

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 06/04/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

RODRIGO DE ALMEIDA

**OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS
RECONHECEDORES DE CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS
HUMANAS**

Araraquara

2017

RODRIGO DE ALMEIDA

**OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS
RECONHECEDORES DE CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS
HUMANAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para o título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Andrei Moroz

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª. Ana Marisa Fusco Almeida

Araraquara

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A447o Almeida, Rodrigo de
Obtenção de anticorpos monoclonais murinos reconhecedores de células tumorais
prostáticas humanas / Rodrigo de Almeida. – Araraquara, 2017.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas á Farmácia. Área de pesquisa em Imunologia.

Orientador: Andrei Moroz.
Coorientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

1. Anticorpos monoclonais. 2. Câncer de próstata. 3. Neoplasias da Próstata. 4. Imunização
subtratativa. I. Moroz, Andrei, orient. II. Almeida, Ana Marisa Fusco, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

RODRIGO DE ALMEIDA

**OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS RECONHECEDORES
DE CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS HUMANAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para o título de mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 06 de Abril de 2017.

Comissão Examinadora

Dr. Andrei Moroz

Dra. Elenice Deffune

Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Aos meus pais, Pedro e Edeni

AGRADECIMENTOS

Agradeço também a instituição de fomento FAPESP (Processo: 2015/21884-0), da qual recebi bolsa de mestrado, possibilitando que eu realizasse esse trabalho.

Agradeço a minha família (Pedro, Edeni, Juliana e Alanis) por sempre terem me dado apoio de todas as maneiras para que eu chegasse até onde cheguei. Meu pai Pedro Geraldo Ferraz de Almeida que nunca me negou o direito de estudar e fez tudo o que estava em seu alcance, e até além dele, para que eu conseguisse me manter firme nos estudos. Minha mãe Edeni de Oliveira Almeida que sempre estava lá me incentivando, dizendo palavras motivadoras, dando conselhos e sendo sempre minha maior fã. Amo vocês.

Agradeço ao José Ricardo Batista pela companhia e convivência durante esta etapa pela qual passamos juntos (cada um com o seu mestrado), muitos desafios que enfrentamos, artigos para escrever, madrugadas sem dormir, maratona de revisões bibliográficas e ortográficas, confusões em nosso condomínio, muitos sufocos, mas também muitas risadas e muitos momentos bons. Lembro até hoje daquela conversa no café em que você me apontou todos os motivos pelos quais eu deveria fazer o vestibular e entrar na graduação e desde então temos caminhado juntos nessa estrada até aqui e ainda temos uma grande jornada pela frente. Muito obrigado por tudo!

Agradeço a Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, minha Coorientadora que abriu as portas do Núcleo de Proteômica desde quando cheguei, inclusive me acolhendo, inicialmente como seu orientado. Muito obrigado por tudo.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Andrei Moroz que desde a minha primeira iniciação científica acreditou em mim muitas vezes até mais do que eu mesmo fazendo com que eu sempre fosse em frente e pudesse realizar esse trabalho de mestrado. Muito obrigado por tudo.

Agradeço a todos os amigos do Núcleo de Proteômica que sempre me acolheram tão bem e me fizeram sentir-se parte da equipe mesmo trabalhando em áreas diferentes. Muito aprendi com todos vocês. Obrigado especialmente a Patricia (Laranja ou melhor Djanja) que foi a primeira a me receber e me introduzir na rotina do laboratório. Agradeço também a todos amigos, Natália, Mônica, Priscila, Mariana, Junya, Nayla, Fer Gullo, Haroldo, Carolzinha, Panta, Lili, Wanessa, Carol MG, Ana Espanha e também aos técnicos Cláudia e Paulo que sempre me ajudaram.

Agradeço a todos os animais utilizados que perderam suas vidas para que esse trabalho fosse realizado. Meu eterno respeito e gratidão a eles.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é o mais diagnosticado e a segunda causa de morte por câncer entre os homens na América e nos países da Europa Ocidental. No Brasil, o número de novos casos de CaP estimado para o ano de 2016 foi de 61.200. A forma mais letal do CaP é aquele resistente à castração, nos quais os tratamentos disponíveis conferem sobrevida média de 24 meses. Não há terapias curativas efetivas para os estágios avançados. Por essa razão, tratamentos adjuvantes associados à quimioterapia e radioterapia têm grande importância; destaque à imunoterapia passiva que utiliza anticorpos monoclonais (AcM), ferramentas que também tem relevância no diagnóstico e estadiamento da doença. Nesse sentido, esse projeto teve como objetivo principal a obtenção de um painel de AcM murinos reconhecedores de células tumorais prostáticas humanas. Para a obtenção dos AcM foi estabelecido um banco de células prostáticas e, também, de células mielomatosas murinas não secretoras de imunoglobulinas utilizadas durante todas as etapas de produção. Foram utilizados camundongos Balb/C imunizados pela técnica de imunização subtrativa com o uso da ciclofosfamida como agente tolerizador com um e dois ciclos (LNCAPS e LNCAPSS, respectivamente) e pela técnica convencional sem o uso de ciclos de tolerização (LNCAP), tendo como tolerógeno células não tumorais da linhagem RWPE-1 e como imunógeno, células tumorais da linhagem LNCaP. Após o término das imunizações, os camundongos foram sacrificados e os baços coletados para obtenção de linfócitos para fusão com células mielomatosas. Foi obtido o total de 12 hibridomas produtores de anticorpos positivos para o imunógeno. Foram clonados os 4 melhores hibridomas, obtendo-se o total de 94 clones com positividade acima de 90% contra o imunógeno, porém positivos também na média de 66,07% contra o tolerógeno. Com os resultados obtidos e com resultados obtidos em trabalhos relacionados do grupo concluiu-se que a eficiência da técnica de imunização subtrativa para obtenção de anticorpos específicos com o uso de ciclofosfamida está associada com o número de ciclos de tolerização.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais. Câncer de próstata. Neoplasias da Próstata. Imunização Subtrativa.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the most diagnosed and the second leading cause of cancer deaths among men in America and in Western European countries. In Brazil, the number of new cases of PCa estimated for the year 2016 was 61,200. The most lethal form of PCa is that resistant to castration, in which the available treatments confer an average survival of 24 months. However, there are no effective curative therapies for the advanced stages. For this reason, adjuvant treatments associated with chemotherapy and radiotherapy are of great importance; The use of passive immunotherapy using monoclonal antibodies (MAbs), tools that also have relevance in the diagnosis and staging of the disease. In this sense, this project had as main objective the obtaining of a panel of murine MAbs recognizing human prostatic tumor cells. In order to obtain the MAbs, a bank of prostatic cells and also non-secretory murine myelomatosis cells used during all stages of production were established. Balb/C mice immunized by the subtractive immunization technique with the use of cyclophosphamide as a tolerant agent with one and two cycles (LNCAPS and LNCAPSS, respectively) and the conventional technique without the use of tolerance cycles (LNCAP) were used as tolerogen Non-tumor cells of the RWPE-1 lineage and as immunogen, tumor cells of the LNCaP lineage. After the immunizations were completed, the mice were sacrificed and the spleens collected to obtain lymphocytes for fusion with myelomatosis cells. A total of 12 hybridomas producing antibodies to the immunogen were obtained. The 4 best hybridomas were cloned, obtaining a total of 94 clones with positivity above 90% against the immunogen, but also 66.07% positive against the tolerogen. With the results obtained and with results obtained in related works of the group, it was concluded that the efficiency of the subtractive immunization technique to obtain specific antibodies with the use of cyclophosphamide is associated with the number of cycles of tolerization.

Keywords: Monoclonal Antibodies. Cancer, Prostate. Subtractive Immunization. Antibodies, Monoclonal. Prostatic Neoplasms.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

AcM	Anticorpo Monoclonal
AcP	Anticorpos Policlonais
BC	Banco de células
°C	Graus Celsius
CaP	Câncer de próstata
Cy	Ciclofosfamida
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetilsufóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Isoticianato de flurosceína
h	hora(s)
HAMA	<i>Human Anti-mouse Antibodies</i>
HAT	Hipoxantina-aminopterina e timidina
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HGPRT	Hipoxantina-ribosina-fosfo-ribosil-transferase
LNCAP	Protocolo utilizado com imunização convencional
LNCAPS	Protocolo utilizado com imunização subtrativa e um ciclo de tolerização
LNCAPSS	Protocolo utilizado com imunização subtrativa e dois ciclos de tolerizações
Ly	Linfócitos
MC	Meio de cultura
µg	micrograma

μ l	microlitro
mg	miligrama
mL	mililitro
PEG	Polietilenoglicol
PSA	Antígeno prostático específico
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino
SCC	Sobrenadante de cultura celular

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Obtenção do Banco de Células (BC).

Quadro 2: Obtenção do Banco de Células (BC) após perda.

Quadro 3: Dados das fusões celulares

Quadro 4. Hibridomas plaqueados, hibridomas testados e hibridomas retidos

Quadro 5: Reatividade dos clones obtidos contra antígenos expressos pela LNCaP, por Citometria de Fluxo

Quadro 6: Controles Auto fluorescência e Anticorpo secundário dos *screenings* dos clones

Tabela 1 – *Screenings* dos clones por Citometria de Fluxo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células utilizadas: A) Linhagem LNCaP; B) Linhagem RWPE-1; C) Linhagem mieloma NS1; D) Linhagem mieloma Sp2/0. Aumento de 100X, barra de escala: 100µm.

Fonte: (A,B e D) Arquivo pessoal; (C) ATCC.

Figura 2: Extração do timo para obtenção dos timócito (*Fedder Cells*). O timo pode ser visto como um órgão esbranquiçado logo acima do coração. Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 3: Agenda de imunizações do protocolo LNCAP. Protocolo convencional. Nos dias 0, 14, 21 e 41 foi feita a inoculação do imunógeno (LNCaP).

Figura 4: Agenda de imunizações do protocolo LNCAPS. Protocolo imunização subtrativa com o uso de Cy. No dia 0 é inoculado o tolerógeno (RWPE-1), seguido de duas doses de Cy, 24 e 48h. Após é feita a inoculação do imunógeno (LNCaP) nos dias 14, 21 e 41.

Figura 5: Agenda de imunizações do protocolo LNCAPSS. Protocolo de imunização subtrativa com o uso de dois ciclos de tolerização. No dia 0 é inoculado o tolerógeno (RWPE-1) no camundongo, seguido de duas doses de Cy 24 e 48h depois. Após 12 dias da última dose de Cy é feita novamente a inoculação do tolerógeno seguido de mais duas doses de Cy. Nos dias 30, 37 e 52 é feita a inoculação do imunógeno (LNCaP).

Figura 6: Obtenção dos esplenócitos. O baço é furado diversas vezes e em seguida meio de cultura é injetado em seu interior expelindo os esplenócitos pelos furos feitos. Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 7. Células pós-fusão: Células Mielomatosas murinas (**a**), linfócitos (**b**) e hemácias (**c**) observadas ao microscópio invertido com contraste de fase, logo após a fusão celular. Algumas das células marcadas com (a) são hibridomas, porém não é possível diferenciá-las morfologicamente das células mielomatosas. Aumento de 400X. Barra de escala= 20µM.

Figura 8. Vias metabólicas relevantes para seleção do híbrido em meio contendo hipoxantina-aminopterina e timidina: Quando as principais vias sintéticas são bloqueadas com o análogo de ácido fólico aminopterina (*), a célula deve depender das enzimas de salvamento HGPRT e timidina quinase. As células HGPRT podem ser seleccionadas por crescimento em meio contendo os análogos de base tóxica 6-tioguanina ou 8 -azaguanina, que são incorporados na célula via HGPRT. Apenas as células HGPRT + sobrevivem. As células HGPRT- não podem crescer em meio HAT a menos que estejam fundidas com células HGPRT +

Figura 9: Clonagem por diluição limitante. Os hibridomas foram diluídos a partir de 10^6 até chegar a 75 células em um tubo com 10 mL de meio de cultura que então foi distribuído em microplaca de cultura de 96 poços.

Figura 10. Crescimento dos Clones (*): **A)** Crescimento de clone único; **B)** Crescimento de clone duplo. Aumento de 100X. Barra de escala de 100µm

Figura 11: Análise dos anticorpos policlonais presentes no soro dos camundongos do protocolo LNCAPSS contra o imunógeno (LNCaP) por citometria de fluxo. **(A)** Animal 1, positivo em 97,3%; **(B)** Animal 3, positivo em 98,3%; **(C)** Controle autofluorescência, positivo em 10,1%; **(D)** Blot da população celular analisada; **(E)** Controle de autofluorescência, positivo em 0,1%.

Figura 12. Soro dos camundongos testados por Citometria de Fluxo com células LNCaP: **a)** Controle negativo; **b)** Camundongo 1 do protocolo LNCAPS **c)** Camundongo 2 do protocolo LNCAPS **d)** Camundongo 1 do protocolo LNCAP **e)** Blot da população celular pesquisada.

Figura 13. Hibridoma ao microscópio invertido: Aspecto morfológico ideal representativo de hibridomas em crescimento saudável (*) para o teste de *screening* quando atingirem maior confluência. Aumento de 100x. Barra de escala = 100µM.

Figura 14. Morfologia dos hibridomas produzidos (esquerda) e perfil dos anticorpos por eles secretados, em citometria de fluxo, contra células-alvo LNCaP (direita): **A)** LNCAPS 1-24, reconhecendo 97% das células-alvo. **B)** LNCAPS 1-33, reconhecendo 52% das células-alvo. **C)** LNCAPS 1-41, reconhecendo 60% das células-alvo. **D)** LNCAPS 1-43, reconhecendo 75% das células-alvo. **E)** LNCAPS 1-62, reconhecendo 65% das células-alvo. **F)** LNCAPS 1-73, reconhecendo 40% das células-alvo. **G)** LNCAPS 1-77, reconhecendo 35% das células-alvo. Todos estes hibridomas foram obtidos com protocolo de imunização subtrativa (provenientes de duas fusões celulares). **H)** LNCAP 1-110, reconhecendo 50% das células-alvo. Este hibridoma foi obtido com protocolo de imunização convencional (obtido de outra fusão, não previsto no projeto, mas realizado

para se ter controles de imunizações convencionais). **I)** Controle negativo. **J)** Controle positivo, CD81. Pode-se observar o perfil positivo quando o gráfico está deslocado e dentro da barra delimitada como M1. Perfis negativos, por sua vez, estão fora da barra M1. Aumento em todas as fotomicrografias de 100X. Barras de escala = 100µM.

Figura 15. Perfil dos anticorpos secretados, em citometria de fluxo, contra células-alvo LNCaP: **A)** LNCAPSS 3-13, reconhecendo 91,3% das células-alvo. **B)** LNCAPSS 1-40, reconhecendo 78,1% das células-alvo. **C)** LNCAPSS 1-43, reconhecendo 73,8% das células-alvo. **D)** LNCAPSS 1-46, reconhecendo 48,9% das células-alvo; **E)** Blot da população celular estudada; **F)** Controle de autofluorescência (acima) mostrando positividade de 0,2% e controle de anticorpo secundário (abaixo) mostrando positividade de 13,3%.

Figura 16: Citometria de fluxo de células da linhagem RWPE-1 (tolerógeno) expostas ao soro de camundongos (**A a E**) que não receberam nenhum ciclo de tolerização (**F a J**) e de camundongos que receberam ciclos repetidos de tolerização; (**K**) Controle de autofluorescência; (**M**) Controle de anticorpo secundário; (**L**) Blot da população celular pesquisada.

Figura 17: Gráfico em coluna da média de positividade do *screening* dos clones de cada hibridoma construído por citometria de fluxo.

Figura 18: Revelação do experimento para detecção de contaminação por micoplasma por coloração indireta com DAPI. (A) Controle de Reporte Cells Fonte: Arquivo Pessoal; (B)

Hibridomas com células LNCaP. Fonte: Arquivo Pessoal; (C e D) controles positivos.

Fonte: Young et al. (2010)

Sumário

<i>Capítulo 1</i>	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. O Câncer de Próstata.....	18
1.2. Anticorpos Monoclonais e Imunoterapia do Câncer de Próstata	19
1.3. Imunização Subtrativa.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
Objetivo Geral:	22
Objetivos Específicos:.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Obtenção das Linhagens Celulares de Câncer de Próstata e Células Efetoras.....	23
3.2. Obtenção das <i>feeder cells</i>	24
3.3. Protocolo de Imunização Subtrativa	26
3.4. Produção dos Anticorpos	29
3.4.1. Fusão Celular	29
3.4.1.1. Preparo de células companheiras de fusão.....	29
3.4.1.2. Eutanásia dos animais e esplenectomia	29
3.4.1.3. Controle da Imunização pelo método de Citometria de Fluxo.....	30
3.4.1.4. Fusão Celular.....	31
3.4.2. Seleção dos Hibridomas	31
3.4.3. Identificação dos Hibridomas para <i>Screening</i>	34
3.4.4. <i>Screening</i> dos Hibridomas	34
3.4.5. Clonagem Celular.....	34
3.5. Controle de contaminação dos hibridomas	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Expansão das linhagens	38
4.2. Padronização da Ciclofosfamida para a imunização subtrativa	39
4.3. Imunização dos Animais	40
4.4. Controle de Imunização	40
4.5. Fusão Celular e <i>Screening</i>	43
4.6. Clonagem celular e <i>screening</i> dos clones obtidos	48
4.7. Controle de contaminação dos hibridomas	56
5. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO.....	62
<i>Capítulo 2</i>	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Câncer de Próstata

A próstata é uma glândula, situada na região baixa do abdômen, abaixo da bexiga e à frente do reto, responsável por parte do conteúdo que forma o sêmen. O câncer de próstata (CaP) é o câncer mais diagnosticado entre os homens nos Estados Unidos (EUA) (DESANTIS *et al.*, 2014; FUNG *et al.*, 2014), totalizando cerca de 200.000 óbitos a cada ano no mundo inteiro (WANG *et al.*, 2011), representando 1 em cada 10 casos de câncer (SINGH *et al.*, 2016). Projeções alarmantes de até 1.7 milhões de novos casos e aproximadamente meio milhão de mortes são esperados para o ano de 2030 (CENTER *et al.*, 2012), gerando gastos excessivos aos sistemas de saúde pública de todos os países. Estima-se gastos em torno de oito bilhões de dólares por ano (11% dos custos para o tratamento de todos os cânceres) e 81.658 dólares por paciente entre o diagnóstico até o óbito (RACIOPPI *et al.*, 2012). De acordo com “*World cancer research fund International*” (WORLD CANCER RESEARCH, 2016) o câncer de próstata está em segundo lugar no *ranking* dos cânceres que acometem homens, sendo responsável pelo total de 15% de todos os casos diagnosticados atrás, apenas, do câncer de pulmão que representa 16,7% dos cânceres em homens. No Brasil, o número de novos casos de CaP estimado para o ano de 2016 foi de 61.200, o que corresponde a aproximadamente 62 casos a cada 100.000 indivíduos. Além dos tumores de pele do tipo não-melanoma, dados do INCA mostram que o CaP é o mais incidente entre os homens em todas as regiões de nosso país (INCA, 2016).

O crescente número de diagnósticos de câncer de próstata pode estar relacionado ao aumento de informação e implementação do exame Antígeno Prostático Específico (PSA, do inglês *Prostate-Specific Antigen*) para homens a partir dos 50 anos e para os homens com 40 anos que possuam casos em familiares (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Todavia, o exame de PSA não é eficiente para a detecção de todos os tipos de CaP, sendo necessário também o exame de toque (ONCOGUIA, 2014).

Quando o CaP é diagnosticado em seus estágios iniciais, a taxa de sobrevivência do paciente em até cinco anos é alta, já nos estágios mais avançados da doença essa taxa cai consideravelmente, acompanhado do aumento do risco de metástase (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012; ONCOGUIA, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Por essa razão, a busca por novas maneiras de detecção da doença de forma mais rápida e eficiente é o

que impulsiona grande parte das pesquisas que envolvem variados tipos de cânceres e assim, é ressaltada a importância dos biomarcadores que de acordo com *National Cancer Institute* são definidos como: “Uma molécula biológica encontrada no sangue, outros fluidos corporais ou tecidos, que é um sinal de um processo normal ou anormal, em dada condição patológica” (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012). Portanto, os anticorpos monoclonais podem ter papel fundamental para a detecção desses biomarcadores.

1.2. Anticorpos Monoclonais e Imunoterapia do Câncer de Próstata

A técnica de produção de anticorpos monoclonais (AcM) murinos foi descrita em publicação no periódico *Nature* há mais de quatro décadas por um pesquisador alemão e outro argentino (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Após vários anos de aplicação diagnóstica, acreditava-se que os anticorpos murinos seriam eficazes no tratamento de doenças humanas (ROSS *et al.*, 2005). No entanto, isso não se verificou devido à *human anti-mouse antibodies* (HAMA), uma resposta imunológica humana contra a imunoglobulina murina (KLEE, 2000; ROSS *et al.*, 2005). Eventualmente, a consolidação das técnicas de humanização e hibridização permitiram o uso de AcM para a aplicação terapêutica. Existe atualmente uma gama de anticorpos em testes clínicos (ROSS *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2010; BERMAN *et al.*, 2015).

Desta forma, após décadas de maturidade tecnológica na produção de AcM, a imunoterapia passiva tem conquistado espaço e vêm apresentando resultados *in vitro* e/ou *in vivo* satisfatórios em uma variedade de tumores sólidos e malignidades hematopoiéticas (ROSS *et al.*, 2005; MCNEEL, 2007; JACHIMOWICZ *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; BERMAN *et al.*, 2015), como terapias adjuvantes ao tratamento do CaP, bem como de outros cânceres (MCNEEL, 2007; FIZAZI *et al.*, 2010; BERMAN *et al.*, 2015).

1.3. Imunização Subtrativa

Com as técnicas clássicas de imunização a probabilidade de obtenção de anticorpos específicos contra antígenos tumorais é menor, tendo em vista que a distribuição destes sobre a membrana celular é reduzida quando comparado a antígenos comuns presentes também, em células não tumorais. Desse modo a resposta imunológica do camundongo a essa célula é majoritariamente contra os antígenos imunodominantes (WILLIAMS *et al.*, 1992; BROOKS

et al., 1993). No entanto, uma técnica inovadora, denominada imunização subtrativa tem sido utilizada com sucesso para a obtenção de anticorpos relevantes e dirigidos contra antígenos associados a apoptose, invasividade, agressividade e potencial metastático em diferentes relatos (WILLIAMS *et al.*, 1992; BROOKS *et al.*, 1993; BOUKERCHE *et al.*, 2000; TREFZER *et al.*, 2000; YANG; WANG, 2002; HOOPER *et al.*, 2003; RASMUSSEN; DITZEL, 2009; YASUMOTO *et al.*, 2012).

A referida técnica tem como princípio uma prévia imunização do camundongo com antígenos pelos quais não há o interesse de se obter anticorpos. Após essa imunização é feita uma tolerização da resposta imunológica obtida, ou seja, é inibido uma futura resposta contra esse imunógeno. Em seguida, faz-se a imunização com os antígenos de interesse, além dos antígenos tolerizados, obtendo-se dessa vez uma resposta imunológica e a produção de anticorpos apenas contra os antígenos de interesse (BROOKS *et al.*, 1993; HAMABASHIRI *et al.*, 2011; JIN *et al.*, 2012).

A imunização subtrativa pode ser feita de três maneiras diferentes, a saber: tolerização neonatal, tolerização química e tolerização baseada no fenômeno natural de tolerância imunológica, denominada “zona de alta tolerância” (GOLUMBESKI; DIMOND, 1986; KRUEGER *et al.*, 2001; JIN *et al.*, 2012). A técnica de tolerização química vem demonstrando promissores resultados na obtenção de anticorpos monoclonais específicos a antígenos raros ou específicos. Essa técnica utiliza-se de um agente imunossupressor, a ciclofosfamida, entre imunizações sequenciais, utilizando-se duas linhagens celulares fenotipicamente semelhantes, mas com características especiais distintas. Esse agente elimina seletivamente os linfócitos B e T ativados por prévia inoculação de um imunógeno (célula não tumoral, por exemplo), agindo como agente alquilante, suprimindo a resposta imune contra antígenos imunodominantes presentes neste imunógeno (COLVIN, 2003) – os imunógenos utilizados nessa imunização inicial são denominados na técnica como tolerógeno. Após o tratamento com a ciclofosfamida e a eliminação dos clones de linfócitos ativados, um segundo imunógeno denominado na técnica apenas como imunógeno, desta vez contendo, além dos antígenos presentes também no tolerógeno, antígenos específicos relacionados a alguma alteração biológica (crescimento desordenado e capacidade metastática, por exemplo) é inoculado nos animais. Os antígenos compartilhados pelas duas linhagens que são em sua maioria imunodominantes não ativarão resposta imune, pois já foram tolerizados, enquanto os antígenos presentes apenas nas células tumorais, o imunógeno, irão gerar resposta imune, obtendo-se desta maneira os desejados anticorpos específicos a processos de agressividade e

invasividade tumoral (BROOKS *et al.*, 1993; RASMUSSEN; DITZEL, 2009; JIN *et al.*, 2012; YASUMOTO *et al.*, 2012).

5. CONCLUSÕES

- O uso da ciclofosfamida mostrou não haver efeitos adversos severos ou comprometedores nos camundongos que pudessem inviabilizar a técnica de imunização subtrativa, de modo que os óbitos que ocorreram dos animais provavelmente foram causados por outros motivos que não pudemos determinar;
- As análises por Citometria de fluxo do soro dos animais revelaram a eficiência na imunização dos animais, mas não foi encontrado, até o momento, anticorpos monoclonais específicos contra o imunógeno
- A clonagem feita pelo método de diluição limitante obteve efetividade em relação a aquisição de possíveis clones únicos.
- Não foi encontrado um clone que produzisse anticorpos específicos e altamente reativos com células utilizadas como imunógeno, sendo assim nesse trabalho não foi encontrado nenhum clone de alta prioridade.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY. About Prostate Cancer. 2016. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about.html> >. Acesso em: March 10.
- BERMAN, D. et al. The development of immunomodulatory monoclonal antibodies as a new therapeutic modality for cancer: the Bristol-Myers Squibb experience. **Pharmacol Ther**, v. 148, p. 132-53, Apr 2015. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25476108> >.
- BOUKERCHE, H. et al. A new Mr 55,000 surface protein implicated in melanoma progression: association with a metastatic phenotype. **Cancer Res**, v. 60, n. 20, p. 5848-56, Oct 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11059782> >.
- BROOKS, P. C. et al. Subtractive immunization yields monoclonal antibodies that specifically inhibit metastasis. **J Cell Biol**, v. 122, n. 6, p. 1351-9, Sep 1993. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8376467> >.
- CENTER, M. M. et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. **Eur Urol**, v. 61, n. 6, p. 1079-92, Jun 2012. ISSN 1873-7560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424666>>.
- COLVIN, M. Alkylation Agents. In: KUFÉ, D.; POLLOCK, R., *et al* (Ed.). **Holland-Frei Cancer Medicine** 6: Hamilton (ON): BC Decker, 2003.
- COSTA, A. R. et al. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 74, n. 2, p. 127-38, Feb 2010. ISSN 1873-3441. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853660> >.
- DEFFUNE, E. **Obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre le troisième composant du complément**:intêret en imunohematologie. 1992. 146p. Thesis (Doutorado em Imunologia) -Universidade Pierre et Marie Curie, LISE / CNRS, França.
- DESANTIS, C. E. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 4, p. 252-71, 2014 Jul-Aug 2014. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24890451> >.
- EARLEY, E. M.; OSTERLING, M. C. Fusion of mouse-mouse cells to produce hybridomas secreting monoclonal antibody: **J Tissue Cult Methods**, v.9, n.3, p. 141-146, 1985. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01665919>>.
- FIZAZI, K. et al. Role of targeted therapy in the treatment of advanced prostate cancer. **BJU Int**, v. 105, n. 6, p. 748-67, Mar 2010. ISSN 1464-410X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353536> >.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques**. 5th. ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

FUNG, C.; DALE, W.; MOHILE, S. G. Prostate cancer in the elderly patient. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 24, p. 2523-30, Aug 2014. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071137>>.

GODING, J. W. **Monoclonal Antibodies: principles and practice**. 3rd. ed. London: Academic Press, 1996. 492p. ISBN 0-12-287023-9.

GOLUMBESKI, G. S.; DIMOND, R. L. The use of tolerization in the production of monoclonal antibodies against minor antigenic determinants. **Anal Biochem**, v. 154, n. 2, p. 373-81, May 1986. ISSN 0003-2697. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2425654>>.

HAMABASHIRI, M. et al. Novel monoclonal antibodies against pancreatic juice from pancreatic cancer patients and their possible application in differential diagnosis. **Int J Mol Med**, v. 28, n. 4, p. 599-603, Oct 2011. ISSN 1791-244X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21667013>>.

HOOPER, J. D. et al. Subtractive immunization using highly metastatic human tumor cells identifies SIMA135/CDCP1, a 135 kDa cell surface phosphorylated glycoprotein antigen. **Oncogene**, v. 22, n. 12, p. 1783-94, Mar 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660814>>.

INCA. Estimativa 2016. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.asp>>. Acesso em: 01/12/2016.

JACHIMOWICZ, R. D. et al. Induction of in vitro and in vivo NK cell cytotoxicity using high-avidity immunoligands targeting prostate-specific membrane antigen in prostate carcinoma. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 6, p. 1036-45, Jun 2011. ISSN 1538-8514. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21525185>>.

JIN, M. et al. A rapid subtractive immunization method to prepare discriminatory monoclonal antibodies for food E. coli O157:H7 contamination. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31352, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347466>>.

KLEE, G. G. Human anti-mouse antibodies. **Arch Pathol Lab Med**, v. 124, n. 6, p. 921-3, Jun 2000. ISSN 0003-9985 (Print) 0003-9985 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835540>>.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-7, Aug 1975. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1172191>>.

KRUEGER, P. et al. Monoclonal antibody identifies a distinctive epitope expressed by human multiple myeloma cells. **J Immunother**, v. 24, n. 4, p. 334-44, 2001 Jul-Aug 2001. ISSN 1524-9557. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11565835>>.

LIETZKE, R.; UNSICKER, K. A statistical approach to determine monoclonality after limiting cell plating of a hybridoma clone. **J Immunol Methods**, v. 76, n. 2, p. 223-8, Feb 1985. ISSN 0022-1759. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3973391>>.

MCNEEL, D. G. Prostate cancer immunotherapy. **Curr Opin Urol**, v. 17, n. 3, p. 175-81, May 2007. ISSN 0963-0643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17414515> >.

MOROZ, A. et al. Finasteride Inhibits Human Prostate Cancer Cell Invasion through MMP2 and MMP9 Downregulation. **Plos One**, v. 8, n. 12, DEC 30, 2013 2013. ISSN 1932-6203.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Prostate-Specific Antigen (PSA) Test. 2012. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/types/prostate/psa-fact-sheet> >. Acesso em: 13/01/2017.

ONCOGUIA, I. Exame de Toque Retal para Diagnóstico do Câncer de Próstata. 2014. Disponível em: < <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/exame-de-toque-retal-para-diagnostico-do-cancer-de-prostata/5856/289/> >. Acesso em: March 14.

RACIOPPI, M. et al. Hot topics in urological health economics. A mini review. **Arch Ital Urol Androl**, v. 84, n. 2, p. 47-52, Jun 2012. ISSN 1124-3562. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22908771> >.

RASMUSSEN, N.; DITZEL, H. J. Scanning the cell surface proteome of cancer cells and identification of metastasis-associated proteins using a subtractive immunization strategy. **J Proteome Res**, v. 8, n. 11, p. 5048-59, Nov 2009. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19764822> >.

ROSS, J. S. et al. Antibody-based therapeutics: focus on prostate cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 24, n. 4, p. 521-37, Dec 2005. ISSN 0167-7659. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16408160> >.

SINGH, P. R. et al. Nimbolide inhibits androgen independent prostate cancer cells survival and proliferation by modulating multiple pro-survival signaling pathways. **Biomed Pharmacother**, Nov 2016. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889231> >.

TREFZER, U. et al. SM5-1: a new monoclonal antibody which is highly sensitive and specific for melanocytic lesions. **Arch Dermatol Res**, v. 292, n. 12, p. 583-9, Dec 2000. ISSN 0340-3696. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11214818> >.

VICENTINI-OLIVEIRA, J. C. et al. Taenia saginata: production and characterization of monoclonal antibodies against Taenia saginata metacestode antigens. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 4, p. 621-5, Dec 2010. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542032> >.

VILLAVEDRA, M.; LEMKE, S.; TO, J.; BROADY, K.; WALLACH, M.; RAISON, R. L. Carbohydrate epitopes are immunodominant at the surface of infectious Neoparamoeba spp. **J Fish Dis.**, v. 30, n.4, p. 191-199, 2007. DOI:10.1111/j.1365-2761.2007.00800.x.

WANG, X. et al. In vitro and in vivo responses of advanced prostate tumors to PSMA ADC, an auristatin-conjugated antibody to prostate-specific membrane antigen. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 9, p. 1728-39, Sep 2011. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750220> >.

WILLIAMS, C. V.; STECHMANN, C. L.; MCLOON, S. C. Subtractive immunization techniques for the production of monoclonal antibodies to rare antigens. **Biotechniques**, v. 12, n. 6, p. 842-7, Jun 1992. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1642892> >.

WORLD CANCER RESEARCH. Fund International. Worldwide Data. 2016. Disponível em: < <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data> >. Acesso em: 01/12/2016.

YANG, L. J.; WANG, W. L. Preparation of monoclonal antibody against apoptosis-associated antigens of hepatoma cells by subtractive immunization. **World J Gastroenterol**, v. 8, n. 5, p. 808-14, Oct 2002. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12378620> >.

YASUMOTO, M. et al. The utility of a novel antibody in the pathological diagnosis of pancreatic acinar cell carcinoma. **J Clin Pathol**, v. 65, n. 4, p. 327-32, Apr 2012. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228907> >.

YOUNG, L. et al. Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nat Protoc**, v. 5, n. 5, p. 929-34, May 2010. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431538> >.