

**JOÃO VICTOR BATALHA DE CARVALHO**

**ANTICORPO MONOCLONAL HUMANIZADO ANTI-CD3: obtenção e caracterização físico-química e funcional com avaliação do perfil imunorregulatório**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**São Paulo - SP  
2022**

# **JOÃO VICTOR BATALHA DE CARVALHO**

**ANTICORPO MONOCLONAL HUMANIZADO ANTI-CD3:** obtenção e caracterização físico-química e funcional com avaliação do perfil imunorregulatório.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Moro.

Versão Corrigida.

**São Paulo – SP  
2022**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Batalha de Carvalho, João Victor  
ANTICORPO MONOCLONAL HUMANIZADO ANTI-CD3:  
obtenção e caracterização físico-química e funcional  
com avaliação do perfil imunorregulatório / João  
Victor Batalha de Carvalho; orientadora Ana Maria  
Moro. -- São Paulo, 2022.  
100 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Anti-CD3. 2. Humanização. 3. Citometria de  
fluxo. 4. Treg. 5. Citocinas. I. Moro, Ana Maria,  
orientador. II. Título.



Programa de Pós-Graduação em Imunologia | Pensando e Inovando em Imunologia  
Universidade de São Paulo

---

Declaração BMI. CCP. 29/novembro/2022

## DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Senhor João Victor Batalha de Carvalho, defendeu o título de Doutor, área de Imunologia, tendo sido aprovado em prova pública na Tese de Doutorado realizada no dia 29 de novembro de 2022, que, oportunamente, será homologada pela comissão de pós-graduação. O trabalho apresentado tem como título: "ANTICORPO MONOCLONAL HUMANIZADO ANTI-CD3: obtenção e caracterização físico-química e funcional com avaliação do perfil imunorregulatório". A comissão julgadora foi constituída pelos seguintes docentes: Profs. Drs. Ana Maria Moro (Presidente); Denise Moraes da Fonseca; Keity Souza Santos e Aryene Góes Trezena.

São Paulo, 29 de novembro de 2022.

Prof. Dra. **Ana Paula Lepique**  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Imunologia  
do ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 04 de fevereiro de 2019.

**PARECER 1425/CEPSH**

CAAE nº 03606718.4.0000.5467

Protocolo CEPSH-ICB nº 1465/18

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Anticorpo monoclonal humanizado anti-CD3: obtenção e caracterização fisicoquímica e funcional**", dos pesquisadores Profa. Dra. **Ana Maria Moro** e aluno João Victor Batalha de Carvalho.

Caberá aos pesquisadores, em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012: 1) elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) conforme modelo constante no site: [ww2.icb.usp.br/icb/cepsb](http://ww2.icb.usp.br/icb/cepsb); 2) desenvolver o projeto conforme metodologia apresentada; 3) manter em arquivo sob sua guarda (impresso ou digital), por até 5 anos após conclusão da pesquisa, toda documentação relacionada a pesquisa; 4) encaminhar os resultados para publicação; 5) justificar ao CEP, via Plataforma Brasil, interrupção do projeto ou a não publicação de resultados; 6) finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **04/02/2020**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wanisia Batalha de Carvalho e Anselmo Rodrigues de Carvalho, por toda paciência, confiança, amor, atenção e amparo financeiro.

À minha mãe, Nadiele Santos de Oliveira, por todo o amor e cuidado dedicados a mim em mais uma parte importante da minha vida.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Moro, pelas oportunidades, confiança, ensinamentos e paciência.

À Ana Paula Guimarães de Moraes pela amizade, estímulo, amparo, paciência e confiança.

À Dr.<sup>a</sup> Daniela Yumi Takata pelo acolhimento, confiança, ensinamentos, preocupação, intimidade, amor e atenção.

À Dr.<sup>a</sup> Carol Georg Magalhães pela amizade, risadas, ensinamentos, animação e estímulo.

À Dr.<sup>a</sup> Tânia Maria Manieri pelos ensinamentos, apoio profissional, espiritual e grande amizade.

À Fátima Aparecida Mendonça de Oliveira e Roselaine Campos Targino por toda a ajuda profissional, mas, principalmente, pelo enorme carinho, ensinamentos, cuidado e atenção.

À Dr.<sup>a</sup> Adriele Silva Alves de Oliveira pela amizade, ensinamentos, atenção, preocupação e risadas.

A todos aqueles que integram, ou já integraram, a equipe do Laboratório de Biofármacos, do Instituto Butantan, da USP, ou de qualquer outro lugar. Vocês, sem a menor dúvida, contribuíram de uma forma muito positiva e engrandecedora na minha jornada.

Às agências, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, cota institucional), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, cota institucional e DTI-B 380316/2022-6), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP projeto nº 2019/10724-2) e Fundação Butantan, pelo amparo financeiro nos projetos, bolsas e conteúdo científico.

Sem todos vocês nada disso seria possível, e nem faria o menor sentido.

Muito Obrigado!

Alguma coisa acontece no meu coração  
Que só quando cruza a Ipiranga e a avenida São João  
É que quando eu cheguei por aqui eu nada entendi  
Da dura poesia concreta de tuas esquinas  
Da deselegância discreta de tuas meninas

Ainda não havia para mim, Rita Lee  
A tua mais completa tradução  
Alguma coisa acontece no meu coração  
Que só quando cruza a Ipiranga e a avenida São João

Quando eu te encarei frente a frente não vi o meu rosto  
Chamei de mau gosto o que vi, de mau gosto, mau gosto  
É que Narciso acha feio o que não é espelho  
E à mente apavora o que ainda não é mesmo velho  
Nada do que não era antes quando não somos Mutantes

E foste um difícil começo  
Afasta o que não conheço  
E quem vem de outro sonho feliz de cidade  
Aprende depressa a chamar-te de realidade  
Porque és o avesso do avesso do avesso do avesso

Do povo oprimido nas filas, nas vilas, favelas  
Da força da grana que ergue e destrói coisas belas  
Da feia fumaça que sobe, apagando as estrelas  
Eu vejo surgir teus poetas de campos, espaços  
Tuas oficinas de florestas, teus deuses da chuva

Pan-Américas de Áfricas utópicas do mundo do samba  
Mais possível novo Quilombo de Zumbi  
Que os Novos Baianos passeiam na tua garoa  
E novos baianos te podem curtir numa boa.

Caetano Emmanuel Viana Telles Veloso. *Sampa*.  
Universal Music Group: 1978.

Trabalho realizado no Laboratório de Biofármacos do Instituto Butantan sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria Moro. O projeto recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e foi realizado com bolsas de doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, cota institucional e DTI-B 380316/2022-6), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, cota institucional) e FAPESP projeto nº 2019/10724-2.



## RESUMO

CARVALHO, JVB. **ANTICORPO MONOCLONAL HUMANIZADO ANTI-CD3:** obtenção e caracterização físico-química e funcional com avaliação do perfil imunorregulatório. 2022. 100 p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O CD3 é um conjunto de cadeias proteicas não-covalentemente associadas às cadeias do receptor das células T (TCR). O complexo CD3 é essencial para a ativação dos linfócitos T e até para a correta expressão do seu TCR na superfície celular. O complexo TCR-CD3 é alvo de várias imunoterapias focadas na regulação da atividade dessas células. Anticorpos monoclonais (mAbs) anti-CD3 possuem grande potencial no tratamento de doenças autoimunes (diabetes mellitus I, doenças inflamatórias do intestino), na indução de tolerância em transplantes alogênicos e na imunoterapia oncológica (anticorpos bi-específicos). O mAb anti-CD3 produzido por hibridoma murino possui limitações de uso terapêutico pela indução de reações adversas como proliferação de células T e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Para evitar problemas associados à imunogenicidade das moléculas não-humanas, alguns mAbs anti-CD3 passaram por humanização, como o Otelixizumab, Visilizumab, Teplizumab. O uso experimental de mAbs anti-CD3 humanizados tem sido associado a um aumento de linfócitos T reguladores (Treg) e de citocinas relacionadas com um perfil imunorregulador. Para testar o potencial imunorregulador de um anti-CD3 humanizado a partir de um hibridoma reclonado no Instituto Butantan, este trabalho propõe a avaliação da atividade imunorreguladora induzida por mAbs anti-CD3 humanizados através de ensaios *in vitro*. Os genes das cadeias leve e pesada da molécula humanizada *in silico* foram clonados em vetor pCHO e transfectados em células CHO-S. Os clones foram avaliados pela produtividade, crescimento celular e ligação ao CD3 humano. Para os ensaios de ligação por ressonância plasmônica de superfície (SPR) foi expresso um antígeno humano CD3 gama-épsilon. O gene do antígeno recombinante foi construído por *DNA assembly* e expresso em *Escherichia coli*. O perfil de ligação dos anticorpos humanizados é mais baixo do que aquele visto com o anti-CD3 murino, o que indica uma menor afinidade da molécula humanizada. Dos 280 clones de anti-CD3 humanizado, foram selecionados alguns para os ensaios funcionais *in vitro* com PBMC humano, além do *pool* estável pré-clonagem. Por citometria de fluxo a taxa de proliferação de dois clones avaliados foi mais baixa do que a induzida por tratamento com o anti-CD3 murino em ambas as concentrações testadas (1 e 5 µg/mL). O tratamento com o anticorpo humanizado aumentou a subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> e diminuiu o CD8<sup>+</sup> em relação ao murino. A subpopulação de

Treg (CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>) aumentou com o tratamento humanizado, ao inverso do mesmo com o anticorpo murino. O perfil de citocinas/quimiocinas (48h/192h) para o tratamento com o anti-CD3 murino foi altamente inflamatório no tempo de 48h na avaliação do sobrenadante e nos tempos de 24 e 72 h no ensaio de marcação intracelular. Os clones humanizados apresentaram um perfil próximo ao controle não tratado na avaliação dessas citocinas. Entretanto, o estudo das citocinas intracelulares apresentou um aumento dos “granulócitos” nos grupos tratados com o anticorpo humanizado, sendo que esses grupos não apresentaram um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Estes dados contribuem para a compreensão da cinética do anti-CD3 humanizado, apesar de não conclusivos. Mais estudos são necessários nas possíveis construções do anti-CD3 humanizado (monoespecíficos, biespecíficos etc.).

Palavras-chaves: Anti-CD3, Humanização, Citometria de fluxo, Treg, Tolerância, Citocinas.

## ABSTRACT

CARVALHO, JVB. HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODY ANTI-CD3: obtaining and physico-chemical and functional characterization with evaluation of the immunoregulatory profile. 2022. 100 p. PhD Thesis (PhD in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

CD3 is a protein chain set non-covalently associated with TCR. The CD3 complex is essential to T cell activation even to the correct TCR expression on the cell surface. TCR-CD3's chains are targets for immunotherapies that focus on the regulation of the T cell's activity. Monoclonal antibodies (mAbs) anti-CD3 have the potential to treat autoimmune diseases (diabetes mellitus I, inflammatory bowel diseases), host-vs-graft disease prevention or reversion, and cancer immunotherapy (bispecific antibodies). Production of the murine anti-CD3 mAb by hybridoma has therapeutics limitations associated with its capacity to cause adverse reactions like T cell proliferation induction and pro-inflammatory cytokines secretion. To overcome those issues also associated with non-human molecules' immunogenicity, some anti-CD3 mAbs were humanized like Otelixizumab, Visilizumab, Teplizumab. The experimental usage of humanized anti-CD3 mAbs has been associated with an increase of regulatory T lymphocytes (Treg) and immunoregulatory cytokines. To test the immunoregulatory potential of the humanized anti-CD3 from a murine hybridoma recloned at Butantan Institute, this study aims to evaluate *in vitro* the regulatory activity of clones of humanized anti-CD3 mAbs. The humanized molecule light and heavy chains genes were cloned into pCHO vector, then transfected into CHO-S. The clones were ranked by their specific productivity, cellular growth, and human CD3 binding capacity. For the binding assay by surface plasmonic resonance (SPR) we used an *in-house* recombinant antigen of the human CD3 gamma-epsilon. The recombinant antigen was made by DNA assembly technique and expressed in *E. coli* in inclusion bodies, then solubilized and *in vitro* refolded. The binding capacity of the humanized anti-CD3 was lower in comparison to the murine molecule, it indicates a low affinity of the humanized anti-CD3. From 280 clones expressing the humanized anti-CD3, some were selected for the *in vitro* functional assays with human PBMC. By flow cytometry, the proliferation rate induced by two clones was lower than that induced by the murine anti-CD3 treatment at two concentrations, 1 e 5 µg/mL. The treatment with the humanized antibody increased the CD4<sup>+</sup> subpopulation and decreased CD8<sup>+</sup> cells in relation to the murine version. The Treg (CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>) subpopulation was increased when the humanized mAb was added and decreased with the murine antibody

treatment. The secreted cytokine profile (48 h/192 h) due to the murine anti-CD3 treatment was highly inflammatory at 48 h and at 24 and 72 h in the intracellular assay. However, the two humanized clones showed a profile close to the non-treated group. The intracellular cytokines assay shows more “granulocytes” with humanized anti-CD3, and no IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  were produced by those group of cells. These data contribute to the understanding of the humanized anti-CD3, although not conclusive. More studies are necessary for the possible constructions of the humanized anti-CD3 (monospecific, bispecific etc.).

Keywords: Anti-CD3, Humanization, Flow cytometry, Treg, Tolerance, Cytokines.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Representação do processo de humanização dos anticorpos. ....	21
<b>Figura 2.</b> Esquema da estrutura de uma imunoglobulina G humana.....	26
<b>Figura 3.</b> Vias intracelulares envolvidas na ativação de células T.....	29
<b>Figura 4.</b> Estrutura dos ectodomínios do heterodímero CD3 $\gamma\epsilon$ humano PDB 1SY6 (KJERNIELSEN <i>et al.</i> , 2004). ....	31
<b>Figura 5.</b> Diagrama do gene CD3 $\gamma\epsilon$ . ....	36
<b>Figura 6.</b> Fluxogramas das estratégias de <i>gates</i> para análise dos resultados de citometria de fluxo.....	46
<b>Figura 7.</b> Geração das populações estáveis mistas produtoras de anti-CD3 humanizado.....	48
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia de fluorescência das colônias formadas em meio semissólido. ....	50
<b>Figura 9.</b> Géis de agarose 1% da síntese do gene CD3 $\gamma\epsilon$ . ....	51
<b>Figura 10.</b> Esquema do vetor pAE com a sequência CD3 $\gamma\epsilon$ inserida totalizando 3413 pares de base. ....	52
<b>Figura 11.</b> SDS-PAGE 12% da expressão do antígeno recombinante. ....	53
<b>Figura 12.</b> Cromatograma da purificação do CD3 $\gamma\epsilon$ em coluna com íons de níquel imobilizados. ....	54
<b>Figura 13.</b> SDS-PAGE 12% e western blot do CD3 $\gamma\epsilon$ humano recombinante com anticorpos monoclonais anti-CD3 murinos.....	55
<b>Figura 14.</b> Ensaio de ligação anti-CD3 x antígenos recombinantes.....	56
<b>Figura 15.</b> Ensaio de ligação de anti-CD3 com PBMC humano.....	58
<b>Figura 16.</b> Análise da proliferação de linfócitos totais tratados com diferentes anticorpos anti-CD3.....	60
<b>Figura 17.</b> Gráficos das frequências relativas às subpopulações CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> proliferados (CFSE <sup>-</sup> ).....	62
<b>Figura 18.</b> Gráficos das frequências relativas aos linfócitos proliferados (CFSE <sup>-</sup> ) e subpopulações de linfócitos T. ....	64
<b>Figura 19.</b> Citocinas e quimiocina secretadas pelo PBMC humano em resposta ao tratamento com anti-CD3 em 48 h e 192 h.....	66
<b>Figura 20.</b> Gráficos das frequências relativas (%) do PBMC humano após o tratamento com anti-CD3 murino ou humanizada e brefeldinA. ....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Painéis para citometria de fluxo. ....	45
<b>Tabela 2.</b> Anticorpos comerciais. ....	46
<b>Tabela 3.</b> Cultivo em batelada das populações mistas estáveis. ....	49
<b>Tabela 4.</b> Valores de corte adotados nas diferentes etapas da clonagem dos produtores de anti-CD3 humanizado. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC – citotoxicidade celular dependente de anticorpo;

ADCP – fagocitose celular dependente de anticorpos;

APC (fluorocromo) – alofococianina;

APC – célula apresentadora de antígeno;

ATCC – *American Type Culture Collection*;

bp – base pair (pares de base);

bsAbs – anticorpos biespecíficos;

BSA – albumina sérica bovina;

BV421 – *brilliant violet 421*;

BV510 – *brilliant violet 510*;

C<sub>H</sub> – domínio Ig da cadeia pesada constante;

C<sub>L</sub> – domínio Ig da cadeia leve constante;

CBA – *cytometric bead array*;

CD3 – *cluster of differentiation 3*;

CD3 $\gamma\epsilon$  – heterodímero gama-épsilon do CD3;

CD4 – *cluster of differentiation 4*;

CDC – citotoxicidade dependente de complemento;

CDR – *complementarity determining region*;

CFSE – carboxifluoresceína succinimidil ester;

CHO–S – *chinese hamster ovary cell - derived suspension culture*;

DAB – 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloroeto;

DMSO – dimetilsulfóxido;

dNTP – desoxirribonucleotídeo;

DO – densidade óptica;

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática);

EpCAM – molécula de adesão celular epitelial

Fab – Fragmento de ligação ao antígeno;

FACS – *fluorescence-activated cell sorting*;

Fc – fragmento cristalizável;

FcFv – região do fragmento cristalizável associada a dois fragmentos variáveis;

FcR – receptors de Fc;

FcRn – Receptor de Fc neonatal;

FDA – *Food and Drug Administration*;

FITC – *fluorescein isothiocyanate*;

FOXP3 – *forkhead box P3*;

g – unidade de aceleração correspondente à aceleração gravitacional da Terra;

GALT – tecido linfóide associado ao sistema gastrointestinal;

HC – Cadeia pesada do anticorpo;

HRP – peroxidase de raiz-forte;

HSA – *human serum albumin* (albumina sérica humana);

Ig – imunoglobulina;

IgG – imunoglobulina G;

IL – interleucina;

INF- $\gamma$  – interferon-gama;

IP-10 – proteína indutora de interferon- $\gamma$  10;

IPTG – isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosida;

ITAM – motivos ativadores baseados em tirosina;

$K_D$  = constante de dissociação;

LAP – *latency-associated peptide*;

LC – Cadeia leve do anticorpo;

LCK – *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*;

mAb – *monoclonal antibody* (anticorpo monoclonal);

Meio LB – meio Luria-Bertani;

MHC – complexo de histocompatibilidade principal;

MTX – metotrexato;

NFAT – fator nuclear ativador de células T;

NF $\kappa$ B – *nuclear factor kappa B*;

NK – *Natural Killer cell*;

NOD – camundongos diabéticos não-obesos;

O.N. – *over night*;

PBMC – células mononucleares do sangue periférico;

PBS – tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline*;

PCR – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase);

PD-1 – proteína 1 de morte celular programada;

PE – ficoeritrina;

PE-Cy7 – *phycoerythrin + cyanine dye 7*;



PerCP–Cy5.5 – *peridinin–chlorophyll–protein complex + cyanine dye 5.5*;

PTK – proteína–tirosina quinases;

Pu – puromicina;

PVDF – *poly vinylidene fluoride co hexafluoropropylene*;

qsp – quantidade suficiente para;

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium;

RU – unidades de ressonância;

SDS – dodecil sulfato de sódio ou sodium dodecyl sulfate;

SDS–PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS;

SFB – soro fetal bovino;

SPR – ressonância plasmônica de superfície ou *surface plasmon resonance*;

T.A. – temperatura ambiente;

T1D – diabetes mellitus tipo 1;

TCR – receptor de células T ou *T cell receptor*;

TEMED – N, N, N', N'– tetrametiletilenodiamina;

TGF– $\beta$  – fator de transformação de crescimento beta ou *transforming growth factor beta*;

Th1 – linfócito T helper 1;

TMB – 3, 3', 5, 5–tetrametilbenzidina;

TNF– $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa ou *tumor necrosis fator alfa*;

Treg – linfócito T regulador;

U – unidade(s);

UFC – unidade formadora de colônia;

V<sub>H</sub> – domínio Ig da cadeia pesada variável;

V<sub>L</sub> – domínio Ig da cadeia leve variável;

WB – *western blot*;

ZAP70 – *Zeta-chain-associated protein kinase 70*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1	A IMUNOTERAPIA E O ANTI-CD3	19
1.2	O ANTI-CD3 E OS BIESPECÍFICOS	23
1.3	O ANTI-CD3 E O INSTITUTO BUTANTAN	24
1.4	MECANISMOS DE AÇÃO DOS MABs	25
1.5	O COMPLEXO TCR-CD3	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
3.1	HUMANIZAÇÃO DO ANTI-CD3	34
3.2	TRANSFEÇÃO E PRODUÇÃO DO ANTI-CD3 HUMANIZADO	34
3.2.1	Transfecção das células CHO-S	34
3.2.2	Purificação dos anticorpos anti-CD3	34
3.2.3	Clonagem das populações estáveis produtoras de anti-CD3	35
3.2.4	Contagem celular e viabilidade	35
3.2.5	ELISA quantitativo para cálculo de produtividade	36
3.3	CONSTRUÇÃO E OBTENÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE CD3 $\gamma\epsilon$	36
3.3.1	Construção da sequência CD3 $\gamma\epsilon$	36
3.3.2	Ligação do gene CD3 $\gamma\epsilon$ ao vetor pAE	38
3.3.3	Clonagem e sequenciamento de DNA	38
3.3.4	Expressão da proteína recombinante CD3 $\gamma\epsilon$	39
3.3.5	Lise celular e <i>refolding</i>	39
3.3.6	Purificação do antígeno recombinante	39
3.3.7	SDS-PAGE coloração por azul de Coomassie	40
3.3.8	Western Blotting	40
3.3.9	Ressonância plasmônica de superfície (SPR)	41
3.4	ENSAIOS FUNCIONAIS COM PBMC HUMANO	41
3.4.1	Obtenção do PBMC humano	41
3.4.2	Congelamento e descongelamento de células	42
3.4.3	Ensaio de ligação PBMC x anti-CD3	42
3.4.4	Marcação com CFSE	43
3.4.5	Tratamento para ensaio de proliferação	44
3.4.6	Tratamento para ensaio com brefeldina-A	44
3.4.7	Citometria de fluxo	44
3.4.8	Avaliação de citocinas secretadas	47

3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
4.1	GERAÇÃO DAS POPULAÇÕES ESTÁVEIS MISTAS DE ANTI-CD3 .....	48
4.2	CLONAGEM DAS POPULAÇÕES ESTÁVEIS PRODUTORAS DE ANTI-CD3 .....	49
4.3	CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE .....	51
4.4	RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE .....	55
4.5	ENSAIOS DE LIGAÇÃO ANTI-CD3 EM CÉLULAS .....	57
4.6	EFEITO DO ANTI-CD3 NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS .....	58
4.7	AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES INDUZIDAS PELO ANTI-CD3 .....	61
4.8	CITOCINAS ENVOLVIDAS NO TRATAMENTO COM ANTI-CD3 .....	64
4.9	SUBPOPULAÇÕES E CITOCINAS INTRACELULARES .....	67
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>
	<b>APÊNDICE A - Sequência do heterodímero humano CD3<math>\gamma</math><math>\epsilon</math> utilizada .....</b>	<b>83</b>
	<b>APÊNDICE B - Sequências dos oligo nucleotídeos utilizados na síntese do antígeno recombinante.....</b>	<b>84</b>
	<b>APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE D – Resultados da análise estatística do ensaio de CBA para quantificação das citocinas do sobrenadante .....</b>	<b>89</b>
	<b>APÊNDICE E – Marcação de CD3 em células tratadas com anti-CD3.....</b>	<b>99</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A IMUNOTERAPIA E O ANTI-CD3

O ano de 1796 pode ser considerado um marco histórico para a imunoterapia envolvendo anticorpos. Ao utilizar pus de feridas de vacas, infectadas com vírus da varíola bovina, para inocular em uma criança de 8 anos, Edward Jenner demonstrou a proteção adquirida contra a varíola humana (NUNES-ALVES, 2016). Mesmo que há época não se sabia como essa proteção funcionava, a conquista de Jenner iniciou uma nova era de estudos e descobertas envolvendo a imunoterapia em humanos.

O desenvolvimento de um soro antidiftérico e antitetânico por Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato em 1891 (BORDON, 2016); a primeira demonstração experimental de imunização polivalente repetida em coelhos associada a uma alta proliferação de células plasmáticas (BJØRNEBOE; GORMSEN, 1943); a comprovação da produção de anticorpos por células plasmáticas *in vitro* (FAGRAEUS, 1947); a descrição da estrutura molecular de uma imunoglobulina humana (SILVERTON; NAVIA; DAVIES, 1977) e a tecnologia do hibridoma que possibilitou a obtenção dos anticorpos monoclonais (mAbs) (KÖHLER; MILSTEIN, 1975) foram alguns dos avanços científicos que viabilizaram o início da imunoterapia humana com mAbs.

Hibridomas são células produtoras de anticorpos imortalizadas pela fusão de células tumorais, de origem mieloide, com linfócitos B parentais (da mesma espécie) proposto por Kohler e Milstein vencedores do Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1984 (C. MILSTEIN, 1975; KUHN, CHANTAL & WEINER, 2016). Além de se obter células produtoras de anticorpos estáveis e replicativas, com essa tecnologia foi possível aumentar as chances de se obter um anticorpo antígeno específico ao imunizar o animal doador dos linfócitos B com o antígeno de interesse. Assim, é possível selecionar e isolar clones de maior interesse avaliando pontos como produtividade, afinidade, especificidade e estabilidade da produção dos anticorpos. Dessa forma, cada clone isolado é cultivado separadamente obtendo uma população celular homogênea produtora de anticorpos monoclonais. Essa metodologia foi pioneira em estudos e avanços biotecnológicos na indução de tolerância (transplante alogênico e doenças autoimunes), que demonstraram resultados clínicos relevantes (KUHN, CHANTAL & WEINER, 2016; PARDOLL, 2012; RIVA; CHOKSHI, 2018).

O primeiro mAb específico à porção  $\epsilon$  do complexo CD3 humano ficou conhecido como OKT3 e foi desenvolvido em 1979 por Kung e colaboradores (KUNG *et al.*, 1979). O OKT3

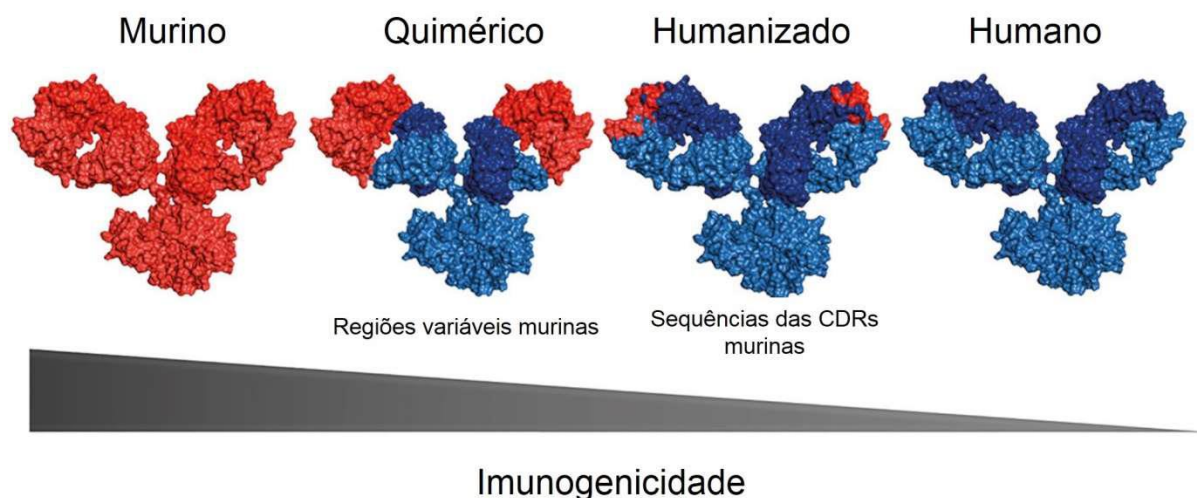
também foi o primeiro mAb a ser aprovado pelo FDA, em 1986 com o nome de Muromonab (Orthoclone®), para imunoterapia humana em pacientes transplantados. Contudo, pelo fato de ser uma molécula (IgG2a) murina, o OKT3 apresentou diversos efeitos colaterais como febre, vômitos, dores de cabeça, diarreia, dores nas articulações, hipotensão etc. (CHATENOUD *et al.*, 1986; SGRO, 1995).

A partir do estudo em camundongos com um anti-CD3 específico ao CD3 murino, demonstrou-se que, após a primeira dose, a porção Fc (fragmento cristalizável) do anticorpo era reconhecida pelos receptores de Fc gama (FcγR) presente em células apresentadoras de antígeno, ao mesmo tempo, que seu fragmento de ligação ao antígeno (Fab) se ligava ao alvo em linfócitos T culminando na ativação destas células e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2 e proliferação celular de linfócitos T efetores (FERRAN *et al.*, 1990; HIRSCH *et al.*, 1988; STEIN *et al.*, 2018). Isso ficou mais evidente com o uso de anticorpos anti-CD3 com região Fc mutada para inibir a interação com os FcRs, capazes de reduzir a tempestade de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a subpopulação de linfócitos T reguladores (Tregs) em comparação com o anti-CD3 original (PENARANDA; TANG; BLUESTONE, 2011). A engenharia da região Fc de mAbs, então, torna-se cada vez mais interessante para a imunoterapia, visto que diversas abordagens já foram descritas resultando em controle do tempo de meia vida do mAb, redução do potencial imunogênico com Fc aglicosilado, aumento da força de ligação e especificidade da interação Fc + FcR para direcionar o mecanismo de ação do mAb, entre outros (KANG; JUNG, 2019).

Por um outro lado, um estudo recente aborda o uso de um *nanobody* (anticorpo de camelídeos) anti-CD3 para tratamento de tumor sólido em camundongos. A capacidade de indução de proliferação de linfócitos T efetores e a tempestade de citocinas pró-inflamatórias, nesse caso, foram os efeitos desejados da proposta de tratamento. Foi conclusivo que com o ajuste de dose o *nanobody* anti-CD3 foi capaz de aumentar a população de linfócitos T efetores infiltrados no tumor levando a redução da massa tumoral (MORADI-KALBOLANDI *et al.*, 2020).

O desenvolvimento da engenharia de anticorpos (SCOTT; WOLCHOK; OLD, 2012) resultou em técnicas de humanização de mAbs. A humanização de um mAb busca manter as características selecionadas no seu correspondente original, tais como: especificidade de ligação da porção Fab ao antígeno e afinidade. Anticorpos quiméricos foram os primeiros a serem obtidos a partir da junção das sequências variáveis murinas com as cadeias constantes humanas (MORRISON *et al.*, 1984) (**Figura 1**).

**Figura 1.** Representação do processo de humanização dos anticorpos.



Proteína murina representada pela cor vermelha e em azul as cadeias humanas (DOS SANTOS *et al.*, 2018).

A humanização de anticorpos também foi importante para a redução de efeitos adversos do anti-CD3 murino. Vários grupos trabalharam, por diversas metodologias, para a humanização do OKT3, utilizando o transplante do CDR (*complementarity determining region*), mutações pontuais na porção Fc e até mesmo obtenção de versões totalmente humanas (ex. Foralumab) (KUHNS, CHANTAL & WEINER, 2016; SERPIERI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009) (**Figura 1**). Até o momento nenhuma das construções humanas ou humanizadas de anti-CD3 foi aprovada pelas agências reguladoras, ainda que vários ensaios clínicos estejam em andamento segundo o website [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), com demonstração de potencialidades e constatação de falhas que levam a novos desenvolvimentos de otimização.

O uso experimental do mAb anti-CD3 murino por via intravenosa apresentou mecanismos de ação relacionados com as porções Fc e Fab. Após cerca de 30 minutos de inoculação o mAb induz o linfócito T a internalizar ou secretar o imunocomplexo anti-CD3 + TCR-CD3 (CHATENOUD, 2003; KUHNS, CHANTAL & WEINER, 2016). O uso terapêutico do mAb anti-CD3 foi também associado ao aumento de subpopulações de Treg e de citocinas regulatórias como TGF- $\beta$  e IL-10 no tratamento de doenças autoimunes (KUHNS, CHANTAL & WEINER, 2016).

O aumento de células Tregs, durante o uso de anti-CD3, deve ser associado à depleção seletiva de linfócitos T efetores, pró-inflamatórios, e preservação de subpopulações de Tregs CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> em experimentos *in vitro* (ABRAHAM *et al.*, 2008); em camundongos saudáveis (PENARANDA; TANG; BLUESTONE, 2011); em modelo animal para doenças autoimunes

como artrite reumatoide (NOTLEY *et al.*, 2010) e diabetes mellitus I (CHATENOUD, 2003, 2019). Um anti-CD3 murino aglicosilado foi capaz de prevenir a destruição das ilhotas pancreáticas, principalmente por inibir linfócitos T-helper 1 (Th1) de produzir INF- $\gamma$  na diabetogênese e aumentar a expressão de PD-1 (proteína 1 de morte celular programada) nas células efectoras de camundongos diabéticos não obesos (NOD) (WALLBERG *et al.*, 2017). Em pacientes com pré-diabetes tipo 1, em estudo de fase clínica 2, foi utilizado o anti-CD3 humanizado Teplizumab (IgG1 kappa não ligante ao Fc $\gamma$ R) por via intravenosa, o que atrasou, por 2 anos em média, a progressão da doença (HEROLD *et al.*, 2019). Esse estudo tornou-se uma matéria na *Nature Biotechnology*, que relatou o potencial inédito do controle da destruição de células beta do pâncreas por esse mAb anti-CD3 (DOLGIN, 2019).

A tolerância induzida por administração de antígenos por via oral (tolerância oral) despertou o interesse de pesquisadores para a indução de imunorregulação a partir do uso de anti-CD3 por via oral. Levando-se em conta o viés tolerogênico do tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal (GALT), estudos pioneiros demonstraram *in vivo* o aumento da expressão de LAP (*latency-associated peptide*) na superfície de células T, associado com o aumento de TGF- $\beta$ 1 livre (OCHI *et al.*, 2008). Subpopulação de células T $\gamma\delta$  LAP<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> foram identificadas como residentes do GALT (REZENDE *et al.*, 2015), assim como subpopulações de células dendríticas regulatórias que podem estar relacionadas com a indução do perfil imunorregulatório do tratamento oral com anti-CD3 (REZENDE *et al.*, 2019).

A via de administração oral gerou repercussão nas pesquisas para tratamento de diabetes mellitus tipo 1. O uso de anti-CD3 por via oral em camundongos NOD demonstrou uma redução na produção de INF- $\gamma$  e IL-17 e um aumento na população de Treg; esses resultados também foram confirmados em modelos pré-clínicos de camundongos com cadeias CD3 humanas (KUHN *et al.*, 2016). Um anti-CD3, Fc $\gamma$ R não-ligante, totalmente humano (Foralumab) foi testado por via oral em camundongos humanizados prevenindo a rejeição de transplante de pele, reduzindo a proliferação de células T CD8<sup>+</sup> esplênicas e reduzindo a secreção de TNF- $\alpha$  (OGURA *et al.*, 2017).

O controle e direcionamento da resposta imune proporcionado pelo uso do anti-CD3 torna de grande interesse para a imunoterapia de diversas doenças. De fato, até aqui, a maioria das abordagens de terapia envolvendo o anti-CD3, em seus diferentes formatos, focam no seu potencial de indução de Treg (KUHN, CHANTAL & WEINER, 2016) ou na sua capacidade de promover a aproximação e a formação de uma “sinapse imunológica” entre uma célula-alvo com outra célula T CD3<sup>+</sup> explorando suas funções efectoras, como no caso dos anticorpos biespecíficos (bsAbs) (LABRIJN *et al.*, 2019).

## 1.2 O ANTI-CD3 E OS BIESPECÍFICOS

O conjunto de informações adquiridas há mais de 40 anos de estudos acerca do anti-CD3 demonstra a importância e o interesse clínico/comercial para a sua utilização no campo dos transplantes, doenças autoimunes e imunoterapia oncológica. A pesquisa e o desenvolvimento de biofármacos devem ser questão de soberania nacional, principalmente por reduzir o alto custo desses medicamentos para o sistema público de saúde.

Um estudo de 2019 analisou o mercado de anticorpos monoclonais desde 2013, com a inclusão de 31 novos mAbs e 10 biossimilares, totalizando 57 mAbs e 11 biossimilares na clínica até o final de 2017 nos Estados Unidos (EUA) e União Europeia (UE). Estimando-se uma movimentação de até 200 bilhões de dólares em 2022 no mercado de mAbs com sua produção concentrada majoritariamente nos Estados Unidos (57%), Europa (36%) e Ásia (7%) (GRILO; MANTALARIS, 2019). Outro grupo acompanha o mercado dos anticorpos terapêuticos desde 2010 e até novembro de 2021 o número de anticorpos aprovados foi 131 nos EUA e UE. Desses, 45% são para tratamento de neoplasias e 27% para doenças causadas por desequilíbrio da resposta imune (KAPLON *et al.*, 2022).

Em 2017 o primeiro anticorpo completo biespecífico (bsAb), capaz de se ligar à dois antígenos diferentes, foi aprovado pelo FDA para o tratamento de hemofilia A (GRILO; MANTALARIS, 2019; LABRIJN *et al.*, 2019). Atualmente, 43 bsAbs, quase a metade dos que estão em ensaios clínicos, contam como um de seus alvos a cadeia CD3 $\epsilon$  (LABRIJN *et al.*, 2019) alcançando mais de 100 formatos de anti-CD3 bsAbs em dezembro de 2020 (MIDDELBURG *et al.*, 2021). A importância de um Fab anti-CD3 nos bsAbs visa criar uma sinapse imunológica entre uma célula T efetora e uma célula tumoral. Assim sendo, a afinidade e especificidade de cada região Fab do bsAb e a sua valência (número de regiões ligantes em cada braço do anticorpo) são fatores cruciais para o sucesso do tratamento (HABER *et al.*, 2021; LABRIJN *et al.*, 2019).

O uso intravenoso de uma bsAb CD3 x EpCAM (molécula de adesão celular epitelial), conhecido como catumaxomab (Removab<sup>®</sup>) para o tratamento de carcinomatose peritoneal, apresentou efeitos adversos importantes. A sua região Fc ativa interagiu com o Fc $\gamma$ R de macrófagos residentes no fígado (células de Kupffer) dos pacientes levando à liberação de citocinas inflamatórias e causando citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) nos hepatócitos resultando em um óbito (BORLAK *et al.*, 2016). A presença de mAbs anti-CD3 como contaminantes no processo de produção de bsAb também foram relacionados com uma



alta produção de citocinas pró-inflamatórias em formulações de biespecíficos (HARADA *et al.*, 2020). Apesar dos bsAbs contendo anti-CD3 em sua construção estarem apresentando bons resultados no tratamento de tumores hematológicos, na imunoterapia de tumores sólidos os avanços ainda são limitados (MIDDELBURG *et al.*, 2021). As principais razões para isso possivelmente passam pela biodisponibilidade e capacidade de penetração na massa tumoral do complexo bsAbs + célula T.

A afinidade do braço anti-CD3 dos bsAb ao complexo TCR-CD3 está diretamente ligada à biodisponibilidade desses biofármacos. BsAb com uma constante de dissociação ( $K_D$ ) da porção anti-CD3 menor do que 1 nmol/L foram mais eficientes em co-cultura *in vitro* (LEONG *et al.*, 2017). Porém, bsAb com  $K_D$  entre 50 e 200 nmol/L referente ao Fab anti-CD3 apresentaram uma melhor biodisponibilidade em tumores *in vivo* com uma menor liberação plasmática e interação com células T de tecidos esplênicos e linfonodos (LABRIJN *et al.*, 2019; LEONG *et al.*, 2017). Estratégias como duplicar a valência contra o antígeno tumoral obtendo um anticorpo com três regiões ligantes, ou aumentar sua afinidade; administrar o bsAbs diretamente no local do tumor; utilizar atividade enzimática para liberar o Fab antineoplásico somente no microambiente tumoral vem sendo estudadas para viabilizar o tratamento com bsAbs em tumores maciços (MIDDELBURG *et al.*, 2021).

Portanto, a importância da manipulação das regiões Fab e Fc de um mAb ou bsAb anti-CD3 fica cada vez mais evidente na imunoterapia baseada em anticorpos. Seja na afinidade do braço anti-CD3 (HABER *et al.*, 2021) ou na presença, ausência ou mutação da região Fc (KANG; JUNG, 2019). Muitos fatores devem ser associados e investigados para que os biofármacos envolvendo anti-CD3 sejam aprovados.

### 1.3 O ANTI-CD3 E O INSTITUTO BUTANTAN

No Instituto Butantan o desenvolvimento e produção de um anticorpo monoclonal anti-CD3 teve início na década de 90, sendo produzidos vários lotes pelo cultivo de um hibridoma murino em biorreatores passando por etapas de purificação e envase (MORO *et al.*, 1994). O anti-CD3 Butantan foi utilizado em ensaios clínicos em pacientes tanto na profilaxia como na reversão de rejeição aguda celular de transplante renal (LEMOS *et al.*, 2006). O estudo envolveu 25 pacientes de transplante renal, sendo eles tratados profilaticamente com anti-CD3 murino (9); desses 3 apresentaram rejeição celular aguda com perda do enxerto em dois casos; já os pacientes em tratamento para rejeição aguda celular (16) e desse grupo 11 apresentaram reversão do processo de rejeição (LEMOS *et al.*, 2006). Contudo, nesse estudo os efeitos

adversos não foram diferentes de outros trabalhos: febre, hipotensão arterial, taquicardia, convulsão, diarreia, náuseas e vômitos, cefaleia etc. (FERRAN *et al.*, 1990; LEMOS *et al.*, 2006). Uma versão humanizada das cadeias leve e pesada por transplante de CDR do anti-CD3 murino Butantan deu origem a uma molécula em formato FcFv (domínios CH3 + CH2 + CDR 1, 2 e 3 das cadeias leve e pesada) e IgG completa. Os estudos preliminares sugeriram um potencial da imunorregulação em sua comparação com o anticorpo murino original, porém as construções resultantes foram instáveis e de baixa produtividade (SERPIERI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009).

O interesse do Laboratório de Biofármacos do Instituto Butantan no mAb anti-CD3 humanizado é de longa data, assim como vários estudos relacionados a mAbs anti-CD3. Seja no contexto de transplantes, doenças autoimunes ou anticorpos biespecíficos este trabalho é a continuação dos estudos que podem contribuir para a compreensão e desenvolvimento de moléculas no nosso país. Levando-se em conta o parque industrial do Instituto Butantan, que conta com uma fábrica de anticorpos monoclonais, espera-se traduzir todos esses anos de trabalho em benefícios para os pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) e população brasileira.

#### 1.4 MECANISMOS DE AÇÃO DOS MABs

Os mecanismos de ação dos anticorpos estão intimamente relacionados com a sua estrutura, tamanho, formato, classe e subclasse. Direcionar ou melhorar o mecanismo de ação de um mAb no organismo do paciente pode envolver tanto eliminar algumas regiões da proteína quanto modificá-las por mutações.

As imunoglobulinas são glicoproteínas formadas por duas cadeias pesadas (HC) com 50 a 60 kDa cada e duas cadeias leves (LC) com 20 a 24 kDa cada, sendo uma LC com uma HC ligadas por pontes de dissulfeto assim como a interação desses pares também mantido por pontes de dissulfeto na região da dobradiça (**Figura 2**) (EDELMAN; POULIK, 1961; PORTER, 1959). Normalmente, tanto as cadeias HC quanto as LC são idênticas entre si dando origem a um anticorpo bivalente monoespecífico. Entretanto, em alguns casos a IgG4 pode apresentar um formato biespecífico em respostas anti-inflamatórias (VAN DER NEUT KOLFSCHOTEN *et al.*, 2007).

A digestão de uma molécula de IgG com a enzima papaína resultou em três fragmentos: dois com aproximadamente 50 kDa, toda a LC e a porção N-terminal da HC, e com a capacidade



As regiões Fc dos mAbs são manipuladas em construções de biofármacos para potencializar algum mecanismo de ação desejado na terapia ou para evitar que eles ocorram. O primeiro mAb para oncoterapia aprovado para o tratamento de linfoma não-Hodgkin em 1997, o rituximab (anti-CD20), induz a morte celular por ADCC, ADCP e CDC, o que pode causar efeitos adversos diferentes em cada paciente, reduzindo o sucesso do tratamento (REDMAN *et al.*, 2015). Novas construções de anti-CD20 foram desenvolvidas e aprovadas com um enfoque no processo de ADCC que está relacionado com o subtipo Fc $\gamma$ RIIIa comumente encontrado em células Natural-Killer (NK) (KANG; JUNG, 2019; REDMAN *et al.*, 2015).

Mecanismos de ações de mAbs também estão intimamente ligados ao seu alvo. Proteínas de superfície celular que não causam um estímulo intracelular ao serem reconhecidas pelo mAb normalmente tem o mecanismo de ação do tratamento associado à porção Fc do anticorpo. O mecanismo é diferente para mAbs que causam um estímulo na célula alvo durante sua atuação como é o caso do anti-CD3. Em poucas horas a partir da administração endovenosa de anti-CD3 murino, nota-se a eliminação do complexo TCR-CD3 da superfície celular. Além disso, uma forte resposta inflamatória também foi associada ao uso de anti-CD3 murino e humanizado envolvendo sua região Fc (CHATENOUD, 2003; FEHERVARI, 2021; FRANCINE *et al.*, 2006; KUHN, CHANTAL & WEINER, 2016).

A presença da porção Fc é importante em construções terapêuticas de mAb devido à sua relação com a farmacocinética e tempo de meia vida do biofármaco. As IgG1, IgG2 e IgG4 apresentam a meia vida de aproximadamente 23 dias, enquanto a IgG3 de 6 a 7 dias em humanos (DOS SANTOS *et al.*, 2018). Isso se deve ao mecanismo de recirculação de imunoglobulinas através do receptor de Fc neonatal (FcRn) presentes na superfície celular e no retículo endoplasmático de diversos tipos celulares incluindo células endoteliais, hepáticas, epiteliais dos pulmões, renais, monócitos, macrófagos, células B e células dendríticas (KANG; JUNG, 2019). Esta interação IgG-FcRn é pH dependente, sendo mais estável em pH ácido (<6,5) e não ocorre em pH neutro. Esse mecanismo foi relacionado com a variação de pH presente nos endo-lisossomas, o que pode justificar a reciclagem da IgG entre o ambiente intra e extracelular aumentando o seu tempo de meia vida (KANG; JUNG, 2019).

## 1.5 O COMPLEXO TCR-CD3

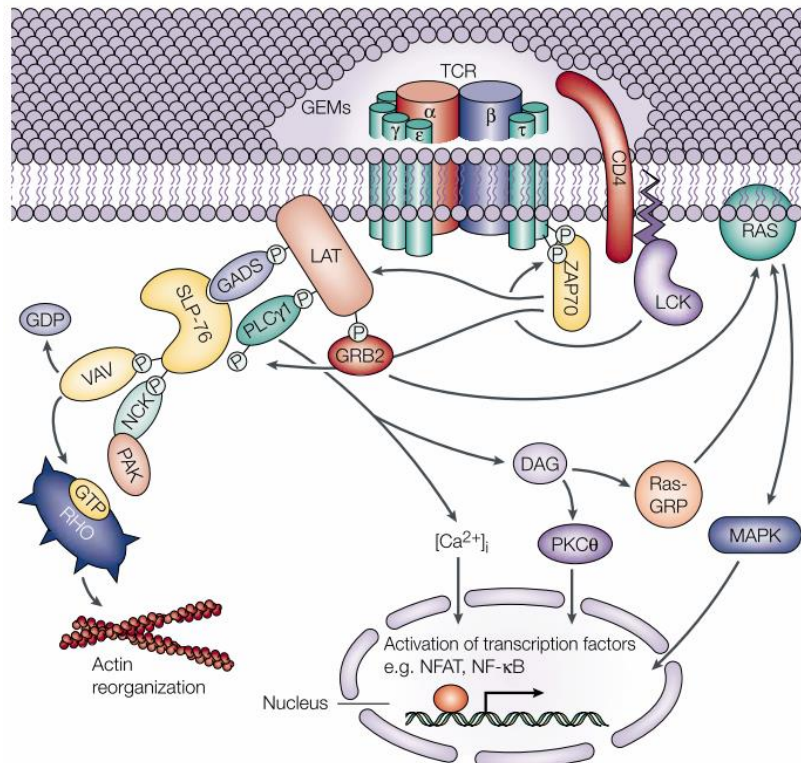
O reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T é mediado pelos receptores de antígeno da célula T (TCR), os quais interagem com um peptídeo associado às proteínas do

complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II (DAVIS; BJORKMAN, 1988; KUHNS; DAVIS, 2012). O TCR pode ser formado por duas cadeias  $\alpha:\beta$  ou uma pequena população com o heterodímero  $\delta:\gamma$  (KUHNS; DAVIS, 2012; MURPHY *et al.*, 2010). Entretanto, o TCR não possui domínios de sinalização intracelulares, para isso, essa célula conta com um aparato de sinalização conhecido como complexo proteico CD3 (*cluster of differentiation 3*) (CALL *et al.*, 2002; CLEVERS *et al.*, 1988; KAPPES; TONEGAWA, 1991).

As cadeias do complexo CD3 apresentam em sua porção intracelular motivos ativadores baseados em tirosina (ITAM) responsáveis pela transdução de sinal e início das vias de ativação celular (KUHNS; DAVIS, 2012). A ativação de proteínas da família da SRC- proteína-tirosina quinases (PTK) como a LCK e FYN, associadas à porção intracelular do CD4 e CD8, é responsável pela fosforilação dos ITAMS nas caudas citoplasmáticas do complexo CD3 gerando sítios de ligação para a ZAP70 (**Figura 3**), que inicia várias vias dependentes de moléculas adaptadoras resultando na ativação de fatores de transcrição como o NF $\kappa$ B e NFAT (fator nuclear ativador de células T) (GLASSMAN *et al.*, 2018; KORETZKY; MYUNG, 2001; KUHNS; DAVIS, 2012).

O complexo CD3 é um conjunto formado por 4 cadeias proteicas CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  e CD3 $\zeta$  presentes na membrana celular de células T e não-covalentemente associadas ao TCR. As cadeias CD3 aumentam a expressão dos heterodímeros TCR $\alpha:\beta$  e participam do processo de ativação dessas células. As cadeias CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  e CD3 $\epsilon$  apresentam um domínio extracelular semelhante ao das imunoglobulinas (Ig), ao passo que as cadeias  $\zeta$  apresentam apenas um pequeno domínio extracelular e são distintas das Ig (KJER-NIELSEN *et al.*, 2004; PUNT *et al.*, 1994).

**Figura 3.** Vias intracelulares envolvidas na ativação de células T.



Após o reconhecimento do peptídeo ligado ao MHC presente na membrana plasmática das células apresentadoras de antígenos (APC) pelo TCR associado ao complexo CD3, ou ligação de um anticorpo anti-CD3 ocorre uma fosforilação dos ITAMS presentes nas caudas citoplasmáticas do complexo CD3, que são responsáveis pela transdução e seguimento da sinalização intracelular. Imagem retirada e adaptada de Gary A. Koretzky and Peggy S. Myung, 2001 (KORETZKY; MYUNG, 2001).

As cadeias  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  apresentam domínios extracelulares muito semelhantes entre si contando com dois resíduos de cisteínas responsáveis pela formação de ponte de dissulfeto intramolecular resultando em um domínio Ig em cada cadeia. Os heterodímeros não-covalentes  $\delta\epsilon$  e  $\gamma\epsilon$  são formados por diversas interações entre suas regiões hidrofóbicas. O padrão de dobramento e interação dos dois heterodímeros são semelhantes, sendo que as cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  auxiliam na estabilização do dobramento correto da cadeia  $\epsilon$  (KIM *et al.*, 2000b; KJERNIENSEN *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2004).

Componente do complexo TCR-CD3, a cadeia humana CD3 $\gamma\epsilon$  recombinante pode substituir o uso de linfócitos CD3<sup>+</sup> em análises de anticorpos monoclonais (mAbs) anti-CD3 humanizados. Ainda que os linfócitos humanos possam ser utilizados em etapas críticas do estudo, é preferível, durante ensaios de rotina, a utilização de um antígeno recombinante, no caso o heterodímero CD3 $\gamma\epsilon$ , principalmente para as etapas de seleção de clones de mAb anti-

CD3 humanizados, quanto à sua produtividade, por métodos imunoenzimáticos e por ressonância plasmônica de superfície (SPR).

Em 2000, Kim e colaboradores delinearam a sequência dos ectodomínios das cadeias gama e épsilon do CD3 humano para expressão em *Escherichia coli* tanto separadas quanto como heterodímero  $\gamma\epsilon$  unidos por um *linker* de 26 aminoácidos. A inserção do *linker* foi necessária para garantir o dobramento nativo do heterodímero. Os resíduos CxxCxE presentes na região próxima à membrana plasmática de cada ectodomínio – V79 do CD3 $\epsilon$  e M81 do CD3 $\gamma$  - foram relacionados com a dimerização entre as duas cadeias (BORROTO *et al.*, 1998). Contudo, durante a produção do CD3 $\gamma\epsilon$  recombinante esses resíduos prejudicaram o seu dobramento correto por troca de pontes de dissulfeto, sendo então removidos da sequência dos ectodomínios (KIM *et al.*, 2000a).

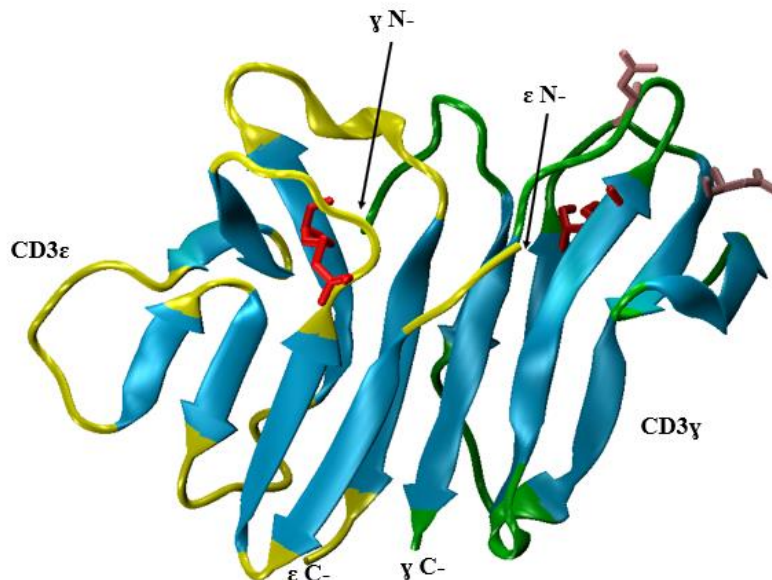
O uso do antígeno recombinante CD3 $\gamma\epsilon$  foi importante para desvendar a interação do anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD3 denominado OKT3 com o seu alvo. A mesma construção definida por Kim e colaboradores, 2000, foi utilizada para interação e cristalização do heterodímeros mais a porção Fab do OKT3 (KJER-NIELSEN *et al.*, 2004). A subunidade CD3 $\epsilon$  apresenta oito cadeias  $\beta$  dobradas em uma orientação antiparalela formando 2 folhas  $\beta$  unidas por uma ponte de dissulfeto em sua porção interna. O monômero CD3 $\gamma$  possui 7 cadeias  $\beta$  também compondo 2 folhas  $\beta$  nas mesmas condições que a cadeia épsilon (**Figura 4**). Essas interações são responsáveis pela formação dos domínios C2 da superfamília das imunoglobulinas. O monômero  $\gamma$  apresenta dois pontos de glicosilação que não influenciam na sua dimerização com a cadeia épsilon (KJER-NIELSEN *et al.*, 2004).

Um estudo estrutural do heterodímero CD3 $\epsilon\delta$  foi conduzido em condições semelhantes e utilizando as mesmas estratégias de construção e expressão das cadeias épsilon-gama (SUN *et al.*, 2001). Kastrop e colaboradores, 2002, promoveram a dimerização *in vitro* dos ectodomínios humanos CD3 $\gamma\epsilon$  e CD3 $\delta\epsilon$  sem a presença de um *linker*. Os heterodímeros foram obtidos durante a etapa de *refolding* das proteínas produzidas em *E. coli* (KASTRUP *et al.*, 2002).

Foram realizados estudos na tentativa de definir como as cadeias do CD3 estão associadas com o TCR, principalmente,  $\alpha\beta$ . A estequiometria do complexo TCR-CD3 foi definida como 1 TCR : 1 CD3 $\gamma\epsilon$  : 1 CD3 $\delta\epsilon$  : 1 CD3 $\zeta\eta$  (CALL *et al.*, 2002; DONG *et al.*, 2019; KRSHNAN *et al.*, 2016). Foi demonstrado que há uma associação das porções transmembranares dos trímeros TCR $\alpha$ -CD3 $\delta\epsilon$  e TCR $\beta$ -CD3 $\gamma\epsilon$  (CALL; WUCHERPFENNIG; CHOU, 2010; DONG *et al.*, 2019; NATARAJAN *et al.*, 2022). A relação entre a cadeia TCR $\beta$  com a subunidade CD3 $\epsilon$  também foi demonstrada por ensaios de microscopia eletrônica,

ressonância magnética nuclear e *docking* molecular (ARECHAGA *et al.*, 2010; DONG *et al.*, 2019; NATARAJAN *et al.*, 2022; RANGARAJAN *et al.*, 2018).

**Figura 4.** Estrutura dos ectodomínios do heterodímero CD3 $\gamma\epsilon$  humano PDB 1SY6 (KJERNIELSEN *et al.*, 2004).



CD3 $\epsilon$  em amarelo; CD3 $\gamma$  em verde; folhas betas em azul; resíduos Cys em pontes de dissulfeto em vermelho; sítios de glicosilação em lilás; ( $\gamma$  N-) região N-terminal da cadeia gama; ( $\epsilon$  N-) região N-terminal da cadeia épsilon; ( $\gamma$  C-) região C-terminal da cadeia gama; ( $\epsilon$  C-) região C-terminal da cadeia épsilon. Gerado em VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

Outro papel importante do complexo CD3 é a sua influência na expressão do TCR na superfície celular. A ausência das cadeias  $\epsilon$  ou  $\zeta$  resulta na ausência de TCR na membrana plasmática dos linfócitos T (HALL *et al.*, 1991; KAPPES; TONEGAWA, 1991; SUSSMAN *et al.*, 1988). A necessidade da cadeia CD3 $\delta$  para a expressão do TCR foi associada ao estágio final do desenvolvimento do linfócito T no timo (DAVE *et al.*, 1997). Mutações na porção terminal do ectodomínio do CD3 $\gamma$  foram associadas a problemas tanto de desenvolvimento das células T no timo quanto na expressão correta do heterodímero CD3 $\gamma\epsilon$  associado ao TCR $\alpha\beta$  (TOUMA *et al.*, 2007).

Vários estudos aplicam-se em desvendar a relação entre o complexo TCR-CD3 e o seu papel no desempenho do sistema imune em resposta à infecção viral, inflamação, doenças autoimunes e mecanismos imunes decorrentes da ação de anticorpos. O controle dos mecanismos de atuação do complexo CD3 através de anticorpos anti-CD3 representa um potencial de tratamento para doenças autoimunes como o diabetes tipo I (T1D), além da



profilaxia e reversão de rejeição a transplantes de órgãos, indução de tolerância ao enxerto e imunoterapia anti-tumoral com anticorpos biespecíficos (CHATENOUD, 2003; KUHN *et al.*, 2016; MARTIN; TISCH; GETTS, 2013; MIDDELBURG *et al.*, 2021).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir o anti-CD3 humanizado e comparar com o anti-CD3 murino avaliando a indução de perfil pró-inflamatório ou imunorregulador em linfócitos T do sangue periférico humano.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Transfectar células CHO com vetor contendo as sequências das cadeias leve e pesada do anti-CD3 humanizado;
- Clonar as células para gerar linhagens monoclonais produtoras de anti-CD3;
- Construir a sequência e o vetor do antígeno recombinante CD3 $\gamma\epsilon$ ;
- Produzir o antígeno recombinante em sistema bacteriano;
- Purificar o antígeno recombinante;
- Avaliar os clones produtores de anti-CD3 humanizado quanto ao seu crescimento, produtividade e especificidade;
- Selecionar clones para os ensaios *in vitro* com PBMC humano;
- Avaliar o potencial mitogênico do anti-CD3 humanizado em linfócitos do sangue periférico humano (PBMC);
- Avaliar a indução de subpopulações de células T pró-inflamatórias ou reguladoras por citometria de fluxo;
- Avaliar o perfil de citocinas dos ensaios *in vitro* por CBA e marcação intracelular.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 HUMANIZAÇÃO DO ANTI-CD3

O anti-CD3 humanizado foi proposto *in silico* pelo transplante dos CDRs murinos ao arcabouço humano germinativo mais próximo do anticorpo murino. Os genes das cadeias leve e pesada, desenhados na sequência completa com peptídeo sinal e fragmento de Kozak, foram sintetizados pela GeneArt (Invitrogen, ThermoFisher) e clonados em vetor pCHO 1.0 (Gibco™ Freedom™ CHO-S™ kit – ThermoFisher A13696-01). Esse processo havia sido realizado anteriormente no laboratório. A versão monoclonal murina é uma IgG2a, produzida a partir do hibridoma OKT3 CRL8001 (ATCC®) anteriormente reclonado no laboratório em meio livre de soro.

#### 3.2 TRANSFECCÃO E PRODUÇÃO DO ANTI-CD3 HUMANIZADO

##### 3.2.1 Transfecção das células CHO-S

Células CHO-S (Gibco™ Freedom™ CHO-S™ kit – ThermoFisher A13696-01) foram descongeladas em meio Dynamis (ThermoFisher A2661501) + L-Glutamina 8mM em 135 rpm de agitação. Após 20 dias em manutenção as células foram transfectadas. Em seguida, as células foram selecionadas em duas fases com metotrexato (MTX) e puromicina (Pu). Primeira fase: uma garrafa com 100 nM de MTX e 10 µg/mL de Pu e uma garrafa com 200 nM de MTX e 20 µg/mL de Pu até a viabilidade  $\geq 85\%$  e a densidade de células viáveis  $\geq 1 \times 10^6$  células/mL. Segunda fase: 500 nM de MTX e 30 µg/mL de Pu ou 1000 nM de MTX e 50 µg/mL Pu até a viabilidade  $\geq 90\%$ . Após a seleção, os *pools* estáveis foram congelados em nitrogênio líquido em meio de congelamento (meio Dynamis + L-glutamina 8 mM + dimetilsulfóxido (DMSO) 10%). Ao final do processo de seleção, as populações estáveis mistas foram submetidas a um cultivo em batelada por 5 dias para avaliar a produtividade específica de cada uma.

##### 3.2.2 Purificação dos anticorpos anti-CD3

Os anticorpos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando resina de afinidade contendo proteína A imobilizada. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, e após o carregamento da amostra, a lavagem foi realizada

com o mesmo tampão do equilíbrio. A eluição foi realizada em duas etapas: a primeira com tampão citrato 100 mM, pH 6,0, e a segunda com tampão citrato 100 mM, pH 3,2. Os dois eluatos foram neutralizados com volume necessário para pH próximo de 7,0 de Tris 1 M. O anticorpo está, normalmente, presente na segunda eluição. O purificado neutro foi dialisado contra PBS 1× em membrana de diálise, de 14000 kDa de corte molecular estimado, *overnight* a 4°C sob agitação. A concentração dos purificados foi obtida por leitura a 280 nm em espectrofotômetro ótico.

### 3.2.3 Clonagem das populações estáveis produtoras de anti-CD3

As populações estáveis mistas de maior produtividade específica foram selecionadas para o processo de clonagem. Os *pools* foram plaqueados (placas de 6 poços) em meio semissólido CloneMedia-CHO (Molecular Devices – K8710) misturado ao CloneDetect (Molecular Devices – K8200) e suplementado com 6 mM de glutamina. As placas foram mantidas a 37°C e 8% de CO<sub>2</sub>. Após 9 dias, foi realizado o “*picking*” das colônias que cresceram no meio semissólido utilizando a plataforma robótica ClonePix FL (Molecular Devices). As colônias foram selecionadas de acordo com o seu formato, isolamento e intensidade de fluorescência, e transferidas para uma placa de 96 poços contendo meio Dynamis + 8 mM de glutamina. A viabilidade, produtividade e taxa de crescimento foram os parâmetros utilizados para selecionar os clones durante as transferências para placas de 24 e 6 poços, garrafas T-25 e erlenmeyers (*Shaker Flasks*). A partir do estágio de cultivo com agitação em erlenmeyers a concentração celular dos clones foi ajustada para  $0,3 \times 10^6$  céls/mL em 20 mL de meio Dynamis + 8 mM de glutamina e dado início a um cultivo em batelada para o ranqueamento dos clones a partir da sua produtividade específica, que é relatada em picograma de anticorpo produzido por célula por dia (PCD).

### 3.2.4 Contagem celular e viabilidade

A contagem celular e a viabilidade foram adquiridas nos equipamentos Guava EasyCyte Mini™ (Merck Millipore) ou Vi-CELL XR™ (Beckman Coulter).

### 3.2.5 ELISA quantitativo para cálculo de produtividade

O ELISA foi realizado em microplaca de 96 poços sensibilizadas com anti-Fc humano produzido em cabra (SouthernBiotech, 2040-01) diluído 1:4000 em PBS + leite desnatado 5%. Uma curva-padrão com IgG humana total foi utilizada para a quantificação. O conjugado utilizado foi o anti-Fc + HRP produzido em cabra (SouthernBiotech, 2040-05) 1:8000. As amostras, o padrão e o conjugado foram, quando necessário, diluídos em PBS + leite desnatado 5%. As incubações foram de 1 hora a 37°C em câmara úmida. As lavagens foram realizadas com PBS + Tween20 0,04%. A revelação foi feita com tampão acetato/ácido cítrico pH = 6,0 + TMB 1% em DMSO com incubação de 20 minutos no escuro. Os sobrenadantes dos cultivos foram coletados em diferentes etapas do estudo e armazenados a -20°C até a realização dos ensaios.

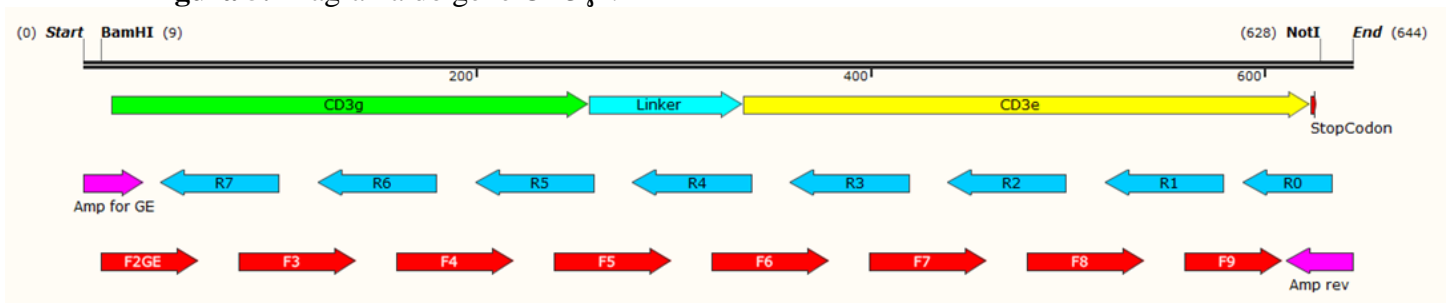
### 3.3 CONSTRUÇÃO E OBTENÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE CD3 $\gamma\epsilon$

Um antígeno recombinante foi desenhado para a testagem da ligação do anti-CD3 humanizado e murino.

#### 3.3.1 Construção da sequência CD3 $\gamma\epsilon$

A sequência de nucleotídeos referente ao CD3 humano apresenta 644 pares de base (bp), conforme a **Figura 5**. As porções extracelulares referentes às cadeias  $\gamma$  e  $\epsilon$ , bem como o *linker* entre elas, foram retiradas da literatura (KIM *et al.*, 2000a; SUN *et al.*, 2004). O gene foi sintetizado pela técnica do DNA *assembly*, uma etapa aprimorada da técnica do DNA *shuffling* (STEMMER *et al.*, 1995).

**Figura 5.** Diagrama do gene CD3 $\gamma\epsilon$ .



BamHI e NotI = sítios de restrição. CD3 $\gamma$  = CD3 $\gamma$ . CD3 $\epsilon$  = CD3 $\epsilon$ . Stop Codon = códon de parada. F2GE e F3-F9 = forward primers. R0-R7 = reverse primers. Amp for GE e Amp rev =

primers amplificadores forward e reverse, respectivamente. A sequência do gene e dos oligos estão disponíveis na sessão de apêndice.

Para a realização do DNA *assembly*, 18 oligo nucleotídeos foram desenhados no programa DNASTAR Lasergene 15 e sintetizados pela empresa Exxtend (Campinas, SP, Brasil). Desses, 8 são representados pelo F2GE até F9 com 50 a 60 bp, outros 8 são os R0 até R7 com 45 a 60 bp e os primers amplificadores Amp for GE e Amp rev com 31 a 33 bp. Todos os oligos apresentam uma região de sobreposição ao seu complementar de 20 a 23 bp (**Figura 5**). Os oligos foram ressuspensos em água ultrapura autoclavada para uma concentração final de 100 pmol/ $\mu$ L e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A primeira reação em cadeia com polimerase (PCR) para a síntese (PCR I - *Assembling*) utilizou: 1  $\mu$ L de uma mistura contendo os oligos F2GE, F3 ao F9 e R0 ao R7 com uma concentração de 100  $\mu$ M de cada (DNA molde); 4  $\mu$ L de dNTP Master Mix (NEB, N0447S) com 10 mM de cada nucleotídeo; 2  $\mu$ L de Q5 High-Fidelity Taq DNA polimerase (NEB, M0491S); 20  $\mu$ L de tampão de reação Q5 5 $\times$  concentrado; água ultrapura autoclavada qsp 100  $\mu$ L. A reação ocorreu em termociclador, sendo:  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto; 20 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos,  $50^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos,  $72^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos; extensão de  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos e fim a  $4^{\circ}\text{C}$ .

O resultado da reação foi avaliado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1%. Em seguida, 1  $\mu$ L da PCR I foi utilizado como DNA molde da segunda reação (PCR II - *Amplification*). Foram adicionados: 4  $\mu$ L de dNTP Master Mix (NEB, N0447S) com 10 mM de cada nucleotídeo; 2  $\mu$ L de Q5 High-Fidelity Taq DNA polimerase (NEB, M0491S); 20  $\mu$ L de tampão de reação Q5 5 $\times$  concentrado; 4  $\mu$ L da mistura dos oligos Amp for GE e Amp rev a 10  $\mu$ M cada; água ultrapura autoclavada qsp 100  $\mu$ L. A reação foi executada em termociclador, sendo:  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto; 25 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos,  $60^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos,  $72^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos; extensão de  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos e fim a  $4^{\circ}\text{C}$ .

O resultado da reação foi avaliado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1%. Em seguida, foi realizada uma purificação por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% seguida pelo uso do kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, A9282) todo o processo foi realizado em temperatura ambiente. As bandas correspondentes ao tamanho de interesse foram cortadas do gel de agarose e aquecidas a  $65^{\circ}\text{C}$  com Membrane Binding Solution, na proporção de 1 mL de solução para cada 1 mg de gel ou 1 mL de reação (PCR, ligação, digestão etc.), até o completo derretimento do gel. Essa mistura foi transferida para a coluna de purificação do kit, a qual estava inserida em um tubo coletor. O sistema foi mantido em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado com  $16000 \times g$  por 1 minuto. O permeado

foi descartado e a coluna foi lavada duas vezes com Wash Solution, sendo a primeira com 700  $\mu\text{L}$  e 1 minuto de centrifugação a  $16000 \times g$  e a segunda com 500  $\mu\text{L}$  e 5 minutos de centrifugação a  $16000 \times g$ . Após descartar o permeado da última lavagem, as colunas foram centrifugadas por 1 minuto a  $16000 \times g$  para secagem. A eluição foi realizada com 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura autoclavada por coluna em um tubo novo. A quantificação foi realizada por leitura com 260 nm em espectrofotômetro óptico.

### 3.3.2 Ligação do gene CD3 $\gamma\epsilon$ ao vetor pAE

O vetor pAE (RAMOS *et al.*, 2004) foi generosamente doado pelo Dr. Enéas de Carvalho, Instituto Butantan. O sítio de restrição NotI (porção 3') foi substituído pelo NcoI utilizando o primer NcoI\_ER. Em seguida, o vetor e o gene foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI (NEB, R0136S) a 20 U/ $\mu\text{L}$  e NcoI (NEB, R0193S) a 10 U/ $\mu\text{L}$  por 3 horas a 37°C. A banda foi recortada do gel de agarose 1% e purificada com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, A9282). Para a reação de ligação foram utilizados 70 ng do vetor; 4  $\mu\text{L}$  de 5 $\times$  ligation buffer; 1  $\mu\text{L}$  da T4 DNA Ligase a 1U/ $\mu\text{L}$  (Invitrogen, 15224-025); água ultrapura autoclavada qsp 20  $\mu\text{L}$ . As massas do inserto foram: 210 ng no tubo Ligação (L) e zero ng no tubo de Self-ligation (SL) para teste da reação de digestão do vetor. Os tubos foram incubados a 26°C por 1 hora no termociclador.

### 3.3.3 Clonagem e sequenciamento de DNA

O plasmídeo contendo o gene CD3 $\gamma\epsilon$  foi clonado em *Escherichia coli* TOP10 eletrocompetentes preparadas previamente a partir da OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, C4040-03). Foi utilizado o meio LB (Luria-Bertani) Ágar acrescido de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina. Os clones foram triados por PCR e sequenciamento de DNA por Sanger utilizando o kit Big Dye 3.1v (Applied Biosystems, 4336919). A aquisição do sequenciamento Sanger foi realizada no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os resultados dos sequenciamentos (eletroferogramas) foram analisados no programa Chromas (Technelysium Pty Ltd, versão 2.6.5) e as análises dos alinhamentos foram realizadas pela ferramenta on-line Clustal Omega (EMBL-EBI). A sequência da proteína recombinante foi analisada no programa online ProtParam (ExPaSy – Bioinformatics Resource Portal) a fim de obter algumas informações teóricas úteis para os processos de expressão, *refolding*, purificação e ensaios.

### 3.3.4 Expressão da proteína recombinante CD3 $\gamma$ e

A expressão da proteína foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) star pLysS (Invitrogen) transformada por choque térmico. A expressão foi realizada em meio LB a 37°C, 200 rpm por 20 horas. A indução ocorreu após a densidade óptica (DO) a 600 nm atingir 0,6, sendo acrescentado 1 mM de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida). Ao final da expressão, o cultivo foi centrifugado a 25000  $\times$  g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado, o sedimento foi mantido a -20°C até a lise celular.

### 3.3.5 Lise celular e *refolding*

O sedimento celular foi ressuspensionado em PBS e a lise foi realizada por sonicação com 10 pulsos de 20 segundos intercalados por 1 minutos de repouso em banho de gelo. O lisado foi centrifugado a 25000  $\times$  g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante armazenado a 4°C. Em seguida, o sedimento insolúvel foi ressuspensionado em PBS com 1 M de ureia e centrifugado a 25000  $\times$  g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante armazenado a 4°C, esse procedimento foi repetido uma vez. O sedimento insolúvel foi ressuspensionado em 6 M de ureia em PBS e mantido sob agitação O.N. a 4°C para solubilização dos corpos de inclusão. Todo o solubilizado foi transferido para uma membrana de diálise e o processo de *refolding* foi iniciado contra 2 L de 5 M de uréia em PBS 1 $\times$  a 4°C e agitação. No mínimo a cada 6 horas o tampão de diálise foi diluído com PBS 1 $\times$ , mantendo o volume de 2 L para as seguintes concentrações de ureia: 4 M, 3 M, 2 M, 1 M, 0,5 M e zero M. O conteúdo da membrana foi centrifugado a 25000  $\times$  g por 20 min a 4°C e o sobrenadante (porção solúvel) e o sedimento insolúvel foram separados e armazenados a 4°C.

### 3.3.6 Purificação do antígeno recombinante

A purificação após o *refolding* foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna com níquel devido a presença de uma cauda de 6 resíduos de histidina na porção N-terminal da proteína. A amostra foi tratada com 50  $\mu$ M de imidazol e 0,5 M de NaCl. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 50 mM, pH = 7,4 e fluxo de 1 mL/min para 10 volumes de coluna. O carregamento foi realizado com fluxo de 0,45



mL/min e a eluição a 1 mL/min com tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 150 mM, pH = 7,4. As frações coletadas durante a purificação foram diafiltradas a  $3500 \times g$  por 30 minutos a 4°C em Amicon Ultra-15 10 KDa (Merck) para PBS 1× a fim de se remover o imidazol e concentrar os purificados. As amostras foram quantificadas por leitura a 280 nm em espectrofotômetro óptico.

### 3.3.7 SDS-PAGE coloração por azul de Coomassie

Para o gel de separação de 12% e volume final de 10 mL foram utilizados: 3,35 mL de água ultrapura; 4 mL de solução de acrilamida/bis-acrilamida a 30%; 2,5 mL de Tris-HCl a 1,5 M e pH de 8,8; 100 µL de solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10%; 50 µL de solução de persulfato de amônio a 10%; 5 µL de TEMED (N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamina). Para o gel de empilhamento e volume final de 5 mL foram utilizados: 3 mL de água ultrapura; 650 µL de solução de acrilamida/bis-acrilamida a 30%; 1,25 mL de Tris-HCl a 0,5M e pH de 6,8; 50 µL de solução de SDS a 10%; 25 µL de solução de persulfato de amônio a 10%; 5 µL de TEMED. Um poço foi utilizado para o marcador de baixo peso molecular na diluição de 1:10. O tampão de corrida 5× utilizado foi glicina 0,96 M; SDS 0,017 M; Tris-base 0,12 M pH de 8,6. As amostras e os padrões de peso molecular foram diluídos em tampão de amostra com ou sem agente redutor (2-mercaptoetanol). A fase de entrada no gel de empilhamento foi de 80 V por 15 minutos e a fase de separação foi de 120 V até o final da corrida. A coloração foi realizada com solução corante Azul de Coomassie 0,2%.

### 3.3.8 Western Blotting

A transferência foi realizada em sistema semi-seco Trans Blot SD *semi-dry electrophoretic transfer cell*, Bio-Rad utilizando tampão Tris 48 mM, glicina 39 mM, etanol 20%, SDS 1,3 mM, pH 9,0 a 9,4, por 30 minutos a 10 V. A membrana utilizada foi de PVDF de 0,45 µm de poro. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBS 1× + 3% albumina sérica bovina (BSA) por 2 horas em agitação em T.A. A membrana foi lavada três vezes por 20 segundos cada com PBS 1× + 0,05% de Tween20. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS 1× + 1% BSA, sendo eles: anti-CD3 murino (Instituto Butantan) 1:1000 ou anti-CD3 murino OKT3 + peroxidase (LS Bio, LS-C260009/126113) 1:1000. Após 1 hora em agitação e T.A., as três lavagens foram repetidas e a membrana com anticorpo primário não conjugado foi incubada por 1 hora em T.A. e agitação com anti-IgG de camundongo +

peroxidase (Sigma, A5906) 1:2500 em PBS 1× + 1% BSA. Para a revelação com DAB (3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloroto) as membranas foram lavadas três vezes conforme anteriormente, e 50 mL da solução Tris-HCl 5 mM, DAB 0,06% + 50 µL de água oxigenada 30% foram adicionados em cada membrana e mantido em agitação até a visualização das bandas.

### 3.3.9 Ressonância plasmônica de superfície (SPR)

O ensaio de ligação por SPR foi realizado no Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences) em chip CM5 (Cytiva, 29104988) imobilizado com o CD3 $\gamma$ ε humano recombinante produzido neste projeto ou comercial (ACRO Biosystems, CDG-H52W9). Em um chip CM5 foram imobilizados 10 µM de cada antígeno em canais separados conforme descrito na literatura (KIM *et al.*, 2000b). Os anticorpos foram injetados em concentração fixa de 20 µg/mL em tampão HBS-EP com contato de 60 segundos, fluxo de 30 µL/minuto, dissociação de 60 segundos, regeneração com NaCl 4 M com contato de 45 segundos, fluxo de 30 µL/minuto e estabilização de 60 segundos. Para o ensaio de cinética e afinidade no estado estacionário as amostras foram diluídas em HBS-EP nas concentrações de 60; 20; 6,67; 2,22; 0,74 e 0,247 µg/mL, sendo aplicadas ao sensor com 180s de contato, fluxo de 40 µL/min e dissociação de 540s. A regeneração do sensor foi realizada com a passagem de NaCl 4 M com contato de 45s, fluxo de 30µL/min e estabilização de 60s.

## 3.4 ENSAIOS FUNCIONAIS COM PBMC HUMANO

### 3.4.1 Obtenção do PBMC humano

Células mononucleadas do sangue periférico (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) foram isoladas a partir de câmaras de leucorredução (LRS, do inglês, *leukoreduction system*) utilizadas em doação de plaquetas por aférese (plaquetaférese) humana em bancos de sangue a partir de doadores saudáveis. O material foi obtido do banco de sangue da Fundação ProSangue/Hemocentro de São Paulo, SP. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) – CAAE nº 03606718.4.0000.5467, Protocolo CEPSH-ICB nº 1465/18.

As PBMC foram separadas por gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque e mantidas em nitrogênio líquido até o uso. Todo o volume da LRS foi drenado em um tubo de centrifugação por fluxo gravitacional. O sangue foi diluído 1:1 com PBS 1× estéril e 20 mL foram adicionados, com cuidado, em cima de 10 mL de Fycoll-Hypaque presente em outro tubo de centrifugação. O sistema foi centrifugado a 800 x g por 20 minutos, TA, sem frenagem. Com o auxílio de uma pipeta sorológica, a nuvem de células mononucleares foi alcançada e transferida para outro tubo contendo 40 mL de PBS 1× estéril. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1× estéril por centrifugação a 300 x g, 10 minutos e TA. O sedimento celular foi dispersado por leves batidas no tubo e ressuscitado com meio RPMI + 10% de soro fetal bovino (SFB) ou 20% de albumina humana.

#### 3.4.2 Congelamento e descongelamento de células

Para o congelamento de células foi utilizado DMSO a 10% com SFB puro ou RPMI + 20% de soro albumina humana (HSA). Após a ressuspensão das células no meio de congelamento, elas foram transferidas para o -80°C por 24h, e no dia seguinte para o nitrogênio líquido. No descongelamento os tubos foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados, rapidamente, no banho-maria a 37°C. Todo o conteúdo do tubo foi transferido para um tubo de centrifugação de 50 mL contendo 40 mL de meio RPMI + 10% de SFB ou RPMI + 20% de HSA. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuscitado em 10 mL de meio de cultura para contagem e viabilidade celular. As PBMC somente foram levadas para os ensaios caso a viabilidade celular estivesse maior ou igual a 95%.

#### 3.4.3 Ensaio de ligação PBMC x anti-CD3

Para avaliar a ligação entre os anti-CD3 e células T humanas, em cada poço,  $1 \times 10^6$  de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano foram lavadas com PBS 1× após o descongelamento (400 x g, T.A., 5 minutos) em placa de 96 poços de fundo cônico 2 vezes. As células foram ressuscitadas 100 µL/poço de ZombieNIR (Biolegend, 423105) e mantidas por 20 minutos em T.A. protegidas da luz. Para bloquear a marcação de viabilidade celular 150 µL de tampão MACS (PBS 1×, albumina bovina 0,5 % e EDTA 2 mM) foram adicionados em cada poço e a placa foi centrifugada a 400 x g, T.A., 5 minutos. As células foram ressuscitadas com 50 µL de anti-CD3 monoclonal murino ou anti-CD3 humanizado a 100 µg/mL e mantidas a 4°C por 1 h protegidas da luz. Após uma lavagem com tampão MACS (400 x g, T.A., 5

minutos), as células foram ressuspensas com 100  $\mu$ L de anticorpos (Fab2) secundários policlonais conjugados com FITC anti-IgG murina (Sigma, F2883) 1:128 ou anti-IgG humana (Sigma, F1641) 1:100 de acordo com a origem do anticorpo primário. Após a incubação de 30 minutos a 4°C protegido da luz, a placa foi centrifugada e as células foram lavadas com tampão MACS (400  $\times$  g, T.A., 5 minutos). Em seguida, os poços foram ressuspensos com 50  $\mu$ L do pool de anticorpos anti-CD14 PE, anti-CD8 PerCP/Cy5.5, anti-CD4 BV510 e anti-CD19 APC-Cy7 (**Tabela 2**), sendo mantidos a 4°C por 30 minutos protegido da luz. Após a incubação, a placa foi lavada uma vez com tampão MACS (400  $\times$  g, T.A., 5 minutos). O conteúdo de cada poço foi ressuspendido com 200  $\mu$ L de PBS 1 $\times$  + formaldeído 2% e incubados por 40 minutos a 4°C protegido da luz. Após uma lavagem com tampão MACS (400  $\times$  g, T.A., 5 minutos), as células foram ressuspensas com 300  $\mu$ L de tampão MACS e mantidas a 4°C protegidas da luz até a aquisição.

#### 3.4.4 Marcação com CFSE

Após o descongelamento, o sedimento celular foi ressuspendido com 10 mL de RPMI + 10% SFB e uma alíquota foi retirada para a contagem celular. Amostras de células foram retiradas para controle e marcação *single colors*. O restante foi lavado uma vez com 40 mL de PBS 1 $\times$ , e o sedimento celular ressuspendido em PBS 1 $\times$  + 2,5  $\mu$ M de CFSE (do inglês, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) (ThermoFisher, C34554) para uma concentração celular de  $2 \times 10^7$  cels/mL. Mantido em T.A. por 20 minutos com agitação manual a cada 5 minutos. Foram adicionados 5 volumes de meio RPMI + 10% de SFB para bloqueio do excesso de CFSE. Após 5 minutos em T.A., as células foram centrifugadas a 300  $\times$  g em T.A. por 10 minutos. O sedimento celular foi ressuspendido em meio de cultura e  $1,5 \times 10^6$  células foram distribuídas por poço em uma placa de 24 poços com 2 mL de volume final cada. As placas foram mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> *overnight* (O.N.). As células marcadas foram cultivadas com anticorpos murino e humanizados anti-CD3 para realização dos ensaios funcionais de proliferação celular e analisados por citometria de fluxo conforme descrito anteriormente (LYONS; PARISH, 1994; QUAH; PARISH, 2012).

### 3.4.5 Tratamento para ensaio de proliferação

Anticorpos anti-CD3 murino e humanizado (1 ou 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram diluídos em meio de cultura (RPMI + 10% de soro fetal bovino) e acrescentados no dia seguinte ao descongelamento das células. Após 48 h do início do tratamento, 1 mL de sobrenadante foi retirado de cada poço e 1 mL de meio de cultura contendo 20 U/mL de IL-2 humana recombinante (Biolegend, 589106) foram adicionados. Nos tempos de 48 h e 192 h, 1 mL de sobrenadante foram coletados de cada condição e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a dosagem de citocinas. O cultivo foi encerrado após 8 dias.

### 3.4.6 Tratamento para ensaio com brefeldina-A

Anticorpos anti-CD3 murino e humanizado (1 ou 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram diluídos em meio de cultura (RPMI + 20% de albumina humana) e acrescentados no mesmo dia do descongelamento das células. Nesse ensaio, foram misturados os anticorpos purificados das quatro populações estáveis mistas de anti-CD3 humanizado (1A, 1B, 2A, 2B) para comparar ao mAb murino. A brefeldina-A 1000 $\times$  (Biolegend, 420601) foi adicionada a cada poço para uma concentração final de 1 $\times$ , 6 horas antes do encerramento do experimento (24 ou 72 h). Células de dois doadores foram utilizadas, tanto como um grupo isolado quanto como um grupo no qual as células dos dois doadores foram misturadas na mesma proporção. O ensaio foi realizado em triplicata.

### 3.4.7 Citometria de fluxo

Para a realização dos ensaios de citometria de fluxo as células foram marcadas com um painel de anticorpos específicos conjugados com fluorocromos (**Tabela 1** e **Tabela 2**) para investigação das subpopulações induzidas (**Figura 6a**), proliferação celular de linfócitos T (**Figura 6b**) e citocinas secretadas ou intracelular. O corante para viabilidade celular Zombie NIR<sup>™</sup> (Biolegend, 423105) foi utilizado para excluir células mortas da análise. As aquisições foram realizadas nos citômetros FACSCanto II (BD) e Guava EasyCyte Mini (Merck Millipore) e as análises foram feitas no programa FlowJo v10 (BD).

Após o tempo total de cada experimento ser alcançado, cada poço foi cuidadosamente homogeneizado com uma pipeta, e seu conteúdo foi transferido para uma placa de 96 poços de fundo cônico e centrifugado a  $400 \times g$ , 5 minutos em T.A. O sobrenadante foi descartado, o

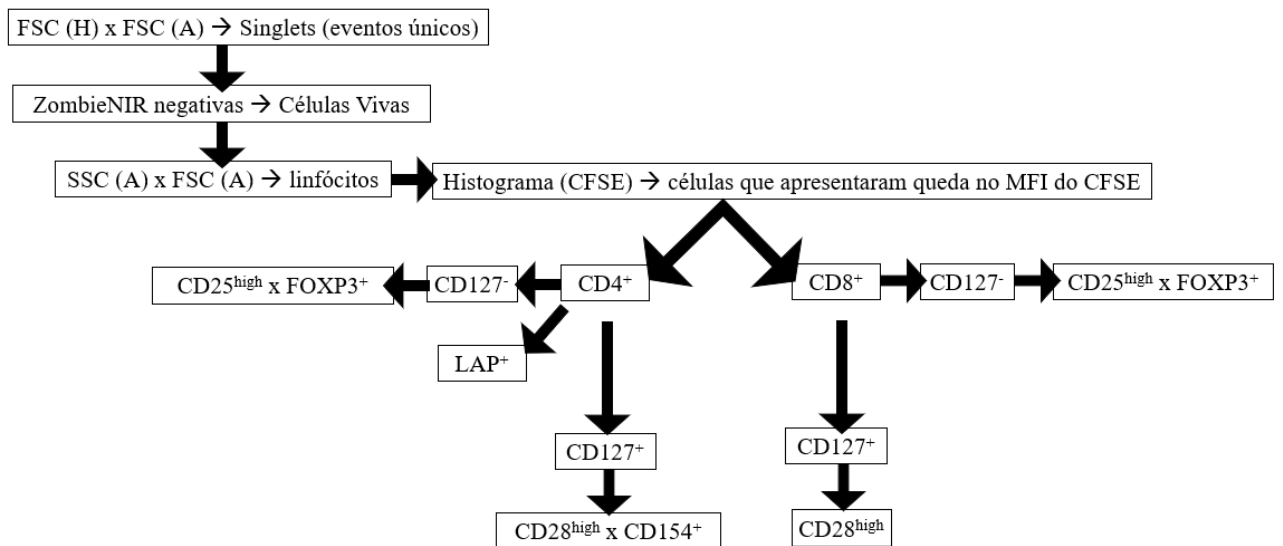
sedimento celular solto com auxílio de um vórtex e ressuspendido com PBS 1×. Então, a placa foi centrifugada a 400 × g por 5 minutos, T.A., e o sobrenadante desprezado. Essa lavagem com PBS 1× foi repetida mais uma vez. As células foram ressuspendidas 100 µL/poço de ZombieNIR e mantidas por 20 minutos em T.A. protegidas da luz. Para bloquear a marcação de viabilidade celular 150 µL de tampão MACS (PBS 1×, albumina bovina 0,5 % e EDTA 2 mM) foram adicionados em cada poço. A placa foi centrifugada a 400 × g por 5 minutos em T.A. e o sobrenadante desprezado. As células foram ressuspendidas com 50 µL do pool de anticorpos de superfície celular correspondentes ao painel de interesse (**Tabela 1**) previamente diluídos em tampão MACS. A placa foi mantida por 1 hora a 4°C protegidas da luz. Após a incubação, 150 µL de tampão MACS foram adicionados em cada poço e a placa foi centrifugada por 400 × g, 5 minutos, T.A. As células foram ressuspendidas com 200 µL de tampão Fix 1× (Biolegend, 424401) e mantidas por 45 minutos a 4°C protegidas da luz. Após a incubação, a placa foi lavada duas vezes (400 × g, 5 minutos, T.A.) com tampão Perm 1× (Biolegend, 424401), e cada poço ressuspendido com 50 µL do pool de anticorpos intracelulares previamente diluídos em tampão Perm 1×. Após a incubação de 1 h a 4°C protegida da luz, a placa foi lavada (400 × g, 5 minutos, T.A.) duas vezes com 200 µL/poço de tampão Perm 1× e uma vez com tampão MACS. Cada poço foi ressuspendido com tampão MACS gelado e transferido para um tubo de citometria em volume final de 300 µL mantidos protegidos da luz a 4°C até a aquisição.

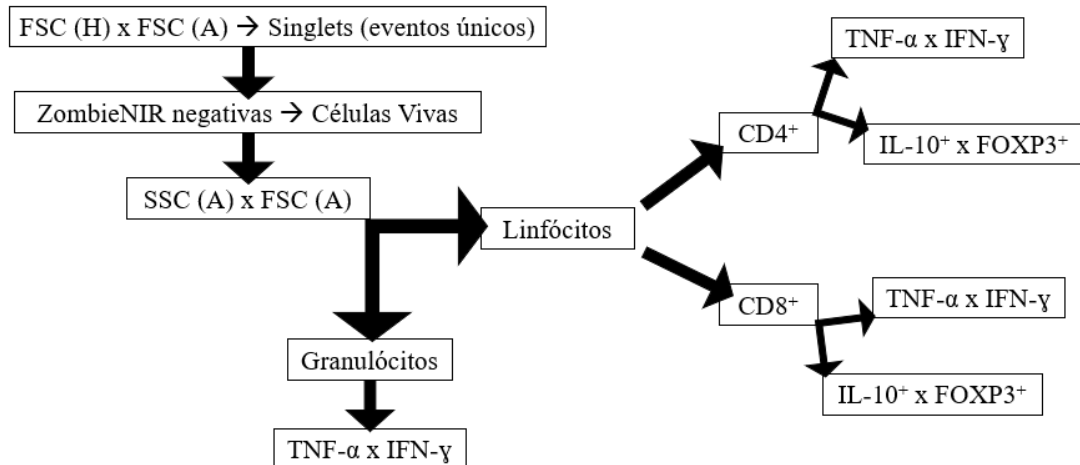
**Tabela 1.** Painéis para citometria de fluxo.

LASERS	FILTROS	PAINEL 1	PAINEL 2	PAINEL 3
<b>488 nm</b>	530/30	CFSE	CFSE	CD4 FITC
	585/42	CD25 PE	-	CD25 PE
	670 LP	CD8 PerCP-Cy5.5	CD8 PerCP-Cy5.5	CD8 PerCP-Cy5.5
	780/60	CD127 PE-Cy7	CD127 PE-Cy7	IL-10 PE-Cy7
<b>405 nm</b>	450/50	FOXP3 BV421	CD154 BV421	FOXP3 BV421
	510/50	CD4 BV510	CD4 BV510	IFN- $\gamma$ BV510
<b>633 nm</b>	660/20	LAP APC	CD28 APC	TNF- $\alpha$ APC
	780/60	ZombieNIR	ZombieNIR	ZombieNIR

**Tabela 2.** Anticorpos comerciais.

ALVO	COR	DILUIÇÃO	CLONE	FABRICANTE	Nº CATÁLOGO
CD3	PerCP	1:10	SK7 ou Leu-4	BD	347344
CD4	BV510	1:100	SK3	Biolegend	344634
CD4	FITC	1:40	RPA-T4	Biolegend	300506
CD8	PerCP/Cy5.5	1:50	SK1	Biolegend	344710
CD14	FITC	1:100	M5E2	Biolegend	301804
CD14	PE	1:100	M5E2	Biolegend	301806
CD19	FITC	1:10	RPA-2.10	BD	555326
CD19	APC/Cy7	1:100	HIB19	Biolegend	302218
CD127	PE/Cy7	1:100	A019D5	Biolegend	351320
CD25	PE	1:50	M-A251	Biolegend	356104
CD28	APC	1:50	CD28.2	Biolegend	302912
CD154	BV421	1:50	24-31	Biolegend	310824
LAP	APC	1:50	TW4-2F8	Biolegend	349608
IL-10	PE-Cy7	1:20	JES3-9D7	Biolegend	501420
IFN- $\gamma$	BV510	1:20	4S.B3	Biolegend	502544
TNF- $\alpha$	APC	1:20	Mab11	Biolegend	502912
FOXP3	BV421	1:40	206D	Biolegend	320124

**Figura 6.** Fluxogramas das estratégias de *gates* para análise dos resultados de citometria de fluxo.**a**

**b**

a = ensaio de proliferação celular e subpopulações; b = ensaio com brefeldina-A. FSC, forward scatter; SSC, side scatter; (H) valor linear referente à altura da curva de emissão daquele parâmetro; (A) valor linear referente à área da curva de emissão daquele parâmetro.

### 3.4.8 Avaliação de citocinas secretadas

As citocinas presentes nos sobrenadantes dos cultivos foram dosadas por CBA (*cytometric bead array*) pelo kit LEGENDplex™ Human Essential Immune Response Panel (Biolegend, 740930). O kit é capaz de dosar as seguintes citocinas: IL-4 (interleucina 4), IL-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-12p70, TGF- $\beta$  livre em software próprio fornecido junto ao kit.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 6. Os ensaios de proliferação celular, CBA e marcação intracelular de citocinas foram analisados utilizando o teste two-way ANOVA com o teste de múltipla comparação de Tukey entre as médias das duplicatas dentro de cada tempo de coleta e doador. Resultados com  $p < 0,05$  (intervalo de confiança de 95%) foram considerados estatisticamente significativos.

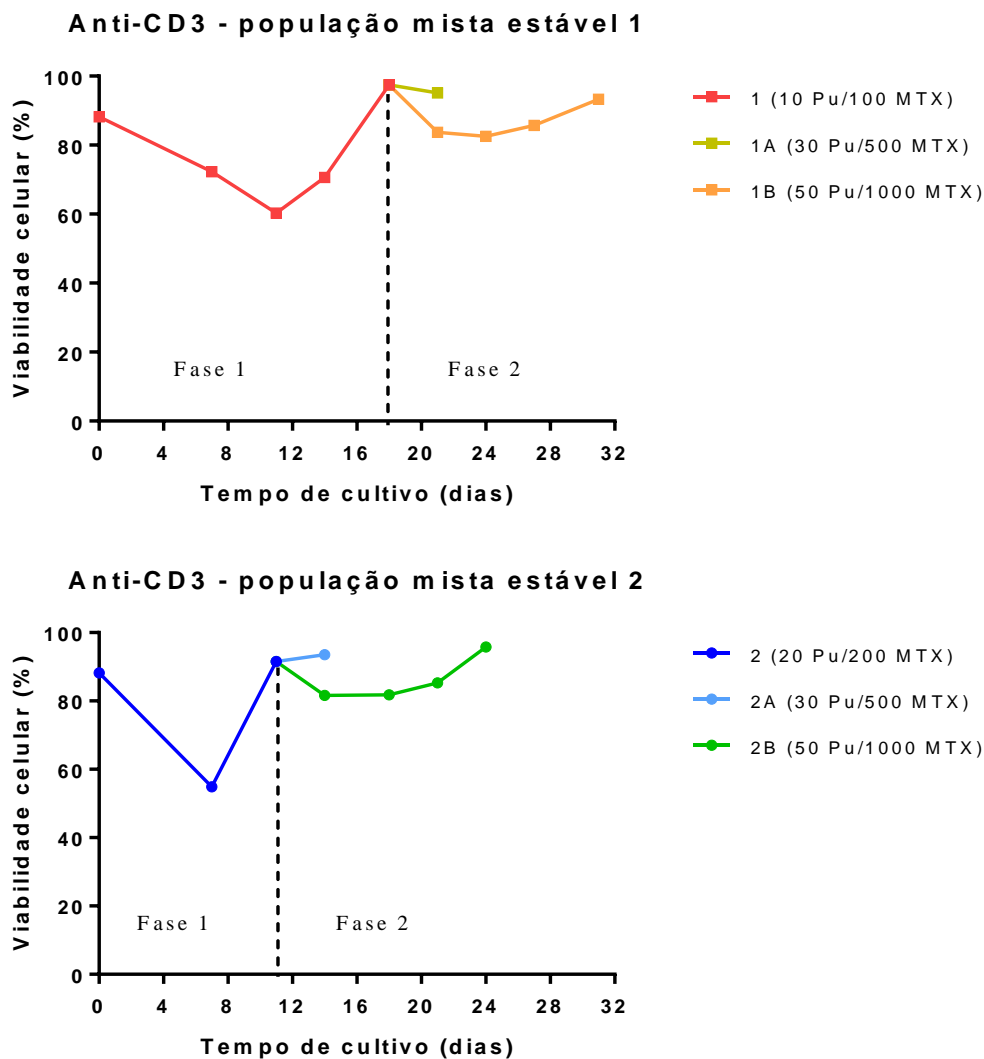


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 GERAÇÃO DAS POPULAÇÕES ESTÁVEIS MISTAS DE ANTI-CD3

Os genes das cadeias leve e pesada do anticorpo anti-CD3 humanizado foram clonados no vetor pCHO 1.0 e transfectados em células CHO-S para a geração de populações estáveis mistas. A seleção dos transfectados utilizando diferentes concentrações de Pu (10 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e MTX (100 a 1000 nM) em 2 fases resultou na geração de quatro populações estáveis mistas denominadas 1A, 1B, 2A e 2B (**Figura 7**).

**Figura 7.** Geração das populações estáveis mistas produtoras de anti-CD3 humanizado.



As seleções foram realizadas com concentrações variadas de puomicina (Pu) em  $\mu\text{g/mL}$  e metotrexato (MTX) em nM. O início da fase 2 e o término dos cultivos estão indicados no gráfico. A viabilidade e a densidade celular definiram o fim de cada fase.

Para a análise comparativa das 4 populações mistas estáveis,  $0,3 \times 10^6$  células de cada população foram ressuspensas em 30mL e cultivadas em batelada por 5 dias (**Tabela 3**). As duas populações estáveis mistas de maior produtividade específica, 1B e 2B, foram escolhidas para inóculo em meio semissólido para a geração da linhagem monoclonal.

**Tabela 3.** Cultivo em batelada das populações mistas estáveis.

Pool estável	Concentração celular ( $\times 10^6$ células/mL)	Viabilidade (%)	Concentração de anticorpo ( $\mu\text{g/mL}$ )	PCD (pg/célula/dia)	Total de anticorpo purificado (g)
1A	18,78	99,0	301,7	3,21	4,01
1B	16,83	98,8	315	3,74	4,37
2A	18,89	99,2	312,5	3,31	4,67
2B	17,21	99,0	363,7	4,23	5,4

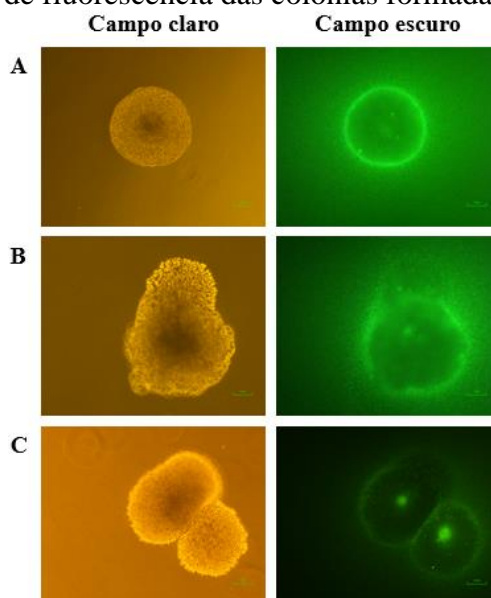
Concentração celular e de anticorpos ao final dos 5 dias.

#### 4.2 CLONAGEM DAS POPULAÇÕES ESTÁVEIS PRODUTORAS DE ANTI-CD3

Após o descongelamento e manutenção, o pool 1B apresentou  $1,54 \times 10^6$  células/mL e 96,2% de viabilidade, e o pool 2B apresentou  $0,8 \times 10^6$  células/mL e 91,9% de viabilidade. Foram plaqueados 2 mL de suspensão celular a 200 células/mL de cada *pool* em cada poço em placas de 6 poços.

Durante a etapa de *picking*, no sistema robótico ClonePix-FL, foram selecionados 134 clones do pool 1B e 146 clones do pool 2B, totalizando 280 clones transferidos individualmente para placas de 96 poços (um clone por poço) em meio de cultura líquido. A **Figura 8** traz exemplos de colônias descartadas ou selecionadas para a transferência. Além do formato e isolamento da colônia, o *software* do equipamento também considera a intensidade do halo de fluorescência da colônia na seleção devido à adição no meio semissólido do CloneDetect (anti-IgG humana-FITC) no meio de cultura (dados não mostrados).

Durante a expansão de cada clone, alíquotas de cada poço foram retiradas para a contagem celular e ELISA do sobrenadante do cultivo para a dosagem do anticorpo produzido. Esses parâmetros foram utilizados para selecionar os clones mais produtivos para seguir no processo de clonagem até a etapa final de cultivo em agitação e avaliação do PCD. Os valores de corte e o número de clones transferidos em cada etapa estão representados na **Tabela 4**.

**Figura 8.** Fotomicrografia de fluorescência das colônias formadas em meio semissólido.

(A) exemplo de colônia selecionada apresentando isolamento, uniformidade e fluorescência; (B) exemplo de colônia descartada por apresentar formato irregular indicativo de mistura de clones; (C) exemplo de colônias descartadas por apresentar grande proximidade e risco de mistura de clones.

**Tabela 4.** Valores de corte adotados nas diferentes etapas da clonagem dos produtores de anti-CD3 humanizado.

Origem	Destino	Nº de células (10 <sup>6</sup> céls/mL)	Concentração de anticorpo (µg/mL)	Nº de clones transferidos
Meio semissólido	Placa de 96 poços	-	-	280
Placa de 96 poços	Placa de 24 poços	-	-	280
Placa de 24 poços	Placa de 6 poços	0,25	15	168
Placa de 6 poços	Garrafas T-25	0,35	10	93
Garrafas T-25	Erlenmeyer	2	25	57

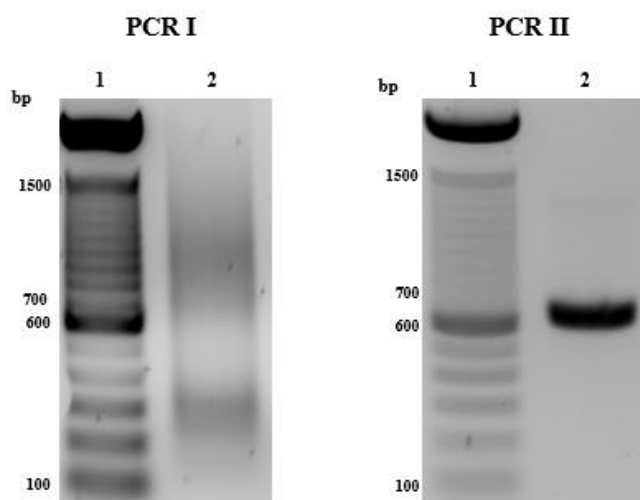
Para a etapa de cultivo em agitação foram selecionados 57 clones. Uma batelada de 4 dias foi realizada para o cálculo do PCD e ranqueamento dos clones. A partir dos resultados do PCD de 4 dias, 49 clones foram selecionados para uma batelada de 5 dias, cujos sobrenadantes foram purificados para a realização dos ensaios de ligação ao antígeno recombinante CD3 $\gamma$ e.

#### 4.3 CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE

A PCR I (*assembling*) da síntese do CD3 $\gamma$  $\epsilon$  apresentou a região de sombra na posição esperada – próximo aos 700 pares de base – conforme a foto do gel de agarose 1% na **Figura 9**. Nessa etapa não há visualização de uma banda única devido à formação (montagem) de vários fragmentos de diferentes tamanhos dentro de uma faixa de pares de base delimitada pelo tamanho do fragmento para o qual os oligos foram desenhados, 644 bp.

Para confirmar se na região de sombra há alguma sequência completa do gene montada na fase de *assembling* (PCR I) e gerar uma maior quantidade de material uma segunda reação é necessária, agora utilizando os *primers* Amp *for* GE e Amp *rev* para amplificar a sequência completa na PCR II (*Amplification*). Uma banda com forte intensidade de coloração foi visualizada na região próxima aos 700 pares de base (**Figura 9**) indicando que a etapa de montagem da PCR I foi realizada com sucesso. A purificação com gel de agarose 1% foi realizada e 6  $\mu$ g de DNA foram recuperados.

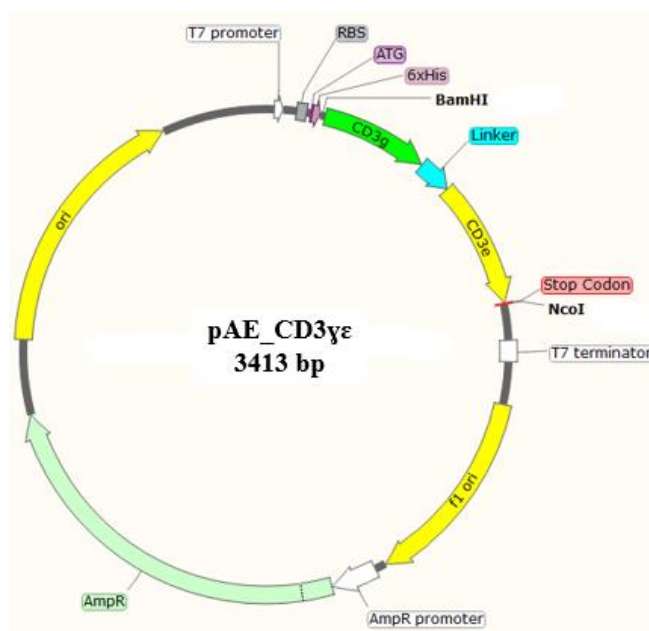
**Figura 9.** Géis de agarose 1% da síntese do gene CD3 $\gamma$  $\epsilon$ .



bp = *base pair* (pares de base); 1 = DNA Ladder 100 bp – Invitrogen; 2 = reação; PCR I = *assembling*; PCR II = *amplification*; Géis expostos por 1 s.

Como o gene sintetizado apresentava os sítios de restrição BamHI (5') e NotI (3') foi necessário realizar uma troca do sítio de restrição da extremidade 3' para NcoI a fim de permitir sua inserção no vetor pAE (**Figura 10**). Ao final da PCR e da purificação a massa obtida foi de 6,6  $\mu$ g. Após a digestão do vetor e do inserto a reação de ligação foi realizada e o produto foi plaqueado a fim de selecionar colônias isoladas para o teste por PCR.

**Figura 10.** Esquema do vetor pAE com a sequência CD3 $\gamma\epsilon$  inserida totalizando 3413 pares de base.



bp = *base pair* (pares de base); RBS = do inglês, sítio de ligação dos ribossomos; ATG = códon de início; 6×HIS = cauda n-terminal com seis histidinas.

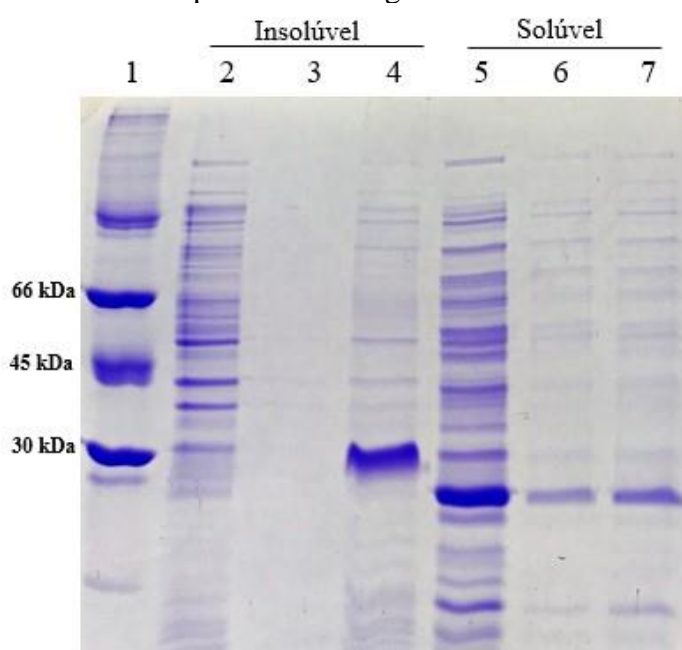
A placa de controle SL apresentou 3 unidades formadoras de colônia (UFC), a placa L com 100  $\mu$ L de transformado (L<sub>100</sub>) apresentou 11 UFC e a placa L com 200  $\mu$ L de transformado (L<sub>200</sub>) apresentou 26 UFC. Foram selecionadas aleatoriamente sete colônias da placa L<sub>100</sub> e 13 colônias da placa L<sub>200</sub> para a PCR. As colônias serão tratadas adiante como clones e receberão o prefixo “Q” antes de seus números. Foram identificados 15 clones positivos para a presença do vetor: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 20. Todos os clones foram preparados e enviados para o sequenciamento de DNA.

Os clones Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q13, Q14, Q15, Q16, Q18 e Q20 apresentaram a sequência correta do gene inserido no vetor. O clone Q17 apresentou uma substituição de base, mas sem alterar o aminoácido no frame de interesse. O clone Q9 apresentou mutação e foi descartado do estudo. O Q1 foi selecionado para a transformação por choque térmico da cepa de *E. coli* BL21 pLysS e início da expressão da proteína recombinante em corpo de inclusão com posterior *refolding in vitro*.

O cultivo apresentou DO<sub>600</sub> igual a 0,67 após aproximadamente 2:20 horas de cultivo sendo, então, induzido com 1 mM de IPTG. Ao final da expressão, por 20 horas, a DO<sub>600</sub> era de 1,37 e o cultivo de 400 mL foi dividido em dois tubos com 200 mL de cultivo celular e após o tratamento os tubos foram congelados a -20°C com os sedimentos lavados.

Após a lise por sonicação as porções solúveis (sobrenadante da lise) e insolúveis (sedimento contendo os corpos de inclusão) foram analisados por SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie a fim de confirmar a expressão (**Figura 11**). Uma banda intensa foi visualizada próximo ao marcador de 30 kDa na porção insolúvel do clone Q1 induzido por 20 h indicando a expressão da proteína em corpo de inclusão. O perfil da corrida e o valor da massa molecular visualizada no SDS-PAGE foram semelhantes aos publicados por Kim e colaboradores, 2000, cuja sequência foi utilizada neste projeto (KIM *et al.*, 2000a, 2000b).

**Figura 11.** SDS-PAGE 12% da expressão do antígeno recombinante.

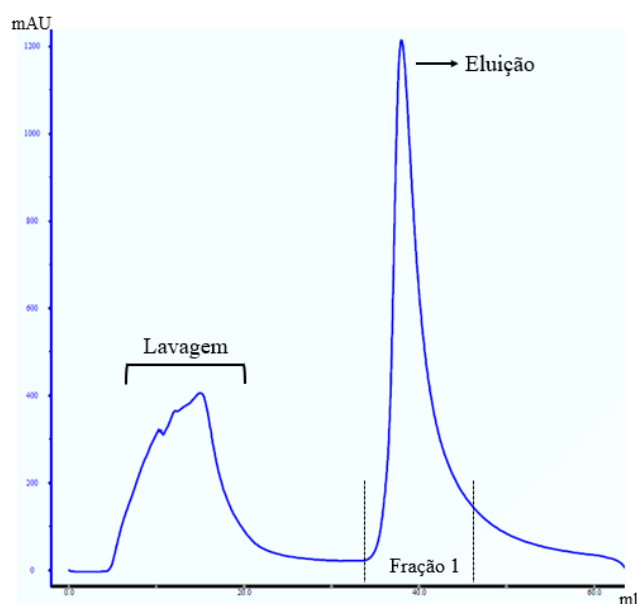


Todas as amostras estão reduzidas, com exceção do marcador de peso molecular. 1 = Marcador de baixo peso molecular; 2 e 5 = BL21 pLysS não transformada; 3 e 6 = clone Q1 não induzido; 4 e 7 = clone Q1 induzido por 20 h.

Um estudo da sequência da proteína foi realizado em uma plataforma *online* (ProtParam ExPaSy – Bioinformatics Resource Portal) a fim de obter alguns dados teóricos relativos à proteína, como por exemplo a sua massa molecular teórica, de 24,1 kDa de uma sequência de 214 aminoácidos. O ponto isoelétrico (PI) teórico foi de 5,99. O coeficiente de extinção molar a 280 nm em água é de  $34630 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (absorbância para 1 mg/mL = 1,436) em condições não redutoras e de  $34380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (absorbância para 1 mg/mL = 1,426) em condições redutoras. O índice alifático da proteína é 57,90 e o seu GRAVY (*Grand Average of Hydropathicity*) é de -1,009 indicando que a proteína é hidrofílica.

Após os processos de *refolding*, purificação e diafiltração dos 200 mL de cultivo foram obtidos 2 mL de antígeno recombinante com 1,61 mg/mL correspondente à fração 1 da purificação (**Figura 12**). Esse produto foi utilizado nos ensaios de SPR.

**Figura 12.** Cromatograma da purificação do CD3 $\gamma$  $\epsilon$  em coluna com íons de níquel imobilizados.

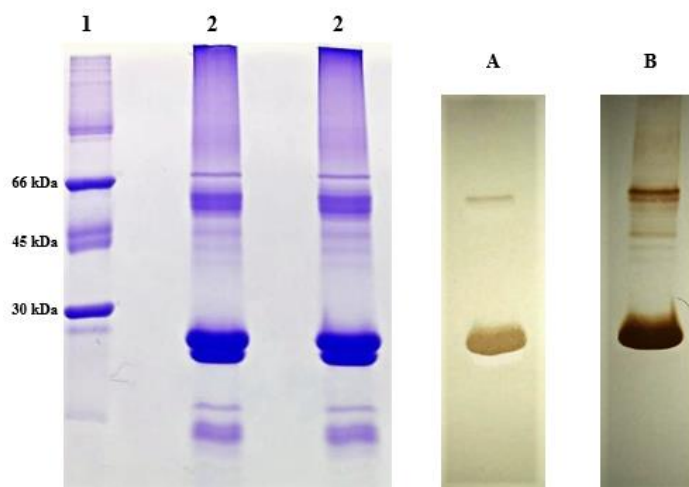


A Fração 1 corresponde ao eluato utilizado nos ensaios pós-purificação.

Os ensaios de WB foram realizados com um anti-CD3 murino produzido no Instituto Butantan pelo cultivo de hibridoma, que reconhece a porção épsilon do heterodímero em um ensaio indireto, e com um anti-CD3 murino comercial conjugado com peroxidase que também reconhece a cadeia épsilon do CD3 $\gamma$  $\epsilon$  em um ensaio direto (**Figura 13**). O WB foi positivo nos dois ensaios realizados. Em ambos os casos foi visualizada uma banda próxima aos 66 kDa podendo ser um agregado formado durante o processo de *refolding in vitro*. O padrão das bandas correspondentes ao antígeno, próximas aos 30 kDa no SDS-PAGE, é semelhante ao obtido na literatura (KIM *et al.*, 2000b, 2000a).

Portanto, a expressão do heterodímero recombinante CD3 $\gamma$  $\epsilon$  em *E. coli* foi satisfatória e o processo de *refolding in vitro* mostrou-se funcional.

**Figura 13.** SDS-PAGE 12% e western blot do CD3 $\gamma$  $\epsilon$  humano recombinante com anticorpos monoclonais anti-CD3 murinos.



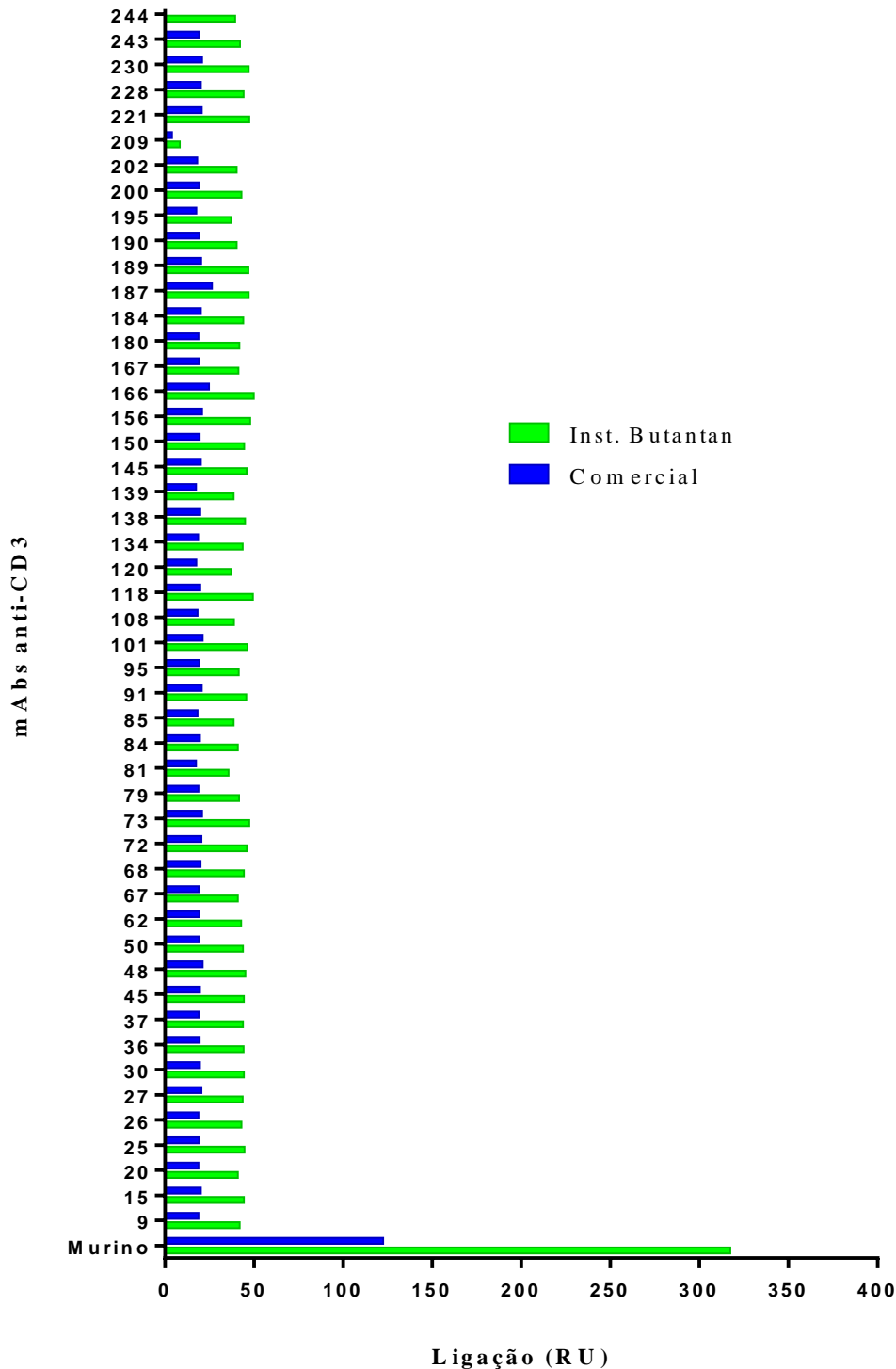
Amostras não reduzidas. 1 = Marcador de baixo peso molecular; 2 = CD3 $\gamma$  $\epsilon$  recombinante produzido; (A) WB indireto com anti-CD3 Butantan; (B) WB direto com anti-CD3 comercial.

#### 4.4 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE

Para a realização do ensaio de ligação por SPR o sensor CM5 foi imobilizado com o antígeno CD3 $\gamma$  $\epsilon$  (1679,5 RU) e um antígeno CD3 $\gamma$  $\epsilon$  comercial (1857,9 RU) em outro canal para validar o antígeno recombinante produzido. Além dos clones humanizados produtores do anticorpo anti-CD3, foi aplicado como controle positivo da ligação o anti-CD3 murino produzido no laboratório. A **Figura 14** apresenta a ligação dos anticorpos aos antígenos imobilizados no sensor. A ligação dos anticorpos humanizados foi aproximadamente 7,2 $\times$  menor quando comparada com o anticorpo murino contra antígeno produzido, que apresentou índice de ligação 2 $\times$  maior do que o antígeno comercial. A diferença se deve, provavelmente, às massas distintas das duas preparações, 50 kDa para o antígeno comercial (expresso em fusão a uma cadeia Fc de anticorpo) e 24,1 kDa para o obtido no laboratório.



**Figura 14.** Ensaio de ligação anti-CD3 x antígenos recombinantes.



Ensaio realizado por SPR com antígenos imobilizados CD3 $\gamma$ e Instituto Butantan e antígeno CD3 $\gamma$ e comercial, proporção equimolar. Todos os anticorpos foram aplicados na mesma concentração (20  $\mu$ g/mL). RU, unidades de ressonância.

Para definir as condições a serem usadas no ensaio de cinética foram avaliados apenas as amostras do anti-CD3 murino e o clone 118. Nas condições testadas, foi possível à obtenção

dos dados cinéticos e afinidade no estado estacionário apenas para o anti-CD3 murino. Das medidas da constante de associação  $K_a = 8,05 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e constante de dissociação  $K_d = 8,58 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , foi calculada a constante de afinidade cinética  $K_D$  (relação entre as velocidades de associação e dissociação)  $= 1,06 \times 10^{-8} \text{ M}$ . A afinidade no estado estacionário (afinidade onde as velocidades de associação e dissociação estão em equilíbrio) foi igual a  $1,68 \times 10^{-8} \text{ M}$ . Os dados cinéticos do clone humanizado 118 não foram calculados em virtude do baixo sinal de interação (RU) obtido, o que está relacionado com a redução da afinidade entre o anticorpo humanizado e o antígeno obtido no ensaio de SPR. Um estudo anterior analisando duas construções de anti-CD3 humanizado, FcFv e IgG completa, de anti-CD3 em comparação com a molécula murina também demonstrou redução da afinidade dos anticorpos humanizados em ensaio de competição por citometria de fluxo (SERPIERI *et al.*, 2010).

A humanização de anticorpos baseada no transplante de CDRs resulta frequentemente na diminuição da afinidade. Há tecnologia disponível para aumentar a afinidade, por exemplo, *back mutation* ou *phage display*. Contudo, dependendo do antígeno e da aplicação terapêutica pretendida, a redução da afinidade da sequência humanizada não é necessariamente negativa, podendo contribuir para evitar efeitos adversos aos desejados. A biodistribuição de anticorpos biespecíficos é diretamente afetada pela afinidade ao CD3. Uma baixa constante de dissociação,  $K_d = 50$  a  $200 \text{ nmol/L}$ , do Fab ligante ao CD3 é preferível por proporcionar uma melhor distribuição no tumor (LABRIJN *et al.*, 2019).

#### 4.5 ENSAIOS DE LIGAÇÃO ANTI-CD3 EM CÉLULAS

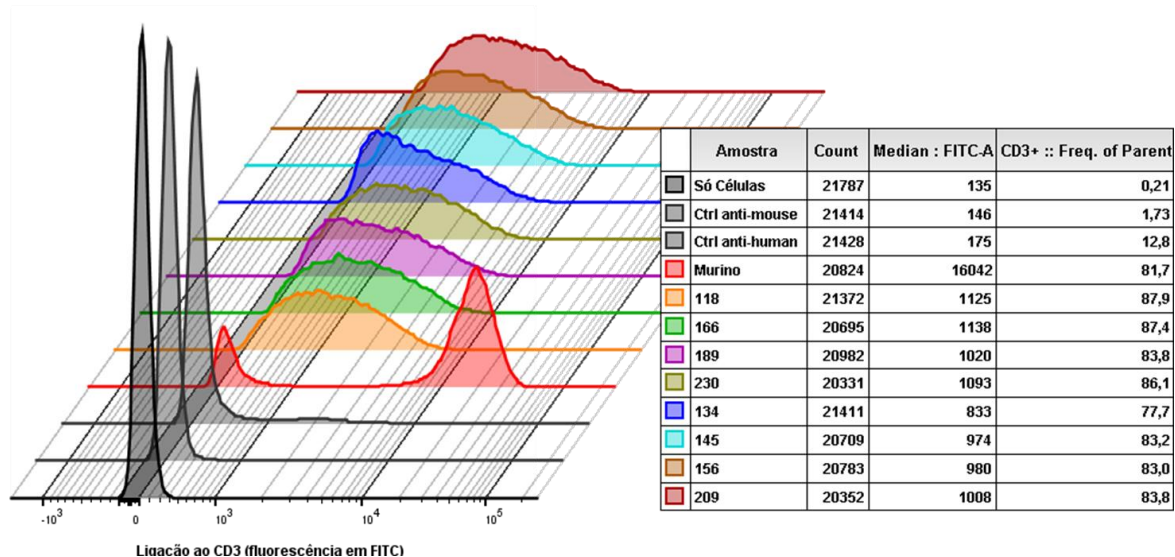
Para avaliar a ligação entre os anti-CD3 e células vivas foram utilizados PBMC de doadores saudáveis e um painel de anticorpos (anti-CD14, anti-CD8, anti-CD4 e anti-CD19) para definir as células T nas análises de citometria de fluxo. Além do anti-CD3 murino, os clones 118, 166, 189, 230, 134, 145, 156 e 209 foram selecionados para esse ensaio devido ao seu desempenho de produtividade de anticorpo e no ensaio de ligação por SPR.

O ensaio foi realizado em duplicata e apresentou uma ligação reduzida dos clones humanizados em relação à molécula murina (**Figura 15**) em concordância com o observado no ensaio de SPR (**Figura 14**), exceto para o clone 209, que apresentou a mais baixa ligação no SPR, mas neste ensaio com células apresentou um perfil de ligação muito próximo dos demais clones. Os controles dos anticorpos secundários anti-murino e anti-humano não apresentaram ligação inespecífica relevante (**Figura 15**). Essa redução de afinidade da construção

humanizada também foi descrita por outro grupo que trabalhou com humanizados a partir do OKT3 (SILVA *et al.*, 2009).

Apesar do número de células positivas (frequência parental) ser muito próximo tanto para o mAb murino quanto para o humanizado, a mediana da fluorescência em FITC da ligação anti-CD3 murino X PBMC foi mais de 10 vezes maior (**Figura 15**). Isso pode estar relacionado com a maior afinidade ao CD3 da molécula murina em comparação com a sequência humanizada. Contudo, por ser um ensaio indireto, é possível que o anticorpo secundário anti-murino apresente uma melhor marcação do que o secundário anti-humano. Um anticorpo humanizado com a mesma sequência de região Fc do anticorpo murino é necessário para testar essa hipótese, ou uma conjugação do anti-CD3 humanizado com algum fluorocromo para diminuir possíveis diferenças entre os controles espécie-específicos.

**Figura 15.** Ensaio de ligação de anti-CD3 com PBMC humano.



Histograma das células CD3+ por reação indireta de anti-CD3 murino ou humanizado com anticorpo secundário conjugado com FITC. Os controles anti-mouse e anti-humano não apresentaram marcação positiva como esperado. 118, 166, 189, 230, 134, 145, 156 e 209 referem-se aos clones de anti-CD3 humanizado. PBMC do doador 3 (D3).

#### 4.6 EFEITO DO ANTI-CD3 NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

Foi utilizado a marcação com CFSE para investigar a proliferação de linfócitos humanos totais a partir do tratamento com o anti-CD3, murino ou humanizado, por 8 dias (**Figura 16A**). Células de 3 doadores saudáveis foram utilizadas em duplicatas em experimentos separados.

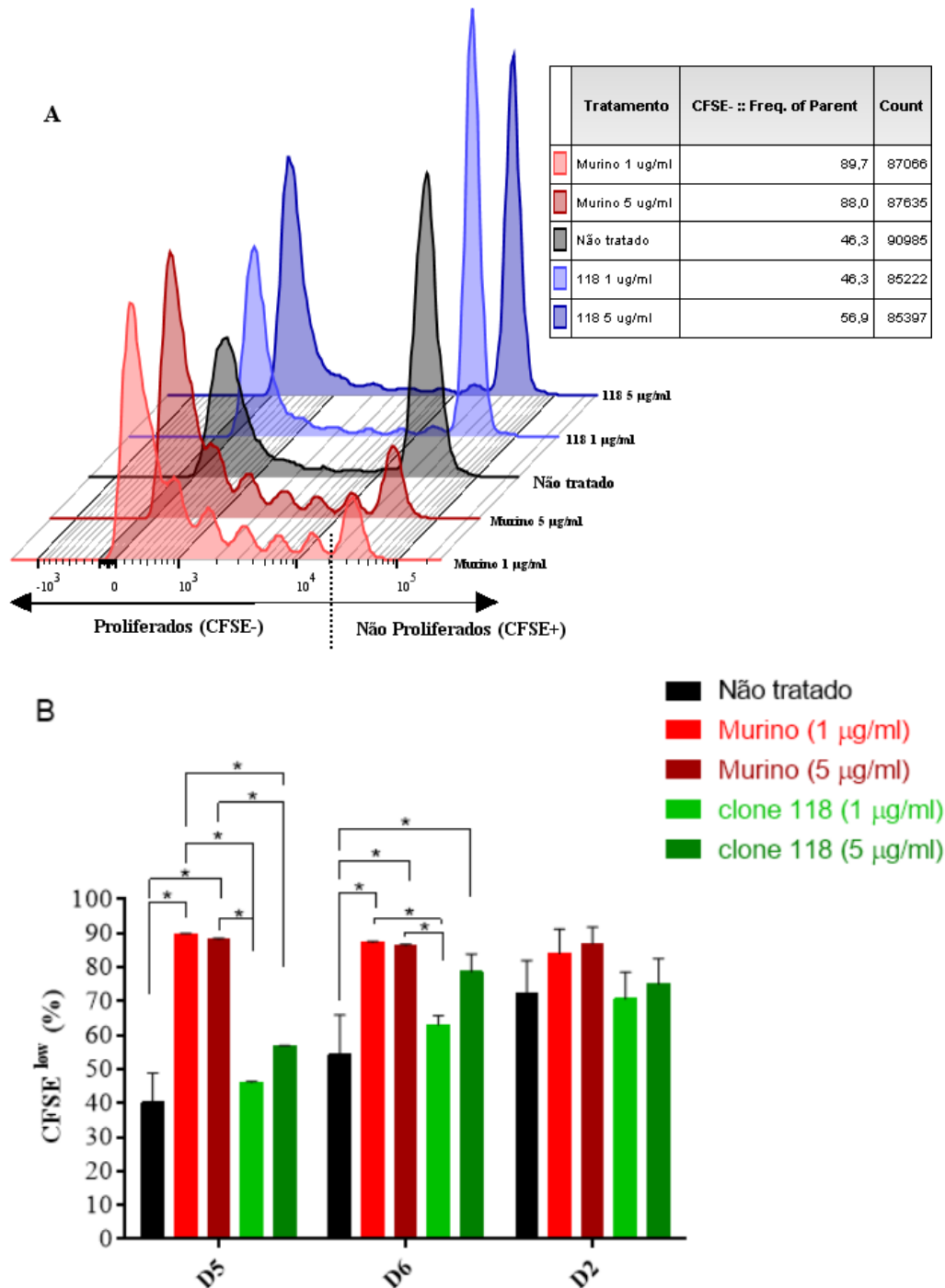
As células do doador 5 quando tratadas com anti-CD3 murino, em ambas as concentrações, apresentaram uma maior taxa de proliferação quando comparado com o grupo não tratado e o grupo tratado com ambas as concentrações do anticorpo humanizado (**Figura 16B**). Não houve diferença significativa entre o grupo não tratado e o tratado com ambas as concentrações do anticorpo humanizado.

No caso do doador 6, o tratamento com o mAb murino nas duas concentrações apresentou maior proliferação que o grupo não tratado (**Figura 16B**). Contudo, a proliferação celular com o tratamento humanizado somente foi diferente na menor das concentrações, na qual o crescimento celular foi inferior aos tratamentos com a molécula murina (**Figura 16B**). O tratamento com o clone humanizado apresentou maior proliferação celular em relação ao grupo não tratado somente com sua maior concentração. Esse tratamento também não apresentou diferença na proliferação celular em relação às duas concentrações de anticorpo murino (**Figura 16B**).

O doador 2 não apresentou diferenças significativas em seu crescimento celular em nenhum dos grupos de estudo (**Figura 16B**). Isso pode estar relacionado com características particulares do doador. Uma hipótese é que a amostra se constitui de células mais ativadas ou responsivas à metodologia de cultura, tendo em vista a proliferação de mais de 70% no grupo não tratado (**Figura 16B**).

Em um estudo com população estável mista (não clonada) de um anti-CD3 humanizado preparado por Silva e colaboradores (2009) no formato FcFv foi detectada uma menor taxa de proliferação. Nesse trabalho foram testados dois mutantes humanizados, resultando em 8% e 13% de proliferação, enquanto o anticorpo murino apresentou 62% (SILVA *et al.*, 2009). O grupo não suplementou o cultivo de 5 dias com IL-2, o que pode estar diretamente relacionado com os resultados aqui apresentados, pois a IL-2, em baixas concentrações, estimula o crescimento de células T *in vitro* (FONTENOT *et al.*, 2005). A IL-2 foi utilizada a 20 U/mL a fim de sustentar uma eventual indução de Treg clássica (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>), pois essa subpopulação reguladora é muito dependente de IL-2 exógena para sua sobrevivência e função, principalmente *in vitro* (BILATE; LAFAILLE, 2012).

**Figura 16.** Análise da proliferação de linfócitos totais tratados com diferentes anticorpos anti-CD3.



(A) Exemplo de histogramas da marcação com CFSE e tratamento com anti-CD3 murino e clone humanizado 118 nas concentrações de  $1\mu\text{g/mL}$  e  $5\mu\text{g/mL}$  mostrando a diferença na indução de proliferação. (B) Gráfico das frequências relativas ao *gate* de linfócitos de eventos CFSE- (células em proliferação) de células de três doadores saudáveis em duplicata. Doadores 5 e 6 apresentaram uma maior proliferação de células com o estímulo murino nas duas concentrações. D2, doador 2; D5, doador 5; D6 doador 6. Dados analisados com two-way ANOVA com teste de múltipla comparação de Tukey. \* $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

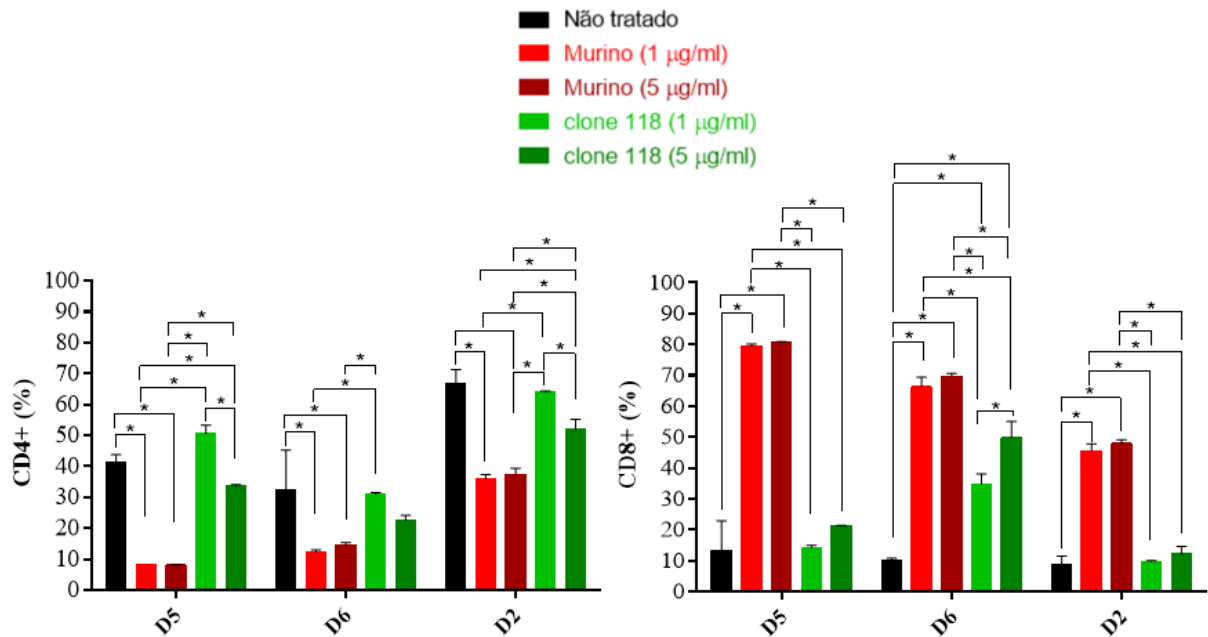
Também foram realizados testes com os mAbs anti-CD3 murino, clones 118 e 166 e um controle não tratado sem adição de IL-2 recombinante. A proliferação observada foi menor que 1% nos grupos não tratado, 118 e 166 (ambas as concentrações). Entretanto, as células tratadas com anti-CD3 murino (1 e 5 µg/mL) cresceram em média 72,5 % (dados não mostrados). Esse fato chamou atenção para a influência que a adição da IL-2 pode ter na indução do crescimento e não somente na manutenção de células Treg. Talvez uma menor concentração de IL-2 recombinante (10 U/mL) a partir do quinto dia de tratamento tenha uma menor influência na taxa de proliferação, mas mantenha populações de Tregs (ABRAHAM *et al.*, 2008).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES INDUZIDAS PELO ANTI-CD3

A população proliferada (CFSE negativa) dos linfócitos totais foi avaliada quanto a expressão de CD4 e CD8 e alguns marcadores de subpopulações de Treg e células T ativadas. A principal diferença entre os tratamentos foi a redução da população de células CD4<sup>+</sup> e o aumento dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> naqueles grupos tratados com ambas as concentrações de anti-CD3 murino nos três doadores (**Figura 17**). Particularmente, o doador 2 apresentou uma alta proliferação CD4<sup>+</sup> no grupo não tratado, assim como a alta proliferação celular total apresentada na **Figura 16B**. Esses dados reforçam a hipótese do perfil mais ativado das células desse doador.

Para avaliar se essas alterações nas subpopulações CD4 e CD8 foram direcionadas para perfis regulatório ou pró-inflamatório foram utilizados os marcadores CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2), CD127 (cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-7), CD28 (molécula co-estimulatória na ativação de células T), CD154 (CD40 ligante) e o fator de transcrição FOXP3.

**Figura 17.** Gráficos das frequências relativas às subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> proliferados (CFSE<sup>-</sup>).



Grupos tratados com anti-CD3 murino apresentaram uma menor taxa de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e um aumento significativo de T CD8<sup>+</sup> em relação ao grupo não tratado e ao grupo tratado com anti-CD3 humanizado (clone 118). Foram utilizados dados de 3 doadores (D2, D5 e D6) em duplicata. \* valor de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. D2, doador 2; D5, doador 5; D6, doador 6. Dados analisados com two-way ANOVA com teste de múltipla comparação de Tukey.

Estudos associam o tratamento com anti-CD3 humanizado com o aumento da subpopulação de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> (KUHN *et al.*, 2016; PENARANDA; TANG; BLUESTONE, 2011; SILVA *et al.*, 2009). O receptor para IL-7 (CD127 ou IL-7R $\alpha$ ) é importante nesse contexto, pois a expressão de FOXP3 é antagônica à expressão de CD127, sendo assim, a ausência de IL-7R $\alpha$  vem sendo utilizado como marcador para populações de células Treg (CHIBA *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2006). O tratamento com o clone humanizado 118 a 1 µg/mL apresentou um ligeiro aumento da expressão de FOXP3 (CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>) em comparação com o grupo não tratado. Por outro lado, nas duas concentrações utilizadas do anticorpo murino a expressão de FOXP3 foi menor em relação ao controle e aos clones 118 e 230 ao final dos 8 dias de cultivo (**Figura 18A**).

A subpopulação ativada CD4<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup>CD154<sup>+</sup>, pró-inflamatória, foi maior nos tratamentos com os clones humanizados em comparação com o anti-CD3 murino em todas as concentrações analisadas (**Figura 18B**). O aumento de CD154 (CD40L) e CD28 é importante para subpopulações CD4<sup>+</sup> Th1, Th2, Th17 e Th folicular, e sua atividade efetora em relação à ativação de células dendríticas, linfócitos B e T CD8<sup>+</sup> (KOGUCHI *et al.*, 2012; PINELLI;

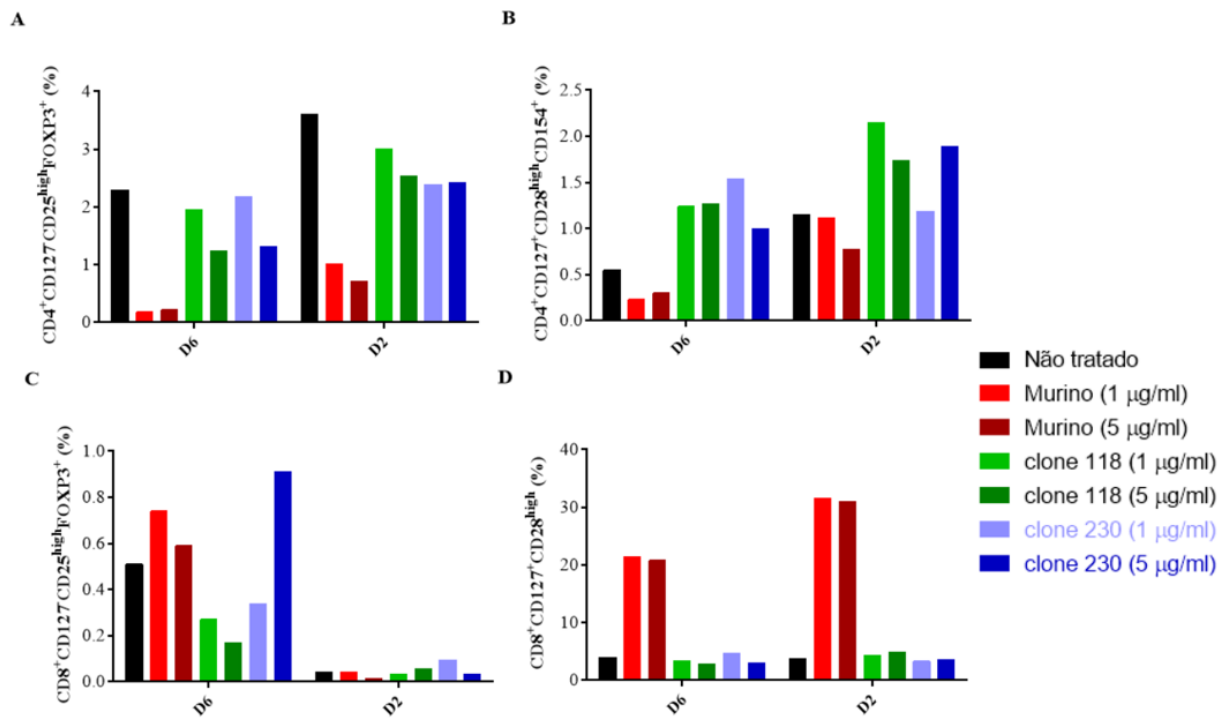
FORD, 2015). Nesse sentido, a avaliação do perfil de citocinas do microambiente é relevante para definir a direção da resposta imune após o tratamento com anti-CD3, tolerância ou inflamação.

Subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> reguladoras também são estimuladas após o tratamento com anti-CD3. Essas Treg CD8<sup>+</sup> podem expressar FOXP3, ou apenas apresentar um perfil CD127<sup>-</sup>CD28<sup>low/-</sup> (NOTLEY *et al.*, 2010; TIAN *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2018). A expressão de FOXP3 na subpopulação CD8<sup>+</sup> foi abaixo de 1% para todas as condições de tratamento (**Figura 18C**). Por outro lado, o tratamento com ambas as concentrações de anticorpo murino, além de estimular o crescimento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (**Figura 17**), aumenta a subpopulação pró-inflamatória CD8<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup> (**Figura 18D**).

A indução de subpopulações CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> não foi alcançada com nenhum dos tratamentos. As frequências relativas foram sempre inferiores ao controle não tratado (dados não mostrados). De fato, subpopulações de Treg induzidas pelo tratamento com anti-CD3 via oral contam com o microambiente tolerante da submucosa intestinal (KUHN *et al.*, 2016; OGURA *et al.*, 2017), situação diferente do microambiente da cultura de PBMC. Entretanto, novos protocolos *in vitro* podem ser desenvolvidos para aproximar o experimento da via de administração oral.



**Figura 18.** Gráficos das frequências relativas aos linfócitos proliferados (CFSE<sup>-</sup>) e subpopulações de linfócitos T.



(A) subpopulação CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>; (B) subpopulação CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD28<sup>high</sup>CD154<sup>+</sup> subpopulação; (C) CD8<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>; (D) subpopulação CD8<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD28<sup>high</sup>. Para os grupos não tratado, murino, clone 118 e clone 230 foram utilizadas amostras de 2 doadores, doadores 2 e 5 (D2 e D5). Nenhuma análise estatística foi realizada.

#### 4.8 CITOCINAS ENVOLVIDAS NO TRATAMENTO COM ANTI-CD3

Diante dos resultados dos fenótipos das subpopulações induzidas pelo tratamento com as diferentes moléculas de anti-CD3, o perfil das citocinas de cada poço em dois tempos (48 e 192 h) permite um melhor entendimento do tipo de estímulo prevalente, inflamatório ou regulatório.

Após 48 h de tratamento as maiores alterações no perfil de citocinas ocorreram nos tratamentos realizados com anti-CD3 murino. As concentrações de IFN- $\gamma$  ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 19A**), TNF- $\alpha$  ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 19B**), IL-1 $\beta$  ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 19C**), IL-6 ( $p \leq 0,0001$ ) (**Figura 19E**), IL-12p70 ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 19F**) e IL-17A ( $p < 0,005$ ) (**Figura 19D**) foram maiores nesse primeiro tempo do que os grupos não tratado e tratados com os clones 118 e 230. A concentração de IFN- $\gamma$  após 48 h ultrapassou a capacidade de dosagem da curva (**Figura 19A**) e se manteve a mais alta dentre todos os grupos também após 192 h ( $p < 0,0001$ ). Contudo, a concentração da citocina reguladora IL-10 ( $p < 0,0001$ ) ficou mais alta no tempo de 48 h nos

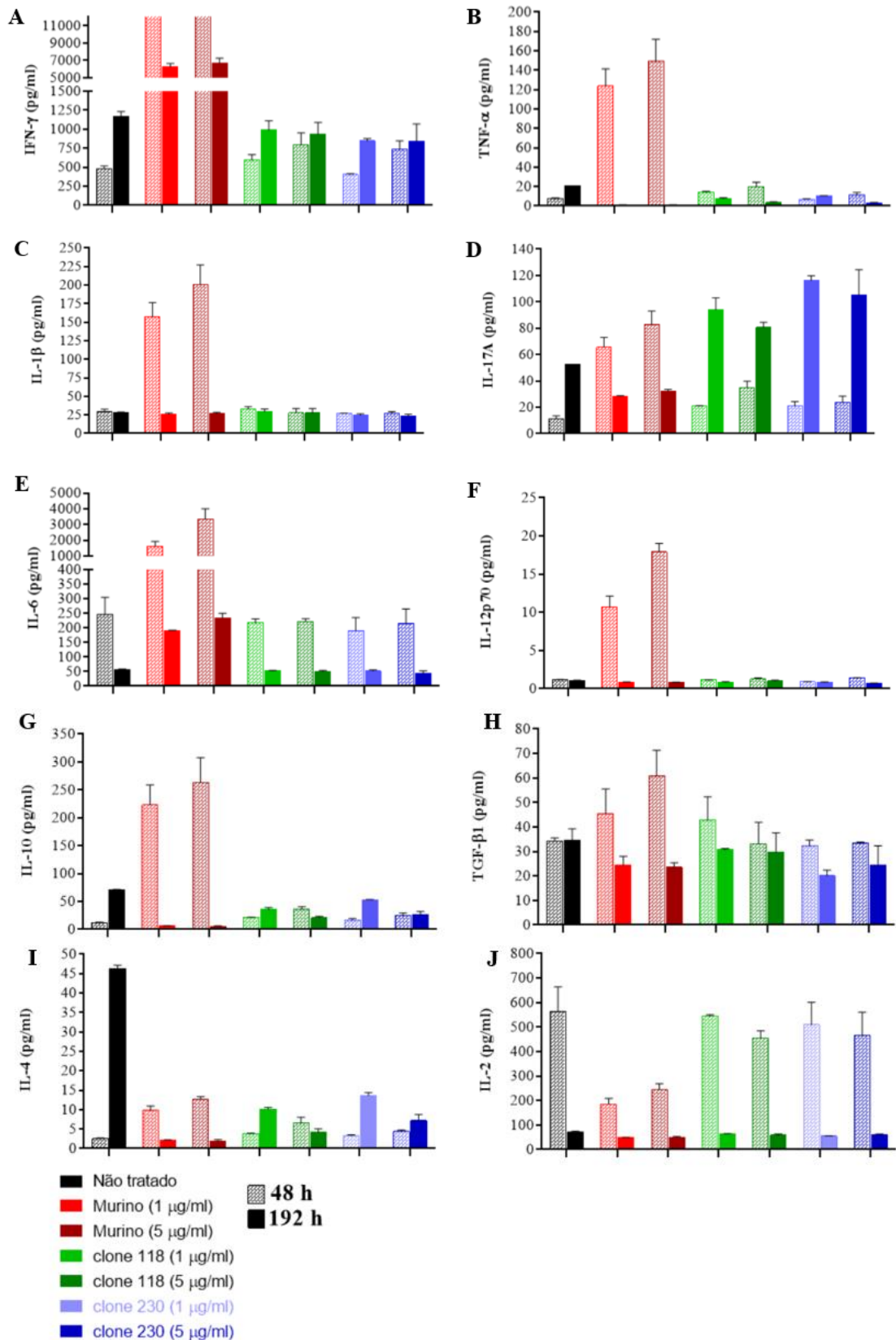
tratamentos com o anti-CD3 murino, principalmente na concentração de 5 µg/mL (**Figura 19G**). Isso pode explicar a redução das concentrações dessas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no tempo de 192 h.

O tratamento com os clones 118 e 230 apresentou um perfil de citocinas e quimiocinas próximo do controle não tratado nos dois tempos. Isso pode estar relacionado com a baixa ligação ao CD3 em comparação ao anticorpo murino (**Figura 14**). A expressão de TGF-β1 e IL-10 também ficou abaixo do esperado no tratamento com os mAbs humanizados em comparação com o anti-CD3 murino (**Figura 19G-H**). O aumento de TGF-β1 e IL-10 após o tratamento com anti-CD3 foi demonstrado em estudos com experimentos em camundongos utilizando anticorpo murino e humano/humanizado em camundongos transgênicos que expressam CD3 humano (KUHN, CHANTAL & WEINER, 2016; KUHN *et al.*, 2016; OCHI *et al.*, 2008; REZENDE *et al.*, 2015, 2019) e em ensaios clínicos com humanos saudáveis e com diabetes tipo I utilizando anti-CD3 humanizados (HEROLD *et al.*, 2019; ILAN; SHAILUBHAI; SANYAL, 2018; LONG *et al.*, 2017). De fato, as particularidades do microambiente das mucosas têm grande papel na indução de uma resposta imunorregulatória nesses tratamentos. Experimentos *in vitro*, para esses casos, devem considerar o uso de citocinas recombinantes, como o TGF-β e IL-10, na tentativa de simular às concentrações basais na mucosa intestinal ou nasal.

A concentração de IL-4 não apresentou diferenças entre os grupos tratados com anti-CD3 murino ou humanizado (**Figura 19I**). No grupo não tratado, após 192 h, houve um significativo aumento de IL-4 ( $p < 0,0001$ ). Esse evento pode ser uma resposta característica do doador das PBMCs, visto que esse grupo recebeu apenas o meio de cultura com SFB e IL-2 humana recombinante.

A dosagem de IL-2 é prejudicada pela adição de IL-2 recombinante (20 U/mL) adicionada a cada 48 h. Entretanto, houve uma redução nas concentrações dessa citocina no tratamento com ambas as concentrações de anti-CD3 murino após 48 h ( $p < 0,05$ ) (**Figura 19J**). Isso pode ser justificado pelo aumento da proliferação de linfócitos durante o tratamento com a molécula murina (**Figura 16**) aumentando o consumo de IL-2. A adição de SFB no meio de cultura deste experimento pode influenciar tanto a ativação celular quanto a dosagem das citocinas humanas, pois citocinas bovinas presentes no SFB podem estimular células humanas e também serem reconhecidas, de forma inespecífica, pelos anticorpos anti citocinas humanas contidos nos imunoenaios comerciais. Um novo ensaio sem adição de SFB foi realizado para a análise de citocinas intracelular.

**Figura 19.** Citocinas e quimiocina secretadas pelo PBMC humano em resposta ao tratamento com anti-CD3 em 48 h e 192 h.



(A) IFN- $\gamma$ ; (B) TNF- $\alpha$ ; (C) IL-1 $\beta$ ; (D) IL-17A; (E) IL-6; (F) IL-12p70; (G) IL-10; (H) TGF- $\beta$ 1; (I) IL-4; (J) IL-2. Ensaio realizado em duplicata tanto para a curva-padrão quanto para as amostras. Sobrenadantes coletados do cultivo de células do doador 6 (D6). Concentrações em

picogramas/mililitros. Dados analisados com two-way ANOVA com teste de múltipla comparação de Tukey.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

#### 4.9 SUBPOPULAÇÕES E CITOCINAS INTRACELULARES

Os anticorpos purificados dos cultivos das populações estáveis mistas 1A, 1B, 2A e 2B foram misturados, de forma equimolar, para este experimento, para avaliar se resultados inesperados eram devidos a um clone em particular. Durante o processo de clonagem, seja por diluição limite ou em plataforma automatizada (ClonePix), somente uma fração das células é recuperada para a geração de linhagens monoclonais, ocorrendo perda aleatória de inúmeros clones em mais de uma etapa do processo. No caso da clonagem em plataforma robótica, há uma diminuição dessas perdas por contaminação de poço, mistura de clones, confirmação de produtividade etc. Contudo, nem todas as células responsáveis pelo produto de uma determinada população estável mista serão isoladas em clones. Diante disso, nos próximos experimentos foi explorado o anticorpo produzido pelas populações estáveis mistas. Uma análise de citometria de fluxo realizada com as populações estáveis mistas havia indicado resultados mais próximos da mediana da fluorescência em relação ao anticorpo anti-CD3 murino. Como essa análise foi realizada em um citômetro rudimentar (sem SSC, *side scatter*), os dados não estão apresentados, porém suscitaram a sugestão da realização de ensaios específicos com os anticorpos produzidos pelas populações pré-clonagem.

Foram realizados experimentos para investigar a produção de IL-10, FOXP3, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por cada subpopulação de células (intracelular) após o tratamento com os anti-CD3 murino e humanizado por meio de cultivo, estímulo, paralização do complexo de Golgi e citometria de fluxo. A marcação intracelular dessas citocinas pode reforçar os resultados obtidos na quantificação das citocinas no sobrenadante do cultivo. Esse experimento também orienta a investigação das mudanças provocadas pelos tratamentos murino ou humanizado, ao permitir associar a produção de determinada citocina à uma subpopulação.

A subpopulação chamada de “granulócitos” foi aquela que apresentou altos valores de SSC (*side scatter*) no *gate* SSC x FSC (*forward scatter*), pois não foram utilizados marcadores para as células do PBMC que normalmente compõe essa região, monócitos, NK etc. Contudo, foram observadas diferenças nessa subpopulação após a aquisição. A frequência relativa dessas células nos grupos tratados com anti-CD3 humanizado, em ambas as concentrações, foi maior do que aqueles tratados com o mAb murino nas duas concentrações. (**Figura 20A**) ( $p < 0,05$ ).

Os grupos murinos 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram maior quantidade de “granulócitos” secretando  $\text{TNF-}\alpha$  no estímulo de 24 h e 72 h (**Figura 20B**) ( $p < 0,05$ ) do que aqueles tratados com o anti-CD3 humanizado. Essa subpopulação pode estar diretamente relacionada com as altas concentrações dessa citocina vistas no experimento anterior (**Figura 19B**). Em relação ao  $\text{IFN-}\gamma$ , as células tratadas com o anticorpo murino apresentaram-se mais produtores de  $\text{IFN-}\gamma$  na subpopulação dos “granulócitos” em relação às tratadas com o anticorpo humanizado nos dois tempos analisados (**Figura 20C**) ( $p < 0,05$ ).

A subpopulação de linfócitos T  $\text{CD4}^+$  foi menor nas duas concentrações de tratamento com o anti-CD3 humanizado em relação aos grupos não tratados e as duas concentrações de anti-CD3 murino (**Figura 20D**) ( $p < 0,05$ ). Já as células  $\text{CD8}^+$  tiveram uma maior frequência nos tratamentos com ambas as concentrações de humanizados nas células do D6 em 72 h em relação aos tratamentos murino e não tratado (**Figura 20E**) ( $p < 0,05$ ). Esses resultados contradizem os obtidos no ensaio de proliferação celular (**Figura 17**), entretanto, foi utilizado suplementação de IL-2 no experimento anterior, que interfere diretamente na sobrevivência dos linfócitos T em cultura (ABRAHAM *et al.*, 2008).

O tratamento com anti-CD3 murino (ambas as concentrações) apresentou um maior número de células  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$  produtoras de  $\text{IFN-}\gamma$ , 24 e 72 h, do que o controle não tratado e com o anticorpo humanizado (**Figura 20F-G**) ( $p < 0,05$ ). Esse resultado confirma o obtido na quantificação de citocinas no sobrenadante dos cultivos (**Figura 19A**), sendo que a redução na quantidade de interferon no tempo de 192h condiz com a redução no número de células produtoras no tempo de 72 h neste experimento. Essa diferença na proporção do tempo pode ser justificada também pelo uso de IL-2 durante o cultivo.

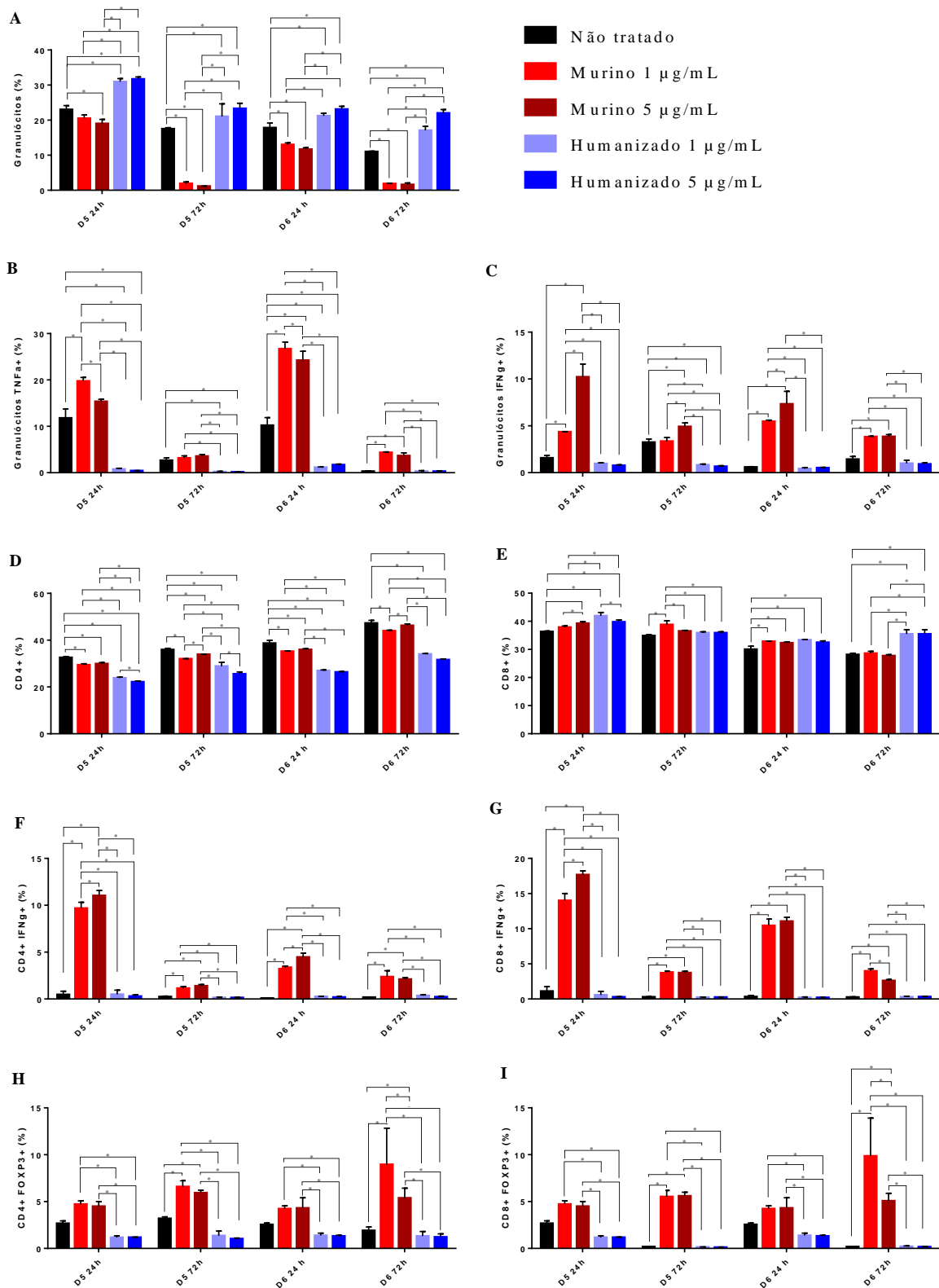
Esse perfil de indução de subpopulações produtoras de citocinas pró-inflamatória do tratamento com o anti-CD3 murino está de acordo com diversos estudos em camundongos e humanos, que mostraram um aumento significativo de citocinas na primeira administração intravenosa, que resultou em vários efeitos adversos como febre, náusea, vômito, dor de cabeça, convulsões, insuficiência cardiopulmonar e renal, sintomas associados à tempestade de citocinas pró-inflamatórias (FERRAN *et al.*, 1990; HIRSCH *et al.*, 1988; KUHN, CHANTAL & WEINER, 2016). A alta afinidade do anticorpo murino e sua porção Fc funcional foram associadas ao contexto inflamatório. (HABER *et al.*, 2021; KUHN, CHANTAL & WEINER, 2016; LABRIJN *et al.*, 2019; PENARANDA; TANG; BLUESTONE, 2011).

Apesar de apresentar o potencial inflamatório maior em ambos os ensaios realizados, o anti-CD3 murino também apresentou uma maior subpopulação produtora de  $\text{FOXP3}^+ \text{CD4}^+$  ou  $\text{CD8}^+$  em relação ao anticorpo humanizado (**Figura 20H-I**). Esse aumento de FOXP3 no

tratamento *in vitro* com anti-CD3 murino também foi obtido por Silva e colaboradores, 2009, sendo associado à alta afinidade do OKT3. Nesse estudo, também verificou-se o aumento do RNA mensageiro para FOXP3 com o aumento da concentração do anticorpo de 1 para 5 µg/mL (SILVA *et al.*, 2009). Isso pode justificar o aumento da concentração de IL-10 no sobrenadante do cultivo com 48 h de estímulo murino (**Figura 19I**). Não foi obtido nenhum evento positivo com a marcação para IL-10 intracelular neste experimento de marcação de citocinas intracelular. A não suplementação com IL-2 humana pode estar relacionada com esse fato, uma vez que essa citocina é também responsável pela ativação de células T e manutenção de células Treg (ABRAHAM *et al.*, 2008).

De uma forma geral, o tratamento com o anti-CD3 murino apresentou potencial inflamatório, em muitos casos, maior com o aumento da concentração de uso. Por outro lado, o anti-CD3 humanizado, advindo de clone ou população estável mista, mostrou um estímulo mais relacionado com o perfil regulador, porém em alguns resultados, equivalente ao grupo sem tratamento. A baixa ligação do humanizado está relacionado com esses achados. Contudo, o comportamento da população de “granulócitos” em relação ao anticorpo humanizado foi um diferencial não esperado, que merece uma melhor investigação.

**Figura 20.** Gráficos das frequências relativas (%) do PBMC humano após o tratamento com anti-CD3 murino ou humanizada e brefeldinA.



Barras em preto, grupos não tratados; barras em vermelho claro, grupos tratados com anti-CD3 murino a 1  $\mu\text{g/mL}$ ; barras em vermelho escuro, grupos tratados com anti-CD3 murino a 5  $\mu\text{g/mL}$ ; barras em azul claro, grupos tratados com pool anti-CD3 humanizado a 1  $\mu\text{g/mL}$ ; barras

em azul escuro, grupos tratados com pool anti-CD3 humanizado a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As linhas em cada barra indicam a média da triplicada com o desvio padrão. D5, doador 5; D6, doador 6.



## 5 CONCLUSÕES

- A transfecção estável de células CHO-S com as cadeias leve e pesada do anti-CD3 humanizado foi alcançada com produção estável de quatro populações estáveis mistas após a seleção;
- Foi possível obter clones estáveis produtores de anti-CD3 humanizado a partir da clonagem das populações estáveis mistas pela utilização da plataforma robótica ClonePix para o isolamento dos clones;
- O vetor contendo a sequência do ectodomínio do heterodímero gama e épsilon do complexo CD3 foi construído e o antígeno recombinante CD3 $\gamma\epsilon$  foi expresso em bactéria com sucesso, assim como o seu *refolding in vitro* e purificação apresentaram rendimento satisfatório;
- O perfil de ligação dos clones humanizados foi obtido por SPR a partir do antígeno recombinante produzido em comparação com outro antígeno comercial resultando na baixa ligação do anti-CD3 humanizado em relação ao murino;
- A diminuição na ligação do anticorpo humanizado também foi verificada no ensaio de ligação com PBMC humano;
- O anti-CD3 humanizado induziu uma menor proliferação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em relação ao murino, em ambas as concentrações utilizadas, sendo que no caso murino a subpopulação induzida apresentou marcadores de ativação celular aumentados;
- O anti-CD3 humanizado apresentou maior crescimento de linfócitos CD4<sup>+</sup> no ensaio de proliferação celular em relação ao tratamento com o anticorpo murino, sendo que a população CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> também foi maior nos grupos tratados com os clones humanizados em relação ao murino;
- O tratamento com anti-CD3 humanizado também apresentou decréscimo de citocinas inflamatórias, em ambas as concentrações de tratamento, (ex. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) em relação ao estímulo com anti-CD3 murino. Esse decréscimo foi verificado tanto na quantificação de citocinas do sobrenadante do poço quanto na marcação intracelular;
- Para melhor definir o comportamento do anti-CD3 humanizado, outros ensaios podem ser realizados (*in vitro* e *in vivo*). Tendo-se em vista a sua baixa afinidade, é possível que sua capacidade de ligação não seja suficiente para o estímulo dos linfócitos T, porém seja importante, e desejada, para a composição em uma construção de anticorpo biespecífico, no qual uma das valências seja anti-CD3;

- O aumento na frequência relativa de “granulócitos” com o anti-CD3 humanizado sem aumentar a quantidade de células produtoras de TNF- $\alpha$  IFN- $\gamma$  deve ser melhor investigado, pois pode indicar um potencial regulador distinto da via Treg.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, M.; KARNI, A.; DEMBINSKY, A.; MILLER, A.; GANDHI, R.; ANDERSON, D.; WEINER, H. L. In vitro induction of regulatory T cells by anti-CD3 antibody in humans. **Journal of Autoimmunity**, v. 30, n. 1–2, p. 21–28, 2008.
- AL-KINANI, K.; TOLBERT, T. **Modifying the Fc Asn297 Glycan of Human IgG2 Subclass for Improved Antibody Therapeutics and Design of Site-Specific Antibody Drug Conjugates**. 2017. 2017.
- ARECHAGA, I.; SWAMY, M.; ABIA, D.; SCHAMEL, W. A.; ALARCÓN, B.; VALPUESTA, J. M. Structural characterization of the TCR complex by electron microscopy. **International Immunology**, v. 22, n. 11, p. 897–903, 2010.
- BILATE, A. M.; LAFAILLE, J. J. Induced CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Immune Tolerance. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 733–758, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-020711-075043>>.
- BJØRNEBOE, M.; GORMSEN, H. Experimental studies on the role of plasma cells as antibody producers. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 20, n. 4, p. 649–692, 1943.
- BORDON, Y. The many sides of Paul Ehrlich. **Nature Immunology**, v. 17, n. S1, p. S6–S6, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ni.3601>>.
- BORLAK, J.; LÄNGER, F.; SPANEL, R.; SCHÖNDORFER, G.; DITTRICH, C. Immune-Mediated Liver Injury of the Cancer Therapeutic Antibody Catumaxomab Targeting EpCAM, CD3 and Fcγ Receptors. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 28059–28074, maio 2016.
- BORROTO, A.; MALLABIABARRENA, A.; ALBAR, J. P.; MARTÍNEZ-A., C.; ALARCÓN, B. Characterization of the region involved in CD3 pairwise interactions within the T cell receptor complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 12807–12816, 1998.
- C. MILSTEIN, G. K. and. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495–497, 1975.
- CALL, M. E.; PYRDOL, J.; WIEDMANN, M.; WUCHERPFENNIG, K. W. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 967–979, 2002.
- CALL, M. E.; WUCHERPFENNIG, K. W.; CHOU, J. J. The structural basis for intramembrane assembly of an activating immunoreceptor complex. **Nature Immunology**, v. 11, n. 11, p. 1023–1029, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ni.1943>>.
- CHATENOUD, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 123–132, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1000>>.
- CHATENOUD, L. A future for CD3 antibodies in immunotherapy of type 1 diabetes. **Diabetologia**, p. 1–4, 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00125-018-4808-7>>.

CHATENOUD, L.; MARC, baudrihaye f.; CHKOFF, N.; KREIS, H.; GOLDSTEIN, G.; BACH, J. Restriction of the human in vivo immune response against the mouse monoclonal antibody OKT3 . Goldstein and J F Bach Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : RESTRICTION OF THE HUMAN IN VIVO IMMUNE MOUSE MONOCLONAL ANTIBOD. **The Journal of Immunology**, v. 137, p. 830–838, 1986.

CHIBA, T.; ENDO, M.; MIURA, S.; HAYASHI, Y.; ASAKURA, Y.; OYAMA, K.; MATSUMOTO, T. Regulatory T cells in Crohn's disease following anti-TNF- $\alpha$  therapy. **JGH Open**, p. 1–4, 2019.

CLEVERS, H. C.; DUNLAP, S.; WILEMAN, T. E.; TERHORST, C. Human CD3-epsilon gene contains three minixons and is transcribed from a non-TATA promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 21, p. 8156–60, 1988. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=282386&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DAVE, V. P.; CAO, Z.; BROWNE, C.; ALARCON, B.; FERNANDEZ-MIGUEL, G.; LAFAILLE, J.; DE LA HERA, A.; TONEGAWA, S.; KAPPES, D. J. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. **The EMBO journal**, v. 16, n. 6, p. 1360–1370, 1997.

DAVIS, M. M.; BJORKMAN, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. **Nature**, v. 334, n. 6181, p. 395–402, 1988. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/334395a0>>.

DOLGIN, E. Anti-CD3 drug keeps diabetes at bay. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1099–1101, 2019.

DONG, D.; ZHENG, L.; LIN, J.; ZHANG, B.; ZHU, Y.; LI, N.; XIE, S.; WANG, Y.; GAO, N.; HUANG, Z. Structural basis of assembly of the human T cell receptor–CD3 complex. **Nature**, v. 573, n. 7775, p. 546–552, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1537-0>>.

DOS SANTOS, M. L.; QUINTILIO, W.; MANIERI, T. M.; TSURUTA, L. R.; MORO, A. M. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, p. 1–15, 2018.

EDELMAN, G. M.; POULIK, M. D. STUDIES ON STRUCTURAL UNITS OF THE  $\gamma$ -GLOBULINS . **Journal of Experimental Medicine**, v. 113, n. 5, p. 861–884, 1 maio 1961. Disponível em: <<https://doi.org/10.1084/jem.113.5.861>>.

FAGRAEUS, A. Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. **Nature**, v. 159, n. 4041, p. 499, 1947.

FEHERVARI, Z. Anti-CD3: The Agonist and the ecstasy. **Nature Milestones**, v. 1698, n. June, p. S19, 2021.

FERRAN, C.; SHEEHAN, K.; DY, M.; SCHREIBER, R.; MERITE, S.; LANDAIS, P.; NOEL, L.-H.; GRAU, G.; BLUESTONE, J.; BACH, J.-F.; CHATENAUD, L. Cytokine-related syndrome following injection of anti-CD3 monoclonal antibody: Further evidence for transient in vivo T cell activation. **European Journal of Immunology**, v. 20, n. 3, p. 509–515,

1990. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/eji.1830200308>>.

FONTENOT, J. D.; RASMUSSEN, J. P.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1142–1151, 2005.

FRANCINE, L.; MARIA, M. A.; RODRIGUES, M. T. A.; GARBUIO, A.; MONTEIRO, S. M.; MARQUES, F.; CASTRO, M. C. R.; IANHEZ, L. E.; PESTANA, J. O. M.; NEUMANN, J.; COELHO, V.; RAW, I.; KALIL, J. Use of the Butantan 's anti-CD3 in renal transplantation. **JBT J Bras Transpl**, v. 9, p. 572–578, 2006.

GLASSMAN, C. R.; PARRISH, H. L.; LEE, M. S.; KUHNS, M. S. Reciprocal TCR-CD3 and CD4 Engagement of a Nucleating pMHCII Stabilizes a Functional Receptor Macrocomplex. **Cell Reports**, v. 22, n. 5, p. 1263–1275, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124717319563>>.

GOLAY, J.; INTRONA, M. Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: Promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 526, n. 2, p. 146–153, 2012.

GRILO, A. L.; MANTALARIS, A. The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 9–16, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.014>>.

HABER, L.; OLSON, K.; KELLY, M. P.; CRAWFORD, A.; DILILLO, D. J.; TAVARÉ, R.; ULLMAN, E.; MAO, S.; CANOVA, L.; SINESHCHEKOVA, O.; FINNEY, J.; PAWASHE, A.; PATEL, S.; MCKAY, R.; RIZVI, S.; DAMKO, E.; CHIU, D.; VAZZANA, K.; RAM, P.; MOHRS, K.; D'ORVILLIERS, A.; XIAO, J.; MAKONNEN, S.; HICKEY, C.; ARNOLD, C.; GIURLEO, J.; CHEN, Y. P.; THWAITES, C.; DUDGEON, D.; BRAY, K.; RAFIQUE, A.; HUANG, T.; DELFINO, F.; HERMANN, A.; KIRSHNER, J. R.; RETTER, M. W.; BABB, R.; MACDONALD, D.; CHEN, G.; OLSON, W. C.; THURSTON, G.; DAVIS, S.; LIN, J. C.; SMITH, E. Generation of T-cell-redirecting bispecific antibodies with differentiated profiles of cytokine release and biodistribution by CD3 affinity tuning. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-93842-0>>.

HALL, C.; BERKHOUT, B.; ALARCON, B.; SANCHO, J.; WILEMAN, T.; TERHORST, C. Requirements for Cell-Surface Expression of the Human Tcr/Cd3 Complex in Non-T-Cells. **International Immunology**, v. 3, n. 4, p. 359–368, 1991.

HARADA, A.; SHIODA, A.; IKUNO, T.; IWATA, Y.; SHIRAIWA, H.; WAKABAYASHI, T.; SANO, Y.; MISHIMA, M. In vitro toxicological support to establish specification limit for anti-CD3 monospecific impurity in a bispecific T cell engager drug, ERY974. **Toxicology in Vitro**, v. 66, n. August 2019, p. 104841, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104841>>.

HEROLD, K. C.; BUNDY, B. N.; ALICE LONG, S.; BLUESTONE, J. A.; DIMEGLIO, L. A.; DUFORT, M. J.; GITELMAN, S. E.; GOTTLIEB, P. A.; KRISCHER, J. P.; LINSLEY, P. S.; MARKS, J. B.; MOORE, W.; MORAN, A.; RODRIGUEZ, H.; RUSSELL, W. E.; SCHATZ, D.; SKYLER, J. S.; TSALIKIAN, E.; WHERRETT, D. K.; ZIEGLER, A. G.; GREENBAUM, C. J. An anti-CD3 antibody, teplizumab, in relatives at risk for type 1 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 7, p. 603–613, 2019.

HIRSCH, R.; ECKHAUS, M.; AUCHINCLOSS JR., H.; SACHS, D. H.; BLUESTONE, J. A. Effects of in vivo administration of anti-T3 monoclonal antibody on T cell function in mice. I. Immunosuppression of transplantation responses. **J Immunol**, v. 140, n. 11, p. 3766–3772, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3286764>>.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0263785596000185>>.

ILAN, Y.; SHAILUBHAI, K.; SANYAL, A. Immunotherapy with oral administration of humanized anti-CD3 monoclonal antibody: A novel gut-immune system-based therapy for metaflammation and NASH. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 193, n. 3, p. 10–27, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cei.13159>>.

KANG, T. H.; JUNG, S. T. Boosting therapeutic potency of antibodies by taming Fc domain functions. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 51, n. 11, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s12276-019-0345-9>>.

KAPLON, H.; CHENOWETH, A.; CRESCIOLI, S.; REICHERT, J. M. Antibodies to watch in 2022. **mAbs**, v. 14, n. 1, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2014296>>.

KAPPES, D. J.; TONEGAWA, S. Surface expression of alternative forms of the TCR/CD3 complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 23, p. 10619–10623, 1991.

KASTRUP, J.; PEDERSEN, L.; DIETRICH, J.; LAURITSEN, J. P. H.; MENNÉ, C.; GEISLER, C. In vitro production and characterization of partly assembled human CD3 complexes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 56, n. 5, p. 436–442, 2002.

KIM, K. S.; SUN, Z.-Y. J.; WAGNER, G.; REINHERZ, E. L. Heterodimeric CD3 $\epsilon\gamma$  extracellular domain fragments: production, purification and structural analysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 4, p. 899–916, 2000a.

KIM, K. S.; SUN, Z. Y.; WAGNER, G.; REINHERZ, E. L. Heterodimeric CD3 $\epsilon\text{psilongamma}$  extracellular domain fragments: production, purification and structural analysis. **Journal of molecular biology**, v. 302, p. 899–916, 2000b.

KJER-NIELSEN, L.; DUNSTONE, M. a; KOSTENKO, L.; ELY, L. K.; BEDDOE, T.; MIFSUD, N. a; PURCELL, A. W.; BROOKS, A. G.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J. Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 20, p. 7675–80, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=419665&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KOGUCHI, Y.; BUENAFE, A. C.; THAULAND, T. J.; GARDELL, J. L.; BIVINS-SMITH, E. R.; JACOBY, D. B.; SLIFKA, M. K.; PARKER, D. C. Preformed CD40L is stored in Th1, Th2, Th17, and T follicular helper cells as well as CD4 +8 - thymocytes and invariant NKT cells but not in Treg cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of

predefined specificity. **nature**, v. 256, n. 5517, p. 495–497, 1975.

KORETZKY, G. a; MYUNG, P. S. Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. **Nature Publishing Group**, v. 1, n. 2, p. 95–107, 2001. Disponível em: <papers3://publication/doi/10.1038/35100523>.

KRSHNAN, L.; PARK, S.; IM, W.; CALL, M. J.; CALL, M. E. A conserved  $\alpha\beta$  transmembrane interface forms the core of a compact T-cell receptor–CD3 structure within the membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201611445, 2016. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1611445113>>.

KUHN, CHANTAL & WEINER, H. L. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies - from bench to bedside. **Immunotherapy**, v. 8, n. 8, p. 889–906, 2016.

KUHN, C.; REZENDE, R. M.; DA CUNHA, A. P.; VALETTE, F.; QUINTANA, F. J.; CHATENAUD, L.; WEINER, H. L. Mucosal administration of CD3-specific monoclonal antibody inhibits diabetes in NOD mice and in a preclinical mouse model transgenic for the CD3 epsilon chain. **Journal of Autoimmunity**, v. 76, p. 115–122, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.10.001>>.

KUHNS, M. S.; DAVIS, M. M. TCR signaling emerges from the sum of many parts. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1–13, 2012.

KUNG, P. C.; GOLDSTEIN, G.; REINHERZ, E. L.; SCHLOSSMAN, S. F. Pillars Article : Monoclonal Antibodies Defining Distinctive Human T Cell Surface. **Science**, p. 347–350, 1979.

LABRIJN, A. F.; JANMAAT, M. L.; REICHERT, J. M.; PARREN, P. W. H. I. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 8, p. 585–608, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41573-019-0028-1>>.

LEMONS, F.; MORO, A. M.; TERESA, M.; RODRIGUES, A.; MONTEIRO, S. M.; MARQUES, F.; CRISTINA, M.; CASTRO, R.; IANHEZ, L. E.; OSMAR, J.; PESTANA, M.; GARCIA, V. D.; NEUMANN, J.; RAW, I.; KALIL, J. A utilização do anti-cd3 butantan no transplante renal. **JBT J Bras Transpl**, p. 572–578, 2006.

LEONG, S. R.; SUKUMARAN, S.; HRISTOPOULOS, M.; TOTPAL, K.; STANTON, S.; LU, E.; WONG, A.; TAM, L.; NEWMAN, R.; VUILLEMENOT, B. R.; ELLERMAN, D.; GU, C.; MATHIEU, M.; DENNIS, M. S.; NGUYEN, A.; ZHENG, B.; ZHANG, C.; LEE, G.; CHU, Y.-W.; PRELL, R. A.; LIN, K.; LAING, S. T.; POLSON, A. G. An Anti-CD3/Anti-CLL-1 Bispecific Antibody for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. **Blood**, v. 129, n. 5, p. 609–618, fev. 2017.

LIU, W.; PUTNAM, A. L.; XU-YU, Z.; SZOT, G. L.; LEE, M. R.; ZHU, S.; GOTTLIEB, P. A.; KAPRANOV, P.; GINGERAS, T. R.; DE ST. GROTH, B. F.; CLAYBERGER, C.; SOPER, D. M.; ZIEGLER, S. F.; BLUESTONE, J. A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 + T reg cells . **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1701–1711, 2006.

LONG, S. A.; THORPE, J.; HEROLD, K. C.; EHLERS, M.; SANDA, S.; LIM, N.; LINSLEY, P. S.; NEPOM, G. T.; HARRIS, K. M. Remodeling T cell compartments during anti-CD3 immunotherapy of type 1 diabetes. **Cellular Immunology**, v. 319, n. May, p. 3–9, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.07.007>>.

LYONS, A. B.; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 171, n. 1, p. 131–137, 1994.

MARTIN, A.; TISCH, R. M.; GETTS, D. R. Manipulating T cell-mediated pathology: Targets and functions of monoclonal antibody immunotherapy. **Clinical Immunology**, v. 148, n. 1, p. 136–147, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2013.04.011>>.

MIDDELBURG, J.; KEMPER, K.; ENGELBERTS, P.; LABRIJN, A. F.; SCHUURMAN, J.; VAN HALL, T. Overcoming challenges for CD3-bispecific antibody therapy in solid tumors. **Cancers**, v. 13, n. 2, p. 1–25, 2021.

MORADI-KALBOLANDI, S.; SHARIFI-K, A.; DARVISHI, B.; MAJIDZADEH-A, K.; JALILI, N.; SADEGHI, S.; MOSAYEBZADEH, M.; SANATI, H.; SALEHI, M.; FARAHMAND, L. Evaluation the potential of recombinant anti-CD3 nanobody on immunomodulatory function. **Molecular Immunology**, v. 118, n. December 2019, p. 174–181, 2020.

MORO, A. M.; RODRIGUES, M. T. A.; GOUVEA, M. N.; SILVESTRI, M. L. Z.; KALIL, J. E.; RAW, I. Multiparametric analyses of hybridoma growth on glass cylinders in a packed-bed bioreactor system with internal aeration. Serum-supplemented and serum-free media comparison for MAb production. **Journal of Immunological Methods**, v. 176, n. 1, p. 67–77, 1994.

MORRISON, S. L.; JOHNSON, M. J.; HERZENBERG, L. A.; OI, V. T. Chimeric Human Antibody Molecules: Mouse Antigen-Binding Domains with Human Constant Region Domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 21, p. 6851–6855, nov. 1984.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; PAULA, A.; LAMBERT, F.; BEATRIZ, C.; BONORINO, C. **de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 885 p.

NATARAJAN, A.; WANG, W.; FLORES, M. B.; LI, T.; SHIN, H. W.; BEESAM, S.; CARDOZO, T.; KROGSGAARD, M. In situ cell-surface conformation of the TCR-CD3 signaling complex. **bioRxiv**, p. 2022.02.07.479368, 1 jan. 2022. Disponível em: <<http://biorxiv.org/content/early/2022/02/11/2022.02.07.479368.abstract>>.

NOTLEY, C. A.; MCCANN, F. E.; INGLIS, J. J.; WILLIAMS, R. O. Anti-CD3 therapy expands the numbers of CD4+ and CD8+ Treg cells and induces sustained amelioration of collagen-induced arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 1, p. 171–178, 2010.

NUNES-ALVES, C. “Blood is a very unusual fluid”. **Nature Immunology**, v. 17, n. S1, p. S5–S5, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ni.3600>>.

OCHI, H.; ABRAHAM, M.; ISHIKAWA, H.; FRENKEL, D.; YANG, K.; BASSO, A.; WU, H.; CHEN, M. L.; GANDHI, R.; MILLER, A.; MARON, R.; WEINER, H. L. New immunosuppressive approaches: Oral administration of CD3-specific antibody to treat autoimmunity. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 274, n. 1–2, p. 9–12, 2008.

OGURA, M.; DENG, S.; PRESTON-HURLBURT, P.; OGURA, H.; SHAILUBHAI, K.; KUHN, C.; WEINER, H. L.; HEROLD, K. C. Oral treatment with foralumab, a fully human



anti-CD3 monoclonal antibody, prevents skin xenograft rejection in humanized mice. **Clinical Immunology**, v. 183, p. 240–246, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2017.07.005>>.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 252–264, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3239>>.

PENARANDA, C.; TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. Anti-CD3 Therapy Promotes Tolerance by Selectively Depleting Pathogenic Cells while Preserving Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 4, p. 2015–2022, 2011. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1100713>>.

PINELLI, D. F.; FORD, M. L. Novel insights into anti-CD40/CD154 immunotherapy in transplant tolerance. **Immunotherapy**, v. 7, n. 4, p. 399–410, 2015.

PORTER, R. R. The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain. **Biochemical Journal**, v. 73, n. 1, p. 119, 1959.

PUNT, J. A.; ROBERTS, J. L.; KEARSE, K. P.; SINGER, A. Stoichiometry of the T cell Antigen Receptor (TCR) Complex: Each TCR/CD3 Complex Contains One TCR $\alpha$ , One TCR $\beta$ , and Two CD3 $\epsilon$  Chains. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. August, p. 587–593, 1994.

QUAH, B. J. C.; PARISH, C. R. New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. **Journal of Immunological Methods**, v. 379, n. 1–2, p. 1–14, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.02.012>>.

RAMOS, C. R. R.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal his-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, p. 1103–1109, 2004.

RANGARAJAN, S.; HE, Y.; CHEN, Y.; KERZIC, M. C.; MA, B.; GOWTHAMAN, R.; PIERCE, B. G.; NUSSINOV, R.; MARIUZZA, R. A.; ORBAN, J. Peptide–MHC (pMHC) binding to a human antiviral T cell receptor induces long-range allosteric communication between pMHC- and CD3-binding sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 41, p. 15991–16005, 2018.

REDMAN, J. M.; HILL, E. M.; ALDEGHAITHER, D.; WEINER, L. M. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. **Molecular Immunology**, v. 67, n. 2, p. 28–45, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.002>>.

REZENDE, R. M.; DA CUNHA, A. P.; KUHN, C.; RUBINO, S.; M'HAMDI, H.; GABRIELY, G.; VANDEVENTER, T.; LIU, S.; CIALIC, R.; PINHEIRO-ROSA, N.; OLIVEIRA, R. P.; GAUBLomme, J. T.; OBHOLZER, N.; KOZUBEK, J.; Pochet, N.; FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Identification and characterization of latency-associated peptide-expressing  $\gamma\delta$ T cells. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

REZENDE, R. M.; NAKAGAKI, B. N.; MOREIRA, T. G.; LOPES, J. R.; KUHN, C.; TATEMATSU, B. K.; BOULENOUAR, S.; MAGHZI, A.-H.; RUBINO, S.; MENEZES, G. B.; CHITNIS, T.; WEINER, H. L.  $\gamma\delta$  T Cell–Secreted XCL1 Mediates Anti-CD3–Induced Oral

Tolerance. **The Journal of Immunology**, p. ji1900784, 2019.

RIVA, A.; CHOKSHI, S. Immune checkpoint receptors : homeostatic regulators of immunity. **Hepatology International**, v. 9, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12072-018-9867-9>>.

SCOTT, A. M.; WOLCHOK, J. D.; OLD, L. J. Antibody therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 278–287, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3236>>.

SERPIERI, F.; INOCENCIO, A.; DE OLIVEIRA, J. M.; PIMENTA, A. A.; GARBUIO, A.; KALIL, J.; BRIGIDO, M. M.; MORO, A. M. Comparison of humanized IgG and FvFc anti-CD3 monoclonal antibodies expressed in CHO cells. **Molecular Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 218–225, 2010.

SGRO, C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. **Toxicology**, v. 105, n. 1, p. 23–29, 1995.

SILVA, H. M.; VIEIRA, P. M. M. M.; COSTA, P. L. N.; PIMENTEL, B. M. S. B. M. S.; MORO, A. M.; KALIL, J.; MARANHÃO, A. Q.; COELHO, V. V.; BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; COELHO, V. V.; BRIGIDO, M. M. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunology Letters**, v. 125, n. 2, p. 129–136, 2009.

SILVERTON, E. W.; NAVIA, M. A.; DAVIES, D. R. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 11, p. 5140–5144, 1977.

STEIN, M. M.; HRUSCH, C. L.; SPERLING, A. I.; OBER, C. Effects of an Fc $\gamma$ RIIA polymorphism on leukocyte gene expression and cytokine responses to anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. **Genes & Immunity**, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41435-018-0038-8>>.

STEMMER, W. P. C.; CRAMERI, A.; HA, K. D.; BRENNAN, T. M.; HEYNEKER, H. L. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. **Gene**, v. 164, n. 1, p. 49–53, 1995.

SUN, Z.-Y. J.; KIM, S. T.; KIM, I. C.; FAHMY, A.; REINHERZ, E. L.; WAGNER, G. Solution structure of the CD3 $\epsilon$ CD3 $\delta$  ectodomain and comparison with CD3 $\epsilon$ CD3 $\gamma$  as a basis for modeling T cell receptor topology and signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 48, p. 16867–16872, 2004.

SUN, Z. Y. J.; KIM, K. S.; WAGNER, G.; REINHERZ, E. L. Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 $\epsilon$  heterodimer. **Cell**, v. 105, n. 7, p. 913–923, 2001.

SUSSMAN, J. J.; BONIFACINO, J. S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; WEISSMAN, A. M.; SAITO, T.; KLAUSNER, R. D.; ASHWELL, J. D. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. **Cell**, v. 52, n. 1, p. 85–95, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3278811>>.

TIAN, J.; DANG, H.; O’LACO, K. A.; SONG, M.; TIU, B.-C.; GILLES, S.; ZAKARIAN, C.; KAUFMAN, D. L. Homotaurine Treatment Enhances CD4 + and CD8 + Regulatory T Cell

Responses and Synergizes with Low-Dose Anti-CD3 to Enhance Diabetes Remission in Type 1 Diabetic Mice . **ImmunoHorizons**, v. 3, n. 10, p. 498–510, 2019.

TOUMA, M.; SUN, Z.-Y. J.; CLAYTON, L. K.; MARISSSEN, W. E.; KRUISBEEK, A. M.; WAGNER, G.; REINHERZ, E. L. Importance of the CD3 Ectodomain Terminal  $\alpha$ -Strand and Membrane Proximal Stalk in Thymic Development and Receptor Assembly. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 6, p. 3668–3679, 2007. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.178.6.3668>>.

VAN DER NEUT KOLFSCHOTEN, M.; SCHUURMAN, J.; LOSEN, M.; BLEEKER, W. K.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, P.; VERMEULEN, E.; DEN BLEKER, T. H.; WIEGMAN, L.; VINK, T.; AARDEN, L. A.; DE BAETS, M. H.; VAN DE WINKEL, J. G. J.; AALBERSE, R. C.; PARREN, P. W. H. I. Anti-Inflammatory Activity of Human IgG4 Antibodies by Dynamic Fab Arm Exchange. **Science (New York, N.Y.)**, v. 317, n. 5844, p. 1554–1557, set. 2007.

WALLBERG, M.; RECINO, A.; PHILLIPS, J.; HOWIE, D.; VIENNE, M.; PALUCH, C.; AZUMA, M.; WONG, F. S.; WALDMANN, H.; COOKE, A. Anti-CD3 treatment upregulates PD-1 expression on activated effector T cells and severely impairs their inflammatory capacity. **Immunology**, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12729>>.

YU, Y.; MA, X.; GONG, R.; ZHU, J.; WEI, L.; YAO, J. Recent advances in CD8<sup>+</sup> regulatory t cell research (Review). **Oncology Letters**, v. 15, n. 6, p. 8187–8194, 2018.

**APÊNDICE A - Sequência do heterodímero humano CD3 $\gamma$  $\epsilon$  utilizada**

AGGTACGCGGATCCCAGTCGATCAAAGGCAATCACCTGGTTAAGGTGTATGATTA  
TCAGGAAGATGGGTCAGTTCTGCTGACTTGTGATGCAGAAGCAAAGAACATTACC  
TGGTTCAAAGATGGCAAGATGATTGGTTTTCTGACCGAAGATAAGAAGAAATGG  
AACCTGGGTAGCAATGCAAAGGACCCACGTGGTATGTATCAGTGTAAGGTAGT  
CAGAACAAAAGCAAACCACTGCAGGTCTATTACCGTATGGGTTTCGGCGGATGAT  
GCGAAAAAGGATGCGGCCAAAAAAGACGATGCGAAAAAAGATGATGCTAAAAA  
AGATGGTTCGACGGCAACGAAGAAATGGGTGGTATTACGCAGACCCCGTATAA  
AGTGTTCGATTAGCGGTACAACCGTTATCCTGACCTGCCCGCAGTATCCGGGATCG  
GAGATTCTGTGGCAACATAACGATAAGAACATTGGCGGCGATGAAGATGATAAG  
AACATCGGTAGTGATGAAGACCACCTGTCCCTGAAAGAGTTTAGCGAACTGGAA  
CAGAGCGGTTACTATGTGTGTTACCCGCGCGGTTCCAAACCGGAGGACGCTAACT  
TTTACCTGTATCTGCGTGCGCGCGTGTA CCATGGCATG

**APÊNDICE B - Sequências dos oligo nucleotídeos utilizados na síntese do antígeno recombinante**

<b>ID</b>	<b>Oligos</b>
F2GE	GATCCCAGTCGATCAAAGGCAATCACCTGGTTAAGGTGTATGATT ATCAG
F3	GACTTGTGATGCAGAAGCAAAGAACATTACCTGGTTCAAAGATG GCAAGATGATTGGTTT
F4	AATGGAACCTGGGTAGCAATGCAAAGGACCCACGTGGTATGTAT CAGTGTAAGGTAGTC
F5	CAGGTCTATTACCGTATGGGTTTCGGCGGATGATGCGAAAAAGGAT GCGGCCAAAAAAGAC
F6	TAAAAAAGATGGTTCGACGGCAACGAAGAAATGGGTGGTATTA CGCAGACCCCGTATAA
F7	CCGTTATCCTGACCTGCCCCGAGTATCCGGGATCGGAGATTCTGT GGCAACATAACGATA
F8	GATGATAAGAACATCGGTAGTGATGAAGACCACCTGTCCCTGAA AGAGTTTAGCGAACTG
F9	GTGTTACCCGCGCGGTTCCAAACCGGAGGACGCTAACTTTTACCT GTATC
R7	TTGCTTCTGCATCACAAGTCAGCAGAACTGACCCATCTTCCTGAT AATCATAACCTTAA
R6	ATTGCTACCCAGGTTCCATTTCTTCTTATCTTCGGTCAGAAAACCA ATCATCTTGCCATC
R5	CCCATACGGTAATAGACCTGCAGTGGTTTGCTTTTGTCTGACTAC CTTACACTGATAC
R4	CGTCGGAACCATCTTTTTTAGCATCATCTTTTTTCGCATCGTCTTTT TTGGCCGCATCCT
R3	CGGGCAGGTCAGGATAACGGTTGTACCGCTAATCGACACTTTATA CGGGGTCTGCGTAAT
R2	CTACCGATGTTCTTATCATCTTCATCGCCGCAATGTTCTTATCGT TATGTTGCCACAGA
R1	TGGAACCGCGCGGGTAACACACATAGTAACCGCTCTGTTCCAGTT CGCTAAACTCTTTCA
R0	GCGGCCGCTTACACGCGCGCACGCAGATACAGGTAAAAGTTAGC G
Amp for GE	AGGTACGCGGATCCCAGTCGATCAAAGGCAA
Amp reverse	TTTTCTTTTTCGGCCGCTTACACGCGCGCACG
BamHI_GF	AGGTACGCGGATCCCAGTCGATCAAAGGCAATCACC
NcoI_ER	CATGCCATGGTTACACGCGCGCACGCAGATA
<b>ID</b>	<b>Oligos</b>

## APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Universidade de São Paulo  
Instituto de Ciências Biomédicas

---

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Adultos)

ESTUDO: Avaliação do perfil imunorregulatório induzido por anticorpo anti-CD3 humanizado.

*Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.*

#### DADOS DO PARTICIPANTE

Nome: \_\_\_\_\_  
 Documento de Identidade: \_\_\_\_\_ Sexo: M [  ] F [  ]  
 Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ Nº \_\_\_\_\_ Compl.: \_\_\_\_\_  
 Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_  
 Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
 Telefones para contato: ( ) \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 E-mail (opcional): \_\_\_\_\_

---

- I. **Objetivos do estudo** - O estudo se destina a avaliar o comportamento das células do sangue das pessoas quando expostas ao anticorpo anti-CD3.
- II. **Quem é convidado a participar do estudo** - Estão sendo convidados a participar do estudo pessoas doadoras voluntárias de plaquetas, já que nessa doação há sobra das células mononucleares, que são as células importantes para nosso estudo.
- III. **Como será feito o estudo** – Para participar deste estudo você terá que vir até a Fundação ProSangue no dia da sua doação de plaquetas. As células que sobram da doação de plaquetas serão utilizadas após a sua concordância em participar e sua participação começará somente após a assinatura deste documento. Essas células que vamos utilizar sobram no equipo da doação de plaquetas, não é uma doação a mais. Se não utilizarmos, serão descartadas.
- IV. **Benefícios para o participante** - A participação neste projeto não tem objetivo de tratamento e não haverá nenhum custo para você.
- V. **Assistência e indenização ao participante** – Para participar da pesquisa você não receberá nenhum valor, somente serão ressarcidas as despesas que você vier a ter com condução ou alimentação, se for o caso. A participação neste projeto ocorrerá após a doação de plaquetas, não tendo nenhuma interferência no processo de doação de plaquetas.

Rubrica Pesquisador \_\_\_\_\_

Rubrica Participante da Pesquisa \_\_\_\_\_

- VI. **Desconfortos e riscos esperados** – Durante a doação de plaquetas, as células do sangue que não são plaquetas e sobram dessa doação são recolhidas numa câmara de plástico do tamanho de um pião e são geralmente descartadas. Nosso estudo pretende utilizar essas células. A doação de plaquetas será realizada na Fundação ProSangue pelos profissionais devidamente treinados e experientes. O procedimento de doação de plaquetas poderá ocasionar dor leve e hematoma no local da punção.
- VII. **Interrupção na participação do estudo** - A participação nesse estudo é voluntária. Se você escolher não participar seus direitos serão preservados e não sofrerá nenhum tipo de punição. Se decidir participar, você poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou recusar qualquer procedimento, nesse caso, por favor, comunique a equipe do estudo.
- VIII. **Garantia de acesso** – A qualquer momento, se você tiver alguma preocupação ou dúvidas sobre a pesquisa, poderá entrar em contato com o responsável pelo estudo. Poderá também contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP, no telefone (11) 3091-7733 ou através do e-mail [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br), de segunda-feira a sexta-feira das 8:00-11:30 e das 14:00-16:00 ou o pesquisador responsável pela pesquisa Prof. Dr. Ana Maria Moro, telefone (11) 26279450, ou e-mail [ana.moro@butantan.gov.br](mailto:ana.moro@butantan.gov.br) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- Esclarecimento sobre o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (<https://ww2.icb.usp.br/icb/cepsh/>) e o Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP ([http://conselho.saude.gov.br/web\\_comissoes/conep/index.html](http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/index.html)): Ambos são comitês que avaliam os aspectos éticos de projetos que envolvem amostras humanas, como este que você está sendo convidado a participar. O CEP é o comitê local e o CONEP é nacional. Ambos possuem profissionais de várias áreas para que a avaliação dos projetos seja o mais fidedigno possível. Este projeto foi enviado ao CEP para aprovação antes de ser apresentado a você.
- IX. **Direito de confidencialidade** - Todas as informações deste estudo são confidenciais. Seu nome ou qualquer dado que possa identificá-lo não será publicado na divulgação dos resultados. Somente pessoas que fazem parte da equipe da pesquisa poderão ter acesso aos seus registros. Esse acesso será utilizado para realizar, acompanhar a pesquisa e analisar os dados obtidos. As normas brasileiras que o protegem serão respeitadas.
- X. Você tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar sem necessidade de qualquer explicação. A desistência não causará nenhum prejuízo a sua saúde ou bem-estar físico e não irá interferir no atendimento ou tratamento médico que você possa estar recebendo;
- XI. Caso desejar, poderá tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa.

Rubrica Pesquisador \_\_\_\_\_

Rubrica Participante da Pesquisa \_\_\_\_\_

**Armazenamento do material coletado (Biorrepositório)** - As amostras do material que você doou para este estudo serão utilizadas para analisar a resposta das células do sangue quando tratadas com anticorpo monoclonal anti-CD3, projeto que estamos desenvolvendo em laboratórios do Instituto Butantan e InCor para avaliar medicamentos para evitar a rejeição de transplantes. Após o processamento das amostras poderá haver sobra desse material que iremos armazenar para futuras pesquisas. Todo material será identificado apenas com um código (o nome do participante não será utilizado) e não poderá ser vendido nem utilizado para fazer produtos comerciais. O processamento das amostras será feito por especialistas em laboratório de modo a separar partes importantes de sua amostra para os projetos. O armazenamento destas amostras está incluso na participação do estudo. Se você não concordar que suas amostras sejam armazenadas, por favor informe a equipe que você prefere não participar. Se você concordar em participar, a qualquer momento poderá mudar de ideia em relação à autorização do armazenamento das amostras. Caso mude de ideia, telefone ou escreva para o responsável pela pesquisa do estudo para informá-los. A partir de então as amostras não serão disponibilizadas para pesquisa e serão destruídas. É importante que você saiba que para utilizar essas amostras armazenadas no futuro, o pesquisador terá que apresentar um novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Comitê de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. O material biológico obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com as normas do Conselho Nacional de Saúde que regulam o armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas, e poderá ser armazenado por até 10 anos (Resolução 441/2011). Asseguramos que quaisquer dados genéticos são confidenciais e não serão repassados a terceiros como: seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, entre outros. Ainda, você poderá escolher se será informado ou não do resultado de exames e de todos os dados genéticos que resultarão deste projeto. Os dados individuais não serão publicados de forma a se identificar o participante, em nenhuma hipótese. Além disso, os dados genéticos não serão armazenados por pessoa física sem a participação de instituição idônea responsável que garanta sua proteção.

- XII. O participante da pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XIII. O pesquisador responsável deverá, da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo. O TCLE será emitido em duas cópias, sendo que uma cópia ficará com o participante da pesquisa e a outra com o pesquisador responsável.
- XIV. Este convite está de acordo com a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012.

---

Rubrica Pesquisador \_\_\_\_\_

Rubrica Participante da Pesquisa \_\_\_\_\_



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo "Avaliação do perfil imunorregulatório induzido por anticorpo anti-CD3 humanizado". Eu discuti com os pesquisadores responsáveis e está claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, quais são seus desconfortos, riscos e a garantia de confidencialidade dos meus dados. Entendo que sempre que eu tiver dúvidas elas serão esclarecidas e que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Concordo que o material colhido possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pelo Comitê de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim.

( ) Sim ou ( ) Não

Resultados da pesquisa:

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Nome do participante: \_\_\_\_\_  
(como escrito no documento de identidade)

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Testemunha** (para casos de participantes analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual):

Testemunha 1: \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

### DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário para a participação neste estudo e forneci uma cópia ao participante deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Nome do profissional que obteve o consentimento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Rubrica Pesquisador \_\_\_\_\_ Rubrica Participante da Pesquisa \_\_\_\_\_

## APÊNDICE D – Resultados da análise estatística do ensaio de CBA para quantificação das citocinas do sobrenadante

### D.1 – INF- $\gamma$

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	2				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
48 h					
Não tratado vs. Murino (1 $\mu$ g/ml)	-11601	-12293 to -10909	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. Murino (5 $\mu$ g/ml)	-11601	-12293 to -10909	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	-114,4	-806,6 to 577,8	No	ns	0,9969
Não tratado vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	-319,3	-1012 to 372,9	No	ns	0,6989
Não tratado vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	72,22	-620,0 to 764,4	No	ns	0,9998
Não tratado vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	-260,3	-952,5 to 431,9	No	ns	0,8483
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. Murino (5 $\mu$ g/ml)	0	-692,2 to 692,2	No	ns	> 0,9999
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	11486	10794 to 12179	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	11281	10589 to 11974	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	11673	10981 to 12365	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	11341	10648 to 12033	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	11486	10794 to 12179	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	11281	10589 to 11974	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	11673	10981 to 12365	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	11341	10648 to 12033	Yes	****	< 0,0001
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	-204,9	-897,1 to 487,3	No	ns	0,9431
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	186,6	-505,6 to 878,8	No	ns	0,9628
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	-145,9	-838,1 to 546,3	No	ns	0,9889
118 (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	391,5	-300,7 to 1084	No	ns	0,4932
118 (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	59,01	-633,2 to 751,2	No	ns	> 0,9999
230 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	-332,5	-1025 to 359,7	No	ns	0,6616
192 h					
Não tratado vs. Murino (1 $\mu$ g/ml)	-5111	-5804 to -4419	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. Murino (5 $\mu$ g/ml)	-5545	-6237 to -4852	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	186,2	-506,0 to 878,4	No	ns	0,9632
Não tratado vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	238,3	-453,9 to 930,5	No	ns	0,8922
Não tratado vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	325,2	-367,1 to 1017	No	ns	0,6824
Não tratado vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	328,1	-364,1 to 1020	No	ns	0,6742
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. Murino (5 $\mu$ g/ml)	-433,1	-1125 to 259,1	No	ns	0,3842
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	5298	4605 to 5990	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	5350	4657 to 6042	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	5437	4744 to 6129	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	5439	4747 to 6132	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	5731	5039 to 6423	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	5783	5091 to 6475	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	5870	5177 to 6562	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	5873	5180 to 6565	Yes	****	< 0,0001
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	52,1	-640,1 to 744,3	No	ns	> 0,9999
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	139	-553,2 to 831,2	No	ns	0,9914
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	141,9	-550,3 to 834,1	No	ns	0,9904
118 (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	86,88	-605,3 to 779,1	No	ns	0,9993
118 (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	89,8	-602,4 to 782,0	No	ns	0,9992
230 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	2,925	-689,3 to 695,1	No	ns	> 0,9999

D.2 – TNF- $\alpha$ 

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	2				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
48 h					
Não tratado vs. Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-116,5	-143,3 to -89,80	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-142,1	-168,9 to -115,4	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-7,085	-33,81 to 19,64	No	ns	0,9657
Não tratado vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-12,59	-39,31 to 14,14	No	ns	0,6802
Não tratado vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	0,21	-26,52 to 26,94	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-4,32	-31,05 to 22,41	No	ns	0,9973
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-25,62	-52,35 to 1,108	No	ns	0,0642
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	109,4	82,71 to 136,2	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	103,9	77,21 to 130,7	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	116,7	90,01 to 143,5	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	112,2	85,48 to 138,9	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	135,1	108,3 to 161,8	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	129,6	102,8 to 156,3	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	142,4	115,6 to 169,1	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	137,8	111,1 to 164,6	Yes	****	< 0,0001
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-5,5	-32,23 to 21,23	No	ns	0,9902
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	7,295	-19,43 to 34,02	No	ns	0,9606
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	2,765	-23,96 to 29,49	No	ns	0,9998
118 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	12,8	-13,93 to 39,52	No	ns	0,6648
118 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	8,265	-18,46 to 34,99	No	ns	0,9311
230 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-4,53	-31,26 to 22,20	No	ns	0,9965
192 h					
Não tratado vs. Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ )	19,18	-7,548 to 45,91	No	ns	0,2483
Não tratado vs. Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ )	19,08	-7,653 to 45,80	No	ns	0,2532
Não tratado vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	12,72	-14,01 to 39,45	No	ns	0,6703
Não tratado vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	16,74	-9,993 to 43,46	No	ns	0,3835
Não tratado vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	9,645	-17,08 to 36,37	No	ns	0,8702
Não tratado vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	17,35	-9,378 to 44,08	No	ns	0,3458
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-0,105	-26,83 to 26,62	No	ns	> 0,9999
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-6,46	-33,19 to 20,27	No	ns	0,978
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-2,445	-29,17 to 24,28	No	ns	0,9999
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-9,535	-36,26 to 17,19	No	ns	0,8759
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-1,83	-28,56 to 24,90	No	ns	> 0,9999
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-6,355	-33,08 to 20,37	No	ns	0,9797
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-2,34	-29,07 to 24,39	No	ns	> 0,9999
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-9,43	-36,16 to 17,30	No	ns	0,8812
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-1,725	-28,45 to 25,00	No	ns	> 0,9999
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	4,015	-22,71 to 30,74	No	ns	0,9982
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-3,075	-29,80 to 23,65	No	ns	0,9996
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	4,63	-22,10 to 31,36	No	ns	0,9961
118 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-7,09	-33,82 to 19,64	No	ns	0,9656
118 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	0,615	-26,11 to 27,34	No	ns	> 0,9999
230 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	7,705	-19,02 to 34,43	No	ns	0,9495

D.3 – IL-1 $\beta$ 

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	2				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
48 h					
Não tratado vs. Murino (1 $\mu$ g/ml)	-127,6	-159,4 to -95,86	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. Murino (5 $\mu$ g/ml)	-171,4	-203,2 to -139,7	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	-3,07	-34,84 to 28,70	No	ns	0,9999
Não tratado vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	1,595	-30,17 to 33,36	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	2,235	-29,53 to 34,00	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	2,565	-29,20 to 34,33	No	ns	> 0,9999
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. Murino (5 $\mu$ g/ml)	-43,8	-75,57 to -12,04	Yes	**	0,0048
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	124,6	92,79 to 156,3	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	129,2	97,46 to 161,0	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	129,9	98,10 to 161,6	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	130,2	98,43 to 162,0	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	168,4	136,6 to 200,1	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	173	141,3 to 204,8	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	173,7	141,9 to 205,4	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	174	142,2 to 205,8	Yes	****	< 0,0001
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	4,665	-27,10 to 36,43	No	ns	0,9984
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	5,305	-26,46 to 37,07	No	ns	0,9968
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	5,635	-26,13 to 37,40	No	ns	0,9955
118 (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	0,64	-31,13 to 32,41	No	ns	> 0,9999
118 (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	0,97	-30,80 to 32,74	No	ns	> 0,9999
230 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	0,33	-31,44 to 32,10	No	ns	> 0,9999
192 h					
Não tratado vs. Murino (1 $\mu$ g/ml)	2,605	-29,16 to 34,37	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. Murino (5 $\mu$ g/ml)	1,86	-29,91 to 33,63	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	-0,81	-32,58 to 30,96	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	1,09	-30,68 to 32,86	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	4,005	-27,76 to 35,77	No	ns	0,9993
Não tratado vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	5,305	-26,46 to 37,07	No	ns	0,9968
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. Murino (5 $\mu$ g/ml)	-0,745	-32,51 to 31,02	No	ns	> 0,9999
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	-3,415	-35,18 to 28,35	No	ns	0,9997
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	-1,515	-33,28 to 30,25	No	ns	> 0,9999
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	1,4	-30,37 to 33,17	No	ns	> 0,9999
Murino (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	2,7	-29,07 to 34,47	No	ns	> 0,9999
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 118 (1 $\mu$ g/ml)	-2,67	-34,44 to 29,10	No	ns	> 0,9999
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	-0,77	-32,54 to 31,00	No	ns	> 0,9999
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	2,145	-29,62 to 33,91	No	ns	> 0,9999
Murino (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	3,445	-28,32 to 35,21	No	ns	0,9997
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 118 (5 $\mu$ g/ml)	1,9	-29,87 to 33,67	No	ns	> 0,9999
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	4,815	-26,95 to 36,58	No	ns	0,9981
118 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	6,115	-25,65 to 37,88	No	ns	0,9931
118 (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (1 $\mu$ g/ml)	2,915	-28,85 to 34,68	No	ns	0,9999
118 (5 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	4,215	-27,55 to 35,98	No	ns	0,9991
230 (1 $\mu$ g/ml) vs. 230 (5 $\mu$ g/ml)	1,3	-30,47 to 33,07	No	ns	> 0,9999

## D.4 – IL-17A

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	2				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
48 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	-54,37	-78,57 to -30,17	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	-71,73	-95,93 to -47,53	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	-9,835	-34,04 to 14,37	No	ns	0,7996
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	-23,63	-47,83 to 0,5721	No	ns	0,0577
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	-9,825	-34,03 to 14,38	No	ns	0,8003
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	-12,55	-36,75 to 11,65	No	ns	0,5854
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	-17,36	-41,56 to 6,842	No	ns	0,2487
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	44,54	20,33 to 68,74	Yes	***	0,0003
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	30,74	6,538 to 54,94	Yes	**	0,0094
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	44,55	20,34 to 68,75	Yes	***	0,0003
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	41,82	17,62 to 66,02	Yes	***	0,0006
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	61,9	37,69 to 86,10	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	48,1	23,90 to 72,30	Yes	***	0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	61,91	37,70 to 86,11	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	59,18	34,98 to 83,38	Yes	****	< 0,0001
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-13,8	-38,00 to 10,41	No	ns	0,4848
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	0,01	-24,19 to 24,21	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-2,715	-26,92 to 21,49	No	ns	0,9997
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	13,81	-10,40 to 38,01	No	ns	0,484
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	11,08	-13,12 to 35,28	No	ns	0,7056
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-2,725	-26,93 to 21,48	No	ns	0,9996
192 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	24,07	-0,1321 to 48,27	No	ns	0,0517
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	20,15	-4,057 to 44,35	No	ns	0,1341
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	-41,49	-65,69 to -17,28	Yes	***	0,0006
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	-28,15	-52,35 to -3,948	Yes	*	0,0183
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	-63,8	-88,00 to -39,59	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	-52,83	-77,03 to -28,63	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	-3,925	-28,13 to 20,28	No	ns	0,9972
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	-65,56	-89,76 to -41,35	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-52,22	-76,42 to -28,02	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-87,87	-112,1 to -63,66	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-76,9	-101,1 to -52,70	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	-61,63	-85,83 to -37,43	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-48,3	-72,50 to -24,09	Yes	***	0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-83,94	-108,1 to -59,74	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-72,98	-97,18 to -48,77	Yes	****	< 0,0001
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	13,34	-10,87 to 37,54	No	ns	0,5214
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-22,31	-46,51 to 1,892	No	ns	0,0799
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-11,35	-35,55 to 12,86	No	ns	0,6844
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-35,65	-59,85 to -11,44	Yes	**	0,0027
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-24,68	-48,88 to -0,4779	Yes	*	0,0443
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	10,97	-13,24 to 35,17	No	ns	0,7147

## D.5 – IL-6

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	2				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
48 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	-1378	-2068 to -688,2	Yes	***	0,0001
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	-3085	-3774 to -2395	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	28,52	-661,3 to 718,3	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	23,6	-666,2 to 713,4	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	54,69	-635,1 to 744,5	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	29,7	-660,1 to 719,5	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	-1707	-2396 to -1017	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	1406	716,7 to 2096	Yes	***	0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	1402	711,8 to 2091	Yes	***	0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	1433	742,9 to 2122	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	1408	717,9 to 2097	Yes	***	0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	3113	2423 to 3803	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	3108	2418 to 3798	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	3139	2450 to 3829	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	3114	2425 to 3804	Yes	****	< 0,0001
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-4,925	-694,7 to 684,9	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	26,17	-663,6 to 716,0	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	1,175	-688,6 to 691,0	No	ns	> 0,9999
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	31,09	-658,7 to 720,9	No	ns	> 0,9999
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	6,1	-683,7 to 695,9	No	ns	> 0,9999
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-24,99	-714,8 to 664,8	No	ns	> 0,9999
192 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	-135,1	-824,9 to 554,7	No	ns	0,9924
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	-178,5	-868,3 to 511,3	No	ns	0,9694
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	4,045	-685,7 to 693,8	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	5,54	-684,2 to 695,3	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	4,23	-685,6 to 694,0	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	12,5	-677,3 to 702,3	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	-43,37	-733,2 to 646,4	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	139,2	-550,6 to 829,0	No	ns	0,9912
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	140,7	-549,1 to 830,4	No	ns	0,9907
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	139,4	-550,4 to 829,1	No	ns	0,9911
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	147,6	-542,2 to 837,4	No	ns	0,988
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	182,5	-507,3 to 872,3	No	ns	0,9659
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	184	-505,8 to 873,8	No	ns	0,9646
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	182,7	-507,1 to 872,5	No	ns	0,9658
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	191	-498,8 to 880,8	No	ns	0,958
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	1,495	-688,3 to 691,3	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	0,185	-689,6 to 690,0	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	8,45	-681,3 to 698,2	No	ns	> 0,9999
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-1,31	-691,1 to 688,5	No	ns	> 0,9999
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	6,955	-682,8 to 696,7	No	ns	> 0,9999
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	8,265	-681,5 to 698,1	No	ns	> 0,9999

## D.6 – IL-12p70

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	2				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
48 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	-9,575	-11,24 to -7,912	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	-16,78	-18,44 to -15,11	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	0,02	-1,643 to 1,683	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	-0,09	-1,753 to 1,573	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	0,26	-1,403 to 1,923	No	ns	0,9978
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	-0,21	-1,873 to 1,453	No	ns	0,9993
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	-7,2	-8,863 to -5,537	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	9,595	7,932 to 11,26	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	9,485	7,822 to 11,15	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	9,835	8,172 to 11,50	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	9,365	7,702 to 11,03	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	16,8	15,13 to 18,46	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	16,69	15,02 to 18,35	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	17,04	15,37 to 18,70	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	16,57	14,90 to 18,23	Yes	****	< 0,0001
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-0,11	-1,773 to 1,553	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	0,24	-1,423 to 1,903	No	ns	0,9986
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-0,23	-1,893 to 1,433	No	ns	0,9989
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	0,35	-1,313 to 2,013	No	ns	0,989
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-0,12	-1,783 to 1,543	No	ns	> 0,9999
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-0,47	-2,133 to 1,193	No	ns	0,9538
192 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	0,2	-1,463 to 1,863	No	ns	0,9995
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	0,215	-1,448 to 1,878	No	ns	0,9992
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	0,24	-1,423 to 1,903	No	ns	0,9986
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	0,065	-1,598 to 1,728	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	0,245	-1,418 to 1,908	No	ns	0,9984
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	0,38	-1,283 to 2,043	No	ns	0,9833
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	0,015	-1,648 to 1,678	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	0,04	-1,623 to 1,703	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-0,135	-1,798 to 1,528	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	0,045	-1,618 to 1,708	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	0,18	-1,483 to 1,843	No	ns	0,9997
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	0,025	-1,638 to 1,688	No	ns	> 0,9999
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-0,15	-1,813 to 1,513	No	ns	> 0,9999
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	0,03	-1,633 to 1,693	No	ns	> 0,9999
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	0,165	-1,498 to 1,828	No	ns	0,9998
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-0,175	-1,838 to 1,488	No	ns	0,9998
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	0,005	-1,658 to 1,668	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	0,14	-1,523 to 1,803	No	ns	> 0,9999
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	0,18	-1,483 to 1,843	No	ns	0,9997
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	0,315	-1,348 to 1,978	No	ns	0,9937
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	0,135	-1,528 to 1,798	No	ns	> 0,9999

## D.7 – IL-10

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	2				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
48 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	-212	-265,8 to -158,2	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	-252	-305,8 to -198,2	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	-10,23	-64,03 to 43,57	No	ns	0,9935
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	-25,2	-78,99 to 28,60	No	ns	0,6852
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	-5,74	-59,54 to 48,06	No	ns	0,9997
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	-13,03	-66,83 to 40,77	No	ns	0,9777
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	-40,08	-93,88 to 13,72	No	ns	0,2156
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	201,7	147,9 to 255,5	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	186,8	133,0 to 240,6	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	206,2	152,4 to 260,0	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	198,9	145,1 to 252,7	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	241,8	188,0 to 295,6	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	226,8	173,0 to 280,6	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	246,3	192,5 to 300,1	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	239	185,2 to 292,8	Yes	****	< 0,0001
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-14,97	-68,76 to 38,83	No	ns	0,957
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	4,49	-49,31 to 58,29	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-2,8	-56,60 to 51,00	No	ns	> 0,9999
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	19,46	-34,34 to 73,25	No	ns	0,8692
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	12,17	-41,63 to 65,96	No	ns	0,9842
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-7,29	-61,09 to 46,51	No	ns	0,999
192 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	64,67	10,87 to 118,5	Yes	*	0,0143
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	65,72	11,92 to 119,5	Yes	*	0,0127
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	35,41	-18,39 to 89,20	No	ns	0,3317
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	50,39	-3,411 to 104,2	No	ns	0,0732
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	17,99	-35,81 to 71,78	No	ns	0,9043
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	44,64	-9,156 to 98,44	No	ns	0,1361
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	1,05	-52,75 to 54,85	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	-29,27	-83,06 to 24,53	No	ns	0,535
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-14,29	-68,08 to 39,51	No	ns	0,9654
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-46,69	-100,5 to 7,111	No	ns	0,1096
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-20,03	-73,83 to 33,77	No	ns	0,8538
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	-30,32	-84,11 to 23,48	No	ns	0,4971
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-15,34	-69,13 to 38,46	No	ns	0,952
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-47,74	-101,5 to 6,061	No	ns	0,0979
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-21,08	-74,88 to 32,72	No	ns	0,8237
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	14,98	-38,82 to 68,78	No	ns	0,9568
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-17,42	-71,22 to 36,38	No	ns	0,9162
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	9,235	-44,56 to 63,03	No	ns	0,9963
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-32,4	-86,20 to 21,40	No	ns	0,4251
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-5,745	-59,54 to 48,05	No	ns	0,9997
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	26,66	-27,14 to 80,45	No	ns	0,6315



D.8 – TGF- $\beta$ 

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	2				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
48 h					
Não tratado vs. Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-11,17	-32,73 to 10,40	No	ns	0,5873
Não tratado vs. Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-26,56	-48,13 to -4,991	Yes	*	0,012
Não tratado vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-8,445	-30,01 to 13,12	No	ns	0,8242
Não tratado vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	1,315	-20,25 to 22,88	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	2,065	-19,50 to 23,63	No	ns	0,9999
Não tratado vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	1,07	-20,50 to 22,64	No	ns	> 0,9999
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-15,4	-36,96 to 6,174	No	ns	0,2531
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	2,72	-18,85 to 24,29	No	ns	0,9993
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	12,48	-9,089 to 34,05	No	ns	0,4685
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	13,23	-8,339 to 34,80	No	ns	0,4054
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	12,24	-9,334 to 33,80	No	ns	0,49
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	18,12	-3,454 to 39,68	No	ns	0,1285
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	27,88	6,306 to 49,44	Yes	**	0,0082
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	28,63	7,056 to 50,19	Yes	**	0,0066
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	27,63	6,061 to 49,20	Yes	**	0,0088
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	9,76	-11,81 to 31,33	No	ns	0,7158
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	10,51	-11,06 to 32,08	No	ns	0,6478
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	9,515	-12,05 to 31,08	No	ns	0,7373
118 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	0,75	-20,82 to 22,32	No	ns	> 0,9999
118 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-0,245	-21,81 to 21,32	No	ns	> 0,9999
230 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-0,995	-22,56 to 20,57	No	ns	> 0,9999
192 h					
Não tratado vs. Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ )	10,26	-11,31 to 31,82	No	ns	0,6712
Não tratado vs. Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ )	11,18	-10,39 to 32,74	No	ns	0,5863
Não tratado vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	3,99	-17,58 to 25,56	No	ns	0,9944
Não tratado vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	4,835	-16,73 to 26,40	No	ns	0,9848
Não tratado vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	14,55	-7,024 to 36,11	No	ns	0,3072
Não tratado vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	10,35	-11,22 to 31,91	No	ns	0,663
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ )	0,92	-20,65 to 22,49	No	ns	> 0,9999
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-6,265	-27,83 to 15,30	No	ns	0,9477
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-5,42	-26,99 to 16,15	No	ns	0,9734
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	4,29	-17,28 to 25,86	No	ns	0,9918
Murino (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	0,09	-21,48 to 21,66	No	ns	> 0,9999
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	-7,185	-28,75 to 14,38	No	ns	0,9057
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-6,34	-27,91 to 15,23	No	ns	0,9449
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	3,37	-18,20 to 24,94	No	ns	0,9978
Murino (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-0,83	-22,40 to 20,74	No	ns	> 0,9999
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 118 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	0,845	-20,72 to 22,41	No	ns	> 0,9999
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	10,56	-11,01 to 32,12	No	ns	0,6437
118 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	6,355	-15,21 to 27,92	No	ns	0,9443
118 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (1 $\mu\text{g/ml}$ )	9,71	-11,86 to 31,28	No	ns	0,7202
118 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	5,51	-16,06 to 27,08	No	ns	0,9712
230 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) vs. 230 (5 $\mu\text{g/ml}$ )	-4,2	-25,77 to 17,37	No	ns	0,9927

## D.9 – IL-4

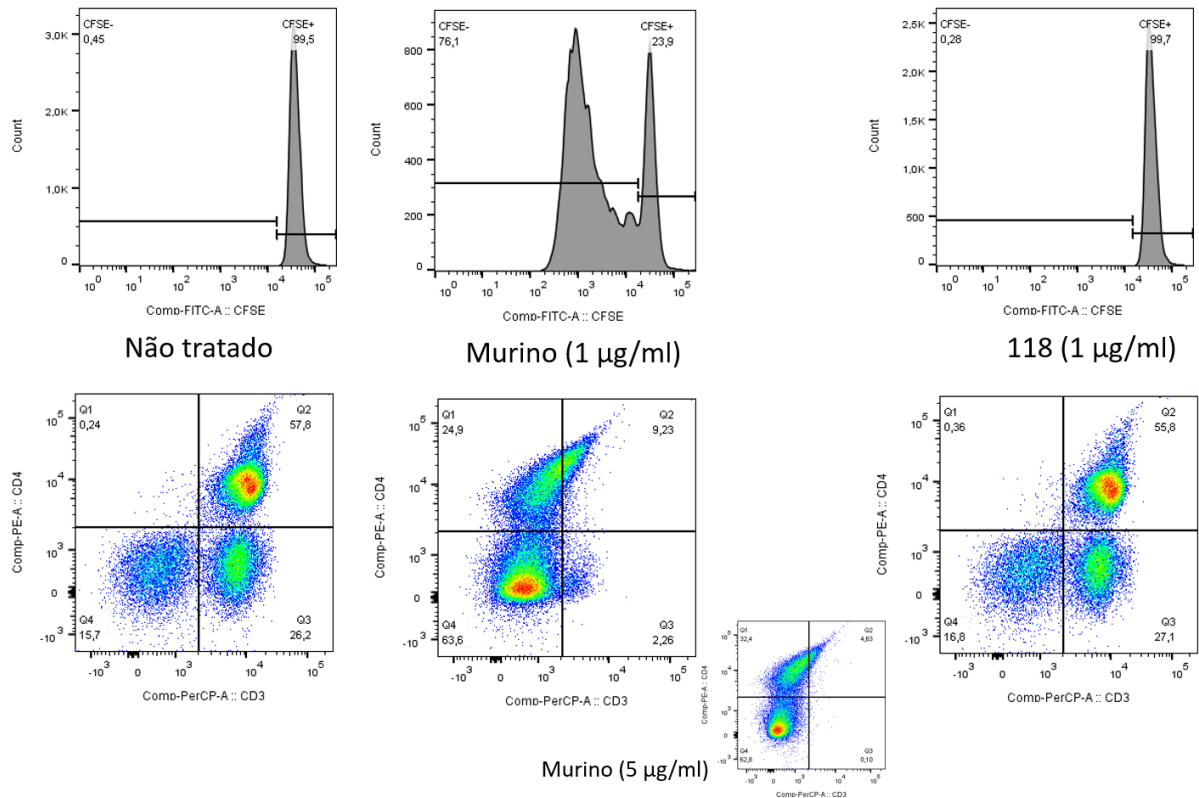
Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	2				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
48 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	-7,175	-9,878 to -4,472	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	-10,21	-12,91 to -7,502	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	-1,285	-3,988 to 1,418	No	ns	0,6715
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	-3,98	-6,683 to -1,277	Yes	**	0,0027
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	-0,785	-3,488 to 1,918	No	ns	0,9478
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	-1,85	-4,553 to 0,8534	No	ns	0,2928
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	-3,03	-5,733 to -0,3266	Yes	*	0,0238
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	5,89	3,187 to 8,593	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	3,195	0,4916 to 5,898	Yes	*	0,0163
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	6,39	3,687 to 9,093	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	5,325	2,622 to 8,028	Yes	***	0,0002
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	8,92	6,217 to 11,62	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	6,225	3,522 to 8,928	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	9,42	6,717 to 12,12	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	8,355	5,652 to 11,06	Yes	****	< 0,0001
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-2,695	-5,398 to 0,008428	No	ns	0,051
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	0,5	-2,203 to 3,203	No	ns	0,9944
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-0,565	-3,268 to 2,138	No	ns	0,9894
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	3,195	0,4916 to 5,898	Yes	*	0,0163
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	2,13	-0,5734 to 4,833	No	ns	0,1716
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-1,065	-3,768 to 1,638	No	ns	0,8203
192 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	44,13	41,42 to 46,83	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	44,3	41,60 to 47,00	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	36,08	33,37 to 38,78	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	41,95	39,24 to 44,65	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	32,66	29,95 to 35,36	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	39,04	36,34 to 41,74	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	0,175	-2,528 to 2,878	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	-8,05	-10,75 to -5,347	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-2,18	-4,883 to 0,5234	No	ns	0,155
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-11,47	-14,17 to -8,767	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-5,085	-7,788 to -2,382	Yes	***	0,0003
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	-8,225	-10,93 to -5,522	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-2,355	-5,058 to 0,3484	No	ns	0,1075
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-11,65	-14,35 to -8,942	Yes	****	< 0,0001
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-5,26	-7,963 to -2,557	Yes	***	0,0002
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	5,87	3,167 to 8,573	Yes	****	< 0,0001
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-3,42	-6,123 to -0,7166	Yes	**	0,0097
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	2,965	0,2616 to 5,668	Yes	*	0,0276
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-9,29	-11,99 to -6,587	Yes	****	< 0,0001
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-2,905	-5,608 to -0,2016	Yes	*	0,0317
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	6,385	3,682 to 9,088	Yes	****	< 0,0001

## D.10 – IL-2

Within each row, compare columns (simple effects within rows)					
Number of families	2				
Number of comparisons per family	21				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
48 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	378,6	220,5 to 536,8	Yes	****	< 0,0001
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	319	160,8 to 477,1	Yes	***	0,0001
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	19,81	-138,3 to 177,9	No	ns	0,9993
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	108,4	-49,75 to 266,5	No	ns	0,2913
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	54,23	-103,9 to 212,3	No	ns	0,8939
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	97,78	-60,34 to 255,9	No	ns	0,3968
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	-59,68	-217,8 to 98,45	No	ns	0,8463
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	-358,8	-516,9 to -200,7	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-270,3	-428,4 to -112,1	Yes	***	0,0007
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-324,4	-482,5 to -166,3	Yes	****	< 0,0001
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-280,9	-439,0 to -122,7	Yes	***	0,0005
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	-299,1	-457,3 to -141,0	Yes	***	0,0002
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-210,6	-368,7 to -52,46	Yes	**	0,0064
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-264,7	-422,9 to -106,6	Yes	***	0,0008
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-221,2	-379,3 to -63,05	Yes	**	0,0042
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	88,56	-69,56 to 246,7	No	ns	0,5038
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	34,42	-123,7 to 192,5	No	ns	0,9869
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	77,97	-80,15 to 236,1	No	ns	0,6362
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-54,14	-212,3 to 104,0	No	ns	0,8945
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-10,59	-168,7 to 147,5	No	ns	> 0,9999
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	43,55	-114,6 to 201,7	No	ns	0,9589
192 h					
Não tratado vs. Murino (1 µg/ml)	21,72	-136,4 to 179,8	No	ns	0,9989
Não tratado vs. Murino (5 µg/ml)	20,92	-137,2 to 179,0	No	ns	0,9991
Não tratado vs. 118 (1 µg/ml)	8,95	-149,2 to 167,1	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 118 (5 µg/ml)	13,23	-144,9 to 171,4	No	ns	> 0,9999
Não tratado vs. 230 (1 µg/ml)	15,93	-142,2 to 174,0	No	ns	0,9998
Não tratado vs. 230 (5 µg/ml)	13,29	-144,8 to 171,4	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. Murino (5 µg/ml)	-0,8	-158,9 to 157,3	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	-12,77	-170,9 to 145,4	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-8,485	-166,6 to 149,6	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-5,79	-163,9 to 152,3	No	ns	> 0,9999
Murino (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-8,425	-166,5 to 149,7	No	ns	> 0,9999
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (1 µg/ml)	-11,97	-170,1 to 146,2	No	ns	> 0,9999
Murino (5 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	-7,685	-165,8 to 150,4	No	ns	> 0,9999
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	-4,99	-163,1 to 153,1	No	ns	> 0,9999
Murino (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-7,625	-165,7 to 150,5	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 118 (5 µg/ml)	4,28	-153,8 to 162,4	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	6,975	-151,1 to 165,1	No	ns	> 0,9999
118 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	4,34	-153,8 to 162,5	No	ns	> 0,9999
118 (5 µg/ml) vs. 230 (1 µg/ml)	2,695	-155,4 to 160,8	No	ns	> 0,9999
118 (5 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	0,06	-158,1 to 158,2	No	ns	> 0,9999
230 (1 µg/ml) vs. 230 (5 µg/ml)	-2,635	-160,8 to 155,5	No	ns	> 0,9999

## APÊNDICE E – Marcação de CD3 em células tratadas com anti-CD3

O tratamento com anti-CD3 murino em ambas as concentrações modula a expressão de CD3 na superfície celular, entretanto com o anti-CD3 humanizado e grupo sem tratamento isso não ocorre.



## PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Manieri TM, Magalhães CG, Takata DY, **Batalha-Carvalho J.V**, Moro AM. In silico Techniques for Prospecting and Characterizing Monoclonal Antibodies. In: Rezaei, N. (Org.). *Monoclonal Antibodies*. 1ed.Londres: *Intechopen* Limited v., p. 1-20, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.94366>

Andrade SA, **Batalha-Carvalho JV**, Curi R, Wen FH, Covas DT, Chudzinski-Tavassi AM and Moro AM. Equine Anti-SARS-CoV-2 Serum (ECIG) Binds to Mutated RBDs and N Proteins of Variants of Concern and Inhibits the Binding of RBDs to ACE-2 Receptor. *Front. Immunol.* 13:871874, 2022. Disponível em: doi: 10.3389/fimmu.2022.871874

Manieri TM, Takata DY, Targino RC, Quintilio W, **Batalha-Carvalho JV**, Silva CML, Moro AM. Characterization of neutralizing human anti-tetanus monoclonal antibodies produced by stable cell lines. *Pharmaceutics*. 2022. Disponível em: doi: 10.3390/pharmaceutics14101985

## PARTICIPAÇÃO EM PATENTE

Moro AM, Manieri TM, Oliveira ASA, **Batalha de Carvalho JV**, Chudzinski SAA, Botosso VF. Anticorpo monoclonal humano anti-SARS-CoV-2, composição farmacêutica, kit de diagnóstico e uso do mesmo. Depositante: Instituto Butantan. BR nº 1020220127441.