrose 50 g

Mistura vitamínica 1 mL

Água destilada q. s.p 1.000 mL

Mistura Vitamínica

Tiamina dicloreto 50 mg

Riboflavina 50 mg

Piridoxina hidroclorida 10 mg

Ácido p-aminobenzoico 10 mg

Inositol 10 mg

Água destilada q. s. p 100 mL

Meio LB

Peptona de caseína 1,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 1,0% (p/v)

pH 7,0

Meio LB ágar

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

Meio SB

Peptona de caseína 3,0% (p/v)

Extrato de levedura 2,0% (p/v)

MOPS 1,0% (p/v)

pH 7,0

Meio SOB

Bactotriptona 2,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 0,06% (p/v)

KCl 0,002% (p/v)

pH 7,0

Meio SOC

Meio SOB 98 mL

Solução estoque de Mg^{2+} 2 M 1 mL

Solução estoque de glicose 2 M 1 mL

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C, por 15 minutos.

4.2. Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos

Meio Ham-F12 com L-glutamina a 2 mM

Meio Base 1 pacote (Invitrogen®, catálogo: 21700-075)

$NaHCO_3$ 1,176 g

dH_2O q.s.p 1 L

pH 7,4 42

Meio RPMI 1640 Medium

Meio Base 1 pacote (Sigma®, catálogo:1001172426)

$NaHCO_3$ 2 g

Piruvato de sódio 100 mM 10 mL

β-meracpto etanol 7 µL

Tampão hepes 5,96 g

Gentamicina 40 mg/mL 1 mL

H_2O Miliq q.s.p 1 L

pH 7,4

Azul de Tripan

Corante Azul de Tripan 400 mg

PBS q.s.p 100 mL

pH 7,2

Meio de congelamento de células

Soro Fetal Bovino 90% (v/v)

DMSO 10% (v/v)

4.3. Soluções e tampões de uso geral

Mix de precipitação

Etanol 100% gelado 28,6 µL

NaOAc 3M pH 5,2 1,5 µL

Glicogênio 1,5 µL

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Glicerol – Solução estoque

Glicerol 50% (v/v)

Tampão PBS 10X

NaCl 1,5 M

Na_2HPO_4 0,1 M

NaN_3 0,02% (p/v)

pH 7,4

Tampão PBS-T 1X,

PBS 1X

Tween 20 0,1% (v/v)

pH 7,4

Tampão Beads

PBS 1X

Soro Fetal Bovino 0,5% (v/v)

EDTA 2mM

4.4. Soluções para preparo de células competentes e transformação bactériana

Solução de $CaCl_2$ 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4ºC

Solução de $CaCl_2$ + 10% de Glicerol (v/v**)**

$CaCl_2$ 50 mM

Glicerol 10%

Esterilizada por filtração e estocada a 4ºC

Glicerol 50% (v/v**)**

Esterilizado por filtração e estocada a 4ºC

4.5. Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base 0,89 M

Ácido Bórico 0,89 M

EDTA 0,02 M

dH_2O q.s.p. 1 L

pH 8,0

Tampão de corrida TAE 50X

Tampão Tris-Acetato 2 M

Trizma-base 242 g

Ácido Acético Glacial 57,10 mL

EDTA 0,05 M pH 8,0

dH_2O q.s.p. 1 L

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

Tampão de corrida TEB 20X 50% (v/v)

Glicerol 50% (v/v)

Azul de Bromofenol 0,1% (p/v)

Xileno Cianol 0,1% (p/v)

Solução de brometo de etídeo 20.000X

Brometo de etídeo 10 mg/mL

Tampão de corrida para SDS-PAGE 5X

Trizma base 125 M

Glicina 125 mM

SDS 0,5% (p/v)

Tampão de amostra 5X para SDS-PAGE

Tris-HCl pH 6,8 250 mM

SDS 10% (p/v)

Glicerol 50% (v/v)

ß-mercaptoetanol 10% (v/v)

Azul de bromofenol 0,5% (p/v)

Acrilamida 30% (29:1)

Acrilamida 145 g

Bis-acrilamida 5 g

dH_2O q.s.p. 500 mL

Estocar a 4ºC, ao abrigo da luz.

Tris-HCl 1,5 M,

Tris 36,34 g

dH_2O q.s.p. 200 mL

pH 8,8

Tris-HCl 0,5M

Tris 12,11 g

dH_2O q.s.p. 200 mL

pH 6,8

SDS 10%

SDS 10 g

dH_2O q.s.p. 100 mL

Gel Concentrador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida 4% (p/v)

Tris-HCl pH 6,8 125 mM

SDS 0,1% (p/v)

APS 0,1% (p/v)

TEMED 0,01% (p/v)

Gel Separador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1) 10% (p/v)

Tris-HCl pH 8,8 400 mM

SDS 0,1% (p/v)

APS 0,1% (p/v)

TEMED 0,01% (p/v)

Solução de Bloqueio

Leite em pó desnatado 5% (p/v)

Dissolvido em PBS-T 1X

4.6. Soluções para cromatografia de afinidade

Tampão de ligação HiTrap Protein A

Fosfato de Sódio 20 mM pH 7,0

Tampão de Eluição HiTrap Protein A

Ácido Cítrico 0,1 M pH 3,5

Tampão de Limpeza HiTrap Protein A

Ácido Cítrico 0,1 M pH 2,0

Todas as soluções utilizadas no ensaio de cromatografia de afinidade foram filtradas em membrana com poros de 0,45 µm.

4.7. Solução estoque de Inibidor de Protease

PMSF 0,1 M

Solubilizado em isopropanol e estocado à temperatura ambiente por até 1 ano. É um inibidor de serino e tiol proteases como, por exemplo, tripsina, quimiotripsina, trombina, papaína etc. Adicionar a uma concentração final de 1 mM.

5. Extração de RNA total

O hibridoma murino produtor do AcMo P6E7 foi cultivado a 37°C, 5% de CO_2, até confluência. As células foram homogeneizadas com 1 mL de Reagente TRIzol® (Invitrogen®, catálogo 10296-010) e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio. Após homogeneização, a mistura foi centrifugada por 15 minutos, a 12000 *x g*, a 4°C. A fase aquosa, que contém o RNA, foi separada e precipitada com 0,5 mL de isopropanol. Após homogeneização por 30 segundos, foi feita nova incubação por 10 minutos, à temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 12000 x *g*, durante 10 minutos, a 4°C. O RNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 7500 *x g*, a 4C°, durante 5 minutos. Em seguida, secou-se o precipitado à temperatura ambiente. Finalmente, o RNA foi suspenso em 50 µL de água livre de RNase; o material foi aquecido por 10 minutos, a 65ºC, e quantificado em espectrofotômetro de espectro completo (190 a 840 nm) (NanoDrop 2000 Thermo scientific).

A amostra de RNA foi tratada com DNase, mediante a utilização do kit Deoxyribonuclease I (DNase I), RNase-free (Fermentas®, catálogo EN0521), conforme instruções do fabricante.

6. Síntese de cDNA

Para obtenção de cDNA, em um microtubo foi adicionado 1µg de RNA total, 10 mM de dNTP e 10 pmol dos iniciadores específicos antissenso para cadeia

pesada gama ou cadeia leve kappa (Tabela 3). Foram aquecidos a 65°C, por 5 minutos, e colocados em banho de gelo por 1 minuto. Após a desnaturação, adicionaram-se DTT 10 mM, $MgCl_2$ 25 mM e tampão de enzima transcriptase reversa e incubados por 2 minutos. Acrescentou-se 50 U de enzima SuperScript II (Invitrogen®, catálogo 18064-014) e o material foi incubado novamente, a 42°C, por 50 minutos. Após esse período, a enzima foi inativada por aquecimento, durante 15 minutos, a 70°C, seguida de banho de gelo por mais 5 minutos. As amostras foram armazenadas a -20C°.

7. PCR para amplificação dos genes codificadores das cadeias variáveis leve (VL) e pesada (VH)

As amplificações das sequências codificadoras das cadeias leve e pesada foram realizadas mediante a utilização de bibliotecas de oligonucleotídeos senso (Tabela 4). Os oligonucleotídeos antissenso foram utilizados para a reação de transcrição reversa na concentração final de 1 µM. Além dos oligonucleotídeos, foram acrescentados 1 µL do cDNA, dNTPs 0,2 mM, tampão de enzima, 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen®**,** catálogo 10342-020) e água deionizada, para um volume final de 50 µL. A reação de amplificação foi realizada em termociclador e iniciou-se com a desnaturação das fitas duplas do DNA molde, durante 3 minutos, a 94°C. Para a VH foram usados 30 ciclos de: 1 minuto, a 94°C; 1 minuto, a 55°C; e 1 minuto, a 72°C. A reação terminou após 5 minutos de polimerização a 72°C. Para a VL foram usados 35 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C e 1 minuto a 72°C. A reação completou-se depois de 5 minutos de polimerização a 72°C. E 20% dos produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose.

Os fragmentos de 300 a 400 pares de base correspondentes aos genes de VL e VH, respectivamente, foram purificados diretamente do gel, utilizando-se o kit GFX™ PCR DNA Gel Band Purification (GE Healthcare, catálogo 28-9034-70), segundo as recomendações do fabricante.

8. Análise de DNA em gel de agarose

A agarose foi preparada na concentração de 1%, em tampão TAE 1X. As amostras DNA que continham tampão de amostra foram aplicadas em gel de agarose e submetidas a eletroforese em tampão TAE 1X, como descrito por

Sambrook et al. (1989). Para visualização do DNA, o gel foi corado numa solução na qual havia 0,5 mg/mL de brometo de etídeo, e o gel foi analisado por meio de transluminador, com incidência da luz ultravioleta.

9. Clonagem dos fragmentos VL e VH no vetor pGEM-T

Os produtos da reação de RT-PCR, VL e VH purificados foram clonados no vetor de clonagem de fragmentos de PCR.

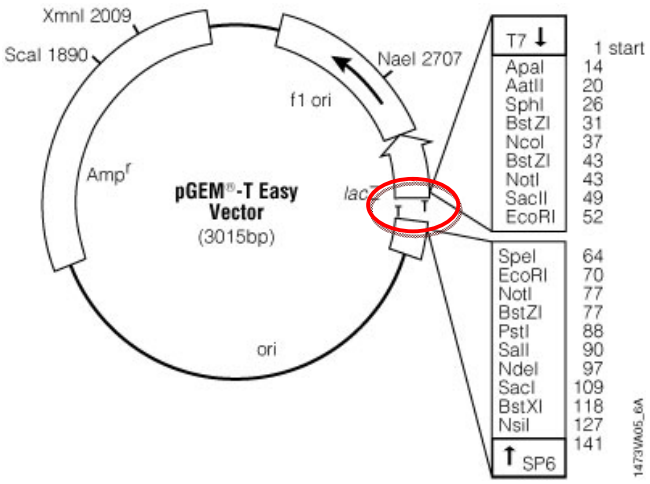

Figura 9- Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy, no qual é apresentado o ponto exato em que nosso inserto entra no vetor (círculo vermelho).

As concentrações de DNA (vetor: inserto) utilizados nos sistemas de ligação apresentavam a razão molar 1:5 e aplicou-se a fórmula:

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{tamanho do inserto em pb}}{\text{Tamanho do vetor em pb}} \times \text{razão } \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} = \text{ng de inserto}$$

A reação foi realizada de acordo com a tabela abaixo, conforme as instruções do fabricante da T4 DNA Ligase (Promega,catálogo M1801) E após incubação de 16 horas, a 4ºC, o produto da ligação foi transformado em células de *E. coli*.

Amostras	353, 362, 365,390, 391, 392 e 393	310 e 322
p-GEM Easy	1 µL	1 µL
Inserto	33ng	33ng
Tampão 2X	5 µL	5 µL
T4 DNA Ligase	1 µL	1 µL
Água	qsq 10 µL	qsq 10 µL

10. Obtenção de células competentes para eletroporação

Foi inoculada uma colônia de *E. coli* em 10 mL de meio SB. As células foram cultivadas durante uma noite, sob agitação de 250 rpm, a 37 ºC. No dia seguinte, 0,5 mL do inóculo foi diluído em 500 mL de meio SB, o qual continha 2,5 mL de solução estoque de Mg 2 M em um frasco de 1 L. Foi incubado de duas a três horas, sob forte agitação (250 rpm), a 37 ºC, até atingir uma densidade óptica a 600 nm (A_{600}) de 0,7 a 0,9. As células foram centrifugadas a 3.000 *x g*, por 20 minutos, a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido.

As células foram ressuspendidas em 25 mL de glicerol 10% (v/v) gelado, mediante o uso de pipetas pré-resfriadas. Em seguida foram adicionados 75 mL de glicerol 10% (v/v) gelado, e a solução foi centrifugada a 3.000 *x g*, durante 20 minutos, a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi realizado mais uma vez.

As células foram então ressupendidas em 2 mL de glicerol 10% (v/v) e foram alicotadas 150 µL por microtubo estéril e congeladas em *freezer* a -80 ºC.

11. Transformação bacteriana por eletroporação

Aproximadamente 100 ng do produto de ligação foi adicionado a 150 µL de bactérias competentes e transferido para uma cubeta previamente resfriada. A eletroporação foi realizada segundo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 µF e 200Ω. O б esperado nessas condições é de 4,0 a 5,0ms.

Imediatamente após a eletroporação, adicionamos 1 mL de meio LB à cubeta. Também realizamos duas lavagens com 1 mL de meio. Os 3 mL foram transferidos para um tubo estéril e a cultura transformada foi incubada por uma hora, sob agitação constante, a 250rpm/37˚C. As bactérias competentes transformadas foram

plaqueadas em meio LB ágar com 100 µg/mL de ampicilina; 0,1 mg/mL de X-gal; 0,5 mM de IPTG e incubadas por 16 horas, a 37°C. As colônias brancas que continham o inserto foram usadas para a obtenção do DNA plasmidial.

12. Obtenção de células competentes com $CaCl_2$

Foram inoculados 500 µL de um pré-inóculo de *Escherichia coli* crescida durante a noite em 500 mL de meio LB. O inóculo foi então incubado a 37ºC, sob agitação, até a cultura atingir uma A_{600} de 0,1 a 0,3 (início da fase exponencial). O material foi então centrifugado a 3.000 x *g*, a 4ºC, durante 15 minutos. O sedimento foi suspenso novamente em 10 mL de solução de $CaCl_2$ a 50 mM gelada, sob uma suave agitação. A partir dessa etapa, a suspensão permaneceu em banho de gelo. Em seguida, foi centrifugada por 15 minutos, a 3.000 x g, a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e ressuspendido lentamente, em 1 mL de solução gelada de $CaCl_2$ a 50 mM. O tubo que comportava as células foi mantido em gelo por 1 hora. Depois disso as células já são consideradas competentes e foram alicotadas 150µL por microtubo estéril e armazenadas em *freezer* a -80ºC.

13. Transformação bacteriana por choque térmico

Foram incubados 500 ng de DNA plasmidial em 200 µL de células competentes, em banho de gelo, por 5 minutos. Em seguida, o sistema de transformação foi incubado a 42ºC, durante 5 minutos. Foi então adicionado 1 mL de meio LB aos tubos submetidos ao choque térmico. Realizou-se uma incubação por uma hora, a 37ºC; depois, semearam-se 100 µL das células transformadas em placas que continham meio LB Ágar. Os 900 µL das células transformadas restantes foram centrifugados a 12.000 *x g*, por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* celular foi ressuspenso com 100 µL de meio LB. Também foram semeados em placas contendo meio LB Ágar, com ampicilina na concentração de 100 µg/mL, X-Gal 40 mg/mL e 0,5 mM de IPTG.

No dia seguinte, observou-se o surgimento de colônias brancas e azuis. Foram selecionadas as colônias brancas para purificação do DNA plasmidial.

14. Purificação de DNA plasmidial por cromatografia de troca iônica

Para preparação plasmidial em larga escala, utilizamos QIAGEN Plasmid Maxi Kit 25 (Qiagen®, catálogo 12163).

O precipitado bacteriano anterior foi ressuspenso em 10 mL de tampão de suspensão gelado. As bactérias foram lisadas com 10 mL de tampão de lise, após incubação de 5 minutos, à temperatura ambiente. O lisado de bactérias foi neutralizado mediante o acréscimo de 10 mL de solução de neutralização. A solução foi homogenizada e incubada durante 20 minutos, em banho de gelo. Após centrifugação durante 1 hora, a 8000 rpm, os *debris* celulares foram precipitados e o DNA permaneceu em solução. O sobrenadante foi cromatografado em coluna de troca iônica QIAGEN, previamente equilibrada com 4 mL de tampão de equilíbrio. A coluna foi lavada três vezes com 10 mL de tampão de lavagem. O DNA plasmidial foi eluído com 5 mL de tampão de eluição e precipitado com 0,7 volume de isopropanol. Após centrifugação durante 1 hora, a 8000 rpm e 4°C, o precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% gelado e novamente centrifugado a 12.000 rpm e 8°C, durante 15 minutos. Depois de seco em Speed Vac, o DNA foi ressuspenso em 200 µL de água deionizada.

Após purificação, a quantificação da amostra foi realizada mediante espectrofotômetro de espectro completo (190 a 840 nm) (NanoDrop 2000 Thermo Scientific), e a confirmação foi feita em gel de agarose. Para visualização do DNA, o gel foi corado em uma solução que continha 0,5 µg/mL de brometo de etídeo e foi analisado por intermédio de transluminador, com incidência de luz ultravioleta. O marcador usado para confirmação do gel foi O'Gene Ruller™ 1Kb DNA *Ladder* (Fermentas, catálogo SM1163).

15. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição

As digestões do pGEM T Easy foram realizadas com enzimas de restrição, conforme instruções dos fabricantes.

16. PCR para sequenciamento de DNA plasmidial

16.1. Hibridização, elongação e terminação do oligonucleotídeo ao DNA dupla fita

A técnica foi desenvolvida por intermédio do emprego do kit Big Dye Terminador (Applied Biosystems®, catálogo 4337455).

Em um microtubo foram adicionados 100 ng de DNA, 3 µL do oligonucleotídeo T7 (3,2 pmoles/µL); em outro tubo, foram adicionados 100 ng de DNA, 3 µL do oligonucleotídeo SP6 (3,2 pmoles/µL). Em ambos os tubos foram

adicionados 3 µL de tampão de sequenciamento 5X, 2µL *Big Dye* e água deionizada, para um volume final de 15 µL. A reação de hibridização**,** elongação e terminação do *primer* ao DNA dupla fita foi realizada em termociclador, com a seguinte programação: por 2 minutos, a 96ºC, seguido de 30 ciclos de 45 segundos, a 96ºC; 30 segundos, a 50ºC; 4 minutos, a 60ºC, e, por fim, 4ºC.

16.2. Precipitação da reação de sequenciamento mediante o uso de glicogênio

Foram acrescidos 25 µL do *mix* de precipitação em 15 µL de reação de sequenciamento, que foi "vortexado" e mantido em gelo por 15 minutos. Posteriormente, o produto da reação foi centrifugado a 4000 rpm, por 20 minutos. O tubo então foi invertido e o sobrenadante, descartado. A seguir, foram dados pulsos de 1000 rpm, com o tubo invertido, e adicionados 50 µL de etanol 70% gelado. Repetiram-se a centrifugação e a drenagem dos tubos. Os tubos foram incubados por 1 minuto, a 95ºC.

Os tubos foram envolvidos com papel alumínio, mantidos a -20ºC e enviados ao Serviço de Sequenciamento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, onde a análise das sequências nucleotídicas e peptídicas preditas dos genes foram determinadas por sequenciamento automático no *ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer* (HITACHI), por meio do emprego do banco de dados Genbank. Obtiveram-se mapas de restrição por intermédio do programa DNA Strider versão 1.2. Também mandamos, ao longo do estudo, algumas amostras para sequenciamento ao Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biologia da USP, onde foi utilizado o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser e as sequências, analisadas pelo *software Sequencing Analyses* 5.3.1, utilizando o Base Caller KB.

17. Amplificação do DNA do gene da VH e da VL

Montou-se um sistema de amplificação de DNA por meio da utilização de um volume final de 50 µL. A quantidade de DNA molde inicial foi de 20 ng. Foram utilizados 30 pmol dos iniciadores específicos desenhados a partir da análise do sequenciamento da cadeia VH ou VL (Tabela 2) e adicionados dNTPs 0,2 mM, tampão de enzima, 1 U da enzima Taq DNA Platinum® (Invitrogen®, catálogo 10966-034) e água deionizada, para completar o volume.

A reação de amplificação aconteceu em termociclador e começou com a desnaturação das fitas duplas do DNA molde, durante 3 minutos, a 95°C. A

amplificação foi executada por 30 ciclos; nos cinco primeiros ciclos, o DNA foi desnaturado a 95ºC, durante 1minuto, anelado na faixa de 52ºC por 1 minuto e elongado a 72°C por um minuto e meio. Nos 25 ciclos restantes, o DNA foi desnaturado a 95ºC, por 1 minuto, anelado a 60ºC e elongado por um minuto e meio. A reação terminou após 5 minutos de polimerização a 72°C.

Os produtos da reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE, aplicando-se 10% da reação, fração que foi submetida a um campo elétrico de 5 V/cm. Após incubação do gel em solução de brometo de etídio, a banda de DNA foi visualizada em transiluminador-UV.

Posteriormente o DNA amplificado foi purificado mediante o emprego do kit GFX™ PCR DNA Gel Band Purification (GE Healthcare, catálogo 28-9034-70), segundo as recomendações do fabricante.

18. Análise e proposição da sequência humanizada

As reações de sequenciamento realizaram-se de acordo com o protocolo para MegaBACE 1000, com a utilização do “DYEnamic ET Dye Terminator Kit” Thermo Sequense ™ II DNA Polimerase (Amersham Biosciences, catálogo US81090). Nessas reações de sequenciamento, foram utilizados os plasmídios pGEM recombinantes.

As sequências obtidas por meio do sequenciamento automático foram analisadas por meio de ferramentas de bioinformática: Phred e CAP3, disponíveis na página www.biomol.unb.br. Depois da análise da qualidade, as sequências foram submetidas à ferramenta de procura de alinhamentos básicos locais (BLAST − do inglês, *Basic Local* 54 *Alignment Search Tool*; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), para análise de identidade com sequências já depositadas no GenBank. Estas últimas também foram manipuladas e comparadas com sequências depositadas em um banco de dados pessoal da professora Andrea Maranhão (UnB), por intermédio do programa BioEdit Sequence Aligment Editor (HALL, 2007). Análises estruturais foram realizadas, a fim de identificar e prever eventuais impedimentos estruturais na proteína recombinante humanizada.

19. Clonagem dos genes dos FvFcs humanizados

Uma vez determinadas as sequências dos domínios variáveis leve e pesado do anticorpo P6E7 murino, partimos para a montagem do fragmento variável desse

anticorpo em forma de cadeia única scFV (VH-linker-VL). Assim mandamos sintetizar um gene com a sequência humanizada do AcMo P6E7 na forma de scFv.

O gene que contém a porção scFv do P6E7 humanizado foi clonado em vetor intemediário pBluescript II SK(-). Para purificação do scFv, o vetor foi digerido mediante o emprego das enzimas Xma I e Xho I. Com isso, obtemos fragmento VH-linker-VL.

A próxima etapa foi fusionar o fragmento gênico do scFvs construído com a sequência dos domínios CH2CH3 de uma IgG1 humana, formando assim o fragmento FvFc. Para tal, foi utilizado o vetor pMIRES.

20. Cultura de células de mamíferos

Durante toda a manutenção da cultura, as células eram observadas em microscópio invertido de contraste de fase NIKON DIAPOH e incubadas em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2 .

21. Congelamento de células CHO

As células aderentes em cultura foram lavadas três vezes com PBS 1X. Após esse procedimento, eram adicionados 5 mL de TrypLe™ select 1X (Invitrogen, catálogo 12605-010), para que as células se soltassem da garrafa de cultura.

A suspensão celular era então transferida para um tubo de centrífuga de 50 mL, ao qual foram adicionados 5 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino Ultra IgG low (Invitrogen®, catálogo: 16250-086), para a inativação da tripsina, que é nociva às células. Estas últimas foram centrifugadas a 130 *x g*, por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, ressuspenso no meio de cultura remanescente do tubo.

As células foram distribuídas em criotubos, em alíquotas de 500 µL, a que se adicionaram 500 µL de meio de congelamento. Os criotubos foram incubados a 4ºC, por 30 minutos; depois, a – 20ºC, por 30 minutos; finalmente, a – 80ºC, durante a noite. As células poderiam permanecer estocadas a essa temperatura ou ser transferidas para a estocagem em nitrogênio líquido.

22. Descongelamento de células CHO.

Transferiram-se os criotubos para um banho a 37ºC, até o total descongelamento das células. As células foram plaqueadas em densidade de 2 x 10^2 células por garrafa de 25cm^2 em meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB.

23. Tripsinização, passagem das células e formação de monocamada celular

Quando as células atingiam a confluência total e cobriam 100% de toda a superfície da placa de cultura, elas deveriam ser repicadas.

O meio de cultura da garrafa era descartado e adicionavam-se 5 mL de tripsina mais EDTA TrypLe^{TM} select 1x na garrafa. Após 3 minutos, as células começavam a se descolar da superfície da garrafa. O descolamento das células foi acompanhado por visualização a olho nu. A tripsina foi neutralizada com cerca de 5 mL de meio acrescido de 10% de SFB. E a suspensão celular foi transferida para tubos cônicos de 50 mL, centrifugados a 130 *x g*, por 8 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento, ressuspenso em 3 mL de meio acrescido de SFB. E toda a população de células foi transferida em garrafas de 75 cm^2 ou 150 cm^2 contendo 10 mL ou 30 mL de meio acrescido de SFB.

24. Estimativa do número de células por contagem em câmara de Neubauer

As células foram tripsinizadas e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura; a câmara de Neubauer foi coberta com a lamínula e foram aplicados 10 µL da supensão de células em cada compartimento da câmara. Caso alguma diluição fosse necessária, o número de células contado era multiplicado pelo fator de diluição. As células eram observadas em microscópio óptico (na objetiva, com aumento de 40 vezes) e contadas as células de quadrante. Em seguida, utilizava-se esta fórmula:

número de células contadas X fator de diluição X 10^4 = nº de células / mL

25. Determinação da viabilidade celular

As células tripsinizadas foram transferidas para um tubo falcon de 15mL, ao qual se adicionaram 5 mL de meio com SFB. As células foram centrifugadas a 130 *x*

g, por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células, ressuspensas em 3mL de meio de cultura remanescente.

Então, 20 µL da suspensão celular foram incubados com 80µL da solução de Azul de Tripan (diluição de 5 vezes da cultura). Montou-se a câmara de Neubauer, e nela se aplicou um volume de 10µL da mistura. Foram contadas 200 células, entre viáveis (transparentes) e não viáveis (azuis). Como as células não viáveis têm a membrana celular mais permeável, o corante penetra nas células, tornando-as azuis. Após a contagem, era estabelecida a porcentagem de células viáveis.

26. Transfecção de células CHO

A transfecção foi realizada por meio do reagente JetPEI ™ (Polyplus Transfection, catálogo CPT 101). Em placa de cultura de 6 poços, semearam-se cerca de 2 x 10^4 células por poço. Foram adicionados, em seguida, 2 mL de meio acrescido de 10 % SFB e solução de antibiótico/antimicótico. As células foram incubadas em estufa a 37ºC, 5% de CO_2, até a obtenção de confluência ideal de 50 a 60%.

Em microtubos de 1,5 mL estéreis, as soluções foram preparadas da seguinte maneira: na solução A, para cada transfecção, 3 µg do vetor em 100 µL de NaCl 150mM. Na solução B, para cada transfecção, 6 µL de JetPEI em 100 µL de NaCl 150mM. As duas soluções foram agitadas rapidamente e centrifugadas. Adicionou-se a solução B à solução A (necessariamente nessa ordem). A mistura foi incubada à temperatura ambiente, por 15 minutos. Então, acrescentaram-se 200 µL da mistura por transfecção – delicadamente, gota a gota, com movimentos em forma de cruz. A placa foi homogeneizada, mexendo-a gentilmente. Após 24 horas, o sobrenadante de cultura foi coletado e verificado quanto à presença de proteínas recombinantes.

27. Seleção de células transfectadas por meio do uso de Geneticina® (G418-Sulfato)

Após 72h da transfecção, o sobrenadante de cultura foi coletado para verificação da expressão de proteínas recombinantes, e o meio foi reposto adicionado de geneticina a uma concentração final de 600 µg/mL, em todos os poços transfectados com o plasmídio, assim como no poço com as células não transfectadas, que foram utilizadas como controle. O meio de cultura, a partir daí, foi

trocado a cada 48h, nas mesmas condições descritas anteriormente, e a análise foi feita em microscópio óptico.

28. Propagação das células transfectadas selecionadas para aumento da expressão.

O meio de cultura de todos os poços foram descartados e acrescentaram-se 500 µL de tripsina a cada poço. Após o descolamento das células da superfície da garrafa, a tripsina foi neutralizada com cerca de 1 mL de meio acrescido de 10% SFB.

A suspensão celular foi transferida para tubos cônicos de 15 mL, centrifugados a 130 *x g*, por oito minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, ressuspenso em 3 mL de meio Ham-F12 acrescido de SFB. Toda a população de células foi transferida para garrafas de 75 cm^2 que continham 10 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB e 600 µg/mL de geneticina. Quando chegaram novamente a uma confluência máxima, as células foram então passadas para garrafas de 150 cm^2 com 30 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% de SFB e 600 µg/mL de geneticina. A partir daí, as células foram mantidas nessas condições, trocando-se o meio a cada 48 h, nas mesmas condições, e o sobrenadante foi coletado para acúmulo de quantidade suficiente para purificação dos anticorpos recombinantes e posterior purificação, visando à realização dos ensaios biológicos.

29. Concentração do sobrenadante das células transfectadas

Para a concentração do sobrenadante de cultura, utilizamos o sistema Amicon *Stirred Ultrafiltration Cell Millipore*® e a membrana de ultrafiltração NMWL: 10.000 (catálogo 13642), a qual permite a passagem de proteínas com tamanho menor que 10 kDa e retém as proteínas com peso molecular superior a esse índice.

Foi adicionado ao sobrenadante PMSF 0,1 mM, para evitar que as proteínas recombinantes presentes degradassem. Acrescentaram-se 50 mL de sobrenadante ao aparato de concentração, que foi submetido a pressão de 4 kgf/cm^2, utilizando nitrogênio gasoso, sob agitação. O sistema foi observado de forma a impedir que todo o sobrenadante passasse e secasse a membrana. Quando restavam somente 10 mL de sobrenadante no sistema, adicionavam-se mais 40 mL de PBS 1X para diálise.

Ao atingir novamente 10 mL, o sobrenadante concentrado era transferido para um tubo cônico de 15 mL e acondicionado a 4 ^{o}C.

30. Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

Para purificação das proteínas recombinantes, utilizamos a coluna HiTrap™ Protein A HP 1mL (GE Lifescience, catálogo. 17-0402-01).

Primeiramente, prepararam-se microtubos de coleta da eluição mediante a adição de 200 µL de Tris-HCl 1M pH9,0 por mL de fração a ser coletada.

As mangueiras da bomba peristáltica foram lavadas com água e preenchidas com tampão de ligação. A coluna cromatográfica foi conectada à mangueira da parte superior da bomba peristáltica e foi lavada com 10 volumes de tampão de ligação, mantendo uma taxa de passagem do tampão pela coluna de 1 mL/min.

O sobrenadante da cultura filtrado foi aplicado na coluna e posteriormente a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de ligação.

Os FvFcs ligados à coluna foram eluidos com 10 volumes de tampão de eluição pH 3,5, coletando-se as amostras nos microtubos de coleta preparados com Tris-HCl.

Por último, foram passados 3 volumes de tampão de eluição a pH 2,0, para retirada das IgGs bovinas ligadas à resina e para a limpeza da coluna. O material também foi coletado.

A coluna era banhada com mais 10 volumes de tampão de ligação. Para finalizar o processo foi aplicado etanol 20%, no qual se estocava novamente a resina a 4ºC.

Imediatamente após o fim da coleta, 5µL de cada amostra eram aplicados em uma membrana de nitrocelulose, para análise por *Dot Blotting*, seguindo o protocolo do item 33. As amostras nas quais se detectavam proteínas eram passadas em filtros de 45 µm e quantificadas por BCA, item 34.

31. Obtenção de exoantígeno de *S. schenckii*

O exoantígeno foi produzido segundo Scott e Muchmore,1989, com algumas modificações. Após a conversão, da fase leveduriforme de *S. schenckii* M-64, as células leveduriformes crescidas em 5 tubos de Ágar BHI, por três dias, a 37 ºC, foram transferidas para um frasco do tipo Erlenmeyer de 500 mL que continha 100

mL de meio líquido YCG. Esse pré-inóculo foi cultivado por 3 dias, sob agitação constante de 200 rpm, a 37 ºC, em incubadora de agitação. Após o terceiro dia, o pré inóculo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 1 L com 400 mL de meio líquido YCG e cultivado por mais sete dias, sob agitação constante, a 37 ºC. Após esse período, foi adicionado ao meio 0,2 g/L de timerosol (Synth, catálogo SYT100901AF), para que houvesse a interrupção do crescimento fúngico e a solução foi mantida a 4 ºC por 24 horas.

Posteriormente a cultura foi centrifugada a 3.000 rpm, por 5 minutos; após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado e concentrado 10 X pelo sistema Amicon (Millipore), com membrana de celulose YM 10 (Millipore, catálogo 4304) e dialisado contra água destilada a 4 ºC, com várias trocas, por 24 horas. Em seguida, o exoantígeno dialisado passou por um filtro de 45 µm (Millipore) e foi estocado a -20 ºC.

32. Dosagem proteica

A dosagem proteica do exoantígeno de *S. schenckii* M-64 foi realizada segundo Bradford, utilizando Comassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, catálogo 27815) e, como padrão, albumina bovina (Sigma-Aldrich, Catálogo A9647).

33. Análise de proteínas por *Dot Blotting.*

Inicialmente, o antígeno total de solúvel de *S. schenckii* foi diluído em tampão carbonato 0,1M, pH 9,6, em uma concentração de 50 µg/mL. A seguir, adicionaram-se 5 µL desse antígeno diretamente a uma membrana de nitrocelulose. Com a membrana seca, foram acrescentados 5 µL das frações obtidas da purificação do sobrenadante de células. Com as proteínas ligadas, procedeu-se ao bloqueio mediante o emprego de um tampão de bloqueio, durante a noite, a 4°C.

Após essa etapa, a membrana foi banhada 3X com PBS – T 1X e incubada com o anticorpo Anti–IgG humano (Fc específico), produzido em cabra e conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, catálogo: A9544) na diluição de 1: 2.500 por 2 horas, à temperatura ambiente. Depois dessa fase, a membrana foi lavada 3X com PBS – T 1X.

A seguir, foi adicionada solução reveladora NBT. O aparecimento das bandas coloridas era controlado visualmente. Após a reação, lavava-se a membrana com

água destilada até ser retirado o excesso da solução reveladora e a interrupção da reação da enzima.

34. Quantificação proteica por BCA

O método do ácido bicinconínico (BCA) permite a detecção colorimétrica e a quantificação de proteína. As amostras que continham as proteínas recombinantes purificadas foram determinadas pela análise de proteína total, por intermédio do kit BCA (Pierce®, catálogo 23225).

Preparação das soluções para a curva padrão

Solução Stock: 2 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA)

Volume de BSA	Volume de Diluente	Concentração final de BSA
100 µl	0 µl	2000 µg/ml
75 µl	25 µl	1500 µg/ml (A)
50 µl	50 µl	1000 µg/ml (B)
50 µl (A)	50 µl	750 µg/ml (C)
50 µl (B)	50 µl	500 µg/ml (D)
50 µl (D)	50 µl	250 µg/ml (E)
50 µl (E)	50 µl	125 µg/ml (F)
20 µl (F)	80 µl	25 µg/ml(G)

Preparação do Reagente BCA

Misturar 50 partes do Reagente A com 1 parte do Reagente B.

Quantificação

Foram adicionados 25 µl por poço de cada uma das soluções padrão de BSA em uma placa de 96 poços. Foram usados 25 µl de diluente para fazer o ponto zero da curva padrão.

Foi pipetado o volume apropriado (≤ 25 µl) das amostras a quantificar e adicionado o volume necessário de diluente para perfazer 25 µl.

Foram adicionados 200 µl do reagente BCA; a placa foi então agitada em um agitador orbital durante 30 segundos, recoberta com filme de PVC e incubada a 37ºC, durante 30 minutos.

A absorbância foi medida a 562 nm. Posteriormente foi construída a curva padrão, representando num gráfico a A(562nm) de cada uma das soluções padrão

versus sua concentração de proteína em µg/ml. Usando a curva padrão, foi determinada a concentração de proteína para cada uma das amostras.

35. Análise dos produtos recombinantes por *imunoblotting*

As proteínas obtidas de sobrenadantes de meios de cultura dos transfectomas foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida. Inicialmente, preparou-se o gel separador a 12% (p/v), e a polimerização foi catalisada por adição de 0,045% (p/v) de persulfato de amônio e 0,2% (v/v) de TEMED. A seguir, o gel concentrador foi vertido a 5% (p/v), e a polimerização foi catalisada por 0,12% (p/v) de persulfato de amônio e 0,2% (v/v) de TEMED. Uma vez vertido o gel concentrador, introduzimos o pente para permitir a formação de poços. Após a polimeração, o gel foi acoplado ao aparato de eletroforese. Após corrida do gel a 25 mA, este foi corado com prata.

36. Coloração de Géis SDS-PAGE com prata

Os géis de acrilamida foram corados com prata, por meio do uso do kit SilverQuest ™ Silver Staining (Invitrogen, catálogo LC6070).

Após a eletroforese, o gel foi retirado do cassete e colocado em uma bandeja, para coloração limpa do tamanho apropriado. O gel foi banhado brevemente com água ultrapura. Adicionaram-se de 50 mL de fixador durante 20 minutos, com rotação suave.

A solução fixadora foi descartada e o gel foi lavado com 30% de etanol, durante 10 minutos. O etanol foi descartado, adicionaram-se 50 mL de solução de sensibilização e procedeu-se a uma incubação durante dez minutos. Foi descartada a solução de sensibilização e o gel foi banhado com 50 ml de etanol a 30%, por 10 minutos. Posteriormente, o gel foi lavado com 50 ml de água ultrapura, durante 10 minutos.

Após esses procedimentos, o gel foi incubado em 50 mL de solução de coloração por quinze minutos. Depois da coloração completa, descarta-se a solução de coloração e banha-se o gel com 50 ml de água ultrapura, por 60 segundos. A seguir, incuba-se o gel em 50 mL de solução de revelação, por oito minutos, até que as bandas comecem a aparecer e a intensidade desejada da banda for atingida. Assim que a intensidade de coloração é alcançada, imediatamente se adicionam 10 mL da solução Stoper diretamente ao gel, ainda imerso em solução de revelação.

Durante 10 minutos, agita-se suavemente o gel. As mudanças de cor-de-rosa para incolor indicam que o desenvolvimento foi descontinuado. Descarta-se a solução, e o gel é lavado com água ultrapura.

37. Separação de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram isoladas do sangue venoso coletado em tubos a vácuo que continham heparina como anticoagulante. A separação foi feita por meio do gradiente de densidade, mediante o uso de Ficoll-Hypaque (SIGMA ALDRICH, catálogo 26873-85-8), na proporção de 1:2 (sangue:Ficoll), formando duas fases, então centrifugadas por 40 minutos, a 2.000 rpm. O anel no qual estavam as células mononucleares após a centrifugação foi aspirado com pipeta de bulbo e as células, lavadas com tampão PBS 1X pH 7,2. Posteriormente, as células foram incubadas com 80 µl de tampão Beads e 20 µl de anticorpo monoclonal anti-CD14 MicroBeads-MACs acopladas com esferas magnéticas para purificação de monócitos (Miltenyi Biotec, catálogo 130-050-201), durante 30 minutos, a 4°C. A solução foi centrifugada por 10 minutos, lavada com PBS 1X e ressuspensa no mesmo tampão usado anteriormente. A separação magnética foi feita por intermédio de seleção positiva. As células foram cultivadas em placas de seis poços em meio RPMI 1640, acrescido de 10% de soro fetal bovino (R10%). Essas placas foram mantidas, durante 7 dias, em estufa de CO_2, a 37°C.

38. Tratamento das células leveduriformes de *S. schenckii* com AcMo antifração de 70 kDa P6E7, fragmento FvFc humanizado e quimérico

Um inóculo em PBS com células leveduriformes de *S. schenckii* foi preparado e ajustado a uma concentração de três células leveduriformes para um macrófago. Colocaram-se as células em tubos cônicos de 1,5 mL e a cada tubo foram acrescidas diferentes concentrações de AcMo antifração de 70 kDa de *S. schenckii* P6E7, do FvFc quimérico e do FvFc humanizado nas concentrações 50, 100 e 200 µg/mL. As células foram incubadas por 1 hora, a 37ºC, sob agitação constante, e depois lavadas por três vezes com PBS, para remoção dos anticorpos livres e reservados para ensaio de fagocitose.

39. Fagocitose

Para o teste de fagocitose, os macrófagos foram ajustados em câmara de Neubauer, na concentração de 2 x 10^5, e foram cultivadas sobre lamínulas de vidro em placa de 24 poços, a 37º e 5% de CO_2, por uma noite.

Após a incubação dos macrófagos, foram adicionadas leveduras de *S. schenckii* na proporção de 3 leveduras para cada macrófago. A seguir, procedeu-se à incubação por 4 horas, em estufa, a 37°C e 5% de CO_2. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X, para remoção das leveduras não fagocitadas e coradas com Giemsa (MERCK, catálogo 1092030025). Após a coloração, as lamínulas foram fixadas com Entellan® (Merck Millipore, catálogo 1092030025); posteriormente, foram analisadas em microscópio óptico comum (40x e 100x).

Calculo Indice d efagocitose:

$$IF = \%\ \text{células fagociticas} \times \frac{\text{númeo de leveduras fagocitados}}{\text{número de células fagociticas}}$$

RESULTADOS

1. Isolamento de RNA total

O RNA total foi extraído a partir do hibridoma do anticorpo monoclonal antiproteína de 70 kDa de *Sporotrix schenckii* (P6E7).

Realizou-se a eletroforese em gel de agarose desnaturante para avaliar a integridade do RNA extraído, verificada pela observação de duas bandas que correspondem às subunidades do RNA 28S (4,4 Kb) e 18S (1,9 kb) (Figura 10).

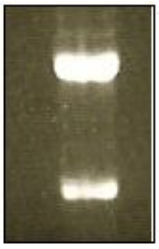

Figura 10: Gel de agarose desnaturante, no qual se mostra a integridade do RNA obtido a partir do hibridoma P6E7.

2. Obtenção de cDNA por RT-PCR

Posteriormente, sintetizamos os cDNA codificadores para a porção variável das cadeias leve e pesada do anticorpo P6E7. Utilizou-se a técnica de RT-PCR. Para a síntese de cDNAs, empregamos uma biblioteca de oligonucleotídeos (oligos) específicos que reconhecem a porção variável das cadeias VH (λ1) e VL (K18) murinas (Tabela 1). Os cDNAs codificadores para a porção variável do anticorpo foram especificamente amplificados por meio da técnica de PCR. Para a amplificação a partir da extremidade 5', foi utilizada, para $V_{H,}$ uma biblioteca de 11 oligos; para $V_{L,}$ foram empregados 8, oligos (listados na tabela 3). Para a amplificação a partir da extremidade 3', foram novamente utilizados os oligos λ1 e K18.

3. Obtenção da cadeia VH

Após RT-PCR, analisamos as bandas que amplificaram e descartamos o amplicom do oligo 321, pois este amplificou algumas bandas inespecíficas com grande intensidade. Foram escolhidos os amplicons dos oligos 322 e 310 para purificação dos fragmentos que amplificaram a banda de aproximadamente 400pb da VH a partir do gel de agarose 1% (Figura 11).

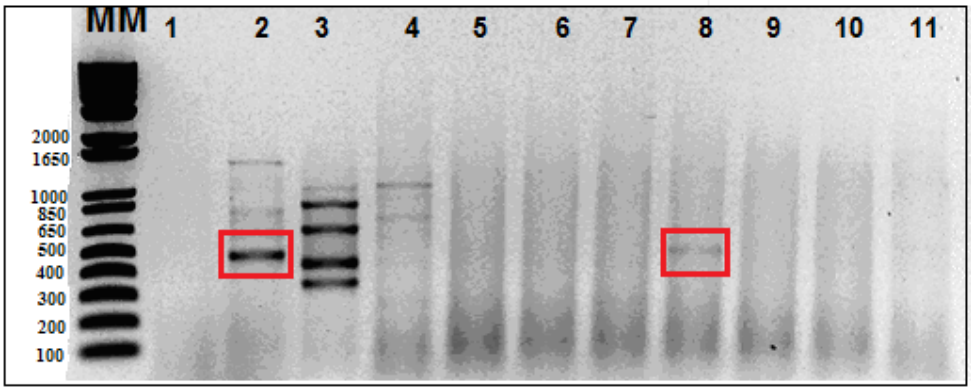

Figura 11- Amplificação dos cDNAs que codificam para o fragmento VH murino. Perfil eletroforético dos fragmentos de cDNA reamplificados por PCR por intermédio do emprego da biblioteca de *primers* que reconhecem todas as famílias de VHs de camundongo. Um quinto do volume do sistema de PCR foi analisado em gel de agarose 1%. A seta vermelha indica os amplicons selecionados. Amostras: MM- Marcador de massa molecular 1 kb plus (Invitrogen), 1- 324; 2- 322; 3- 321; 4-320; 5- 319; 6- 312; 7- 311; 8- 310; 9- 309; 10- 308; 11- 307.

4. Obtenção da cadeia VL

Para a cadeia leve, analisamos os resultados; os primers 353, 362, 365, 390, 391 e 394 amplificaram um fragmento com aproximadamente 400pb e foram selecionados para purificação a partir do gel de agarose 1% (Figura 12).

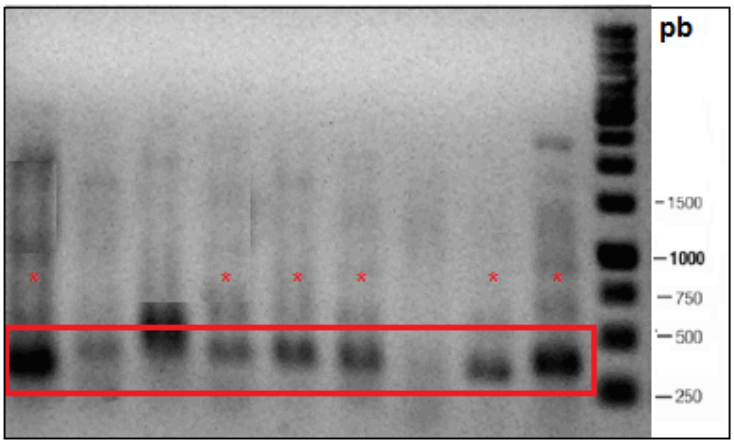

Figura 12- Amplificação dos cDNAs que codificam para o fragmento VL murino. Perfil eletroforético dos fragmentos de cDNA reamplificados por PCR por meio da utilização da biblioteca de *primers* que reconhecem todas as famílias de VLs de camundongo. Um quinto do volume do sistema de PCR foi analisado em gel de agarose 1%. O asterisco vermelho indica os amplicons selecionados. Amostras: MM- Marcador de massa molecular 1 kb *ladder F*ermentas,1- 394; 2- 393; 3- 392; 4- 391; 5-390; 6-365; 7-364; 8- 362 e 9-353.

5. Purificação, ligação em vetor, clonagem e sequenciamento das amostras

Os fragmentos selecionados tanto da cadeia leve quanto da cadeia pesada foram purificados, quantificados em gel de agarose e ligados ao vetor pGEM-T Easy.

Após quantificação, realizou-se cálculo para obtermos uma proporção de 5:1 (inserto: vetor). De acordo com o cálculo, fez-se a ligação de 33ng de cada inserto com vetor de clonagem pGEM-T Easy.

Os sistemas de ligação foram utilizados para transformação por eletroporação em células de *Escherichia coli* DH-5α. Os clones recombinantes foram selecionados mediante o plaqueamento dos transformantes em placas contendo meio LB ágar com ampicilina (100µg/mL), X-gal (0,1mg/mL) e IPTG (0,5mM). Os clones brancos foram escolhidos para uma preparação plasmidial em pequena escala e analisados quanto ao perfil de restrição.

Com relação à clonagem dos cDNAs que codificam para cadeia VH do anticorpo monoclonal P6E7 murino, obtiveram-se clones do fragmento que amplificou para o *primer* 322 e foram escolhidos cinco clones para obtenção de DNA plasmidial em larga escala. Estes apresentaram perfil de restrição para a enzima EcoRI, compatível com o esperado e foram sequenciados em ambas as fitas, com os *primers* T7 e SP6. A sequência nucleotídica obtida para VH do anticorpo P6E7 murino está demonstrada a na Figura 13.

```
      X  X  V  D  L  Q  A  A  A  N  S  L  V  I  E  V  K  L  V  E  S  G  G  D  L  V
1       CCCNTNTGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGTGATTGAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTG   80
1       GGGNANACCAGCTGGACGTCCGCCGGCGCTTAAGTGATCACTAACTCCACTTCGACCACCTCAGACCCCCTCTGAATCAC   80

        K  P  G  G  S  L  K  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  I  S  Y  A  M  S  W  V  R  Q
81      AAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCATTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCA   160
81      TTCGGACCTCCCAGGGACTTTGAGAGGACACGTCGGAGACCTAAGTGAAAGTAATCGATACGGTACAGAACCCAAGCGGT   160

        T  P  E  K  R  L  E  W  V  A  S  I  S  S  G  G  D  T  Y  Y  P  D  S  V  K  G
161     GACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTGACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCC   240
161     CTGAGGTCTCTTCTCCGACCTCACCCAGCGTAGGTAATCATCACCACCACTGTGGATGATAGGTCTGTCACACTTCCCGG   240

        R  F  T  I  S  R  D  I  A  R  N  I  L  F  L  Q  M  N  S  L  R  S  E  D  T  A  M
241     GATTCACCATCTCCAGAGATATTGCCAGGAACATCCTGTTCCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATG   320
241     CTAAGTGGTAGAGGTCTCTATAACGGTCCTTGTAGGACAAGGACGTTTACTTGTCAGACTCCAGACTCCTGTGCCGGTAC   320

        Y  Y  C  A  S  L  S  F  D  Y  W  G  Q  G  T  T  L  T  V  S  S  A  K  T  T  P  P
321     TATTACTGTGCAAGCCTCTCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCC   400
321     ATAATGACACGTTCGGAGAGGAAACTGATGACCCCGGTTCCGTGGTGAGAGTGTCAGAGGAGTCGGTTTTGCTGTGGGGG   400

        S  V  Y  P  L  A  P  G  S  A  A  Q  T  N  S  M  V  T  L  G  C  L  V  K  G  Y
401     ATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATT   480
401     TAGACAGATAGGTGACCGGGGACCTAGACGACGGGTTTGATTGAGGTACCACTGGGACCCTACGGACCAGTTCCCGATAA   480

        F  P  E  P  V  T  V  T  W  N  S  G  S  L  S  K  S  N  S  R  G  R  H  G  G  R  E
481     TCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAG   560
481     AGGGACTCGGTCACTGTCACTGGACCTTGAGACCTAGGGACAGGTTTAGCTTAAGGGCGCCGGCGGTACCGCCGGCCCTC   560
        H  A  T  S  G  P  I  R  P  I  V  S  R  I  T  I  H  W  P  S  F  Y  N  V  V  T  G
561     CATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG   640
561     GTACGCTGCAGCCCGGGTTAAGCGGGATATCACTCAGCATAATGTTAAGTGACCGGCAGCAAAATGTTGCAGCACTGACC   640

        K  T  L  A  L  P  N  L  I  A  L  Q  H  I  P  L  S  P  A  G  V  I  A  K  R  P
641     GAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCG   720
641     CTTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGCGGAACGTCGTGTAGGGGGAAAGCGGTCGACCGCATTATCGCTTCTCCGGGC   720

        A  P  I  A  L  P  T  V  A  X  P  E  W  R  M  D  P  P  C  S  G  A  L  X  R  R  V
721     CACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCANCCTGAATGGCGAATGGACCCCCCCTGTAGCGGCGCATTANCGCGGCGGGTG   800
721     GTGGCTAGCGGGAAGGTTGTCAACGCGTNGGACTTACCGCTTACCTGGGGGGGACATCGCCGCGTAATNGCGCCGCCCAC   800

        W  X  L  P  X  X  D  A  T  L  P  A  P  X  A  A  L  C  F  F  X  P  F  X  X  X  X
801     TGGNGGTTACCGCANCGNGACGCTACCTTGCCAGCGCCTANCGCCGCTCTTTGCTTTTTCCNTCCTTTTCNCNNNTCNCN   880
801     ACCNCCAATGGCGTNGCNCTGCGATGGAACGGTCGCGGATNGCGGCGAGAAACGAAAAAGGNAGGAAAAGNGNNNAGNGN   880
```

Figura 13. Sequência nucleotídica obtida e polipeptídica predita para VH do anti-P6E7 murino. A análise desta sequência em banco de dados possibilitou identificar CDRs em azul e os residuos que as delimitam em verde.

Já em relação à clonagem dos cDNAs que codificam para cadeia VL do anticorpo monoclonal P6E7 murino, os clones obtidos de todos os fragmentos de aproximadamente 400pb foram selecionados e escolhidos 2 clones de cada amplicon para obtenção de DNA plasmidial em larga escala. Foi analisado perfil de restrição com a enzima *PVU*II onde apenas os clones do amplicon 392 não foram compatíveis com o esperado (Figura 14).

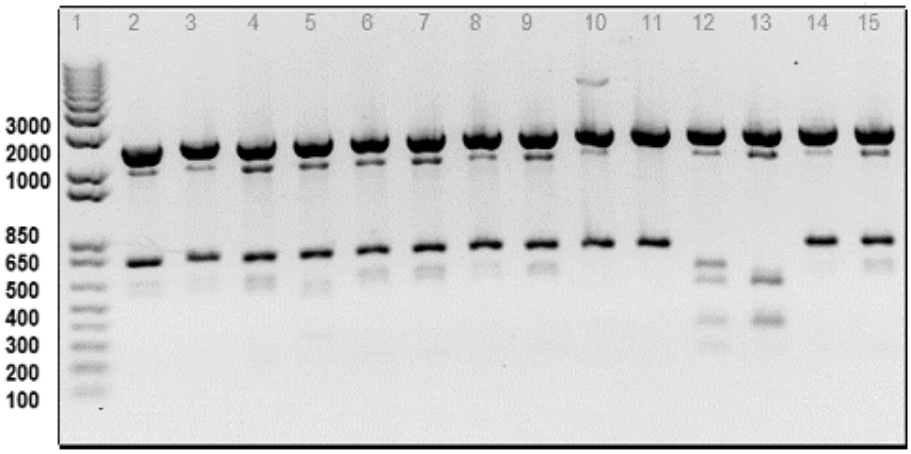

Figura 14. Digestão do vetor p-GEM T Easy com enzina *PVU* II para confirmar ligação da VH do hibridoma P6E7. Amostras: 1- Marcador Molecular : 1 kb Plus ladder Invitrogem, 2- 353(clone 1), 3- 353 (clone 2), 4- 362 (clone1), 5- 362 (clone 2), 6- 365(clone 1), 7- 365 (clone 2), 8- 390 (clone1), 9- 390 (clone 2), 10- 391 (clone 1), 11- 391 (clone 2), 12- 392 (clone1), 13- 392 (clone 2), 14- 393 (clone 1) e 15- 393 (clone 2).

Os DNAs dos clones com perfil de restrição compatível com o esperado foram enviados para sequenciamento em ambas as fitas utilizando os primers T7 e SP6.

6. Expressão do scFv murino anti-P6E7

Uma vez determinada a sequência do domínio variável pesado e leve do anticorpo murino P6E7, partimos para a montagem do fragmento variável deste anticorpo na forma de cadeia única (scFv) que posteriormente foi introduzido em vetor de expressão pMIRES que contém domínio Fc humano.

A montagem deste fragmento scFv murino foi feito no plasmídio bacteriano intermediário pIg16 Z22. A estratégia utilizada para esta clonagem resume-se na troca da VH e VL do vetor pIg16 pela VH e VL do anti-P6E7 (Figuras 15 e 16). Para realizarmos esta troca primeiramente nova amplificação por PCR foi realizada, sendo que desta vez o plasmídeo pGEM T easy contendo o gene VH murino já clonado foi utilizado como molde (template) desta reação. Foram utilizados os primers desenhados a partir do sequenciamento da VH murina com sítios de restrição para as enzimas *Xma* I e *Xba* I, na extremidade 5' e 3' respectivamente. Após amplificação, foi realizada confirmação em gel de agarose do fragmento amplificado. O fragmento resultante da PCR foi clonado em pGEM- T.

Posteriormente os vetores pIg16 Z22 e pGEM-T/VH foram digeridos com as endonucleases de restrição *Xma* I e *Xba* I. Os sistemas de digestões foram

analisados em gel de agarose e os fragmentos correspondentes ao vetor linearizado (pIg 16 sem VH) e a VH do anti-P6E7 (Figura 15) foram eletroeluídos e ligados. O sistema de ligação foi utilizado para transformação em células de *Escherichia coli*, linhagem DH-5α. Com os clones transformantes foi feita preparação em pequena escala e após análise feita através de PCR utilizando os transformantes como molde e os oligonucleotídeos *Xma* I VH e *Xba* I VH, foi realizada preparação plasmidial em larga escala, e o material resultante foi denominada de pIg16 anti P6E7VHMU.

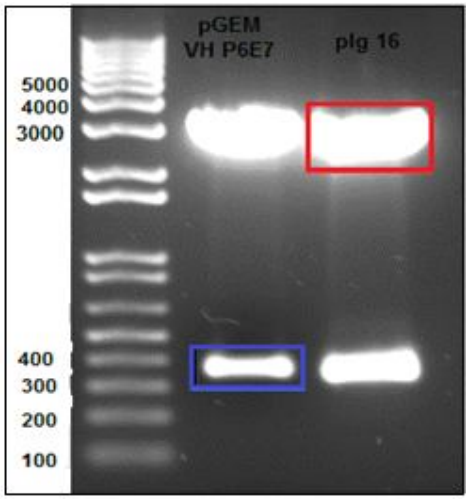

Figura 15. Digestão dos vetores pGEM/VH P6E7 e pIg16. Os vetores foram digeridos com enzimas Xma I e Xba I, para liberação das respectivas cadeias variáveis pesada. O vetor pIg16 linearizado, sem VH (vermelho), foi ligado à VH do anti-P6E7 (azul) utilizando enzima T4 ligase.

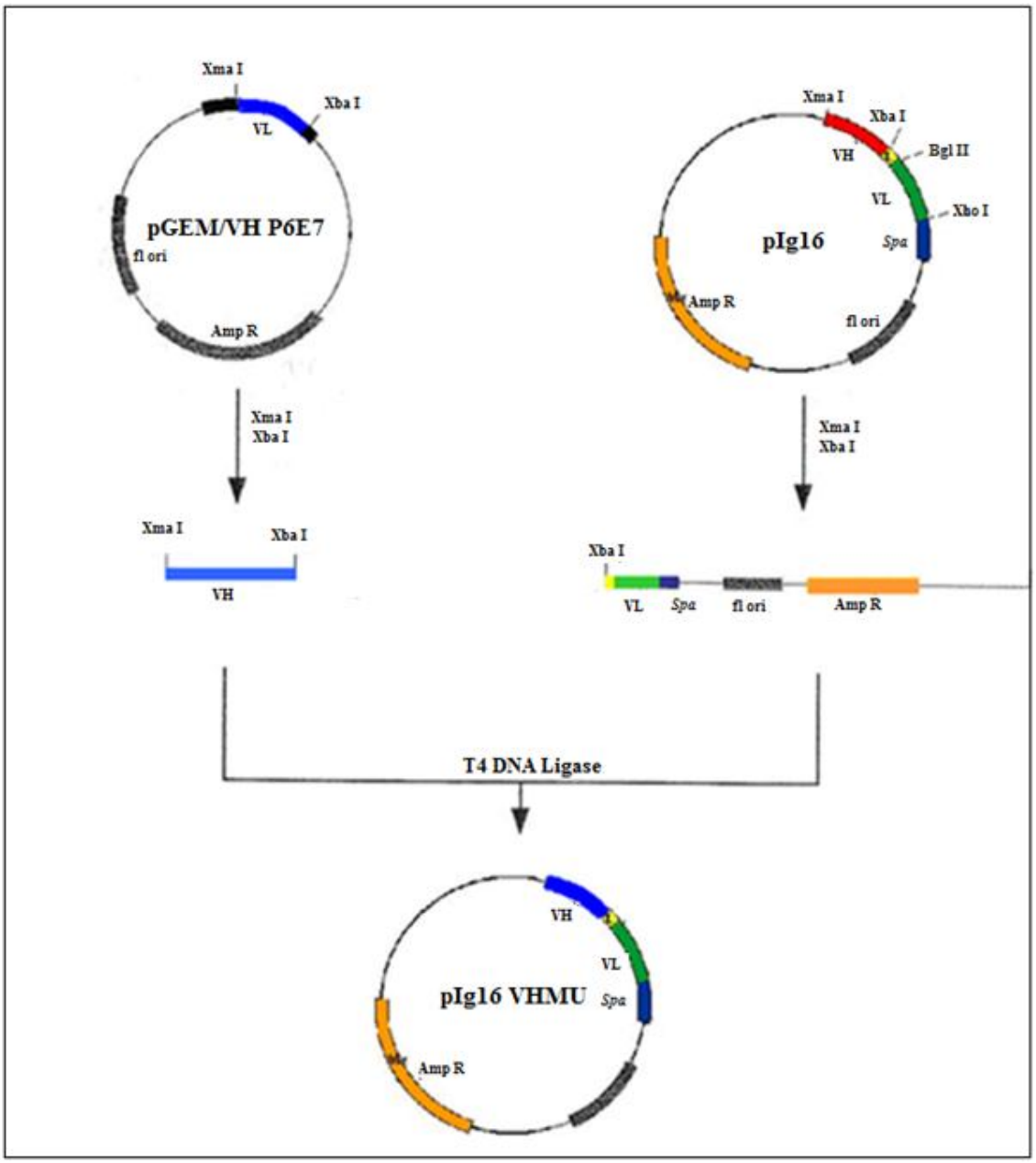

Figura 16. Representação esquemática da estratégia utilizada para clonagem da VH para a clonagem do anti-P6E7 no vetor pIg16 Z22. Desta forma foi criado o vetor pIgP6E7VHMU no qual foi clonado à VH murina juntamento com a VL do pIg16 Z22, ligados a um peptídeo ligante; Amp^R: gene da enzima β-lactamase, que confere resistêcia à ampicilina; promotor gene10 do fago T7 (pT7); Ori indica a origem de replicação plasmideal Col E1; f1 indica a origem de replicação viral; SPA: domínio da proteína *Streptococcus aureus*.

Na promeira estratégia que desenvolvemos o vetor pIg16VHMU foi ligado diretamente ao fragmento VL amplificado por PCR usando oligonucleotídeos que inseriram sítios *Bcl* I e *Xho* I nas extremidades 5' e 3' respectivamente. Decidimos ligar o produto de PCR diretamente no vetor pIg16VHMU porque não seria possível

a clonagem do fragmento direto do vetor pGEM-T, pois a enzima *Bcl* I é sensível a metilação no sítio de restrição pela enzima dam-metilase bacteriana, o que bloqueia o sítio de restrição, impossibilitando a digestão do segmento de DNA do vetor. Após sequenciamento foi verificado que a VL não se ligou de forma satisfatória ao vetor pIg16VHMU. Foi preciso mudar a estratégia, escolhendo agora um sítio de restrição para VL que pudesse ser clonado em pGEM T- easy. O sítio que escolhido foi *Bgl* II. Porém a cadeia leve do anti- P6E7 já possuía um sítio interno de *Bgl* II.

Então desenvolvemos uma estratégia para retirar o sítio de Bgl II interno e adicionarmos os sítios de restrição nas extremidade 5' e 3' da cadeia (esquema Figura 17). Pra realizarmos esta troca primeiramente nova amplificação por PCR foi realizada, sendo que desta vez o plasmídeo pGEM T easy contendo o gene VL murino já clonado anteriormente foi utilizado como molde (template) desta reação. Foram utilizados os oligonucleotídeos desenhados a partir do sequenciamento da VL murina para amplificação de dois fragmentos da VL. Um fragmento denominado fragmento 1com sítios de restrição na extremidade 5' para as enzimas *Bgl* II utilizando oligo VL *Bgl* II e outro para extremidade 3' que permitisse a amplificação da cadeia somente até a região anterior ao sítio interno de *Bgl* II utilizando oligo VL intermediário 1. E os oligonucleotídeos para um segundo fragmento que amplificasse a região 5' após o sítio *Bgl* II utilizando oligo VL intemediário 2 até o final da VL adicionando ao final da sequencia 3' um sítio de restrição para *Xho* I. Após amplificação e obtenção de dois fragmentos da VL (um fragmento de 100 kb e outro de aproximadamente 200 kb) estes foram aquecidos a 90 ºC por 5 minutos em tampão com alta concentração de sal e deixado esfriar lentamente para que houvesse o anelamento destes fragmentos e formassem assim um fragmento único (com aproximadamente 300 kb) da cadeia leve. Foi feito um gel de agarose para confirmação do anelamentos dos dois fragmentos (Figura 18). E então foi realizada nova PCR utilizando os oligos VL *Bgl* II e *Xho* I para que houve amplificação da cadeia leve agora sem o sítio interno de *Bgl* II. O fragmento resultante da PCR foi clonado em pGEM- T.

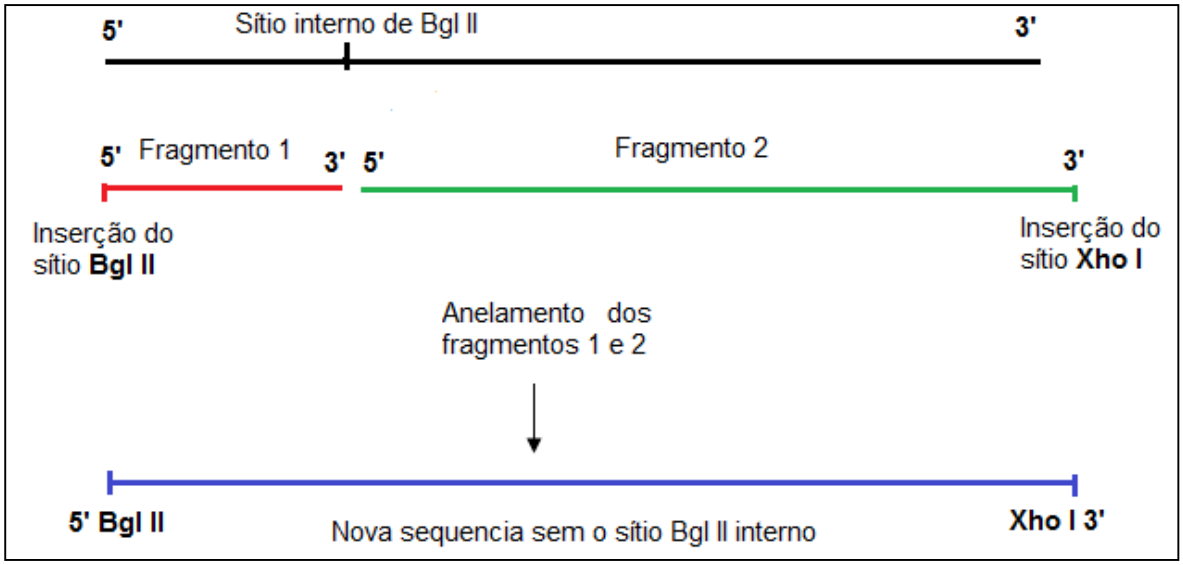

Figura 17. Estratégia para síntese e retirada do sítio de Bgl II interno da sequencia de VL. Foram amplificados dois fragmentos da cadeia leve que foram anelados para formar uma nova cadeia leve sem o sítiointerno de *Bgl* II.

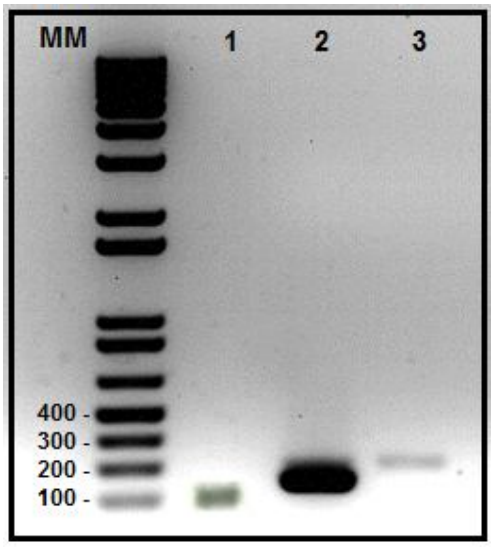

Figura 18- Estratégia para retirada e síntese do sítio de Bgl II interno da sequencia de VL. Perfil eletroforético de amplificação da (1) cadeia VL resultante do anelamento do fragmento 1 mais o fragmento 2, sem o sítio de *Bgl* II interno; do (2) fragmento 2 e do (3) fragmento 1 gerados a partir da cadeia leve original do AcMo P6E7.

Posteriormente os vetores pIg16VHMU e pGEM-T/VL foram digeridos com as endonucleases de restrição *Bg l* II e *Xho* I. Os sistemas de digestões foram analisados em gel de agarose e os fragmentos correspondentes ao vetor linearizado (pIg 16 sem VL) e a VL do anti-P6E7 foram eletroeluídos (Figura 19) e ligados.

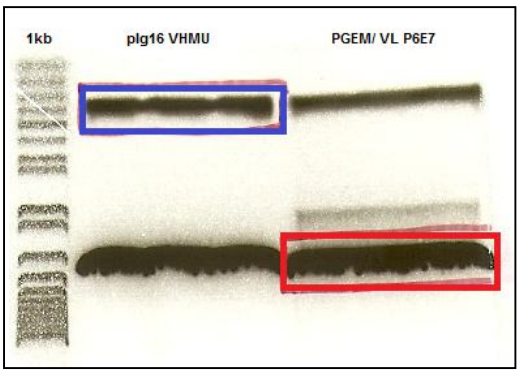

Figura 19. Digestão dos vetores pIg16VHMU e pGEM/VL P6E7. Os vetores foram digeridos com enzimas *Bgl* II e *Xho* I, para liberação das respectivas cadeias variáveis leve. O vetor pIg16VHMU linearizado, sem VL (azul), foi ligado à VL do anti-P6E7 (azul) utilizando enzima T4 ligase.

O sistema de ligação utilizado para transformação foi realizado utilizando células de *Escherichia coli*, linhagem DH-5α. Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados através de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para cadeia leve e pesada do anticorpo P6E7. Uma preparação plasmidial em larga escala, denominada de pIgP6E7scFV foi feita.

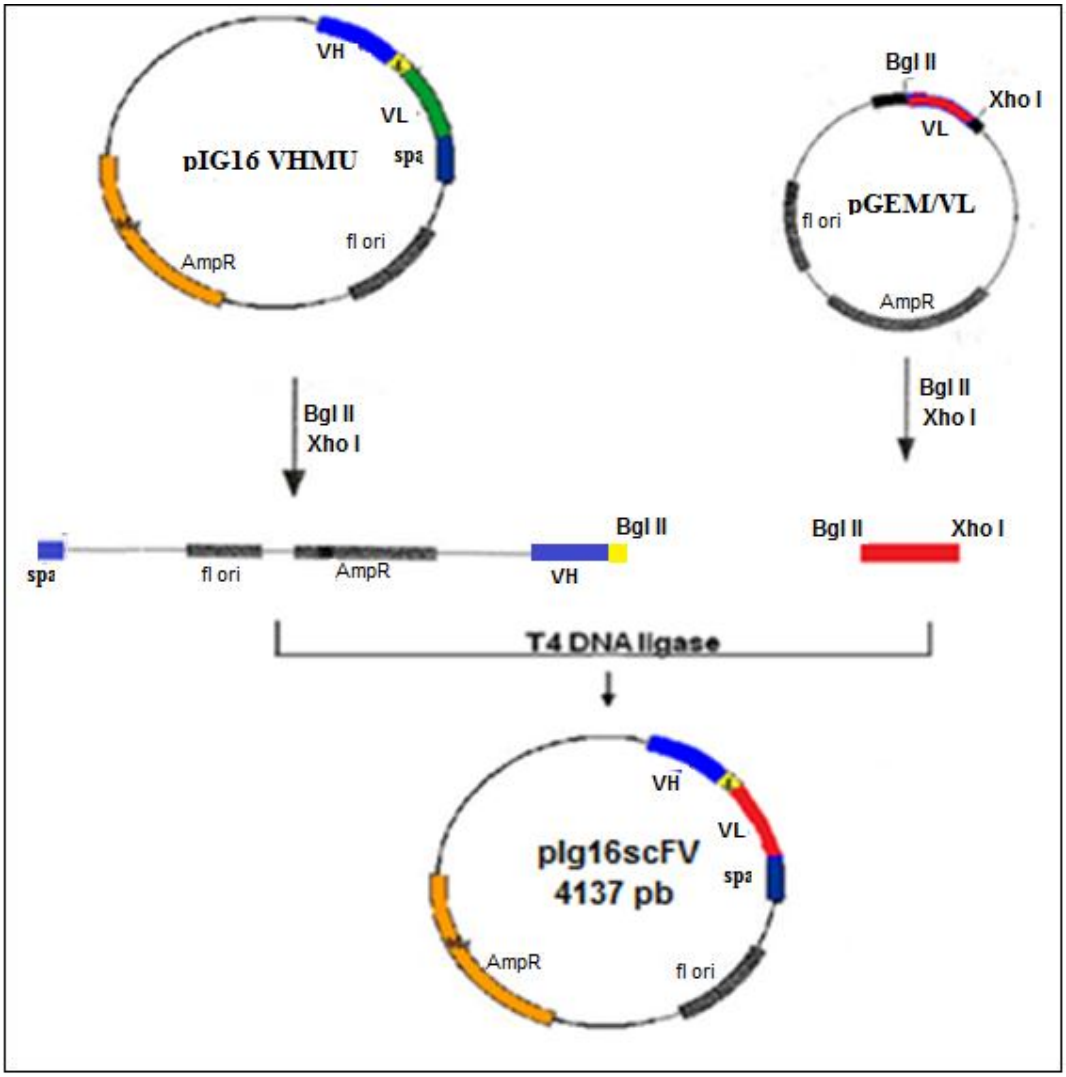

Figura 20. Esquema de estratégia utilizada para clonagem da VL anti-P6E7 no vetor pIgP6E7VHMU. A VL do anticorpo P6E7(vermelho) foi ligado ao vetor pIgVH P6E7MU linearizado e desprovido da VL do pIg16, utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase. Com isso, foi obtido o vetor pIgP6E7scFv, com VH (azul) fusionada à VL (vermelho) através de um peptídeo conector.

7. Proposição e síntese de gene que codifica para versão humanizada do scFV do anti-P6E7.

Para criamos uma versão humanizada do anticorpo P6E7 foi utilizada a sequência nucleotídica obtida para predizer a estrutura primária da VH e VL do AcMo murino P6E7. Esta sequência de aminoácidos foi então comparada com as sequências no banco de dados (*GenBank*, EMBL, PDB), com o objetivo de buscar sequências polipeptídica germinal humana mais próxima. A sequência encontrada foi utilizada como arcabouço para receber as CDRs do anticorpo murino. As sequências também foram manipuladas e analisadas com sequências depositas em

um banco de dados utilizando-se o programa BioEdit Sequence Aligment Editor. Análises estruturais foram realizadas, buscando identificar e prever eventuais impedimentos estruturais na proteína recombinante humana.

A versão proposta para humanização da VH e da VL do AcMo P6E7 (Figura 21) foi analizada e posteriormente foi sintetizado o gene humanizado na forma de scFV o qual consiste na VH ligada a VL por um linker polipeptideo flexivel (Gly4Ser)3 como mostra o esquema da figura 22. O gene foi sintetizado e clonado em vetor intermediário pBluescript II SK(-).

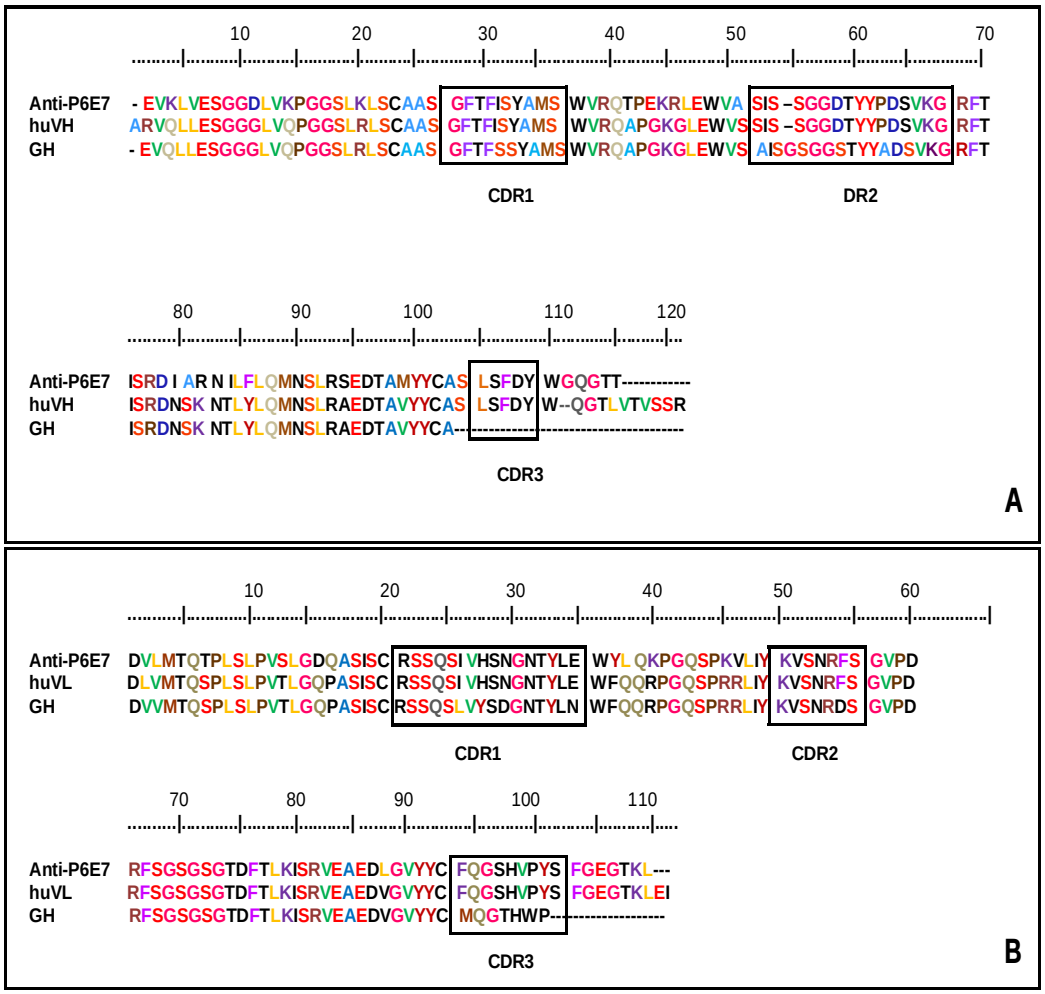

Figura 21. Alinhamento das sequências de aminoáciods do do anti-P6E7 murino. Sequência codificadora do anticorpo anti-P6E7, versões humanizadas para as cadeias pesada (huVH) e leve (huVL) e sequência humana (GH) utilizada como arcabouço para as CDRs murinas do anti-P6E7. A- Cadeia pesada. B- Cadeia leve. São destacadas dentro das caixas pretas as sequências CDRs 1, 2 e 3 de cada cadeia.

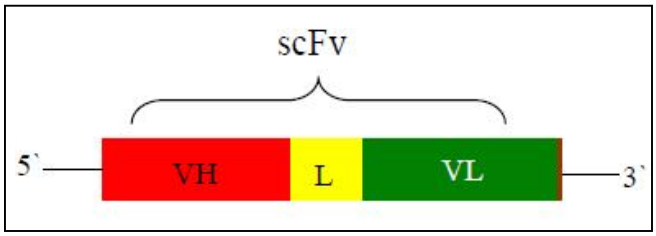

Figura 22. Representação esquemática do gene scFV sintetizado. Gene proposto com VH e VL contendo arcabouço humano e CDRs do AcMo P6E7 murino (Adaptado de SILVA, 2008).

8. Clonagem das sequencias codificadoras de anticorpos recombinantes quimérico e humanizado no vetor pMIRES

Após o plasmídeo pMIRES ser estabelecido como vetor de expressão, foram direcionadas estratégias de clonagem e montagem das sequências codificadoras dos anticorpos recombinantes humanizado e quimérico para inseri-las nesse vetor e possibilitar a expressão em células e mamíferos.

Primeiro transferimos as sequências codificadoras do anticorpo quimérico do vetor pIg16scFV P6E7 para o vetor de expressão pMIRES. Para tal ambas as construções foram digeridas com as enzimas *Xma* I e *Xho* I, o que promoveu a liberação dos fragmentos correspondentes ao scFV do anti-P6E7 e tornou apto o pMIRES receber tais fragmentos (Figura 23). Após purificação, ligação, transformação e preparação plasmidial, os clones foram analisados por PCR utilizando primers específicos para VH e VL do anticorpo P6E7. Pela observação das bandas podemos constatar que o vetor pMIRES dos clones 1, 2 e 4 contém o inserto de nosso interesse (Figura 24). Escolhemos o clone 3 para darmos prosseguimento ao trabalho.

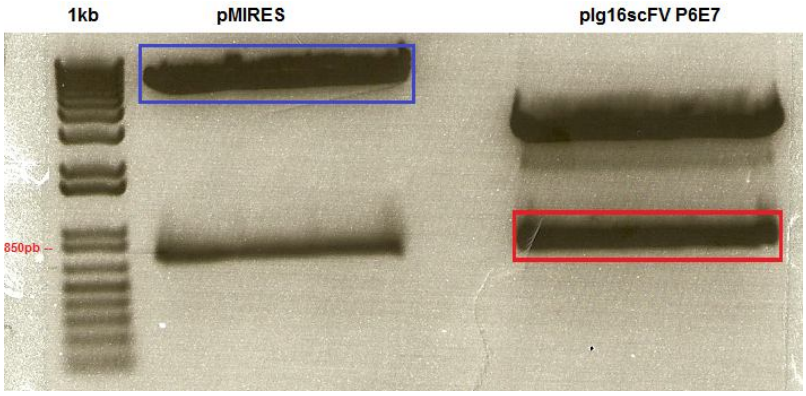

Figura 23. Digestão dos vetores pMIRES e pIg16scFv P6E7. Os vetores foram digeridos com enzimas Xma I e Xho I, para liberação das respectivas scFV. O vetor pMIRES linearizado, sem scFV (azul), foi ligado à scFV do pIg16scFv P6E7 (azul) utilizando enzima T4 ligase.

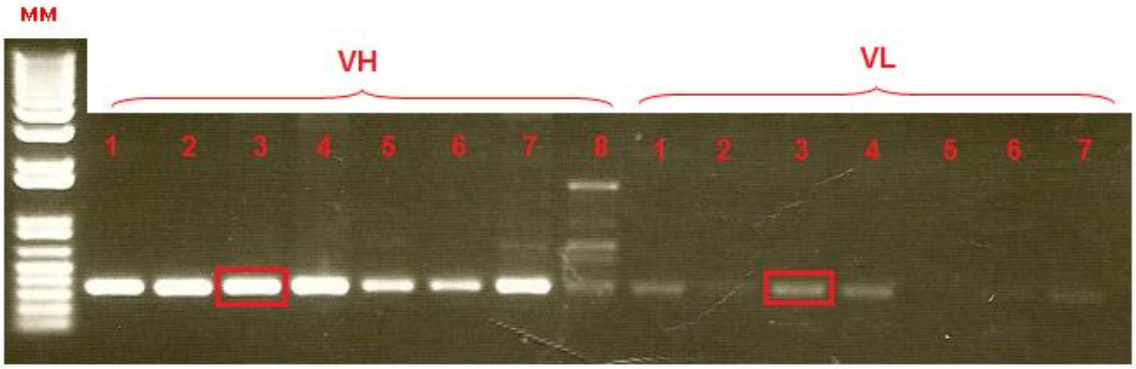

Figura 24- Análise da amplificação das cadeias VH e VL do scFV P6E7 inseridas no vetor pMIRES. Perfil eletroforético das cadeias VH e VL murinas amplificadas por PCR utilizando-se os primers específicos para cada cadeia. O perfil esperado para cada uma dessas análises era de 350pb. MM- Marcador de massa molecular: 1kb *ladder* Invitrogen®.

Posteriormente partimos para transferência das sequências codificadoras do anticorpo humanizado presentes no vetor intermediário pBluescript II SK(-) para o vetor de expressão pMIRES. Para tal ambas as construções foram digeridas com as enzimas *Xma* I e *Xho* I, o que promoveu a liberação dos fragmentos correspondentes ao scFV do anti-P6E7 e tornou apto o pMIRES receber tais fragmentos (Figura 25). Após purificação, ligação, transformação e preparação plasmidial, os clones foram analisados por PCR utilizando primers específicos para VH e VL do anticorpo P6E7 para confirmarmos que o inserto presente no pMIREs era o scFV P6E7 humanizado.

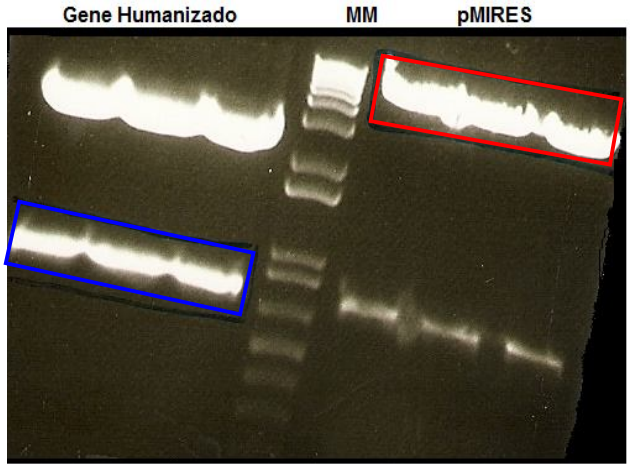

Figura 25. Digestão dos vetores pBluescript II (contendo o scFV P6E7) humanizado e pMIRES. Os vetores foram digeridos com enzimas *Xma* I e *Xho* I, para liberação das respectivas scFV. O vetor pMIRES linearizado, sem scFV (vermelho), foi ligado à scFV do gene humanizado (azul) utilizando enzima T4 ligase. MM- Marcador de massa molecular: 1kb l*adder* Invitrogen®.

9. Transfecção das células de ovário de *hamster* chinês (CHO) com os plasmídios pMIRES FvFc P6E7 humanizado e pMIRES P6E7 quimérico.

Com os vetores pMIRES P6E7 humanizada e quimérica, que codificam as duas versões dos FvFcs anti-P6E7 partiu-se para a produção dessas proteínas recombinantes nas células CHO. Para tal foram realizadas transfecções em duplicatas utilizando JetPEI. Após 72 horas da transfecção o meio foi reposto e adicionado 600 µg/mL de geneticina, o meio com geneticina foi trocado a cada 48 horas. Para verificar a presença de proteínas recombinate nos diferentes tempos de indução, as amostras coletadas foram submetidas a gel de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida. Após a coloração com prata foram observadas bandas de indução tanto para FvFc humanizado quanto.

O meio com antibiótico foi adicionado aos poços controles contendo as não transfectadas. Essa células foram utilizadas como controle da morte celular das células não transfectadas. A cada troca de meio as células foram observadas em microscópio óptico onde foram observadas sua morfologia e aderência à placa.

Como as células não transfectadas são sensíveis a geneticina aproximadante três semanas após a transfecção essa células apresentavam fenótipo de células mortas (Figura 26), a partir deste ponto assumia-se que as células transfectadas viáveis estavam selecionadas. Após este período as células dos poços transfectados foram tranferidas para garrafas de 75 cm^2 e posteriormente para garrafas de 150 cm^2 para aumentar a expressão das proteínas recombinantes. Os sobrenadantes destas culturas foram coletados uma vez por semana e armazenados para serem concentrados e purificados.

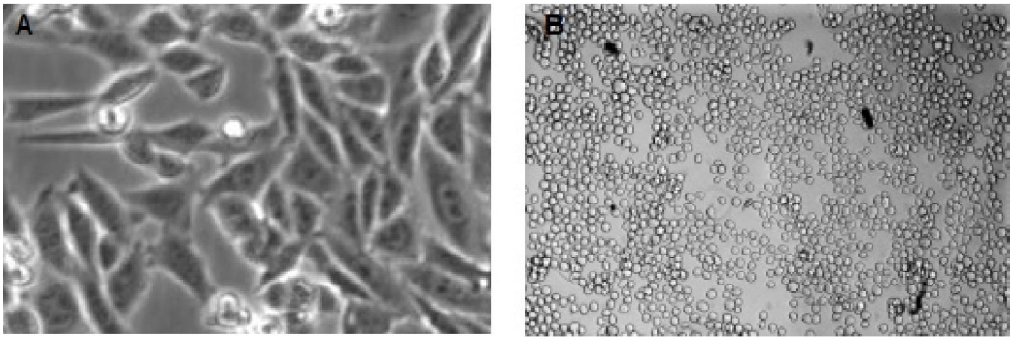

Figura 26. Morfologia das células CHO-K1. **A:** nas células transfectadas com vetor pMIRES observamos células vivas que apresentam forma elíptica e possuem capacidade de aderência à placa de cultura.**B:** células não transfectadas onde observamos que houve mudança morfologicas destas células que passaram apresentar foram esféricas e perderem a aderência à placa de cultura demonstrando sua morte após 3 semanas de cultura. Foto ilustrativa, (Adaptada de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cells.jpg).

10. Purificação dos FvFcs humanizados e quiméricos

Os sobrenadantes foram concentrados e purificados através coluna Hitrap protein A HP, as frações coletadas da coluna foram analisadas quanto à presença das proteínas recombinantes por ensaio de Dot Blot (Figura 27). Podemos observar que a purificação foi bem sucedida uma vez que não houve presença de proteínas nas frações coletadas da ligação a resina e apresentava as proteínas humanizada e quimérica a partir das frações de eluição.

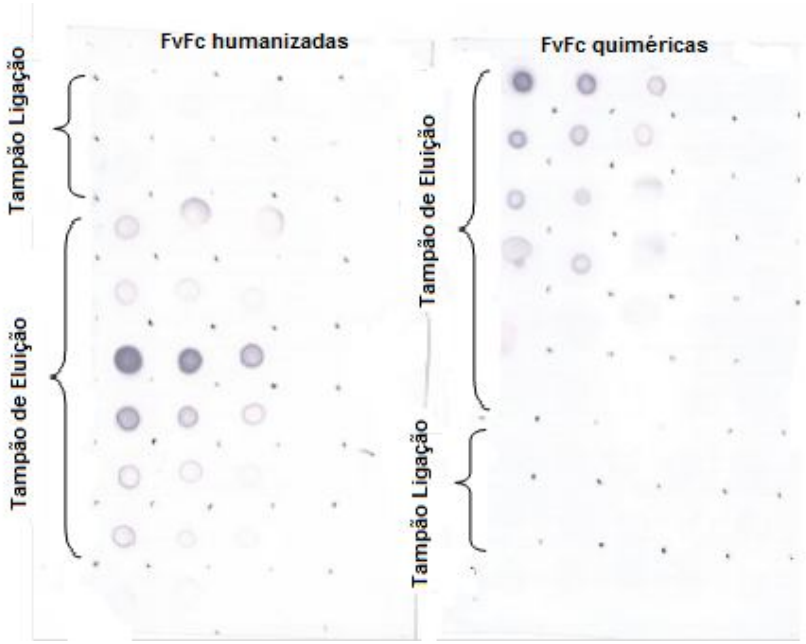

Figura 27. Análise das frações purificação por Dot Blot dos FvFc quimérico e humanizado. Após purificação dos FvFcs por cromatografia de afinidade as frações obtidas foram analisadas por *Dot Blot* quanto a presença das proteínas de interesse.

As frações que apresentavam as proteínas foram concentradas e filltradas em filtro de 45 µm e quantificadas por BCA.

11. Pureza das amostras dos FvFcs humanizados e quimérico.

Para avaliarmos a presença e a pureza das amostras obtidas realizamos gel SDS- PAGE, corado com prata (Figura 28). Analisando o gel corada pela prata podemos observar que o grau de pureza das amostras são satisfatórias onde podemos observar no gel corado uma banda de 55 kDa correspondente a dos FvFcs em uma prevalência significativa.

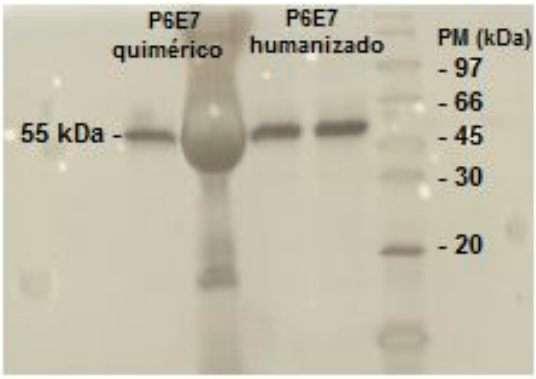

FIGURA 28. Análise da purificação por cromatografia de afinidade dos FvFc quimérico e humanizado. SDS- PAGE dos anticorpos recombiantes do P6E7 quimérico e humanizado eletrofororese em gel de agarose 10 % e corado com prata. A molécula FvFc migra como um monómero de 55 kDa, podemos observar a formação desta bandas correspondentes aos FvFcs humano e quimérico.

12. Teste dos FvFc humanizados e quiméricos anti-P6E7 quanto a capacidade de ligação

Realizamos ensaio de fagocitose (Figura 30) para verificarmos a interação de macrófagos obtidos de sangue periférico de voluntários com s células leveduriformes tratadas com 100 µg/mL FvFcs humanizada e quimérica para avaliarmos a capacidade de opsonização destes anticorpos. Utizamos como controle leveduras que não foram tratadas com nenhum tipo de anticorpos e leveduras tratadas com 100 µg/mL AcMo P6E7. Podemos observar um grande aumento do índice fagocítico quando comparamos o controle com as células leveduriformes tratadas com AcMo P6E7, FvFc humanizado e FvFc quimérico (Figura 29) .

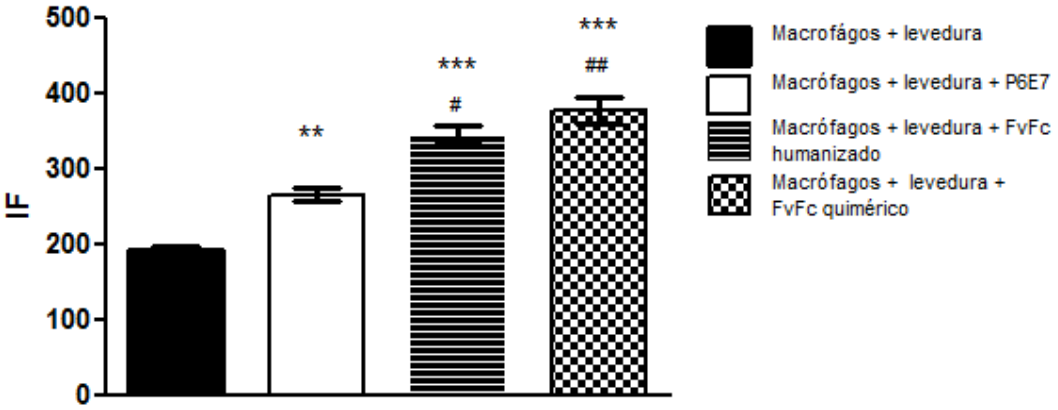

Figura 29. Ensaio de fagocitose. As leveduras foram tratadas com 100 µg/mL P6E7, FvFc humanizado ou FvFc quimérico e interagiram por 5 horas com macrofágos. ** (p<0,01) e *** (p<0,005) em relação às células não tratadas. # (p<0,05) e ##(p<0,01).

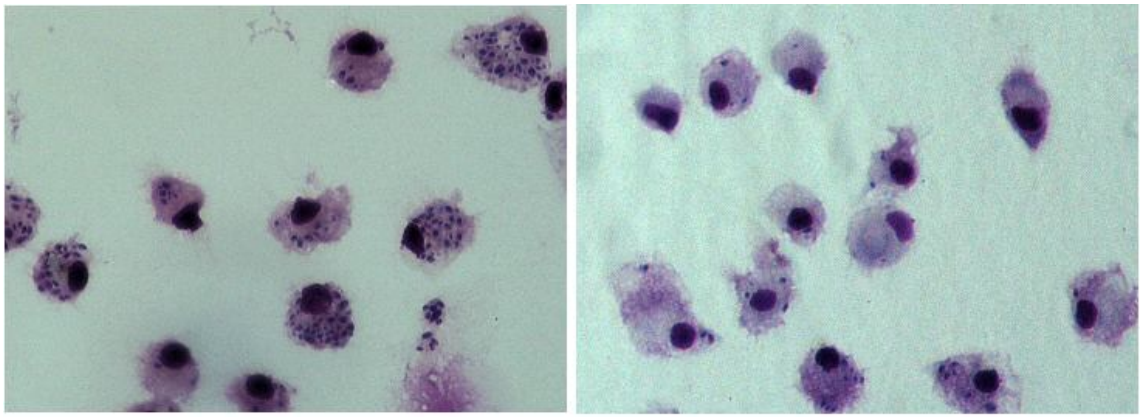

Figura 30. Fotos do ensaio de fagocitose. Os macrófagos foram incubados por 5 horas com levedura de *S. schenckii* (1) tratadas com 100 µg/mL FvFc humanizado e (2) sem tratamento prévio. Microscópio Óptico 40X.

DISCUSSÃO

A esporotricose é uma doença causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. As principais manifestações clínicas ocorrem na pele, mas o número de casos sistêmicos e viscerais vem aumentando nos últimos anos, especialmente em pacientes imunocomprometidos (VERDAN et al., 2012).

A esporotricose é considerada uma doença negligenciada e durante muito tempo foi descrita como uma enfermidade de baixa incidência no Brasil; no entanto, relatos recentes mostram que o número de casos descritos tem-se elevado e a incidência de formas clínicas graves ou atípicas da doença vem ocorrendo com maior frequência (da SILVA, 2012; LOPEZ-BEZERRA, 2006). No Brasil, especificamente no estado do Rio de Janeiro, vem ocorrendo uma epidemia de esporotricose que se caracteriza pela transmissão zoonótica da doença em ambiente domiciliar e pelo fato de ter como transmissor o gato doméstico (da SILVA, 2012).

O tratamento da doença nem sempre é fácil, pois as drogas de escolha para combater a esporotricose exigem longos períodos de tratamento e recaídas são frequentes principalmente, em pacientes imunocomprometidos (revisado por ALMEIDA, 2013).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e no controle da esporotricose sugerem que a imunidade mediada por células desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra *S. schenckii*. Porém, estudos recentes demonstraram que anticorpos com especificidade definida apresentam diferentes graus de proteção contra micoses (CASADEVAL; PIROFSKI, 2012). Em algumas doenças fúngicas, o uso de AcMo confere proteção contra o *Paracoccidioides brasiliensis* (BUISSA-FILHO et al., 2008) e o *Candida albicans* (MORAGUES et al, 2003), além de ter modificado o curso da infecção experimental por *Cryptococcus neoformans* em camundongos (RIVERA et al., 2005). Além disso, alguns AcMo desenvolvidos para proteger contra criptococose (LARSEN et al., 2005) e candidíase (PACHL et al., 2006) foram aprovados pelo FDA para avaliação clínica.

Em nosso laboratório, Nascimento et al (2008) relataram pela primeira vez o efeito protetor de um anticorpo específico contra *S. schenckii*. Primeiramente foi descrito que camundongos infectados com esse fungo apresentaram alto nível de anticorpos contra a molécula de 70 kDa, indicando a possível participação de

anticorpos específicos no controle da infecção (NASCIMENTO et al., 2005). Para analisar essa hipótese, um AcMo contra a molécula de 70 kDa foi gerado. Por meio de ensaios de imunização passiva, constatou-se que a administração do AcMo P6E7 em camundongos BALB/c foi capaz de alterar o curso da infecção experimental por *S. schenckii.* Houve uma diminuição da carga fúngica nos órgãos desses animais, sugerindo atividade profilática e terapêutica em relação à esporotricose experimental. A imunolocalização por intermédio do uso do AcMo contra gp 70 mostrou que o antígeno estava localizado preferencialmente na superfície da célula. Em outro estudo, foi demonstrado que as células de levedura opsonizadas com AcMo contra gp70 tiveram um aumento do índice de fagocitose e a produção de TNF-α (FRANCO et al., 2011). Na esporotricose, a proteção sempre foi atribuída a uma forte resposta imune celular. Pela primeira vez, demonstrou-se que anticorpos podem revogar o estabelecimento e o desenvolvimento da doença.

Tendo em vista os resultados desenvolvidos em nosso laboratório e que o principal empecilho do anticorpo monoclonal murino na prática clínica é que ele pode induzir anticorpos antimurinos (HAMA) em pacientes (CHIU et al, 2011). Para melhorar a eficiência da utilização clínica do AcMo P6E7, visamos, no presente trabalho, à síntese de uma versão humanizada para a cadeia variável leve e para a cadeia variável pesada através da tecnologia de engenharia genética. Assim, substituímos o teor de componentes murinos por resíduos de aminoácidos homólogos humanos, para reduzir a possibilidade de induzir imunogenicidade em pacientes. Os anticorpos humanizados podem ser uma terapia alternativa para o tratamento de pacientes com esporotricose.

Além da versão humanizada, propomos a produção de uma versão quimérica do anticorpo P6E7 murino no formato de FvFc. Esse fragmento de anticorpo possui regiões variáveis originais do anticorpo murino que foi utilizado como base para o processo de humanização unido à porção Fc de uma IgG1 humana e teve como função o controle para a molécula recombinante humanizada. Assim, ele determinou o comportamento da ligação e o desencadeamento de funções efetoras consideradas como parâmetro de comparação com a versão humanizada (SILVA, 2008).

Primeiramente fomos conhecer a sequência nucleotídica dos genes que codificam para VL e VH do AcMo P6E7 murino. A partir do mRNA obtido do lisado celular do hibridoma secretor de AcMo P6E7, sintetizamos os cDNAs codificadores

para as porções variável leve e pesada do anticorpo e amplificamos por meio da estratégia de RT-PCR, utilizando uma biblioteca de oligonucleotídeos para região 5' e 3' das VL e VH (Tabela 3 e 4).

Os oligonucleotídeos 308 e 310 da biblioteca para VH foram desenhados por Coloma et al. (1991), que utilizaram o banco de dados de Kabat et al (1991). Foram levadas em consideração todas as degenerações de cada aminoácido para construção desses oligonucleotídeos (CALDAS, 1999).

Os demais oligonucleotídeos de ambas as bibliotecas foram projetados por Zhou et al. (1994), que alinharam as sequências de imunoglobulinas de camundongos disponíveis no banco de dados de Kabat et al. (1991). As sequências similares foram agrupadas. E para cada grupo foi desenhado um oligonucleotídeo putativo; posteriormente, foram comparados um a um com as sequências de imunoglobulinas de camundongo. Selecionaram-se os oligonucelotídeos que apresentaram a melhor complementaridade. Esse processo foi repetido até que todas as sequências de imunoglobulinas do banco de dados fossem cobertas (CALDAS, 1999).

Uma vez determinadas, as sequências das cadeias leve e pesada do AcMo P6E7 analisamos e localizamos as CDRs de cada cadeia. Foram desenhados oligonucleotídeos 5' e 3' para cada cadeia, em que inserimos sítios de restrição para posterior manipulação das cadeia VL e VH. Partimos, então, para a construção do anticorpo quimérico murino. Primeiramente obtivemos scFV, em que a VL e a VH foram fusionadas por meio de um peptídeo conector. Posteriormente o scFV anti-P6E7 foi inserido em vetor de expressão que continha os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana na forma de FvFc.

Na versão proposta para humanização da VH e da VL do AcMo P6E7 (Figura 21), observa-se que as regiões dos *frameworks* correspondem à sequência germinal humana mais próxima e as CDRs murinas da estrutura predita das cadeias variáveis VH e VL foram mantidas. Excetuam-se na versão para cadeia VH proposta para humanização em que os dois primeiros resíduos foram alterados para criação de sítios de clonagens. Também se adicionaram ao final da cadeia proposta para humanização VH e VL sítios para clonagens que foram imprescindíveis para a inserção do gene humanizado no vetor pMIRES. Escolhendo o arcabouço humano mais similar ao anticorpo murino original, pretendíamos favorecer a manutenção de

características estruturais importantes do arcabouço original, permitindo, dessa forma, uma correta orientação espacial dos CDRs (THOMLINSON et al., 1992).

Para a produção dos FvFcs quimérico e humanizado, escolhemos o sistema de expressão para células de mamíferos pMIRES, com o objetivo de alcançar taxas de produção das proteínas recombinantes significativas e estáveis. Esse vetor foi construído pelo grupo do laboratório de Imunologia Molecular da UnB e possui como características um promotor citomegalovírus (pCMV), promotor esse largamente utilizado para expressão de altos níveis de proteínas recombinantes. Apresenta também um sinal de poliadenilação eficiente do vírus 40 de macaco (SV40, do inglês, *Simian Vírus 40*) e uma sequência líder que, quando traduzida, origina um peptídeo sinal para direcionamento da proteína expressa para o aparato secretório da célula. Destaca-se nesse vetor a presença de um sítio de entrada ribossomal interna (IRES) interposto entre o final da região codificadora do anticorpo recombinante e o início da marca de resistência ao antibiótico G418. Essa construção permite a tradução, pelo ribossomo, da sequência do anticorpo clonado e do gene de resistência a partir de um único transcrito na forma policistrônica (SILVA, 2009).

A citada construção permite a geração somente de um transcrito policistrônico que contém a marca de resistência G418, garantindo que, durante o processo de seleção das células transfectadas, somente aquelas produtoras da proteína de interesse serão selecionadas. Isso se dá porque a célula só adquire resistência ao antibiótico G418 quando estiver produzindo o transcrito que contém tanto a marca de resistência como o gene da proteína de interesse.

Atualmente, no âmbito da produção heteróloga de proteínas recombinantes para fins farmacêuticos, destacam-se as células de mamíferos. E nesse cenário a linhagem celular mais favorável para a produção de proteínas recombinantes são as células derivadas de ovário de *hamster* chinês (CHO). Essas células apresentam glicosilação semelhante à dos humanos, uma vez que as estruturas de oligossacarídeos podem variar muito entre diferentes sistemas de expressão. O padrão de glicosilação de uma proteína determina a sua função terapêutica, rejeição ou período de meia-vida da proteína na corrente sanguínea (BETENBAUGH, 2004). Mais de 70% das proteínas recombinantes terapêuticas produzidas em células de mamíferos já disponíveis no mercado são produzidas em células da linhagem CHO

(JAYAPAL et al., 2010; LI et al., 2007). Dessa forma, propomos a expressão das versões humanizadas dos anticorpos anti-P6E7 utilizando essa linhagem.

Foram realizadas transfecções do vetor contendo os FvFcs quimérico e humanizado nas células CHO; as células produtoras de proteínas recombinantes foram selecionadas (Figura 26) e o sobrenadante acumulado foi concentrado, purificado, dialisado e filtrado. Conseguimos obter, em média, uma quantidade de 35 a 45ng/mL dos FvFcs quiméricos e humanizados. Os níveis de expressão obtidos não apresentaram similaridade aos observados em dados da literatura para expressão de células aderidas utilizando vetores com promotor PCM (JAYAPAL et al., 2010; LI et al 2007). Apesar de esses resultados estarem abaixo do esperado, optamos por manter a cultura de células nessas condições, com o intuito de gerar um acúmulo de sobrenadante suficiente para preparação das proteínas para as próximas etapas do trabalho.

Com as amostras purificadas, realizamos ensaio de SDS-PAGE, corado por prata (Figura 28), para verificarmos se a purificação havia sido bem sucedida. Podemos observar, no gel corado com prata que alcançamos um grau de pureza alto nas proteínas recombinantes purificadas, não sendo possível a detecção de contaminantes. A banda referente aos FvFcs quimérico e humanizado pode ser observada em torno de 55 kDa, na sua forma monomérica.

Os anticorpos são produtos naturais do sistema imunitário e interagem com outros componentes do sistema imunológico. A proteção obtida por anticorpos pode se dar por intermédio de lise mediada pelo complemento, melhoria ou inibição de fagocitose, a liberação de citocinas mediada pela porção Fc ou efeitos antimicrobianos (revisado por ALMEIDA, 2013).

Um mecanismo importante na proteção mediada por anticorpos é a opsonização do microrganismo pelo receptor Fc gamma (FCγR) (ALVAREZ et al., 2008). FCγR realiza a mediação de várias funções dos macrófagos, incluindo fagocitose, estimulação da secreção de citocinas, ativando a explosão respiratória e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CLAVEL et al, 2008; RICHARDS et al., 2008).

Os resultados obtidos com P6E7 murino mostraram que as células de levedura opsonizadas com anti-gp70 aumentaram o índice fagocítico de macrófagos murinos. No entanto, o macrófago não foi capaz de matar as leveduras de *S. schenckii.* Essa constatação sugeriu que os macrófagos apresentam um potencial

limitado de eliminação da carga fúngica. Estudos anteriores também demonstraram que os macrófagos exercem um papel limitado na proteção contra a infecção por *S. schenckii* (FRANCO et al, 2011).

Nossos resultados mostraram que os fragmentos FvFcs de P6E7 humano e quimérico têm capacidade de ligação à gp 70 e que as células de levedura de *S. schenckii* opsonizadas com os dois fragmentos na forma FvFc humanizado ou quimérico elevaram o índice fagocítico dos macrófagos (Figura 29). Porém, no presente estudo não foi analisada a capacidade dos macrófagos de destruir as leveduras de *S. schenckii* opsonizadas pelos FvFcs anti- gp 70 e a subsequente produção de citocinas.

Precisamos caracterizar melhor os mecanismos de interação durante a fagocitose mediada por anticorpos para compreendermos o papel dos FvFcs gerados durante a resposta imune do hospedeiro e também para avaliarmos os mecanismos de ação passiva dos FvFcs anti-gp70 na terapia da esporotricose experimental.

Finalmente, devemos considerar que o presente trabalho trouxe uma evolução no contexto atual de desenvolvimento de biofármacos como terapia antimicrobiana, pois apresenta avanços na terapia humana, com perspectivas de aplicação no tratamento das micoses que afetam seres humanos, especificamente esporotricose.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ✓ Conseguimos obter sequências das cadeias variáveis leve e pesada do AcMo P6E7;

- ✓ Foram realizadas a proposição e a síntese dos genes que codificam para a versão humanizada da VH e VL na forma de scFV do anticorpo AcMo anti-gp70;

- ✓ Construíram-se duas versões da FvFc humana e quimérica do AcMo P6E7.

- ✓ A expressão das proteínas recombinantes em células de mamífero CHO mediante a utilização de vetor de expressão pMIRES apresentou níveis de estabilidade satisfatória;

- ✓ As proteínas recombinantes apresentaram capacidade de ligação ao antígeno de 70 kDa de *S. schenckii;*

- ✓ As proteínas recombinantes apresentaram capacidade de opsonizar as leveduras de *S. schenckii* e assim aumentaram o índice fagocítico dos macrófagos humanos;

- ✓ Ainda precisamos avaliar a capacidade dos macrófagos de matar as leveduras após a fagocitose, a resposta imune celular, a produção de citocinas e a realização de ensaios *in vivo*, com o intuito de verificar se os anticorpos construídos têm efeito protetor.

- ✓ E avaliar a capacidade do FvFc humanizado anti-P6E7 de controlar a infecção relativa à esporotricose experimental em animais sadios e imunodeficientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; et al. In: Imunologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Revinter. Cap.3, p.36-50, 2005.

ABHINANDAN, K.R.; MARTIN, A. C.R. Analysis and prediction of VH/VL packing in antibodies. Protein Engineering, Design & Selection. 23(9): 689–697, 2010.

ALMEIDA, S. R. In: Micologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 6, p.64-66, 2008.

ALMEIDA, S. R. Therapeutic monoclonal antibody for sporotrichosis. Front Microbiol.409 (3): 1-4, 2013.

ALVAREZ, M.; et al. Antibody action after phagocytosis promotes Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii macrophage exocytosis with biofilm-like microcolony formation. Cell Microbiol. 10: 1622–1633, 2008.

ALVIANO, D. S.; et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. Infect.Immun. 72:229–237, 2004.

ANDERSEN, D. C.; REILLY, D. E. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. Current Opinion in Biotechnology. 15:456– 462, 2004.

ARENAS, R. In: Micologia Médica Ilustrada, 3ª edição México City, México: McGraw-Hil; p.149-160, 2008.

AZEVEDO, M.O.; et al. Técnicas básicas de biologia molecular. Brasília:Universidade de Brasília. Cap. VIII, p.129, 2003.

AZULAY, R. D.; In: Dermatologia: Micoses subcutâneas e sistêmicas.Rio de Janeiro: Guanabar- Koogan, p. 285- 301, 2004.

BARNES, L.M.; et al. Dickson, Advances in animal cell recombinant protein production:GS-NS0 expression system. Cytotechnology. (32) 109–123, 2000.

BARROS, M. B. L.; et al. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil:epidemiological aspects of a series of cases. Epidemiol. Infect. 136:1192-1196, 2008.

BARROS, M. B.; et al. A. *Sporotrix schenckii* and Sporotricose. Clin Microbiol Rev.(4):633-54, 2011.

BENJAMIN, R. J.; et al. Tolerance to rat monoclonal antibodies: Implications for Serotherapy. Journal of Experimental Medicine. 163: 1539- 1552, 1986.

BETENBAUGH, M J.; et al. Biosynthesis of human-type N-glycans in heterologous systems. Curr Opin Struct Biol. 14: 601-606, 2004.

BOOY, E. P.; et al. Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics. Arch.Immunol. Ther. Exp.54: 85–101, 2006.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. Introduction to protein. New York: Garland Publishing. p.302, 1991.

BRÍGIDO, M. M. Clonagem e expressão em *Escherichia coli* da porção variável de dois anticorpos anti-Z-DNA, 1992. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade São Paulo, 1992.

BRÜDDEMANN, M.; et al. The immunogenicity of chimeric antibodies. Journal of Experimental Medicine. 170: 2153- 2157, 1989.

BUISSA- FILHO, R.; et al. The Monoclonal Antibody against the Major Diagnostic Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* Mediates Immune Protection in Infected BALB/c Mice Challenged Intratracheally. INFECTION AND IMMUNITY. 76 (7): 3321–3328, 2008.

CALDAS, C. A. Construção de versões Hemi-humanizadas da porção variável de um anticorpo anti-CD18 Humano, 1999. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 1999.

CARDOSO, D. B. S.; et al. Isolation and characterization of a glucocerebroside (monoglucosylceramide) from Sporotrix schenckii. FEEMS Microbiol. Lett. 43: 279-282, 1987.

CARLOS, I. Z.; et al. Detection of cellular immunity with the soluble anitigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. Mycopathologia. 117:139-144, 1992.

CARLOS, I. Z.; et al. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. Mycopathologia. 168 (1):1-10, 2009.

CASADEVALL, A. Antibody immunity and invasive fungal infections. Infection and Immunity. 63 (11): 4211- 4218, 1995.

CASADEVALL. A.; PIROFSKI L. A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. Cell Host Microbe. 11 (5):447-56, 2012.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. FEMS Microbiol Rev, 24 (1): 45-66, 2000.

CHADD, H. E.; CHAMOW, S. M. Therapeutic antibody expression technology. 12(2): 188-194, 2001.

CHATENOUD, L. CD3-specific antibody- induced active tolerance: from bench to bedside. Nature Reviews Immunology. 3: 123- 132, 2003.

CHATENOUD, L. Anti-CD3 antibodies: towards clinical antigen-specific immunomodulations. Current Opinion in Pharmacology. 4: 403–407, 2004.

CHATURVERDI, A. K.; et al. Monoclonal immunoglobulin G1 directed against A*spergillus fumigatus*cell wall glycoprotein protects against experimental murine aspergillosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 1063–1068, 2005.

CHIU W.; et al. Humanization and characterization of an anti-human TNF-α murine monoclonal antibody. PLoS ONE. 6(1): 1-9, 2011.

CIVILA, E. S.; et al. Importatnce of the direct examination in the diagnostic of cutaneous sporotrichosis. Int. Journal Dermatol. 43: 808- 810, 2004.

CLAVEL, C.; et al. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcgamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. Arthritis Rheum.58:678–688, 2008.

CO, M.S.; QUEEN, C. Humanized antibodies for therapy. Nature. 351:501-502, 1991.

COLOMA, M. J.; et al. Primer design for the cloning of immunoglobulin heavy-chain learder-variable regions from mouse hybridoma using PCR. Bio Techniques. 11: 152-156, 1991.

COSTA, A, R.; et al. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production.European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 74: 127–138, 2010.

da SILVA, M. B. T.; et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. Cad. Saúde Pública. 28(10): 1867-1880, 2012.

de BERNARDES, F.; et al. Protective role of antimannan and anti- aspartyl proteinase antibodies in experimental modelo of *Candida albicans* vaginitis in rats. Infect Immun.65: 3399-3405, 1997.

de MEYER, E. M.; et al. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii complex. Mycology. 100(4):647-61, 2008.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant protein by microbes and high organisms. Bitechnology Advances. 27: 297-306, 2009.

DICKERSON, C.L.; et al. Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis. Infect Immun. 40: 417-420, 1983.

ELBAKRI, A.; et al. The state of antibody therapy. Human Immunology. 71: 1243–1250, 2010.

FIGUEIREDO, C. C.; et al. The in vitro interaction of Sporotrix schenckii with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. Microbial Pathogenesis. 36: 177-188, 2004.

FRANCO, D. L. et al. Antibody against *Sporotrix schenckii* enhance TNF-_ production and killing by macrophages. Scand J Immunol. 75: 142-146, 2011.

GARRISSON, R.; et al. An extracellular substance of *Sporotrix schenckii* in human infection. Mykosen. 26: 462- 468, 1983.

GERNGROSS, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nat Biotechnol. 22(11):1409-14, 2004.

GUARRO, J.; et al. Developments in fungal taxonomy. Clinical Microbiology Reviews. 12(3): 454-500, 1999.

HALL, T. BioEdti: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis programa for Windows 95/98/NT. Carlsbad: Ibis Biosciences 2007.

HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol. 166(4):557-580, 1983.

HAY, R. J.; In: Tratado de micologia: Micoses profundas. Rio de Janeiro: Revinter, p.2372- 2373, 2005.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol. 23 (9): 1126-1136. 2005.

HOWARD, D. H. Dimorphism of *Sporotrix schenckii*. Journal of Bacteriology. 81(3):464- 469, 1961.

ISHIZAKI, H. Some antigenic substances culture filtrate of *Sporotrichum schenckii*. Japan Journal dermatol. 80: 16- 23, 1970.

JAMES, K.; BELL, G. T. Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects. *J. Immunol. Methods* .100: 5–40, 1987.

JANEWAY C.A. et al. In: Imunologia: o sistema imune na saúde e na doença. Porto Alegre: Artmed. Cap.3, p.103-113, 2007.

JAYAPAL, K. P.; et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. CHO Consortium SBE Special Section. 40-47, 2010.

JONES, P. T., et al. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. Nature. 321, 522–525, 1986.

KABAT, E. A.; et al. Sequences of proteins of immunological interest. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. Clin Infect Dis. 29: 231-236, 1999.

KELLEY, B. Industrialization of mAb production technology. *MAbs* .1 (5): 443–452, 2009.

KENANOVA, V. et al. Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti– carcinoembryonic antigen single- chain Fv-Fc antibody fragments. Cancer Res. 65: (2), 2005.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256(5517):495-4977, 1975.

KRACKER, S.; DURANDY, A. Insights into the B cell specific process of immunoglobulin class switch recombination. Immunology Letters. 138(2): 97–103, 2011.

KWON-CHUNG; BENNETT. J. E. In: Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, cap. 20, p.479- 497,1992.

LACAZ, C. S., et al. Tratado de Micologia Médica: Esporotricose e outras micoses gomosas. São Paulo: Sarvier. Cap.20, p.479- 497, 2002.

LARCEN, R. A., et al. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murinederived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis.Antimicrob Agents Chemother. 49(3):952-8, 2005.

LEVITZ, S. M. Overview of host defenses in fungalinfections. Clin. Infect. Dis. 14(1): S37- S42, 1992.

LI, B.; et al. Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. Immunology. 116(4): 487-498, 2005.

LI, J.; et al. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. J Immunol Methods, 318(1-2): 113-124,2007.

LLOYD, K. O.; BITTON, M. A. Isolation and purification of peptido-rhamnomanana from yeast form of *Sporotrix schenckii*. Strutural and immunochemical studies. Journal Immunol. 107(3): 663-671, 1971.

LOPES-BEZERRA L.M., et al. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. Annals of the Brazilian Academy of Sciences. 78: 293-308, 2006.

LUTZ, A.; ESPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. Contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. Rev. Med. São Paulo. 10(21): 433-450, 1907.

MARANHÃO, A. Q.; BRIGIDO, M. M. Anticorpos Humanizados. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. v. IV, 2001.

MARIMON, R., et al. *Sporotrix brasiliensis, S. globosa* and *S. mexicana*, three new Sporotrix species of clinical interest. J. Clin Microbiol. 43: 3198-3206, 2007.

MARQUES, S. A. et al. Sporotrichosis: survey and clinical aspects from Botucatú School of Medicine, state of São Paulo. An. Bras. Dermatol. 72: 343- 347, 1997.

MATTOS GROSSO, D. et al. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. Infect. Immun. 71: 6534–6542, 2003.

McCAMISH, M.; WOOLLETT, G. Worldwide experience with biosimilar development.MAbs. 3 (2): 209-217, 2011.

MENDONZA, M. et al. Production of culture filtrates of Sporotrix schenckii in diverse culture media. Med Mycol. 40 (5): 447- 454, 2002.

MILSTEIN, C. Handbook of Experimental Immunology: Overview: monoclonal antibodies. Applications of Immunological Methods in Biomedical Sciences. In:. Oxford: Black Scientific Publicatrions. 107-112, 1986.

MISTRY, P. K. et al. Therapeutic delivery of proteins to macrophages: implications for treatment of Gaucher's disease. Lancet. 348(9041): 1555-1559, 1996.

MOLNÁR, E.; et al. Targeting with scFv: immune modulation by complement receptor specific constructs. J. Mol. Recognit. 16: 318–323, 2003.

MORAGUES, M. D.; et al. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. Albicans* activities. Infect. Immun. 71:5273–5279, 2003.

MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. Clinical and Ex.dermatology. 27: 427-431, 2002.

MORRIS-JONES, R.; et al. Synthesis of melanin-like pigments by Sporothrix schenckii in vitro and during mammalian infection. Infect. Immun. 71:4026–4033, 2003.

MORRISON, S. L.; et al. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domain. J. of Rheumatology. 25:221-228, 1984.

MOUNTAIN, A.; ADAIR, J.R. Engineering antibodies for therapy. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 10: 1-141, 1992.

MUKHERJEE, J.; et al. Antibody mediated protection in mice with lethal intracerebral Cryptococccus neoforms infection. Proc Nat acad Sci USA. 90: 3636-3640, 1993.

MUYLDERMANS, S. Nanobodies: Natural Single-Domain antibodies.Annu. Rev. Biochem. 82: 17-23, 2013.

NASCIMENTO, R.C.; ALMEIDA, S.R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. FEMS Immunol Med Microbil. 43: 241-247, 2005.

NASCIMENTO, R.C. et al. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70 kDa putative adhesin of *Sporotrix schenckii* induces proctetion in murine spotrichosis. Eur J Immunol. 38: 1-10, 2008.

NELSON, A. L. et al. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics.Natue reviews -Drug Discovery. 9: 767-774, 2010.

NEUBERGER, M. S. et al. Memory in the cell-B compartment antibody affinity maturation. The Royal Society. 355: 357- 360, 2000.

NOSANCHUK, J. D. et al. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. J. Clin. Investig. 112:1164–1175, 2003.

OZTURK,S.S.; HU, W.S. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellbased Therapies, CRC Press, New York, 2006.

PLOUFFE, J.F.Jr. et al. Cell-mediated immune response in sporotrichosis. J infect Dis. 139: 152-157, 1979.

PRESTA, L. G. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. Adv. Drug Deliv Rev. 58 (5/6): 640- 656, 2006.

PRESTA, L. G. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. Current Opininion in Immunology. 20: 460- 470, 2008.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. The 43-kDA glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. Arch biochem Biophys. 289: 298-302, 1991.

RAMOS-E-SILVA, M., et al. Sporotrichosis. Clinics in Dermatology. 25: 181-187, 2007.

READ, S. I.; SPERLING, L.C. Feline sporotrichosis transmission to man. Arch. Dermatol. 118 (6): 429- 431, 1982.

REICHER, J. M.; PAVLOU, A. Monoclonal antibodies market. NATURE REVIEWS. 3:383- 384, 2004.

REICHER, J. M. Monoclonal antibodies as innovative therapeutics. Curr Pharm Biotechnol. 9(6):423-30, 2008.

REICHER, J. M. Antibodies to watch in 2010. **MAbs**. 2: 84–100, 2010.

REICHER, J. M. Which are the antibodies to watch in 2013? **MAbs**. 5(1):1-4, 2013.

REICHER, J. M. Antibodies to watch in 2013: Mid-year update. **MAbs.** 5(4): 1-5, 2013.

RICHARDS, J. O.; et al. JR. Optimization of antibody binding to Fc gamma RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. **Mol Cancer Ther.** 7: 2517–2527, 2008.

RIPPON, J.W. Sporotrichosis. In: **Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. Phyladelphia: WB Saunders. Cap.11, p.325-352, 1988.

RIVERA, J. et al. Antibody-mediated protection against Cryptococcus neoformans pulmonary infection is dependent on B cells. **Infect Immun**. 73(2):1141-50, 2005.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology.** 4: 1-12, 2004.

ROMEO, O.; CRISEO, G. What lies beyond genetic diversity in Sporothrix schenckii species complex?: New insights into virulence profiles, immunogenicity and protein secretion in S. schenckii sensu stricto isolates. **Virulence**. 4 (3):203-2066, 2013.

ROMERO-MARTINEZ, R. et al. Biosyntesis and functions of melanin in *Sporotrix schenckii.* **Infection and Immunity**. 68(6): 3696- 3703, 2000.

RUGGIERO, L. A. Clonagem e expressão de anticorpos recombinantes em células de ovário de hamster chinês (CHO) em cultura, 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 2002.

RUIZ-BACA, E. et al. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of Sporothrix schenckii involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. **Med. Mycol**. 47:185–196, 2009.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning- a laboratory manual**. 2ª ed. Cold spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

SAMPAIO, S. A. P.; LACAZ C. S. Clinical and statistical studies on sporotrichosis in São Paulo (Brazil). **Hautarzt**. 10: 490- 493, 1959.

SÁNCHEZ-ALEMÁN, M. A., et al. Aislamiento y caracterización de cepas slivestres e invertigación de reactors a la esporototicina. **Gac. Med. Mex**. 140 (5): 507- 512, 2004.

SCHECHTMAN, R. C. Sporotrichosis: Part I. **SKINmed.** 8 (4): 216-220, 2010.

SCHECHTMAN, R. C. Sporotrichosis: Part II. **SKINmed.** 8 (5): 275- 280, 2010.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by fungal caused by a fungus possibly related to sporothrichia. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**. 9: 286-290, 1898.

SCOLNIK, P. A. mAbs: a business perspective. **MAbs**. 1(2):179-84, 2009.

SCOTT, E. N.; MUCHMORE, H.G. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporotrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology.** 27:300-304, 1989.

SHIRAISHI, A. et al. Role of cell-mediated immunity in resistence to experimental sporotrichosis in mice. **Mycopathology.** 120: 15-21, 1992.

SHUBACH A. et al. Epidemic sporotrichosis**. Curr Opin Infect Dis.** 21(2):129-33, 2008.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica.** Guanabara- Koogan**,** Rio de Janeiro, 1999.

SILVA, H.M. Caracterização da atividade ligante e da função efetora de Anticorpo humanizado Anti-CD3 Humano, 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2008.

SILVA, H.M. et al. Novel humanized anti- CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in humam peripheral blood mononuclear cells. **Immunology Letters**. 125: 129-136, 2009.

SINGER-VERMES, L.M.; et al. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in experimental murine model. **Exp Immunol.** 97: 113-119, 1994.

SPECTOR, D. L.; et al. Cells: a laboratory manual. New York: CSHL press. 1.1-2.13 p, 1998.

STEINMAN, L., et al. In vivo effects of antibodies to immune response gene products: Prevention of experimental allergic encephalitis. **Proc. NatL Acad. Sci. USA Immunology**.78 (11): 7111-7114, 1981.

TACHIBANA, T. et al. Involviment of CD4+ T cells and acrophages in acquired protection against infection with *Sporotrix schenckii* in mice. **Med. Mycol**. 37: 397, 1999.

TOMLINSON, I. M.; et al. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops**. J Mol Biol**. 227(3): 776-798, 1992.

TRABULSI L.R.; ALTERTHUM F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRAVASSOS, L. R., et al. Comparison of rhamnomannans from the human pathogen Sporotrix schenckii with those from the Ceratocystis species. **Infection and Immunity**. 8 (5): 685- 693, 1973.

TRAVASSOS, L. R. **Immunology of fungal disease:** Antigenic strutures of Sporotrix schenckii. New York: Dekker. Cap.8, p. 193- 221, 1989.

UENOTSUCHI, T. et al. Differential induction of Th1- prone immunity by human dendritic cells activated with Sporotrix schenckii of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. **International Immunology**. 18 (12): 1637-1646, 2006.

VAZ DE ANDRADE, E. et al. Single-Chain Fv with Fc Fragment of the Human IgGl Tag: Construction, *Pichia pastoris* Expression and Antigen Binding Characterization. **J. Biochem.** 128:891- 895, 2000.

VAZ DE ANDRADE, E. et al. Thermodynamic basis for antibody binding to Z-DNA: comparison of a monoclonal antibody and its recombinant derivatives. **Biochim Biophys Acta**. 1726(3) 293-301, 2005.

Vásquez-del-Mercado E.; et al. Sporotrichosis. **Clin Dermatol**. 30(4):437-43, 2012.

VERDAN, F. F. et al. Dendritic cell are able to differentially recognize Sporothrix schenckii antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. **Immunobiology**. 217(8):788-94, 2012.

VIEIRA-DIAS, R.; et al. Ocular and concomitant cutaneus sporotrichosis. **Mycoses**. 40(5/6): 197- 201, 2007.

VILELA, R.; et al. Cutaneous and meningeal sporotrichosis in a HIV patient. **Rev. Iberoam. Mocol**. 24 (2): 161- 163, 2007.

YANG, J.D., et al. Fed-batch bioreactor process scale-up from 3-L to 2500-L scale for monoclonal antibody production from cell culture, Biotechnol. **Bioeng**. 98: 141–154,2007.

YUPIN, C. The roles of humoral and cellular immune responses in experimental sporotrichosis in the hamster. **Dissertation Abstr. Intern B**. 37: 1553- 1554, 1976.

WALDMANN, T. A. Immunotherapy: past, present and future. **Nature Medicin**. 9 (3):269–277, 2003.

WANG, Z.; et al. A therapeutic anti-CD4 monoclonal antibody inhibits T cell receptor signal transduction in mouse autoimmune cardiomyopathy. **Chinese Medical Journal**.120(15):1319-1325, 2007.

WANG, S. Advances in the production of human monoclonal antibodies. **Antibody Technology Journal.** 1:1-4, 2011.

WATANAKUNAKORN C. Photo quiz. Sporotrichosis. **Clin Infect Dis**. 22(5):765- 837, 1996.

WELLS, J.; et al. Active immunization against *Pneumocystis carinii* with a recombinant *P. Carinii* antigen. **Infect. Immun**. 74:2446–2448, 2006.

WINTER, G.; HARRIS, W. J., Humanized antibodies. **Immunology Today**. 14: 243-252,1993.

WINTER, G.; MILSTEIN**,** C. Main-made antibodies. **Nature**. 349: 293-299, 1991.
WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nat Biotechnol**. .22 (11): 1393-1398, 2004.

WRIGHT, F.; MORRISON, S. L. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. **Trends Biotechnol**. 15 (1): 26- 32, 1997.

ZHOU, H.; et al. Optimization of primer sequences for mouse scFv repertoire display library construction. **Nucleic Acid Research**. 22: 888- 889, 1994.