

**APARECIDA VITÓRIA GONÇALVES DE SOUZA**

**DIFICULDADES NA OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS ANTI-  
PROTEÍNA F RECOMBINANTE DO VÍRUS SINCICIAL  
RESPIRATÓRIO HUMANO (RSV) PARA DIAGNÓSTICO  
LABORATORIAL**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina de  
Botucatu – UNESP, Programa  
de Pesquisa e Desenvolvimento  
– Biotecnologia Médica, para  
obtenção do título de Mestre

**Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune**

**Botucatu  
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
**BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus**

Souza, Aparecida Vitória Gonçalves de.

Dificuldades na obtenção e caracterização de anticorpos monoclonais murinos anti-proteína F recombinante do vírus sincicial respiratório humano (RSV) para diagnóstico laboratorial / Aparecida Vitória Gonçalves de Souza. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Elenice Deffune

Assunto CAPES: 40101037

1. Aparelho respiratório – Doenças – Aspectos imunológicos 2. Vírus Respiratórios 3. Vírus sincicial respiratório - Diagnóstico

CDD 616.2

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais; Diagnóstico laboratorial; Proteína; Vírus sincicial respiratório; bactéria

A minha família e aos bons amigos

Primeiro, agradeço aos meus pais, minha irmã Alécia, meu irmão Vitor, por todo apoio dado durante esses anos longe de casa. Obrigada por nunca terem duvidado da minha capacidade e vontade de crescer.

Agradeço em especial a Dra. Elenice Deffune, exemplo de sabedoria e genialidade, por ter me aceitado em sua equipe, apenas acreditando e confiando na minha vontade de aprender. Doutora sua bondade jamais será esquecida.

Nosso anjo, por vezes mãe, Dra. Rosana Rossi Ferreira, seu apoio foi indispensável a cada nova etapa do caminho.

Tatíssima, mãe de minhas células, sem você e suas mão mágicas para cultura celular, este momento não teria se concretizado.

Queridas Josy e Gabi, não consigo expressar em palavras a imensa gratidão e dívida que tenho com vocês. Jo, seu empenho, carinho e dedicação com permitiu seu desenvolvimento em breves doze meses, muito obrigada. Gabi, meu exemplo de força, profissionalismo e perseverança e amiga literalmente para todas as horas, obrigada.

Priscila, Daniel, Valdir por vezes deixaram seus compromissos para colaborarem com esta dissertação, grata xuxus.

As queridas Márjorie e Léia, apesar da rotina conturbada, sempre houve possibilidade para analisar, discutir e em especial ensinar, com carinho sem igual.

Agradeço à Marina (hoje distante), mas fundamental durante os primeiros passos, Andrei, Renan, Janice e Rita, obrigada

Carlinhos (biotério) agradeço pela paciência, dedicação e carinho com que conduziu a parte experimental deste projeto.

Janaina e Rodrigo, obrigada. Já, agradeço por estes anos de aprendizado desde a residência até hoje, minha Irma por escolha e sem tempo determinado.

Aos xuxus, sempre presentes no coração: Marcela, Acácia, Juliana, Luciana, Gustavo e Camile. Fabia (bia) companheira desde a graduação, apesar de longe, sei que continua torcendo pelo meu crescimento profissional e pessoal, saudades.

Amanda, sua destreza e alegria em colaborar foi impar.

Ao professor João Pessoa que tão prontamente nos auxiliou em fase crítica de nossos experimentos.

Sou grata a todos que direta ou indiretamente colaboraram com a elaboração desta tese. Este foi um trabalho realizado em conjunto com várias equipes: Laboratório de Engenharia Celular, Citometria de Fluxo, Bioquímica, Biologia Molecular, Biotério, Microcristologia e Imunologia. Afirmando sem receios que esta foi uma dissertação realizada a 10 mãos.

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,  
mas na intensidade em que acontecem.  
Por isso existem momentos inesquecíveis,  
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”  
(Fernando Pessoa)*

## Resumo

O Vírus Sincicial Respiratório humano (VSR) é o principal agente causal das Infecções Respiratórias Agudas (IRAs) em lactantes e pré-escolares. Apresenta dois subgrupos – A e B – sendo o primeiro responsável por quadros clínicos mais graves. Os RNA mensageiros virais codificam 11 proteínas conhecidas, das quais a proteína F é responsável pela fusão viral à célula e se apresenta na forma de F0 com peso molecular de 67kDa, podendo ser clivada em duas unidades: F2 de 20kDa e a F1 de 47kDa. A proteína F recombinante (F<sub>r</sub>), expressa em *E.coli* (BL21A no vetor pET28a), foi cedida por pesquisadores da UNESP de São José do Rio Preto. Com intuito de produzir anticorpos monoclonais contra a proteína F<sub>r</sub> para fins de diagnóstico laboratorial, inoculamo-la em camundongos isogênicos Balb/c. Durante o desenvolvimento do monoclonal, foi necessário a eliminação da contaminação de cultura por *Mycoplasma ssp.* Após ajuste de dose de inoculação e descontaminação do antígeno (hipótese: contaminação com endotoxinas provenientes de *E.coli*), seis clones secretores de anticorpos monoclonais foram produzidos (5 do tipo IgM e 1 do tipo IgG2a) e testados, simultaneamente, contra toxina bacteriana e proteína F<sub>r</sub> (40µg/mL) por técnica de ELISA indireto. Paralelamente, testes por citometria de fluxo foram realizados, incubando-se os clones obtidos com *E.coli* (bactéria com membrana permeabilizada e *in natura*). Os clones (VIRSV2-87A74 e VIRSV2-87A80) apresentam um reconhecimento inespecífico de proteínas da *E. coli* e não foi possível caracterizar os clones obtidos em função da dificuldade de se obter novas amostras de proteína F<sub>r</sub>. Para o futuro, os anticorpos obtidos deverão ser marcados com isotiocinato de fluoroceína e comporem um amplo teste epidemiológico em paralelo com o kit disponível em mercado respeitando a sazonalidade da doença. Novos ensaios para caracterização dos anticorpos (como *Western blotting* e técnicas de imunoprecipitação) já estão sendo realizadas no sentido de se identificar eventual reconhecimento dos anticorpos com a proteína recombinante ou não.

**Palavras-chave:** vírus sincicial respiratório, diagnóstico laboratorial, anticorpos monoclonais, proteína F, *Escherichia coli*

## Abstract

The Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is the main cause of Acute Respiratory Insufficiency in suckling child and children below 5 years old. It has 2 subgroups – A and B – being the first one responsible for more dangerous clinical situations. The viral messenger RNA codifies 11 known proteins, which the F protein is responsible for the viral fusion and it is presented as F<sub>0</sub> with molecular weight of 67kDa, but once is broke it generates two units: F<sub>2</sub> with 20kDa and F<sub>1</sub> with 47kDa. The recombinant F (F<sub>r</sub>) protein were expressed on *E.coli* (BL21A, on vector pET28a), and it was given to us by researches from UNESP of São José do Rio Preto. Wishing to produce monoclonal antibodies (Mab) against F<sub>r</sub> protein to laboratorial diagnosis, mice (Balb/c) were inoculated with de antigen (F<sub>r</sub> protein). During the development of the Mab, it was necessary to eliminate, from the culture, *Mycoplasma spp.* After we adjusted the necessary amount to inoculate on the mice and eradicated the contamination of the antigen (hypotheses: there were endotoxins from the *E.coli*), six clones that secrete Mab were produced (5 of the kind IgM, and 1 of the kind IgG2a) and they were tested, simultaneously, against bacterium toxin and F<sub>r</sub> protein (40µg/mL) using ELISA technique. Together, flow cytometry test were performed when we incubated the clones with *E. coli* (bacterium with permeable membrane and in natura). The clones (VIRSV2-87A74 and VIRSV2-87A80) presented an unspecific recognition for the proteins from *E.coli* and it was not possible to characterize the cells because we couldn't get more samples of Fr protein. For the future, the Mab should be conjugated with FITC and then, they must be part of a wide epidemiologic test side by side from the commercial kit, always respecting the seasonal disease. New assays to characterize antibodies (like Western blotting and imuneprecipitation) are already being done to identify eventual recognition of the F<sub>r</sub> protein or *E.coli* toxins.

**Keywords:** Respiratory Syncytial Virus, laboratorial diagnosis, monoclonal antibodies, F protein, *Escherichia coli*

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1</b> – Taxonomia do RSV humano e de outros vírus relacionados	<b>28</b>
<b>Figura 2</b> – Estrutura genômica do RSV	<b>29</b>
<b>Figura 3</b> – Representação tridimensional da Proteína F e esquema simplificado do mecanismo de ativação da fusão celular do RSV.	<b>30</b>
<b>Figura 4</b> – Estudo da proteína de fusão em diferentes membros da família <i>Paramyxoviridae</i> .	<b>31</b>
<b>Figura 5</b> - Infecções Respiratórias Agudas (IRAs) em lactante, detalhe em gravura da bronquiolite aguda.	<b>33</b>
<b>Quadro 1</b> – Relação entre superfícies contaminadas (partículas virais) com a meia-vida do agente	<b>35</b>
<b>Figura 6</b> – Aspecto da Imunização	<b>46</b>
<b>Quadro 2</b> - Protocolos de Imunização em camundongos BALB/c com proteína F <sub>r</sub> do vírus sincicial respiratório.	<b>47</b>
<b>Figura 7</b> – Características macroscópicas do cultivo da enterobactéria <i>E. coli</i>	<b>49</b>
<b>Quadro 3</b> – Protocolos realizados para obtenção de endotoxinas de amostra de <i>E. Coli</i>	<b>49</b>
<b>Quadro 4</b> – Materiais submetidos à pesquisa de Micoplasma	<b>52</b>
<b>Figura 8</b> – Detalhe do Microscópio Zeiss Axiovert 200/ Micromanipulador Eppendorf®	<b>54</b>
<b>Figura 9</b> – Esplenectomia de camundongo imunizado	<b>55</b>
<b>Figura 10</b> – Aspecto da população de híbridos	<b>56</b>
<b>Figura 11</b> – ELISA indireta	<b>57</b>
<b>Figura 12</b> – Esquema do método de <i>Western blotting</i> .	<b>61</b>

<b>Figura 13</b> - Detalhe do equipamento de purificação por cromatografia de afinidade	<b>61</b>
<b>Figura 14</b> - Teste de toxicidade de linfócitos de roedores e humanos incubados com diferentes concentrações de proteína F	<b>66</b>
<b>Gráfico 1</b> - Média das viabilidades celulares em 24 horas de células de roedor e humano na presença de proteína F <sub>r</sub>	<b>66</b>
<b>Figura 15</b> - Achados de necrópsia nos primeiros protocolos de imunização com Proteína F <sub>r</sub>	<b>67</b>
<b>Figura 16</b> – Edema cerebral e aumento dos giros encefálicos nos animais imunizados com proteína F <sub>r</sub>	<b>68</b>
<b>Figura 17</b> – SDS-PAGE 12% de proteína F purificada 2 horas após a indução com 0,4μM de IPTG e 0,2μM de arabinose. Coloração de Coomassie.	<b>68</b>
<b>Figura 18</b> – proteína F purificada: SDS-PAGE gradiente 4-15 corado em azul de Coomassie e coloração de nitrato de prata	<b>69</b>
<b>Figura 19</b> – <i>E. coli</i> : SDS-PAGE gradiente 4-15 corado em azul de Coomassie e coloração de nitrato de prata	<b>70</b>
<b>Figura 20</b> – Aspecto final da placa ELISA após a revelação	<b>73</b>
<b>Figura 21</b> – Aspecto da Clonagem celular	<b>74</b>
<b>Figura 22</b> – Produção de líquido ascítico	<b>75</b>
<b>Figura 23</b> – Imagem produzida pelo <i>Software Cell Quest/BD®</i> dos sobrenadantes de cultura dos clones selecionados utilizando kit CBA Flex (IgA, IgG e IgM)	<b>76</b>
<b>Figura 24</b> – Eletroforese em gel de ágar e poliacrilamida SDS PAGE dos ascites e purificado	<b>77</b>
<b>Figura 25</b> – Purificação do clone VIRSV 2-23A46	<b>78</b>
<b>Gráfico 2</b> – Avaliação da densidade óptica (D.O.) dos clones retidos frente à proteína F <sub>r</sub>	<b>79</b>

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Resultados do teste de linfotoxicidade da proteína F <sub>r</sub> frente às células linfomononucleares (LMN) humanas e de roedor	<b>65</b>
<b>Tabela 2</b> – Quantidade de proteína total nas amostras de <i>E.coli</i> após seus respectivos processamentos	<b>70</b>
<b>Tabela 3</b> - Determinação da contaminação por <i>Mycoplasma</i> spp	<b>71</b>
<b>Tabela 4</b> - Resultados após protocolos de descontaminação propostos	<b>72</b>
<b>Tabela 5</b> – Híbridos construídos, testados e percentagem de híbridos testados	<b>72</b>
<b>Tabela 6</b> – Híbridos selecionados para clonagem, viabilidade celular, quantidade de clones testados, quantidade de clones retidos no primeiro e segundo <i>screening</i> .	<b>73</b>
<b>Tabela 7</b> – Quantificação de proteína no líquido ascítico de cada clone obtido.	<b>75</b>
<b>Tabela 8</b> – Avaliação da reatividade da <i>E. coli</i> com os anticorpos monoclonais obtidos	<b>79</b>
<b>Tabela 9</b> – Avaliação da reatividade da <i>E. coli</i> após permeabilização com saponina, frente aos anticorpos monoclonais obtidos	<b>80</b>

## SUMÁRIO

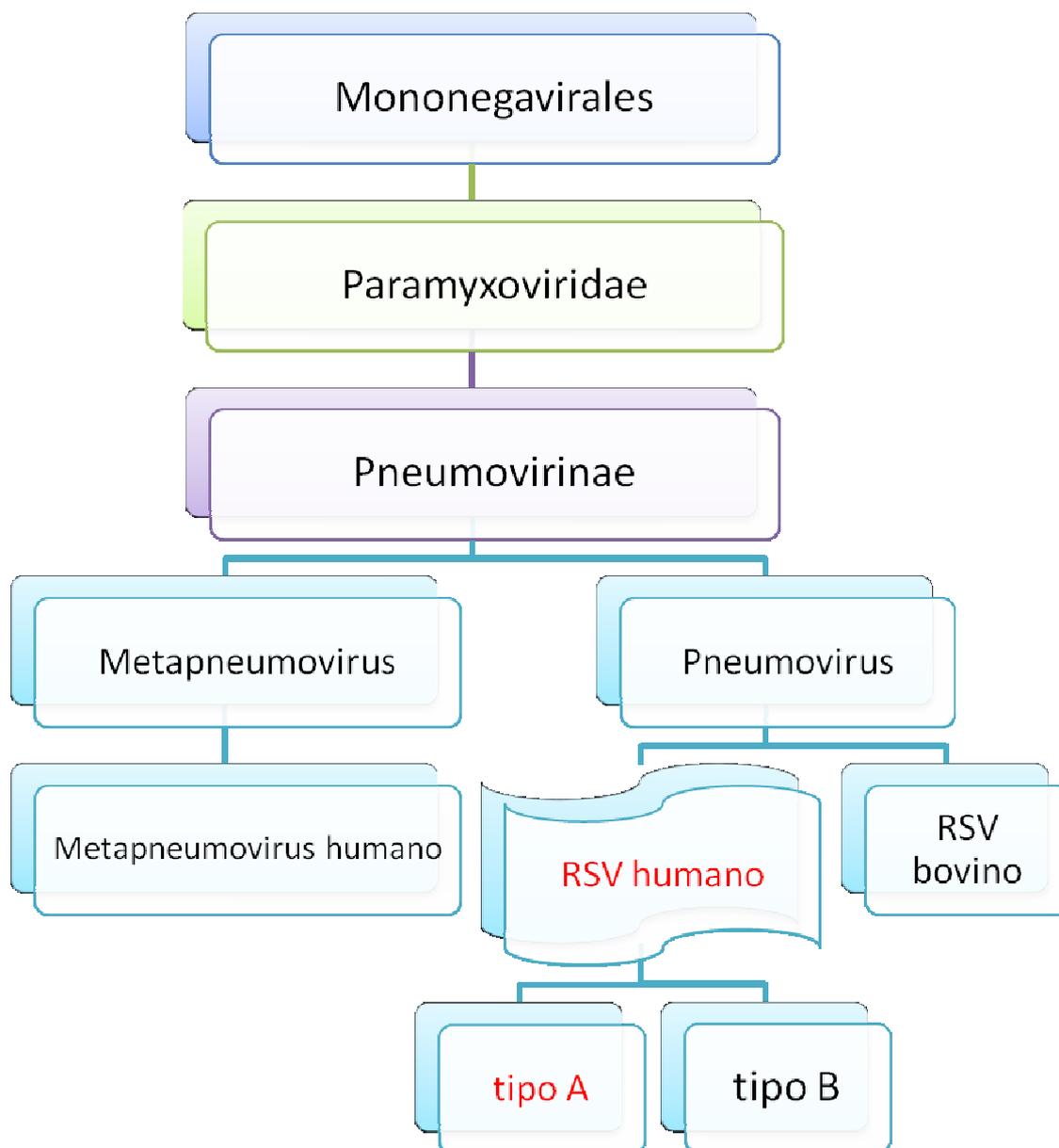
Resumo	
Abstract	
Lista de Ilustrações	
Lista de tabelas	
1. Introdução	27
2. Objetivo geral	41
2.1 Objetivos específicos	41
3. Material e Métodos	44
3.1 Escolhas do Antígeno	45
3.2 Imunização	45
3.3 Células Parceiras de fusão	51
3.4 Fusão	54
3.5 Caracterizações dos anticorpos	56
3.6 Clonagem	59
3.7 Produções de Líquido Ascítico (LA)	59
3.8 Determinações de Classe e subclasse de Imunoglobulinas	60
3.9 Comprovações da monoclonalidade	60
3.10 Caracterizações imunoquímica pelo Método de <i>Western Blotting</i>	60
3.11 Purificações dos Anticorpos Monoclonais	61
3.12 Dosagens de Proteínas	62
4. Resultados e Discussão	65
5. Conclusões	84
6. Perspectivas	84
7. Referências Bibliográficas	87

## 1.Introdução

Nos registros históricos, o primeiro marco referente às viroses que acometem o trato respiratório superior, foi em 1956 quando Morris e colaboradores (EUA) estudaram um grupo de chimpanzés com doença respiratória que apresentavam coriza, espirros, tosse, secreção nasal e mal estar. Os pesquisadores constataram que, aproximadamente, 100% dos animais apresentavam sintomatologia respiratória cuja secreção foi coletada e co-cultivada com células hepáticas, determinando a morte celular em sete dias. Em função de o agente estar presente na secreção, e do mesmo ser citopatogênico, foi denominado de Agente da Coriza dos Chipanzés (ACC ou *chimpanzee coriza agent* - CCA) (MORRIS et al., 1956). Estudos subseqüentes identificaram o mesmo causador em crianças com doença respiratória. Com base na citopatogenia em cultura de tecidos, e em especial pela formação de sincícios, Chanock e colegas sugeriram o termo “Respiratory Syncytial Virus” (RSV) (CHANOCK et al., 1957; HACKING & HULL, 2002).

No Brasil os primeiros estudos são de Candeias que isolou o RSV da secreção de crianças menores de seis meses. Em 1967 a confirmação veio por meio de testes de neutralização com soro padrão (CANDEIAS, 1967).

O RSV pertencente ao gênero *Pneumovirus*, sub-família *Pneumovirinae*, família *Paramyxoviridae* e ordem *Mononegavirales*. (FARHAT et al., 2002). A taxonomia do RSV humano e de outros vírus relacionados, como o bovino está representado na figura 1.



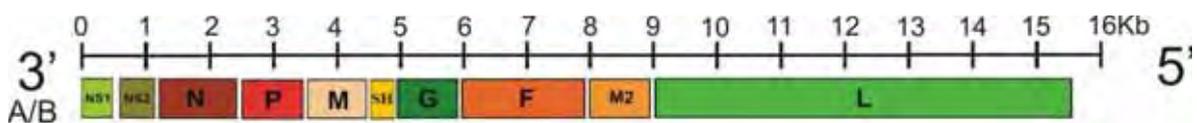
Fonte: Adaptado de Machado, 2007.

**Figura 1** – Taxonomia do RSV humano e de outros vírus relacionados

O virion do RSV possui dupla camada lipídica (15-20% dos constituintes da membrana) envolvendo o nucleocapsídeo de simetria helicoidal. Sua superfície apresenta prolongamentos formados por uma glicoproteína de fusão – proteína F, que recobre a superfície externa, tendo um comprimento de 11-20nm e uma distância entre elas de 6-10nm (MACHADO, 2007)

O genoma é composto por uma fita simples de RNA de 15.200 nucleotídeos, (HACKING & HULL, 2002). Este RNA (figura 2) codifica RNA mensageiros que traduzem:

- 4 proteínas do nucleocapsídeo: proteína (N) ou nucleoproteína, fosfoproteína (P), grande subunidade (L) de polimerase, e fator M2-1 de prolongamento de transcrição;
- 3 glicoproteínas transmembrânicas: proteína acessória (G), proteína de fusão (F), e uma pequena proteína hidrofóbica (SH). No entanto, apenas as duas primeiras – G e F – representam interesse para o reconhecimento imune. Apesar disto, o RSV não confere imunidade sendo a re-infecção um fato corriqueiro;
- 2 proteínas não-estruturais, NS1 e NS2 estão presentes de forma abundante nas células infectadas, mas em baixa quantidade no virion;
- Proteína matriz (M) e Fator M2-2 regulador de RNA que são proteínas estruturais da matriz.



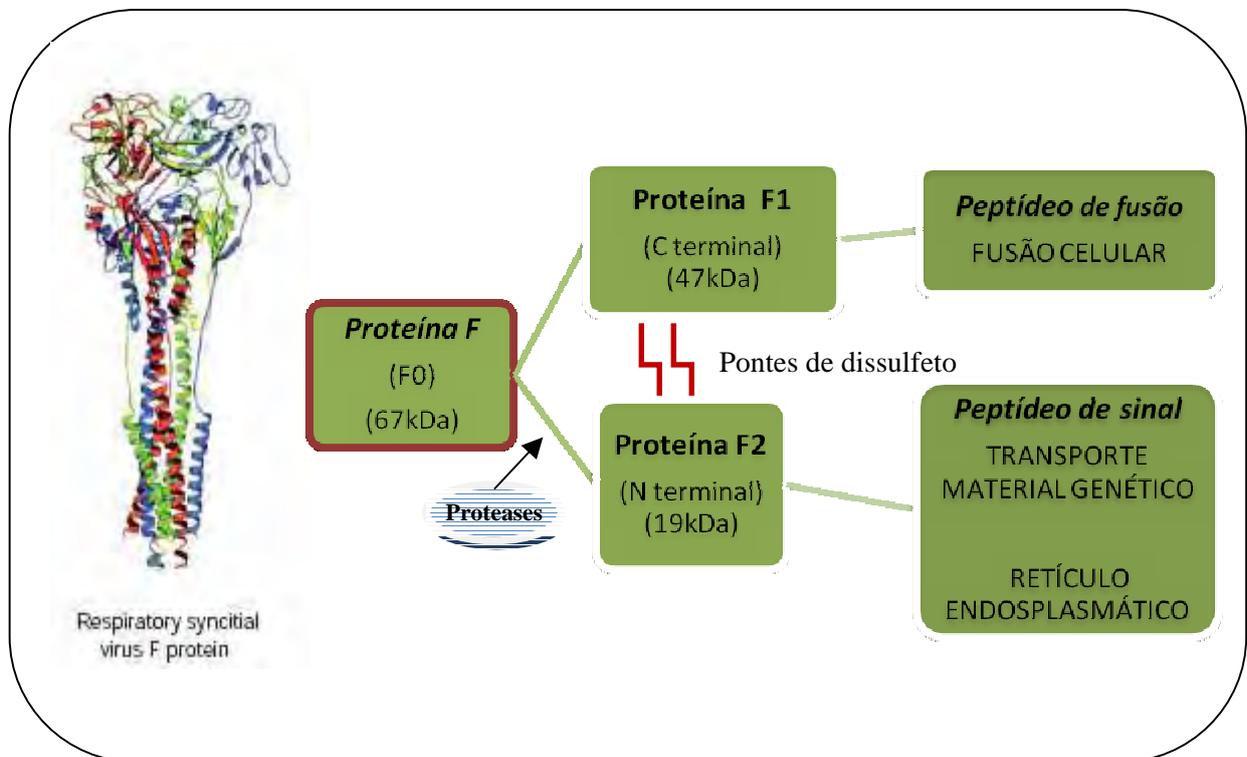
**Figura 2** – Estrutura genômica do RSV.

Durante a replicação do RSV, há ligação do vírus pela proteína de adsorção (G) à receptores específicos como heparina ou outro glicosaminoglicano presentes na superfície da membrana da célula hospedeira. Durante a fusão, o peptídeo de fusão subunidade da porção F (segmento hidrofóbico e rico em glicina) se insere na membrana celular durante o processo (ZHAO et al., 2000). Em seguida, o nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma celular onde ocorre a replicação viral (MACHADO, 2007).

O bloqueio da entrada do vírus é um mecanismo importante para terapias antivirais e por esta razão muitas pesquisas são direcionadas para a função das principais glicoproteínas de superfície F e G. O vírus sincicial respiratório tem uma absoluta necessidade da proteína F para infecção. Ele identifica a célula através de interações entre a membrana plasmática e proteína G. Este é um passo essencial para o ciclo de vida do vírus (OGRA, 2004).

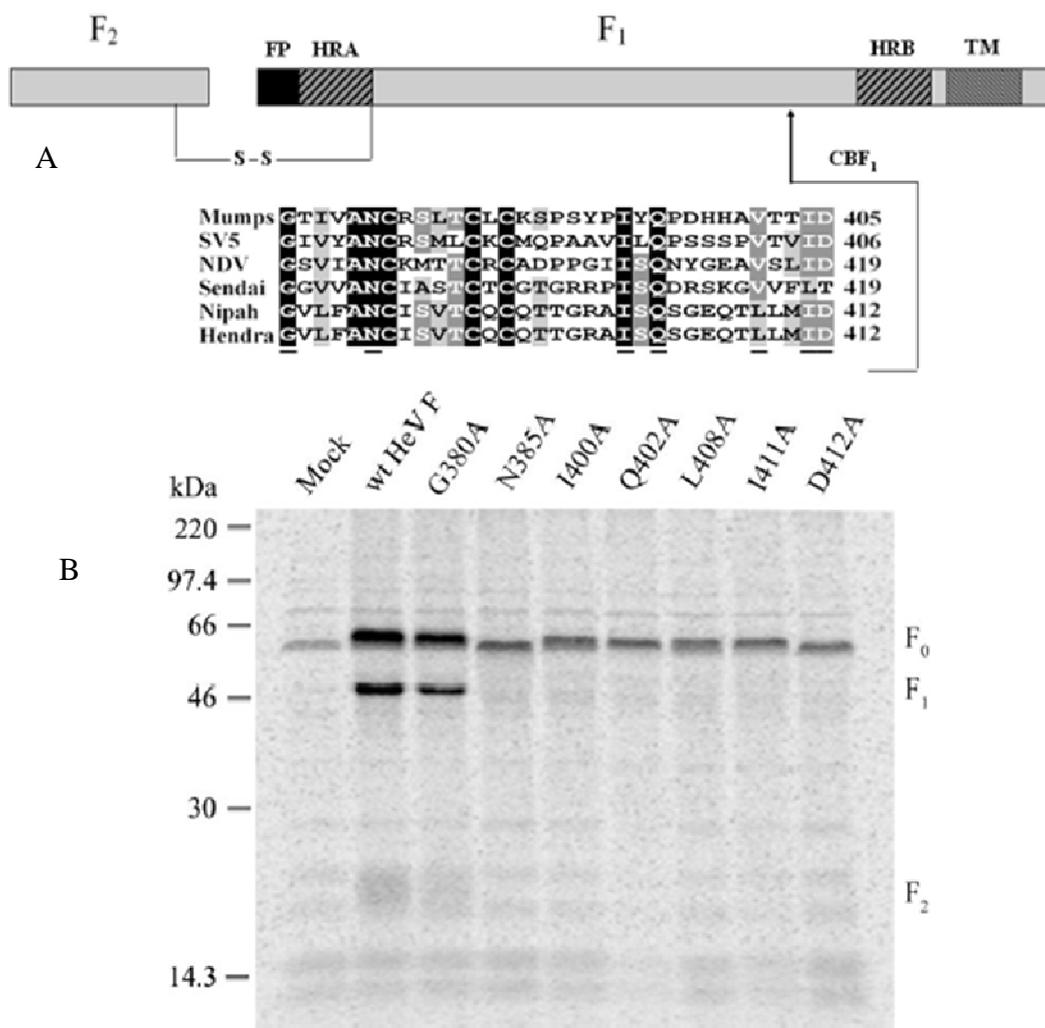
As glicoproteínas G e F são os maiores protetores do vírus e indutores de anticorpos RSV-neutralizantes que conferem resistência à infecção (WHITEHEAD et al., 1999; OGRA, 2004).

A proteína F demonstra ter papel fundamental na patogênese viral *in vitro* e *in vivo* sendo responsável pela fusão de células infectadas com células adjacentes que ainda não foram infectadas, induzindo a formação de sincícios (MACHADO, 2007). Esta é altamente conservada na família *Paramixoviridae* (figura 3) e é sintetizada por um precursor de 67 kDa (denominado F0) que por ação de proteases produz dois polipeptídeos: F1 com uma região C-terminal(50 kDa) e F2 (16kDa 20 kDa) com região N-terminal (figura4) (HACKING & HULL, 2002; GARDNER et al., 2007).



Fonte: (Respiratory syncitial vírus F protein) DIMITROV, 2004.

**Figura 3** – Representação tridimensional da Proteína F (à esquerda) e esquema simplificado do mecanismo de ativação da fusão celular do RSV.



Fonte: GARDNER, et al., 2007

**Figura 4** – Estudo da proteína de fusão em diferentes membros da família *Paramyxoviridae*. **A**. Proteína F e subunidade F1 e F2: FP (peptídeo de fusão), TM (domínio transmembrânico), HRA/B (heptad repeat A/B), CBF<sub>1</sub> (representa regiões de aminoácidos conservados na fração F1) **B**. Eletroforese em gel de poliácridamida destacando os pesos moleculares de F0, F1 e F2

Sequências de nucleotídeos têm revelado que a proteína de ligação G é a mais divergente entre os dois subgrupos (ZLATEVA et al., 2005). O ectodomínio G difere em nível de aminoácido próximo a 53% e tem 95% de diversidade antigênica baseada em reatividade de soro policlonal mono específico. No entanto, a proteína F madura diverge antígenicamente cerca de 9% na sequência de aminoácidos e de 50% entre os subgrupos (WHITEHEAD et al., 1999). Estudos com vacinas em humanos têm comprovado a evidência de que crianças soronegativas de 1 a 2 semanas de idade (população alvo da vacina) possuem resposta imune contra a proteína G maior do que

contra a proteína F e esta imunidade dependente da proteína G, provavelmente, ser influenciada por diferenças antigênicas entre os subgrupos (WHITEHEAD et al., 1999).

Dois grupos antigênicos, RSV-A e RSV-B, foram identificados com base em reações com anticorpos (ZLATEVA et al., 2005; OGRA, 2004). Há maior predominância de viroses pertencentes ao grupo antigênico do RSV-A em relação ao RSV-B. Este fato tem sido atribuído pela alta variabilidade da cepa A (ZLATEVA et al., 2005). Vários estudos têm demonstrado que o subgrupo A induz doença de maior gravidade do que o subgrupo B (DEVINCENZO, 2004).

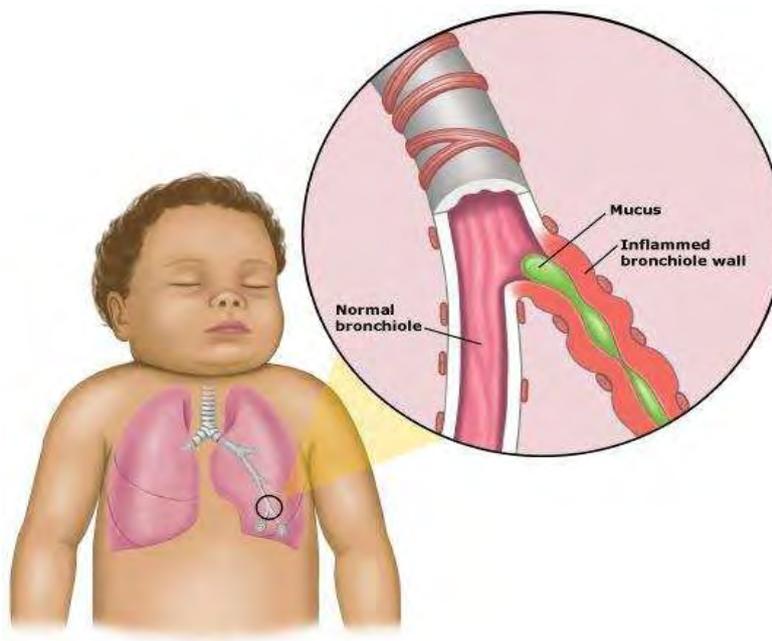
O RSV é um dos principais agentes envolvidos nas Infecções Respiratórias Agudas (IRAs) em lactantes, sendo responsável por 75% das bronquiolites e 40% das pneumonias. Reconhecido como o responsável pela maior relevância de IRAs, pode associá-lo a outras síndromes virais respiratórias, tais como traqueobronquite e pneumonia ([www.sbp.com.br](http://www.sbp.com.br)).

Moore e colaboradores enfatizam que quase todas as crianças com até 2 anos de idade foram infectadas com o vírus e pelo menos metade sofreram re-infecção (MOORE et al., 2006). Frequentemente causando bronquiolite e sendo um fator predisponente para pneumonias, em especial crianças menores de 6 anos de idade (CALEGARY et al., 2005; SIDWELL, 2006). O RSV é também uma significativa causa de infecções respiratórias em idosos e adultos consideradas de alto risco para imunocomprometidos (MOORE et al., 2006; SIDWELL, 2006).

A etiologia das IRAs, na maioria dos casos é viral, especialmente em países em desenvolvimento. Apesar de o RSV ser o agente etiológico mais frequente, outros vírus como parainfluenza, influenza, adenovírus, rinovírus, coronavírus, metapneumovírus humano e, agentes não virais como a *Bordetella pertussis*, a *Clamidia trachomatis*, o *Mycoplasma pneumoniae* e a *Moraxella catarrhalis* também são causadores dessas patologias (FISHER et al., 1991; LUISI et al., 2008).

Os mecanismos responsáveis pela lesão das vias aéreas são: o efeito citopático viral direto, que ocorre após a interação célula – vírus; e o efeito indireto, mediado por resposta imunológico. O efeito direto provoca edema da mucosa adventícia, aumento na produção do muco, infiltração mononuclear e necrose celular do epitélio, causando obstrução da via aérea (figura 5). Enquanto, o efeito indireto consiste na infiltração tecidual produzida pela migração de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos após a liberação de mediadores químicos procedentes das células epiteliais

lesadas. Estes mediadores alteram a permeabilidade endotelial, as interligações epiteliais e o transporte de íons, propiciando a inflamação com migração celular adicional e promovendo edema na maioria das vezes. O aumento das secreções e detritos predispõe a obstrução das vias aéreas, produzindo limitações no fluxo de ar, assim como atelectasias e desequilíbrio ventilação-perfusão consequente (LUISI et al., 2008).



Fonte: [www.uptodate.com/patients](http://www.uptodate.com/patients)

**Figura 5.** Infecções Respiratórias Agudas (IRAs) em lactante, detalhe em gravura da bronquiolite aguda.

O quadro clínico é caracterizado por tosse, febre, coriza, taquipnéia, aumento do esforço respiratório, dispnéia com retrações/tiragens intercostais e subcostais e batimento de asas de nariz. Ele é classicamente caracterizado como o primeiro episódio de broncoespasmo dos lactentes. A radiografia de tórax pode mostrar hiperinsuflação pulmonar, atelectasias e infiltrado peri-brônquico no entanto, em 10% dos casos pode ser normal, fato este que dificulta ainda mais o diagnóstico e posterior tomada de decisão. Na ausculta pulmonar predominam sibilos expiratórios e estertores crepitantes inspiratórios (LUISI, et al., 2008).

As IRAs têm sido consideradas como uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo mundo. Quatro milhões de infantes morrem a cada ano devido à

infecção que consiste hoje na maior causa de morte em crianças de países em desenvolvimento (RODRIGUES et al., 2004). Bebês prematuros, com doença pulmonar crônica da prematuridade, cardiopatias congênitas, doenças neuromusculares ou imunodeficiência representam a população de risco para infecção pelo RSV, segundo Academia Americana de Pediatria ([www.sbp.com.br](http://www.sbp.com.br), 2008).

Os dados nacionais dos últimos cinco anos enfatizam a presença de anticorpos anti-RSV em 36,4% das infecções do trato respiratório baixo em crianças com idade inferior a cinco anos. Estudos realizados entre os meses mais chuvosos do ano (março a julho) demonstraram incidência de até 53% de infecções respiratórias promovidas pelo RSV em especial em lactantes com até 12 meses de vida (CALEGARY et al., 2005; ELIA et al., 2005; TOMAZELLI et al., 2007).

A infecção pelo RSV é tipicamente sazonal, ocorrendo nos meses do outono e inverno, em países de clima temperado. Esta característica também foi observada no Brasil, nas cidades do Rio de Janeiro, São Paulo e Ribeirão Preto, onde o período epidêmico do RSV acontece no primeiro semestre do ano, com variações nos meses de pico, conforme a localidade (FARHAT et al., 2002). No estado do Rio Grande do Sul, uma revisão de cinco anos, um hospital pediátrico notificou que 80% dos casos clínicos ocorreram durante os meses de junho a agosto (FISCHER & MENDONÇA, 1991).

As duas principais formas de transmissão e infecção pelo vírus sincicial respiratório incluem contato direto com partículas de secreção e auto-inoculação pelas mãos (após contato com material contaminado). Pacientes hospitalizados, portadores de infecção por RSV, podem liberar o vírus por longos períodos (média 6,7 dias), com variações entre 1 a 21 dias (AMANTÉA & SILVA, 1998).

Quanto à resistência ambiental do RSV observam-se diferentes durabilidades do vírus em meios variados conforme mostra o quadro 1.

**Quadro 1** – Relação entre superfícies contaminadas (partículas virais) com a meia-vida do agente

<i>Local/Meio</i>	<i>Meia-vida</i>
Secreção nasal em superfícies e lenços	6 horas
Luvras de borracha Superfícies com látex e plásticas	90 minutos
Aventais	30 minutos
Mãos	25-30 minutos

Como já descrito, as IRAs podem ser causadas mais de 200 tipos de vírus, no entanto, o diagnóstico diferencial das viroses tem sido limitado prejudicando o cuidado com o paciente. O desenvolvimento tecnológico tem mudado a perspectiva e estimulado o desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos para viroses agudas, com particular ênfase para o vírus sincicial respiratório (MATTHEY et al., 1992).

O padrão ouro para o diagnóstico definitivo do RSV é o cultivo celular. Dentre as células permissivas ao RSV as mais comumente empregadas são:

- Células epiteliais humanas (Hep2), derivadas do carcinoma laríngeo humano;
- HeLa, células de carcinoma cervical humano;
- MDCK, extraídas de rim de cão;
- RhMk, linhagem celular de rim de Macaco *Rhesus*;
- Fibroblasto humano.

A manutenção de linhagem celular visando o diagnóstico de enfermidades virais requer pessoal treinado, coordenado por virologista, significativa experiência e dedicação em tempo integral. As principais limitações do processo são contaminação bacteriana ou fúngica, e resultados que podem necessitar de até três semanas para conclusão (NUNES, 2004). Atualmente, o padrão para detecção viral está se alterando progressivamente. A biologia molecular, com potencial para se tornar o novo padrão de identificação viral, tornou-se uma ferramenta acessória para diagnóstico, já que fica

restringida por necessidade de equipamentos específicos e recursos humanos altamente especializados tornado-se de alto custo.

Pelas dificuldades apresentadas acima, ensaios imunoenzimáticos e por imunocromatografia (IC) em células de aspirado nasofaríngeo ou lavado brônquico são mais empregados, pois apresentam facilidade de manipulação e necessidade de equipamentos muitas vezes já disponíveis nos centros de diagnósticos.

Por outro lado, testes de imunofluorescência têm se mostrado altamente sensíveis para detecção do RSV, porém estas técnicas, apesar de empregadas rotineiramente para diagnósticos de doenças infecciosas, apresentam prós e contras: (1) necessidade de microscópio de imunofluorescência; (2) técnico altamente treinado; e (3) tempo de no mínimo 1 hora para conclusão do teste (KUROIWA et al., 2004). Além disso, o resultado está diretamente relacionado com a correta coleta de secreções, que em função da grande quantidade de muco, podem não conter número suficiente de células gerando maior inespecificidade no momento da leitura.

O ensaio imunocromatográfico, baseado em membrana, apresenta vantagens quando comparado com o anticorpo fluorescente marcado incluindo um menor tempo de execução e baixo nível de complexidade (BOREK et al., 2006).

Já foi demonstrado que misturas de anticorpos monoclonais têm alta sensibilidade e especificidade para identificar antígenos virais em amostras clínicas, comparável a qualquer método de referência. Pode-se esperar uma perda mínima de sensibilidade quando são comparados com anticorpos policlonais de alta qualidade, mas os monoclonais permitem uma leitura mais simples e de qualidade muito superior (Organização Mundial de Saúde - OMS, 1992). Infelizmente, os anticorpos disponíveis são comercializados a alto custo, restringindo sua administração irrestrita na rede pública de saúde brasileira.

Apesar da importância clínica das IRAs virais, a maioria dos serviços de saúde não apresenta disponibilidade para diagnóstico em cultura de células e métodos sorológicos. Poucos dispõem das novas técnicas diagnósticas por imunofluorescência direta e indireta, imunoensaio enzimáticos e reação em cadeia de polimerase (PCR) (RODRIGUES et al., 2004).

Alguns anticorpos já disponíveis no mercado são empregados na profilaxia e tratamento das complicações promovidas pelo RSV como o RespiGam®, o Palivizumabe® e o Numax®.

A imunoglobulina polivalente disponível, RSV-IGIV (RespiGam®), é um anticorpo policlonal obtido a partir do soro de seres humanos adultos, ou seja, trata-se da apresentação de uma gamaglobulina hiperimune anti-RSV. Há relatos da redução no tempo de hospitalização e no emprego de oxigênio, no entanto, quando técnicas de inativação viral como solução solvente-detergente ou nanofiltração não são empregadas o produto, que é um derivado do sangue, pode apresentar potencial para transmitir agentes patogênicos. Trata-se, portanto, de um hemoderivado com efeitos colaterais relacionados a este tipo de medicamento. Outro inconveniente é o volume requerido para administração e sua viscosidade podendo promover sobrecarga de fluidos (SIDWELL, 2006).

O Palivizumabe® (Pvz) (Synagis; MédImune, Gaithersburg, MD) é um anticorpo monoclonal humanizado (IgG1) direcionado contra a proteína F do vírus sincicial respiratório que foi aprovado para prevenção de infecção pelo vírus em crianças que apresentam alto risco (MEJÍAS et al., 2005). É empregado com sucesso no mundo inteiro com relatos de proteção de 78% em média, porém, lactentes com doença pulmonar crônica da prematuridade ou cardíaca congênita tiveram taxa de proteção significativamente menor (SIDWELL, 2006).

O MEDI-524 (Numax®) é um novo anticorpo monoclonal IgG1 humanizado recombinante, com maior poder de neutralização anti-RSV. A atividade específica do MEDI-524 está direcionada para o epítopo altamente conservado da glicoproteína F (MEJÍAS et al., 2005).

Como a opção terapêutica para o tratamento antiviral vem se tornando mais freqüente, há renovado interesse em diagnóstico precoce. Melhores técnicas de diagnóstico virológico e um maior interesse na detecção do Vírus Sincicial Respiratório resultam em maior atenção a este agente e à pesquisa do seu papel como causador de IRAs em pacientes com câncer ou transplantados (CINTRA & ARRUDA, 1999).

Diante do exposto, ocorre grande esforço que conta com associação de vários projetos para desenvolver a tecnologia nacional em relação ao RSV. Este projeto em particular vem propor a obtenção de anticorpos anti-RSV visando a disponibilização a baixo custo desta metodologia para diagnóstico.

Para a produção de anticorpos monoclonais anti-RSV, a proteína viral de eleição tem sido a proteína de fusão. No entanto, para obtê-la, a infra-estrutura laboratorial requer laboratórios de nível biológico controlado (NB3) com equipes de

microbiologistas e virologistas associados aos pesquisadores da área da biologia molecular (ARCURI, et al., 2008).

Tendo em vista o rigor para a manipulação de cultura do RSV, este projeto integrou parceria dentro do Projeto Genoma Vírus financiado pela Fapesp, onde laboratórios de virologia da USP de São Paulo e da UNESP de São José do Rio Preto, em primeira instância, se responsabilizaram da produção da proteína F recombinante ( $F_r$ ) do RSV. Com a produção e caracterização desta por outras equipes, o material foi enviado para o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu para a produção e caracterização de anticorpos monoclonais murinos anti-proteína  $F_r$  do RSV.

Há que se ressaltar que o protocolo estabelecido foi entremado de inúmeras complicações, ora relacionado com a proteína F recombinante e, ora com sua caracterização e dificuldades encontradas no Laboratório de Engenharia Celular. Todas estas dificuldades foram educativas, pois resolvê-las exigiu o desenvolvimento de muitas habilidades e aprofundamento de muitas questões que não teriam ocorrido, caso o antígeno fosse uma proteína comum, e se os procedimentos de bancada fossem sempre isentos de intercorrência.

## **2. Objetivo Geral**

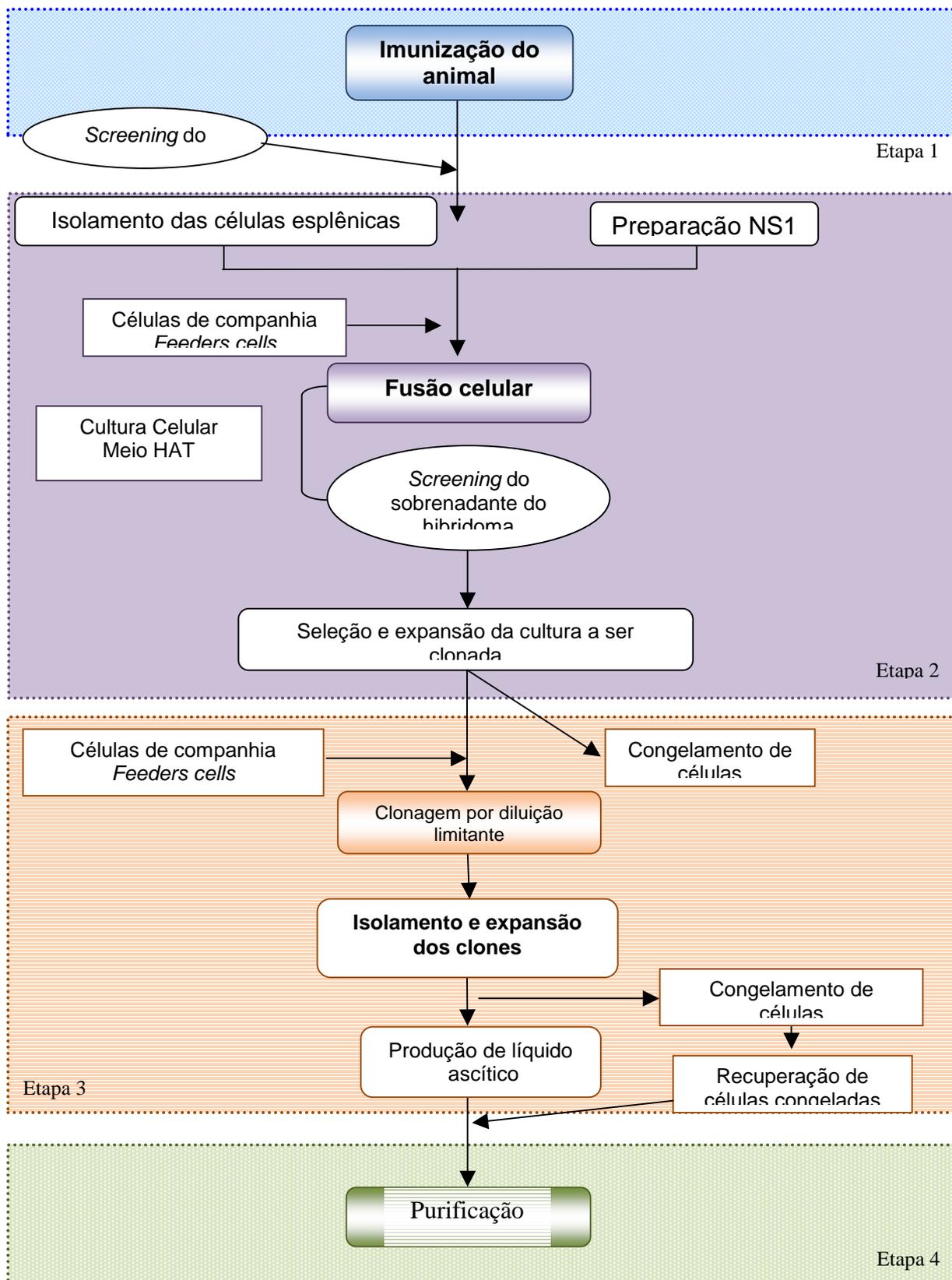
Produção de anticorpos monoclonais murinos (AcMm) dirigidos contra proteína F recombinante, do Vírus Sincicial Respiratório humano para diagnóstico rápido.

### **2.1. Objetivos Específicos**

- Obtenção de anticorpos monoclonais murinos anti-RSV utilizando a proteína F recombinante como agente imunogênico;
- Caracterização dos Clones secretores anti-RSV por métodos imunoquímicos;
- Purificação de anticorpos expandidos pelo método de ascite, por cromatografia de afinidade;

### 3. Material e Métodos

Para a facilitação metodológica, este trabalho envolveu 4 etapas identificadas no fluxograma abaixo, com exceção das etapas de descontaminação celular/laboratorial.



Para a obtenção dos AcMm dirigidos contra a proteína F<sub>r</sub> do RSV humano, utilizamos a técnica descrita por Köhler e Milstein em 1975 (KÖHLER & MILSTEIN, 1975) e modificada por Deffune 1992 (DEFFUNE, 1992). Seguimos as diferentes etapas esquematizadas no fluxograma 1.

### 3.1 Escolha do Antígeno

A proteína F<sub>r</sub> do Vírus Sincicial Respiratório humano empregada neste estudo foi proveniente do projeto de pós-doutorado da Prof. Dra. Fátima Pereira de Souza (processo:150358/2003-2) em colaboração com a Prof. Paula Rahal do Laboratório de Estudos Genômicos da UNESP de São José do Rio Preto, Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey do Departamento de Física - UNESP de São José do Rio Preto, Prof. Dr. Luciano Henrique Apponi e Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Prof. Dr. Edison Luiz Durigon e Prof. Dr. Armando Ventura - Instituto de Ciências Biomédicas – USP. Esta foi expressa em cepas de *E. coli* da linhagem BL21A usando o vetor pET28a a 37<sup>0</sup> C. No serviço de origem a proteína foi purificada da fração solúvel usando resina de afinidade e caracterizada por SDS-PAGE e *western blotting* (ARCURI, et al., 2008).

Recebemos alíquota devidamente estocada em tubo tipo eppendorf®, com 0,3mg da proteína recombinante.

### 3.2 Imunização

Os animais utilizados para a produção de Anticorpos Monoclonais foram camundongos da linhagem isogênica BALB/c provenientes do biotério do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Inicialmente o protocolo de imunização envolveu 10 animais. Todos receberam a dose de 50µg por via intra-peritoneal e ocorreu o óbito antes da dose de reforço (*booster*) e fusões celulares em caráter de emergência foram procedidas (figura 6).



**Figura 6** – Aspecto da Imunização: A= injeção intraperitoneal; B= vista superior da gaiola e C condicionamento das gaiolas em ambiente controlado.

Estes resultados imponderáveis determinaram etapa suplementar:

- Determinação da linfotoxicidade da proteína  $F_r$  frente a linfócitos humanos e murinos;
- Hipótese de contaminação por endotoxinas durante o processo de purificação da proteína  $F_r$  a partir de linhagens de *E. coli* BL21 A.

Após o estabelecimento da linfotoxicidade descrita a seguir, novos protocolos de imunização foram reiniciados. Estes novos protocolos levaram em consideração as duas ponderações levantadas: toxicidade da proteína  $F_r$  e a eventual contaminação por endotoxinas oriundas do processo de expressão na cepa super resistente de *E. coli*, BL21 A.

Os novos protocolos de imunização receberam a denominação: VITRI, para animais que receberam o antígeno após re-purificação pelo método Triton-X-114 e VIRSV para aqueles animais que continuariam recebendo a proteína  $F_r$  em dose ajustada, porém sem passagem pelo Triton X-114. Em cada um dos protocolos de imunização foram utilizados 5 animais, vide quadro 2. O adjuvante de imunização utilizado foi Oligodeoxinucleotídeo (ODN) que aumenta a capacidade do antígeno em induzir resposta imune (HANCOCK et al., 2001).

Após período de imunização, cada camundongo recebeu um *booster* final por via intravenosa sem adjuvante três dias antes da data prevista para a fusão .

**Quadro 2:** Protocolos de Imunização em camundongos BALB/c com proteína F<sub>r</sub> do vírus sincicial respiratório.

Protocolos	Antígeno	Dose/animal	Via adm/tempo	Nº imunizações	Nº animais
•VITRI	•Proteína F <sub>r</sub> /Triton X-114	•20µg	•IP/15dias	•3	•5
•VIRSV	•Proteína F <sub>r</sub>	•10µg	•IP/15 dias	•3	•5

### 3.2.1 Determinação da Linfotoxicidade da proteína F<sub>r</sub>

Os testes de linfocitotoxicidade dependentes de complemento ou não são utilizados em imunologia há quase uma década com especial atenção nos laboratórios de histocompatibilidade. Para a realização da prova laboratorial se faz necessária a separação da camada mononuclear. O método empregado nesta etapa do projeto foi o de separação celular por diferença de gradiente de densidade segundo ZAGO & COVAS, 2006. Foram utilizados linfócitos de roedores (*Rattus norvegicus*) e humanos.

Para o ensaio com células humanas foi utilizado 20 mL de sangue periférico de doadores voluntários coletados em presença do anticoagulante EDTA. O sangue de roedor foi obtido por punção cardíaca de cinco ratos, provenientes do Biotério-Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Após a contagem celular em equipamento semi-automático Horiba ABX® e câmara de Neubauer, iniciou-se a determinação da linfotoxicidade da proteína F<sub>r</sub> incubando  $1 \times 10^5$  células LMN/mL (humanas e de roedor) nas concentrações 0,25µg/mL e 0,125µg/mL da proteína recombinante. As células mononucleadas foram incubadas por 24 horas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) na presença das concentrações de proteína F<sub>r</sub> mencionadas. Foi determinando a viabilidade celular com azul de tripano nos tempos de 0, 1, 3, 6, 12, 24 horas.

### 3.2.2 Contaminação por endotoxinas de *E. coli*

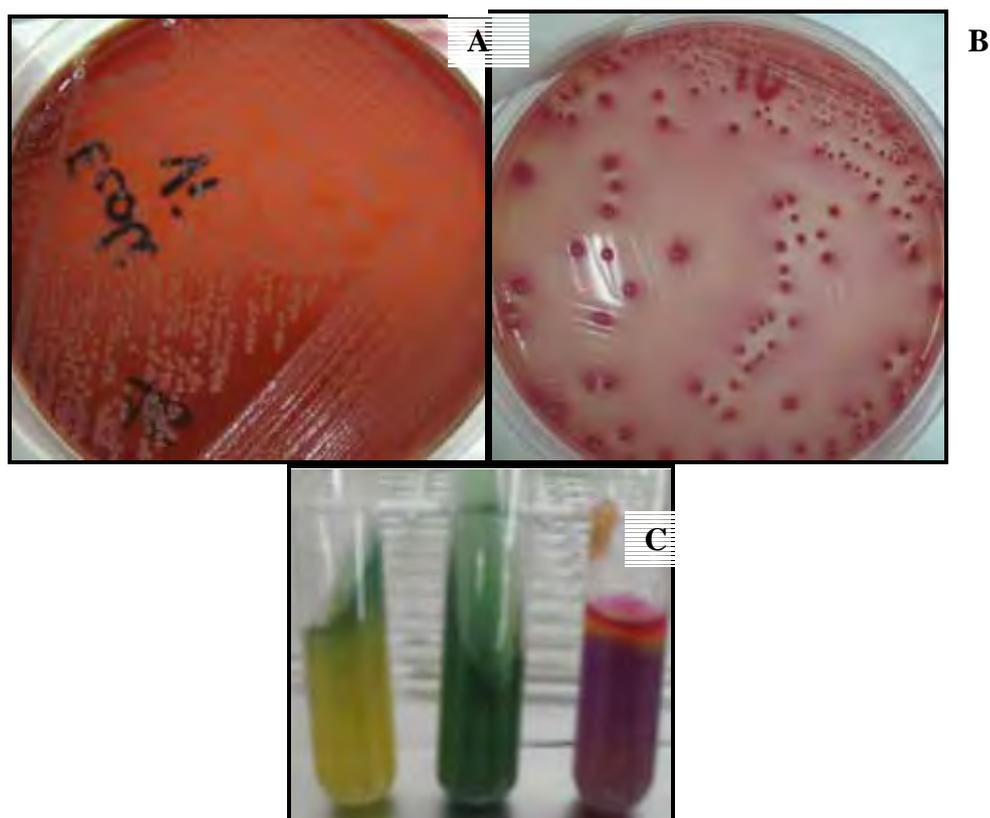
Durante os primeiros protocolos de imunização de camundongos Balb-c, mesmo após determinação da concentração protéica ideal pelo teste de linfocitotoxicidade, ainda se observou morte nos animais. Realizaram-se exames

macroscópicos dos órgãos internos e encéfalo. Como a proteína foi obtida por expressão gênica em plasmídeos de *E. coli* houve a hipótese de contaminação por endotoxinas.

A contaminação de proteínas recombinantes por endotoxinas tem sido apontada na literatura como um dos grandes problemas da metodologia. As endotoxinas são lipopolissacarídeos responsáveis pela organização e estabilização da membrana das bactérias. Estas proteínas são expostas e liberadas no momento do preparo da proteína recombinante, onde integrantes da membrana das bactérias Gram negativas se tornam constituintes do produto final. Esta contaminação nem sempre é fácil de ser controlada. As endotoxinas são sabidamente resistentes às alterações de temperatura e pH. Estas características tornam a eluição da proteína recombinante pura, uma etapa extremamente difícil. Várias metodologias de eliminação de endotoxinas estão listadas pela literatura internacional. Entre estas metodologias está o uso do Triton X-114, que tem a capacidade de remover endotoxinas. Esta técnica requer inúmeras passagens que determinam a perda em média de 20% da proteína.

Frente ao fato de que não foi possível obter linhagem da mesma cepa super-resistente utilizada pela equipe de ARCURI et al., 2008, esforços foram realizados no sentido de se obter cepa semelhante. Amostra de cultura de cepa de alta virulência de *E.coli* foi gentilmente cedida do projeto de mestrado da pesquisadora Amanda Keller Siqueira, Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista - Botucatu (FMVZ-UNESP-BTU) permitindo ensaios suplementares.

A alíquota de *E. coli* recebida foi semeada em ágar sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar Mac Conkey. As placas foram mantida em condição de aerobiose a 37°C, por 24 horas (figura BB). O agente foi submetido a testes bioquímicos MILI (motilidade, lisina, indol), EPM (glicose, gás, LTD, H<sub>2</sub>S, uréase) e citrato (SIQUEIRA, 2005) como controle de estoque e caracterização do agente (figura 7), Procedimento realizado no Serviço de Diagnóstico Microbiológico de Doenças Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, segundo Siqueira, 2006.



**Figura 7** – Características macroscópicas do cultivo da enterobactéria *E. coli*. A e B representam o cultivo em Ágar Sangue bovino e Mac Conkey, respectivamente; C: aspecto bioquímico

Aproximadamente vinte colônias da amostra bacteriana foram diluídas em 20 mL de água milli Q® estéril. O volume produzido foi distribuído em quatro alíquotas e procedemos às propostas para obtenção de subprodutos do metabolismo celular (quadro 3).

**Quadro 3**– Protocolos realizados para obtenção de endotoxinas de amostra de *E. Coli*

<i>E. coli</i> / protocolo	Processamento	Material Recuperado
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morte TA (48 h)</li> <li>• Macerado</li> <li>• Autoclavação</li> <li>• Fervura</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Pellet</i>/Sobrenadante</li> <li>• <i>Pellet</i>/Sobrenadante</li> <li>• Sobrenadante</li> <li>• Sobrenadante</li> </ul>

### 3.2.2.1 Amostra submetida à fervura

Procedemos a extração de material molecular segundo Blanco et al., 1997. Após repasse em meio de cultura, a 37°C, por 24 horas, raspado de quatro colônias foram suspensos em 1000µl de água Milli Q. ® estéril Esta amostra foi fervida por 10 minutos e centrifugadas a 9676,8g. O sobrenadante produzido foi nomeado sobrenadante fervido.

### 3.2.2.2 Amostra submetida à autoclavação

Procedemos como descrito no tópico acima, porém a amostra foi autoclavada a 121°C por 15 minutos. Os materiais foram identificados como sobrenadante e *pellet* autoclavados.

### 3.2.2.3 Amostra macerada

A suspensão bacteriana foi prensada repetitivas vezes, movimentos de triturar, com auxílio de pistão em frasco de fundo côncavo (10 mL). Amostras foram avaliadas por microscopia a cada 10 minutos, objetivando a presença de material disperso, com pequena quantidade de bactérias vivas. O material produzido foi centrifugado como descrito anteriormente. As amostras foram nomeadas sobrenadantes e *pellet* macerados.

### 3.2.2.4 Amostra submetida à morte em temperatura ambiente(TA)

Alíquota bacteriana foi incubada a temperatura ambiente, por 48 horas sem suplementação para manutenção da vida. Procedemos como mencionado acima. Estas alíquotas foram tanto de sobrenadante como de *pellet* com morte em TA.

Os materiais recuperados, após confirmação da morte bacteriana, foram avaliados em SDS-PAGE nas mesmas condições citadas para a proteína F<sub>1</sub>.

### 3.2.3 Descontaminação de endotoxinas: Método Triton X-114

Padronizou-se o protocolo de descontaminação com uso do Triton X-114, para remoção de endotoxinas, adaptado por AIDA & PABST, 1990.

Preparou-se uma solução de Triton X-114 (Sigma®) a 10% (em água aprotogênica), em seguida a solução foi incubada a 4°C em geladeira para completa dissolução do produto. Na seqüência, misturou-se uma alíquota da solução contendo proteína F<sub>r</sub> com o Triton X-114 (diluído) e incubou-se por 30 minutos em banho de gelo, agitando em vórtex a cada 5 minutos. Após, aqueceu-se a amostra a 37°C por 5 minutos. A solução foi centrifugada a 13000g em temperatura ambiente, permitindo a visualização de duas faces distintas na solução. A fase detergente no fundo do tubo e fase aquosa (sobrenadante) de onde a proteína de interesse foi recuperada.

Realizamos este procedimento por mais 4 vezes, sendo que em cada etapa pequena alíquota foi estocada para os testes.

### 3.3 Células Parceiras de fusão

As células utilizadas como parceiras de fusão foram mieloma múltiplo murino da linhagem NS/1, obtidos segundo Köhler e Milstein (1976), provenientes *do Laboratoire de Genie D`Institute National de Transfusion Sangüine* (INTS) de Paris, integrante da *Agence Française du Sang*, mantidas em nitrogênio líquido (DEFFUNE, 1996).

Procedeu-se o descongelamento segundo Deffune, 1992. Logo após as células foram colocadas em cultura em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SBF) até apresentarem viabilidade celular igual ou superior a 90% (KEESLER & SACHSE, 1990).

Durante o descongelamento e avaliação do mieloma múltiplo, foram identificados aspectos morfológicos incompatíveis com células saudáveis: alteração na curva de crescimento, aumento da apoptose, grumos celulares, entre outros aspectos. A identificação destas alterações determinou a inclusão de mais uma etapa metodológica não prevista, em função da hipótese levantada de contaminação por *Mycoplasma*. Trata-se do mais sério e temido problema para laboratórios de cultivo celular.

As etapas incorporadas foram:

- Confirmação da hipótese de *Mycoplasma spp* por biologia molecular- PCR

- Eliminação do Micoplasma da cultura (mieloma) por dois métodos:
  - Uso de antibiótico (ciprofloxacina 2mL/L de meio de cultura) – tratamento *in vitro*;
  - Passagem *in vivo* (camundongos isogênicos).
- Descontaminação física do ambiente – Ácido peracético a 2%

### 3.3.1 Identificação da infecção por Micoplasma

Transpostas as dificuldades de concentração e toxicidade da proteína F, iniciou-se novos protocolos de imunização. Nesta etapa, 10 animais foram injetados, porém após a fusão celular os híbridos construídos (n = 6912) mostravam-se instáveis com uma alta taxa de mortalidade em 48 horas após o procedimento de fusão, destes protocolos todas as células foram descartadas. Tendo sido levantado a hipótese de contaminação da linhagem de NS1 por micoplasma, procedeu-se a confirmação diagnóstica pela técnica de PCR realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular- Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu- UNESP.

Os materiais analisados provenientes do Laboratório de Engenharia Celular estão descrito no quadro 4.

**Quadro 4** – Materiais submetidos à pesquisa de Micoplasma

<i>Linhagem celular/Insumo</i>	<i>Amostras</i>
Mieloma Murino	NS1
Clone Produtor de Mab	TAN1-33 A 45
Clone Produtor de Mab	TAN1-77 A 3
Meio de cultura	MEIO CULTURA
Soro Fetal Bovino	SFB

Alíquotas de 2 mL foram coletadas em fluxo laminar, assepticamente, armazenadas em ampolas de congelamento e transportadas refrigeradas para o

Departamento de Microbiologia e Imunologia. As amostras foram processadas e analisadas empregando a técnica de PCR, segundo Nogueira, 2004.

As células de mieloma murino e clones estavam armazenadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>, durante 21 dias, observadas diariamente e supridas com meio de cultura sem antibiótico para sua manutenção, segundo DEFFUNE, 1996. O meio de cultura, depois de reconstituído ou manipulado, foi estocado em geladeira (4°C) juntamente com o soro fetal bovino (descomplementado a 56°C, por 45 minutos). Nenhuma das linhagens celulares foi deliberadamente infectada com micoplasma representando, portanto, culturas contaminadas acidentalmente.

### **3.3.2 Descontaminação da infecção por Micoplasma**

#### **3.3.2.1 Tratamento *in vitro***

A partir da terceira semana de cultivo as células receberam meio de cultura acrescido com ciprofloxacina (2mg/L) por mais 40 dias, nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao término deste período novas amostras celulares foram testadas para a presença de *Mycoplasma sp.*

#### **3.3.2.2 Tratamento *in vivo***

Após 21 dias de cultivo nas mesmas condições já mencionadas as células foram inoculadas em camundongos Balb/c, com peritônio irritado como descrito na etapa de produção de líquido ascítico (ver abaixo). Os animais foram acompanhados por 15 dias consecutivos. Em seguida coletamos o líquido ascítico, expandimos as células resgatadas por 21 sem adição de antibiótico ao meio de cultura. Ao final, novas alíquotas foram enviadas para novos testes com 30, 60 e 90 dias.

#### **3.3.2.3 Descontaminação ambiental**

Foi distribuído por todas as superfícies laváveis, ácido peracético a 2%, duas vezes ao dia durante sete dias, seguido de vazio sanitário de 2 meses. Imediatamente antes de reiniciarmos as atividades no Laboratório de Engenharia Celular repetimos o processo de desinfecção pré-uso.

### 3.4 Fusão

Para todas as etapas subseqüentes que envolveram a cultura celular, realizamos as observações microscópicas foram ao microscópio invertido Zeiss® Axiovert 200 (figura 8).



**Figura 8** – Detalhe do Microscópio Zeiss Axiovert 200/ Micromanipulador Eppendorf®

Após controle de imunização pelo método ELISA, os camundongos Balb/c foram anestesiados com pentobarbital sódico - 35mg/Kg (via peritoneal) e transferidos para ambiente de fluxo laminar. Prodeceu-se então a esplenectomia (figura 9), em seguida administramos dose suplementar do anestésico induzindo a morte do animal. Este procedimento é necessário para a recuperação da maior quantidade possível de linfócitos para serem fusionados. As células esplênicas obtidas foram utilizadas como fonte de células para fusão com mieloma murino.

Em processo semelhante, ocorreu a timectomia (obtenção de células de companhia) dos animais. Os animais timectomizados, que se apresentavam em boas condições clínicas após a reanimação anestésica, foram mantidos vivos e empregados na produção de líquido ascítico ou em outros experimentos.



**Figura 9** – Esplenectomia de camundongo imunizado. A: animal anestesiado, B: incisão e visualização do baço, C: remoção esplênica, D: baço

Uma vez o baço removido, o mesmo foi perfurado com auxílio de agulha de insulina e pequenas quantidades de meio de cultura (MC) RPMI 1640 foram injetadas para a liberação suave das células para o MC. As células esplênicas obtidas dos animais foram fusionadas com os mielomas, previamente expandidos. A fusão foi realizada por co-centrifugação dos esplenócitos recém coletados juntamente com células de mieloma murino na proporção de 10:1, respectivamente, em meio acrescido de polietilenoglicol (PEG – peso molecular 4000/Merck®) a 30%, que proporcionou a fusão de membranas celulares.

### 3.4.1 Seleção enzimática dos híbridos

As células obtidas na fusão celular foram distribuídas em placas de cultura, 96 poços e cultivadas por quinze dias em meio seletivo HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina/Gibco®) previamente preparadas com monocamada de células de companhia (timócitos murinos).

Os timócitos suplementam o meio de cultura com fatores de crescimento que auxiliam o desenvolvimento dos hibridomas. O meio seletivo HAT propicia a

proliferação das novas células recém criadas e a eliminação das não fusionadas bem como dos plasmócitos.

### 3.5 Caracterizações dos anticorpos

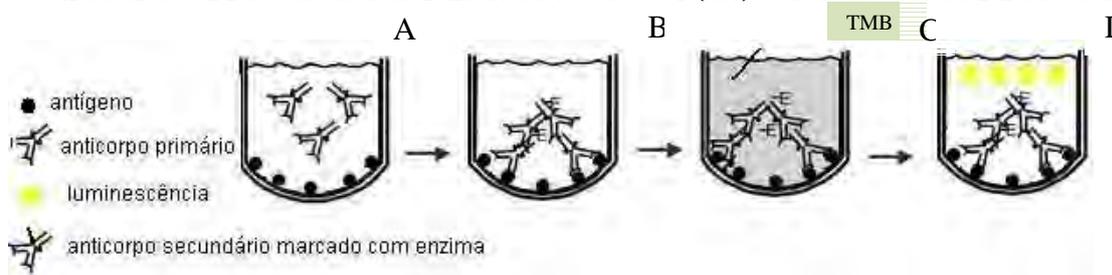
Esta etapa compreendeu a observação cuidadosa por microscopia invertida, dia a dia, de cada unidade das placas de 96 poços que receberam os híbridos construídos. Esta observação foi realizada em objetiva de 10 e 40X. Quando as células atingiram confluência maior ou igual a 80% de células não agrupadas, ou superiores a 60%, nos poços com agrupamentos (figura 10), os sobrenadantes de cultura foram coletados para análise (*screening*). O agrupamento celular poder conter até 4-5 camadas superpostas e quando homogeneizadas ocorrem desprendimentos com visualização de confluência plana 100%.



**Figura 10** – Aspecto da população de híbridos com mais de 80% de confluência, na fase de seleção dos poços de cultura para coleta de sobrenadante a ser testado. *Objetiva de 10x e ph2.*

#### 3.5.1 *Screening* dos sobrenadantes de cultura pelo método de ELISA indireto

Este método (figura 11) avaliou qualitativa e quantitativamente a positividade do anticorpo monoclonal murino.



**Figura 11** – ELISA indireto A: poço sensibilizado com proteína F e sobrenadante de cultura; B: adição do anticorpo secundário conjugado com enzima peroxidase; C: adição do substrato – TMB; D: reação positiva evidenciada por luminescência ao espectrofotômetro

### 3.5.2 Screening pelo método ELISA indireto com Proteína F<sub>r</sub> na fase sólida

Utilizamos placas comerciais de ELISA para detecção de anticorpos anti-proteína F<sub>r</sub> no sobrenadante de cultura (SNC), vide figura 11 acima. As placas de ELISA foram sensibilizadas com a proteína F<sub>r</sub> na concentração 40µg/mL.

- Controles:
  - Controle positivo: não foi possível identificar no mercado um anticorpo comercial.
  - Controle negativo: 100µL de meio de cultura estéril
- Anticorpo secundário: Anti-mouse conjugado com peroxidase (1: 8000)
- Solução cromógena: TMB (Diidrocloreto de tetrametilbenzidina) - Abbot Center

O padrão de positividade (critério de retenção de células) nas técnicas de produção de anticorpos monoclonais que não disponham de reagente-padrão no mercado é aquele estabelecido no *Monoclonal Antibodies Workshop-Lund, 1992*:

Densidade óptica (DO) do híbrido a ser retido > Ex DO CUTLE

Respeitando este critério, as células identificadas como positivas foram expandidas em cultura das placas de 96 poços para aquelas de 24 para obtenção de SNC suficiente para os demais experimentos e, quantidade celular satisfatória para

realizarmos congelamento de cinco ampolas de cada híbrido adquirido, segundo Deffune, 1996.

As placas ELISA foram lidas por espectrofotometria a 450nm.

### **3.5.3 Screening para identificação de falso positivo (*E. coli*)**

#### **3.5.3.1 Método Elisa**

Dos protocolos propostos para obtenção de endotoxinas (*E. coli*) o sobrenadante morte temperatura ambiente, apresentou proteínas com pesos moleculares semelhante ao expresso pela proteína F em gel de poliacrilamida (gradiente 4-15), sendo empregado como antígeno para sensibilização das placas ELISA.

Procedeu-se como descrito no ELISA indireto. Devido à dificuldade de importação, em breve período de tempo, de monoclonal anti- endotoxina de *E. coli* específica, não foi possível realizar controle positivo do *screening*.

#### **3.5.3.2 Método Citometria de Fluxo**

Com intuito de avaliar a reação obtida na etapa anterior procedeu-se estudos pela metodologia em citometria de fluxo utilizando o equipamento FACs Calibur BD® com leitura do *Software CellQuest®* na faixa das plaquetas ( levando em consideração o tamanho similar da *E. coli*). Alíquotas de 100µl de suspensão de *E. coli* ( $1 \times 10^6$  bactérias/mL) foram distribuídas em tubos de poliestireno 12x75mm e incubadas com 100µl do líquido ascítico de cada um dos clones obtidos no trabalho (diluído 1:200). Para revelação por citometria de fluxo, é necessário que haja fluorescência, portanto utilizou-se um anticorpo secundário anti-imunoglobulina murina tipo IgG conjugado com isoticianato de fluoresceína (FITC) e anti-imunoglobulina murina tipo IgM conjugado com ficoeritrina (PE), segundo Golim, 2008.

As análises foram realizadas avaliando o deslocamento dos *dot plots* (tamanho, granulosidade e expressão de fluorescência) em relação ao eixo estabelecido pelo equipamento. Foram utilizadas duas amostras para análise: bactéria íntegra (avaliação de eventual reação cruzada com antígeno de superfície) e com a permeabilização da membrana utilizando saponina (PEREIRA, 2007). Esta etapa permitiu avaliar a interação dos anticorpos produzidos com antígenos intracitoplasmáticos e intranucleares.

### 3.6 Clonagem

Os híbridos que mantiveram o desempenho no teste ELISA, considerados reagentes, ou seja, cuja densidade óptica era superior a 3X o controle negativo foram amplificados em frascos de 25cm<sup>2</sup>, quantificados e analisados a viabilidade pela técnica de azul de tripano e foram submetidas à clonagem. O método padronizado para a clonagem celular no Laboratório de Engenharia celular é a Técnica de Diluição Limitante clássica.

A clonagem teve como objetivo garantir a colocação de 1 única célula sobre um tapete de células de companhia. Estas, além de desempenhar companhia física ao híbrido isolado, garantem também um micro-ambiente de citocinas necessárias para o melhor desempenho da célula. Desta forma, a observação por microscopia invertida identificou em cada poço da placa de clonagem sua condição como: único ou múltiplo. Todos foram testados, no entanto, somente os clones oriundos de poços denominados únicos foram ser denominados monoclonais.

### 3.7 Produção de Líquido Ascítico (LA)

Para a produção de líquido ascítico foram utilizados 24 camundongos, fêmeas, de aproximadamente 90 dias de vida, da linhagem isogênica BALB/c também, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. O método de produção de líquido ascítico respeitou a técnica clássica de irritação do peritônio de camundongos com 1 mL de óleo mineral de alta qualidade do tipo tetramethylpentadecane - Pristane®. A partir da intumescência e abaulamento abdominal (ainda discreta nesta fase), procedemos à injeção do clone de interesse previamente descongelado e cultivado para garantir quantidade mínima de  $5 \times 10^6$  células/camundongo. Esta etapa não necessitou de anestésico, pois a dor corresponde a de uma punção com agulha de insulina. A distensão abdominal foi monitorada acompanhando o aumento de volume. Em média 15 dias após a inoculação iniciamos as coletas do líquido ascítico produzido. Procedeu-se à clarificação do LA, através da centrifugação a 12000g, a 4°C por 30 minutos. Eliminou-se a camada de gordura presente na superfície do sobrenadante e o pellet com restos celulares, o sobrenadante foi aliquoteado e congelado a -80°C. Este método possibilitou a obtenção de anticorpos mais concentrados

e em menor volume. Esses procedimentos não envolveram, intencionalmente, estresse ou dor nos animais.

### **3.8 Determinação de Classe e sub-classe de Imunoglobulinas**

As classes e subclasses foram determinadas por citometria de fluxo através do kit CBA Flex - IgA, IgG e IgM - (usado de acordo com as instruções do fabricante - customizado pela BD Biosciences®).

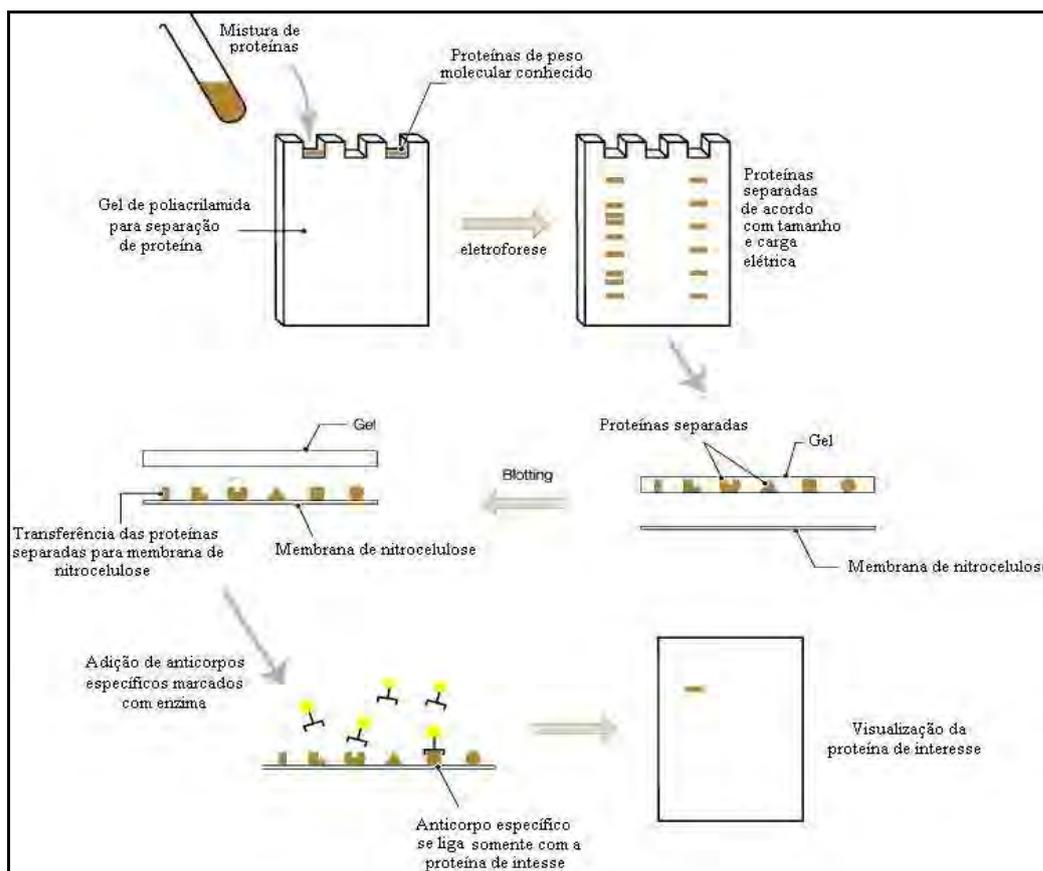
O princípio da técnica é baseado em micro partículas de polimetilmetilado (*beads*) marcadas com intensidades de fluorescência distintas ligadas a anticorpos monoclonais específicos para imunoglobulinas murinas (IgA, IgE, IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>3</sub>). Amostras dos sobrenadantes de cada clone foram incubadas com as *beads* e posteriormente reveladas com anticorpo secundário marcado com fluorocromo. O resultado das fluorescências foram adquirido pelo BD CellQuest Software™ e analisados automaticamente pelo BD CBA Software™.

### **3.9 Comprovação da monoclonalidade**

Utilizamos a técnica de eletroforese sobre lâminas em gel de ágar (1%) e poliacrilamida, gradiente 4-15, SDS-PAGE, dos líquidos ascíticos e purificado obtidos. O protocolo operacional padrão usado foi desenvolvido no laboratório de bioquímica e no laboratório de Engenharia Celular – Hemocentro de Botucatu – Faculdade de Medicina.

### **3.10 Caracterização imunoquímica pelo Método de *Western Blotting***

Nesta metodologia, a proteína F obtida pelo método recombinante e a *E.coli* (sobrenadante a temperatura ambiente) foram migrados e as bandas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e esta incubada separadamente com cada anticorpo monoclonal obtido com posterior revelação com a adição do anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (1:8000) ou fostatase alcalina (1:1000), figura 12.



**Figura 12** – Esquema do método de *Western blotting*.

### 3.11 Purificação dos Anticorpos Monoclonais

A purificação dos anticorpos produzidos foi realizada pelo método de cromatografia de afinidade em aparelho Akta Prime®, em colunas de proteína-A-Sepharose próprias para a classe e subclasse do anticorpo a ser purificado (segundo especificação do fabricante), sendo o programa de purificação caracterizado por gradiente de pH, Figura 13.



**Figura 13** - Detalhe do equipamento de purificação por cromatografia de afinidade

A imunocromatografia em proteína A-Sepharose é baseada na interação entre a fração Fc da imunoglobulina G. A proteína A foi isolada inicialmente de *Staphylococcus aureus*, que demonstrou afinidade exacerbada frente à porção Fc da imunoglobulina G com alta especificidade e afinidade. A sheparose é uma matriz capaz de adsorver proteínas neste âmbito a proteína A se liga a matriz, não sendo eluída durante o processo de purificação. Já as demais proteínas presentes no LA são eliminadas. A interação proteína A e fração Fc é revertida por gradiente de pH das soluções utilizadas, eluindo especificamente a subclasse presente (Golim, 2008).

Por dificuldades na obtenção das colunas de cromatografia para purificação dos anticorpos da classe IgM, esta etapa não foi possível. No entanto, a purificação do clone da classe IgG foi realizada. O LA após descongelamento foi filtrado (filtro Millex® 45µm) e o volume final purificado em coluna (rHi-Trap Protein-A - GE®). O material recuperado foi congelado a -80°C.

### **3.12. Dosagem de proteínas**

A determinação de proteínas totais presentes nos LA coletados assim como nos subprodutos da manipulação dos extratos de *E. coli* foram realizadas em espectrofotômetro (Nanodrop 1000®) de acordo com instruções do fabricante.

#### 4. Resultados e Discussão

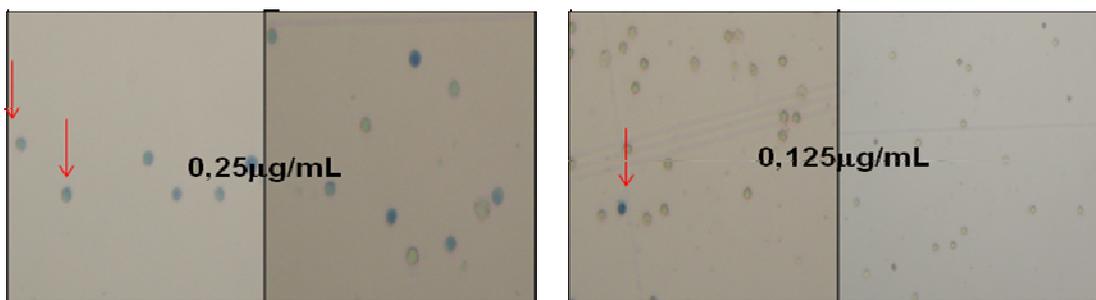
Em função da toxicidade da proteína recombinante obtida, os 10 primeiros animais que receberam imunização morreram depois da terceira dose de antígeno. A avaliação clínica dos animais evidenciava pêlo eriçado, animais cambaleantes, aparente diminuição de peso recusando alimentação nos dias subseqüentes à ultima dose de antígeno. Mesmo diante destas características desfavoráveis, entendendo a dificuldade e o custo da produção de proteínas recombinantes, 10 fusões celulares foram realizadas perfazendo um total de 6912 híbridos construídos. Em nenhum dos 10 primeiros protocolos as células mantiveram viabilidade pós-fusão com polietileglicol. Nesta etapa, todos os protocolos foram suspensos para se rediscutir com a equipe produtora da proteína recombinante os resultados encontrados.

Uma das hipóteses levantadas era a toxicidade pela capacidade fusionante da proteína F associada a uma etapa de produção de anticorpos monoclonais, a fusão entre os linfócitos e o mieloma múltiplo murino, com substância química também agressiva. Frente a estes resultados, a determinação de linfocitotoxicidade foi determinada tanto em linfócitos humanos como em de roedores.

LMN	Viabilidade(%)	
	0,25 µg/mL	0,125 µg/mL
Humano	39,54 (+/- 30,36)	86,96 (+/-6,93)
Controle	83,88 (+/- 9,1)	
Roedor	28,62 (+/- 36,87)	94,7(+/- 4,56)
Controle	96,58 (+/- 2,18)	

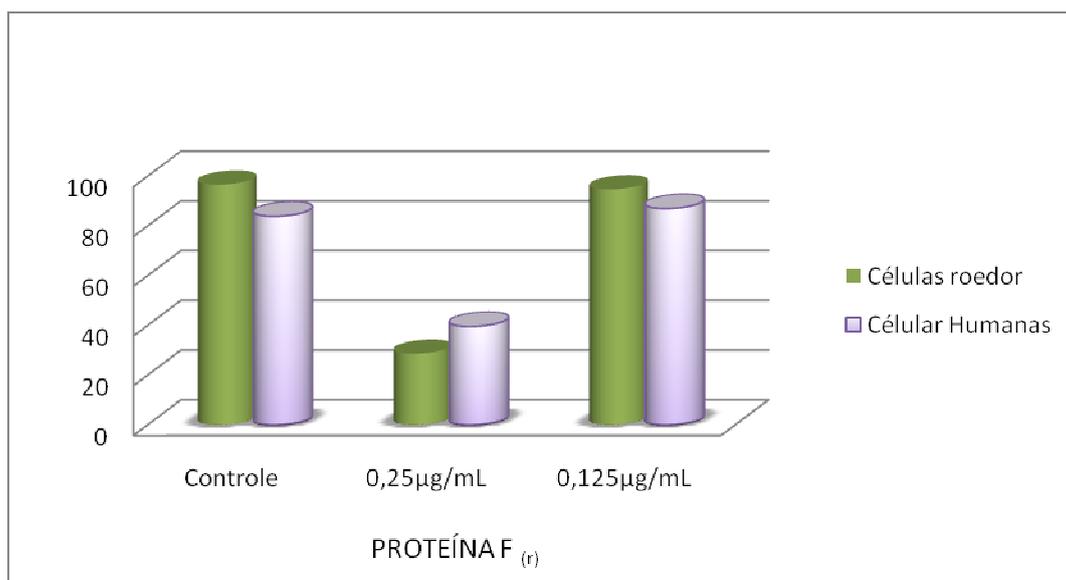
**Tabela 1** – Resultados do teste de linfotoxicidade da proteína F<sub>r</sub> frente às células linfomononucleares (LMN) humanas e de roedor

Pelo teste de Dunnett os controles diferiram significativamente ( $p < 0,01$ ) quando se analisa a concentração de 0,25µg/mL. Nesta concentração a lise / morte dos linfócitos foi mais intensa nas células de roedores (figura 14). Na concentração de 0,125µg/mL o valor de  $p > 0,05$  não tendo portanto diferenças estatisticamente significantes.



**Figura 14** - Teste de toxicidade de linfócitos de roedores e humanos incubados com diferentes concentrações de proteína F

O gráfico abaixo representa as médias das viabilidades celulares de cultura de linfócitos, por azul de trípino e câmara de Neubauer, durante 24 horas. Comparou-se células de roedor e humanas frente a diferentes concentrações de 0,25µg/mL e 0,125µg/mL.

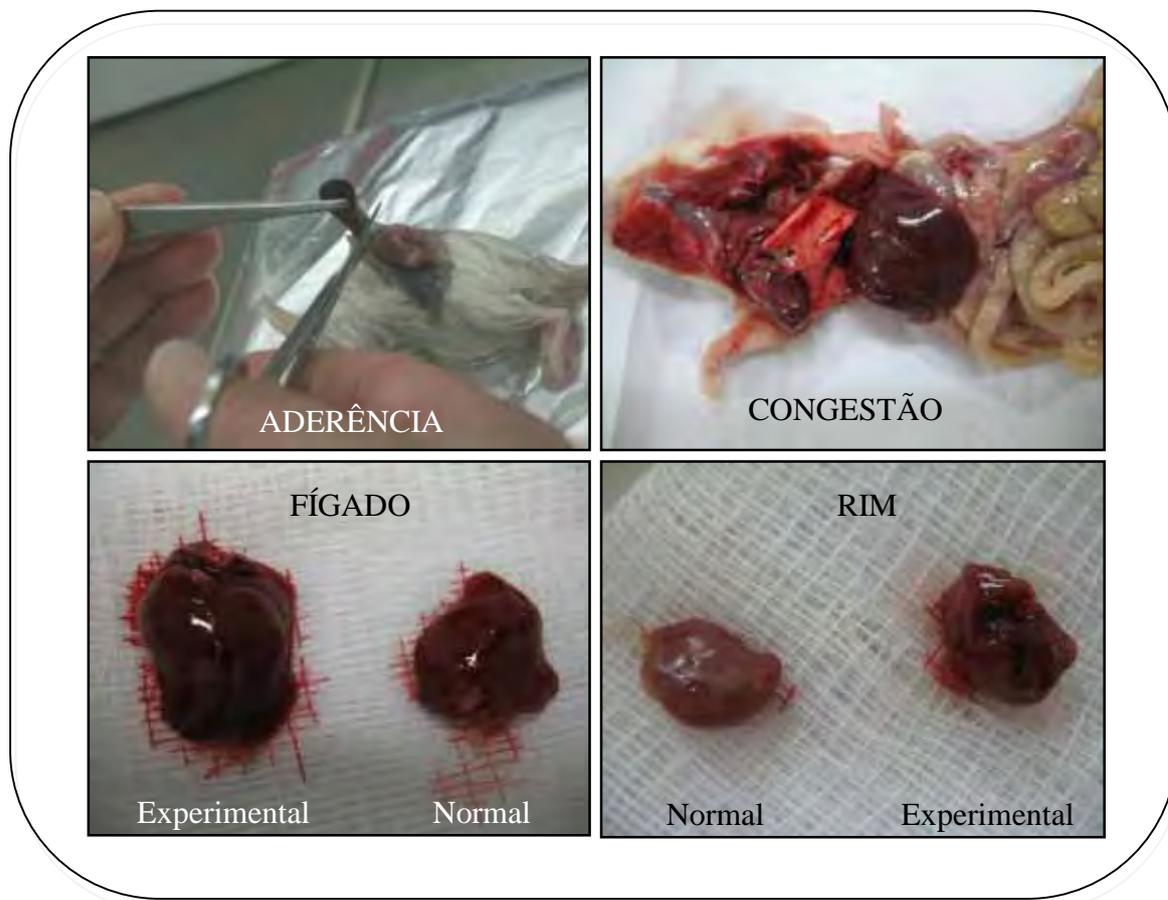


**Gráfico 1**- Média das viabilidades celulares em 24 horas de células de roedor e humano na presença de proteína F<sub>r</sub>

Observou-se que na menor concentração de 0,125µg/mL de proteína F<sub>r</sub>, a taxa percentual de viabilidade pela técnica de azul de trípino foi igual ao controle incubado ( meio de cultura), nos linfócitos de ambas as espécies.

Após análise dos resultados acima, outros 10 animais receberam injeções diferenciadas de antígeno conforme descrito no quadro 2 (material e métodos). Entre a primeira e a segunda injeção, 4 animais de cada protocolo morreram (40% de

mortalidade). Foi procedida a avaliação macroscópica *pós-mortem* dos animais (figura 15).



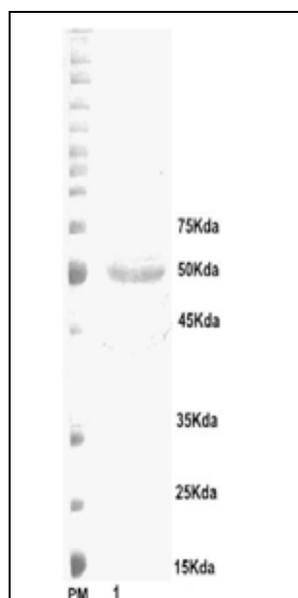
**Figura 15** - Achados de necrópsia nos primeiros protocolos de imunização com Proteína F<sub>r</sub>

Além dos achados de aumento do volume dos órgãos, congestão e aderências (figura 15), importantes alterações macroscópicas encefálicas foram identificadas. A figura 16 representa o aumento dos giros encefálicos e evidente edema cerebral de animal sensibilizado com o antígeno, em comparação com animal não imunizado. O material encontra-se congelado em N<sub>2</sub> para análises histológicas oportunas.



**Figura 16** – Edema cerebral e aumento dos giros encefálicos nos animais imunizados com proteína  $F_r$ : A = encéfalo de camundongo não imunizado e B = encéfalo de camundongo imunizado com proteína  $F_r$ .

Diante dos achados necroscópicos, novos contatos com a equipe de produção da proteína recombinante foram feitos. Para esclarecer dúvidas sobre as bandas encontradas no gel SDS PAGE, realizado em Botucatu, solicitou-se o padrão da corrida realizada em São José do Rio Preto. A figura 17 representa o padrão eletroforético ilustrando o peso da proteína obtida em São José do Rio Preto. É possível observar a presença de banda específica comparada com marcador de peso molecular.



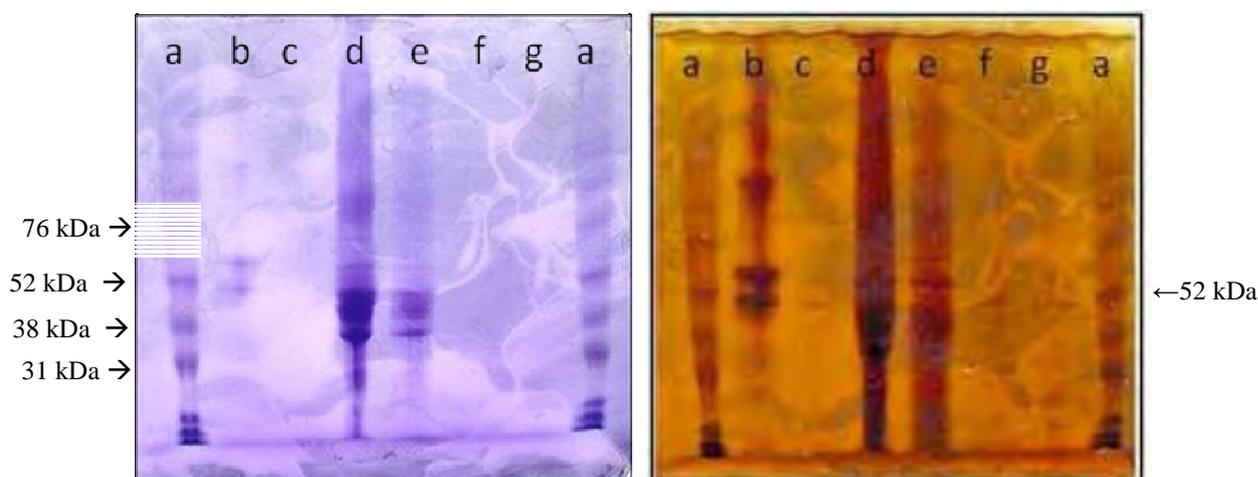
*H.A. Arcuri et al./Protein Expression and Purification 62 (2008) 146–152*

**Figura 17** – SDS-PAGE 12% de proteína F purificada 2 horas após a indução com 0,4 $\mu$ M de IPTG e 0,2 $\mu$ M de arabinose. Coloração de Coomassie.

Foi feita nova solicitação de proteína  $F_r$ , mas a informação recebida era de que a cepa especial de super *E. coli* utilizada BL21A havia sido perdida. Novas

tentativas de expressão se mostraram insatisfatórias. Portanto, não houve possibilidade de obter mais amostra de proteína F<sub>r</sub> para continuar os ensaios com os anticorpos obtidos.

Em Botucatu, no Laboratório de Engenharia Celular, o sistema de eletroforese utilizado como padrão usa equipamento *Phast System* da Pharmacia/Amershan®. Na figura 18 representa-se o padrão encontrado da amostra de proteína Fr em diferentes concentrações, corado comparativamente com azul de Coomassie e nitrato de prata.

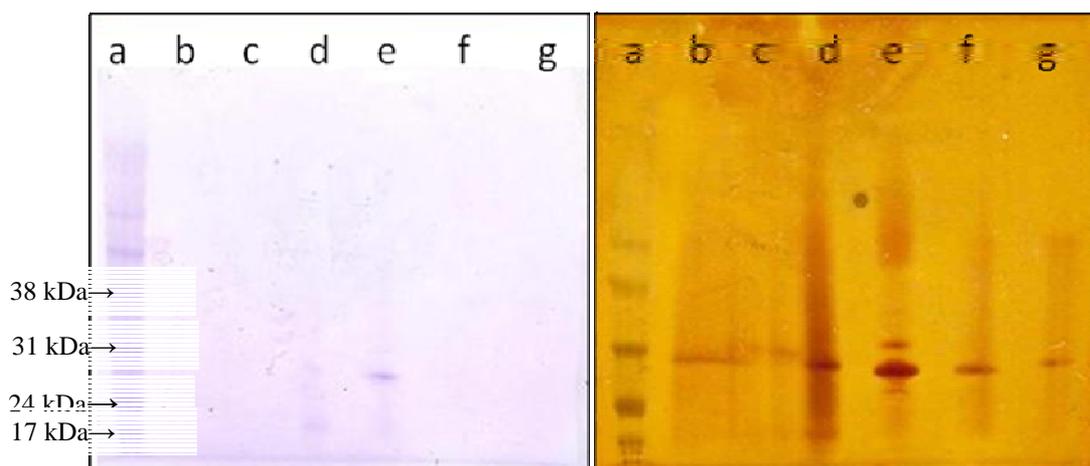


**Figura 18** - À esquerda: SDS-PAGE gradiente 4-15 corado em azul de Coomassie, à direita coloração de nitrato de prata. Pista a = marcador de peso molecular Rainbow®; b= proteína F<sub>r</sub> 25µg, pré tratamento com Triton X-114, com mercaptoetanol; c = proteína F<sub>r</sub> 25µg, pré tratamento com Triton X-114, sem mercaptoetanol; d = proteína F<sub>r</sub> 0,3mg, pré tratamento com Triton X-114, sem mercaptoetanol; e= proteína F<sub>r</sub> 50µg, pré tratamento com Triton X-114, sem mercaptoetanol; f = proteína F<sub>r</sub> 25µg, após 2 passagens no tratamento com Triton X-114, sem mercaptoetanol; g= proteína F<sub>r</sub> 25µg, após 5 passagens no tratamento com Triton X-114, sem mercaptoetanol.

Como podem ser observadas, as figuras 17 e 18 têm importantes diferenças. Entre elas encontram-se padrões de bandas não identificados na corrida publicada por ARCURI et al., 2008. Optou-se pela coloração de nitrato de prata, comparativamente, ao padrão obtido pelo azul de Coomassie por se ter dados de literatura que apontam que esta técnica pode atingir um padrão de até 100 vezes mais sensível.

Tendo obtido a cepa de *E.coli*, foi preparado o macerado da bactéria e analisado o padrão eletroforético e a determinação da quantidade de proteínas totais do sobrenadante do macerado *in natura*, fervido, autoclavado, e morte da bactéria em temperatura ambiente e *pellet* de macerado e *pellet* autoclavado.

A coloração em azul de Coomassie revela a tênue banda na corrida de material oriundo de sobrenadante de cultura com morte à temperatura ambiente. A coloração em nitrato de prata confirma este dado com mais evidência e identificando bandas nas demais pistas, impossíveis de serem visualizadas na primeira coloração, com peso molecular semelhante à detectada nas amostras de proteína F<sub>r</sub> (figura 19).



**Figura 19** – À esquerda: SDS-PAGE gradiente 4-15 corado em azul de Coomassie, à direita coloração de nitrato de prata. Representação da eletroforese dos subprodutos de *E. coli*. Pista a = marcador de peso molecular Rainbow®; b= Sobrenadante Macerado; c = Sobrenadante Fervido; d = Sobrenadante Autoclavado; e= Sobrenadante morte temperatura ambiente; f = *Pellet* Macerado, diluição (1:40); g= *Pellet* Autoclavado, diluição (1:40)

A tabela 2 representa as determinações das proteínas totais nos diferentes subprodutos do extrato de *E. coli*.

<i>E. coli</i>	Proteína (mg/mL)
Sobrenadante Macerado	0,36
Sobrenadante Fervido	0,2
Sobrenadante Autoclavado	0,92
Sobrenadante Morte T. A.	2,04
<i>Pellet</i> Macerado	3,07
<i>Pellet</i> Autoclavado	11,88

**Tabela 2** – Quantidade de proteína total nas amostras de *E.coli* após seus respectivos processamentos

Após o protocolo de descontaminação proposto para endotoxinas, a perda protéica foi substancial, a ponto da corrida eletroforética, mesmo corada por nitrato de prata, ter apenas uma tênue banda. Esforços adicionais foram realizados no sentido de construir clones produtores de imunoglobulinas contra proteína F<sub>r</sub>.

Em paralelo aos ensaios de caracterização da proteína recombinante, dificuldades pontuais foram identificadas quanto ao clone de NS1. Diante da hipótese de contaminação por micoplasma, foram selecionados três clones para determinação da contaminação em paralelo às amostras de Meio Completo e o SFB (tabela 3). Os testes foram realizados no Instituto de Biociências por técnicas de biologia molecular sendo que tanto o clone de mieloma (NS1), como os clones TAN1-33 A 45 (anti-B) e TAN1-77 A 3 (anti-AB) tiveram a reação de PCR positiva. O meio de cultura e o soro fetal bovino foram negativos.

<b>Linhagem celular/Insumo</b>	<b>Amostra</b>	<b>PCR (<i>Mycoplasma spp</i>)</b>
<b>Mieloma Murino</b>	NS1	Positivo
<b>Clone Produtor de Mab</b>	TAN1-33 A 45	Positivo
	TAN1-77 A 3	Positivo
<b>Meio de cultura</b>	MEIO CULTURA	Negativo
<b>Soro Fetal Bovino</b>	SFB	Negativo

**Tabela 3** - Determinação da contaminação por *Mycoplasma spp*

Após o período de descontaminação, novos testes foram realizados, constatando que todas as amostras eram negativas em ambos os protocolos propostos para eliminação do Micoplasma (tabela 4). Estes resultados foram interessantes pelo fato de que a literatura especializada não aponta possibilidades de recuperação de clones de alto valor agregado pelo uso de antibióticos no meio de cultura. Utilizando a perspectiva de estudo comparado, propôs-se o uso de ciprofloxacina 2mg/L em meio de cultura, cujos resultados foram superponíveis à passagem *in vivo*. Este fato é além de inovador, eticamente mais aspirado pela comunidade internacional que preconiza o uso restrito de animais de experimentação.

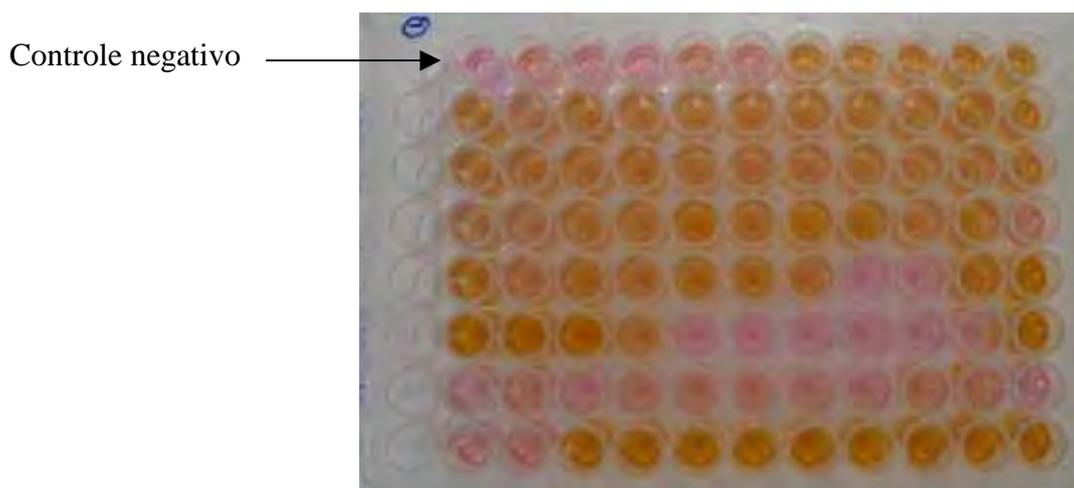
Linhagem celular/Insumo	Amostra	Descontaminação	
		Ciprofloxacina (30/60/90d)	Passagem <i>in vivo</i> (30/60/90d)
Mieloma Murino	NS1	Negativo	Negativo
Clone Produtor de AcMm	TAN1-33 A 45	Negativo	Negativo
	TAN1-77 A 3	Negativo	Negativo
Meio de cultura	MEIO CULTURA	Negativo	Negativo
Soro Fetal Bovino	SFB	Negativo	Negativo

**Tabela 4** - Resultados após protocolos de descontaminação propostos

Após superar as dificuldades descritas, os novos protocolos de imunização geraram outros 2965 híbridos construídos. Os híbridos que apresentaram crescimento satisfatório foram avaliados no *screening* (figura20). Aqueles que apresentaram desenvolvimento de fibroblastos, características morfológicas bizarras, crescimento lento ou contaminação fúngica foram eliminados. O percentual médio de híbridos construídos que chegaram à etapa do *screening* foi de 19,48% , tabela 5.

Protocolo	Nº Placas	Híbridos construídos	Híbridos testados	% Híbridos testados
VITRI-1	7	665	130	19,5
VITRI-2	7	668	121	18,1
VIRSV-1	9	864	196	22,7
VIRSV-2	8	768	135	17,6
Total	<b>31</b>	<b>2965</b>	<b>582</b>	<b>19,63</b>

**Tabela 5** – Híbridos construídos, testados e percentagem de híbridos testados



**Figura 20** – Aspecto final da placa ELISA após a revelação (fase sólida = proteína F<sub>r</sub>)

Os híbridos selecionados no primeiro teste foram submetidos a dois *screening* com 7 dias e 21 dias após a fusão celular.

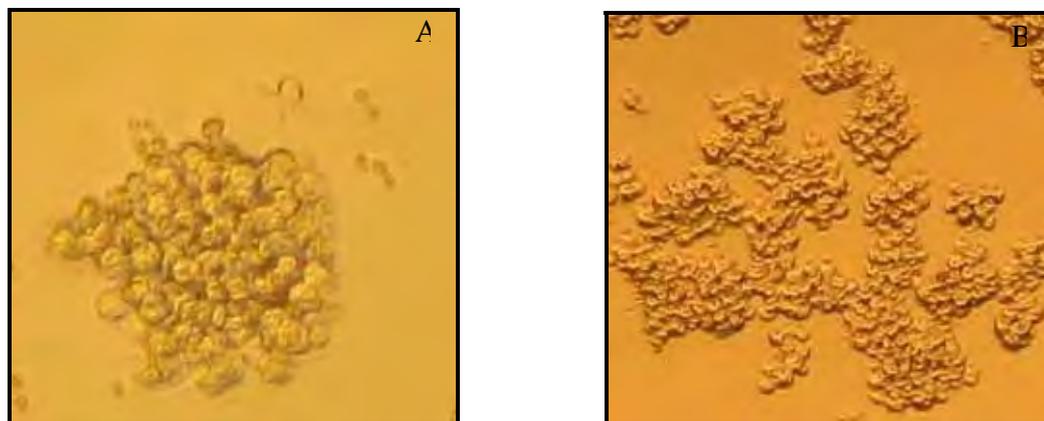
Dos 27 híbridos construídos e identificados como reagentes no primeiro *screening* somente 3 deles se mantiveram reagentes após a estabilização da célula e repiques a cada 48 horas. Estes três foram selecionados para a clonagem (tabela 6).

Híbridos	Viabilidade (%) Azul Tripano	Testados	Retidos (1° <i>Screening</i> )	Mantidos como reagentes (2° <i>Screening</i> )
VITRI 1-104	92	106	7	0
VITRI 1-121	89	87	1	0
VIRSV 1-149	96	95	6	0
VIRSV 2-23	85	92	3	1
VIRSV 2-56	76	68	1	1
VIRSV 2-87	90	129	9	1
Total	<b>(média) 88</b>	<b>577</b>	<b>27</b>	<b>3</b>

**Tabela 6** – Híbridos selecionados para clonagem, viabilidade celular, quantidade de clones testados, quantidade de clones retidos no primeiro e segundo *screening*.

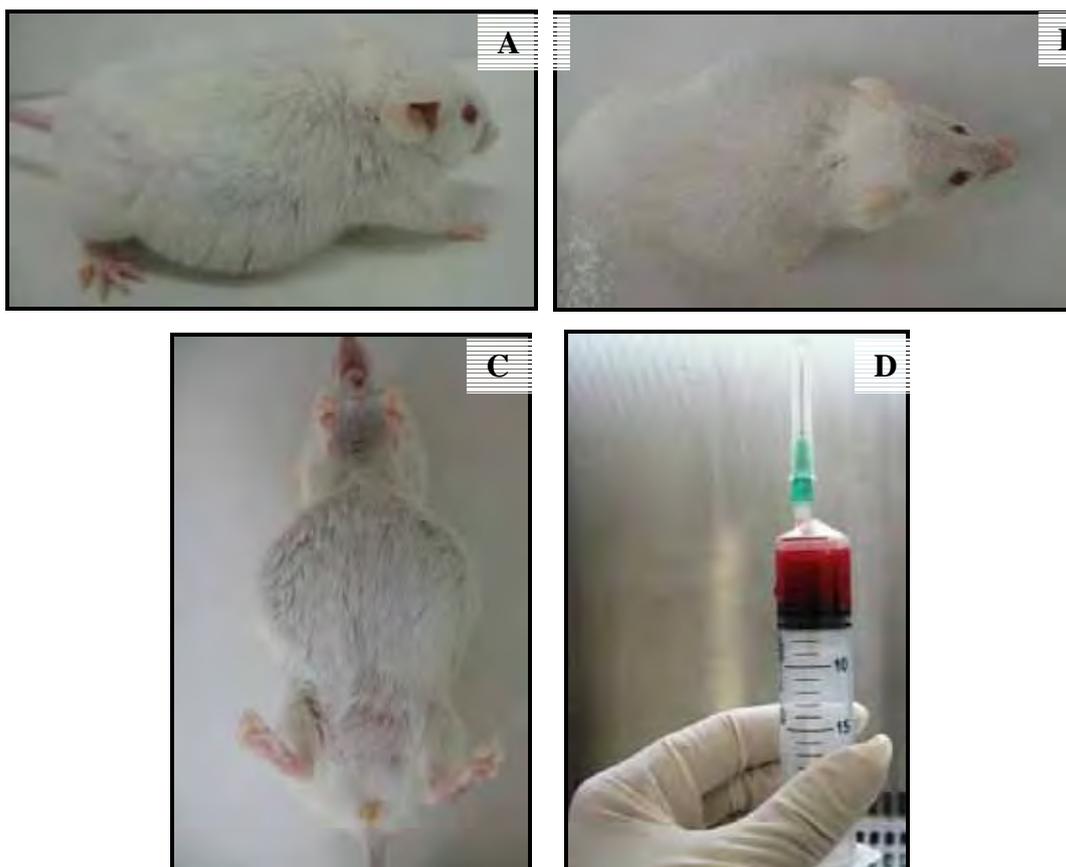
Foi realizada a distribuição das células nos poços de cultura, de modo que obtivemos clones a partir de células únicas ou de várias células (figura 21). Ao realizar a clonagem pela técnica de diluição limitante, a observação microscópica diária é imprescindível para o sucesso. Os clones provenientes de célula única, com crescimento

satisfatório e positivo a dois novos *screenings* foram expandidos para placas de 24 poços, frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> (30 mL) e finalmente frascos de 75cm<sup>2</sup> (160 mL). Nesta etapa identificou seis clones, todos provenientes do protocolo VIRSV 2.



**Figura 21** – Aspecto da Clonagem celular. A= clone único; B= clones múltiplos. *Objetivas de 40 e 10x e ph1.*

Os clones estabilizados em cultura foram congelados em nitrogênio líquido e descongelados dentro da agenda de produção de líquido ascítico que depende da disponibilidade de animais pelo biotério. No momento oportuno são colocados em cultivo para garantir quantidade celular mínima de  $5 \times 10^6$  células a ser injetada via intraperitoneal no camundongo. Todos os 24 animais inoculados produziram líquido ascítico, figura 22. Porém, houve morte de aproximadamente 20% dos Balb/c. A média de líquido ascítico foi de 9 mL/animal, quantidade satisfatória para análises propostas.



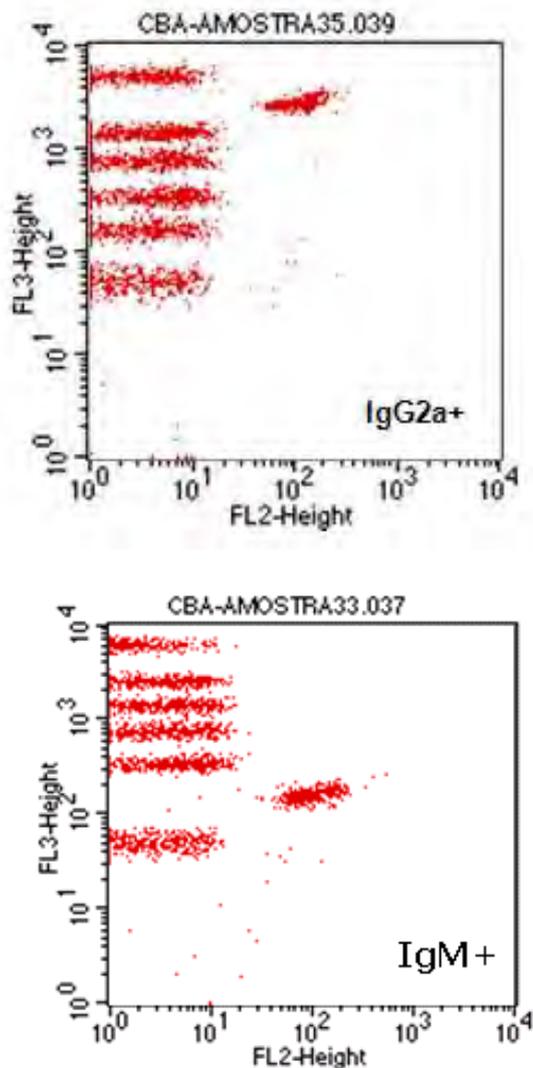
**Figura 22** – Produção de líquido ascítico: A, B e C= abdome abaulado e claramente distendido após inoculação com clone celular; D= aspecto do fluido ascítico imediatamente antes da clarificação

Após recuperação do líquido ascítico (figura 22), determinamos a quantidade de proteínas em cada clone inoculado, tabela 7.

Clone	Proteína (mg/mL)
VIRSV 2-23A46 (ascite)	28,08
VIRSV 2-23A46 (purificado)	1,45
VIRSV 2-56A80	35,75
VIRSV 2-87A80	24,9
VIRSV 2-87A74	43,29
VIRSV 2-87A56	17,37
VIRSV 2-87A54	16,89

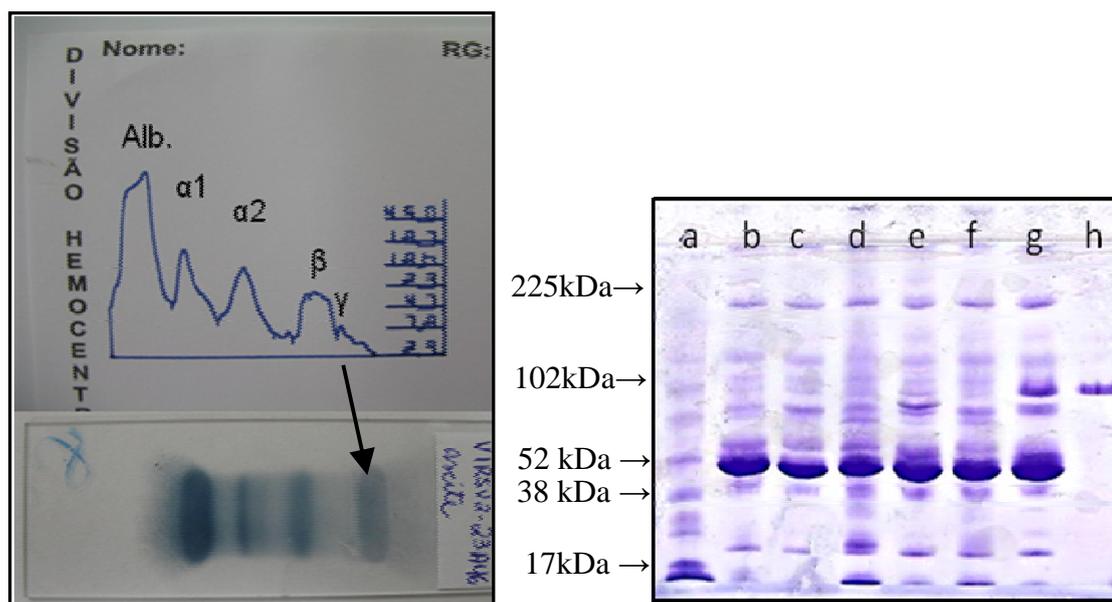
**Tabela 7** – Quantificação de proteína no líquido ascítico de cada clone obtido.

Dos seis clones selecionados, cinco são produtores de imunoglobulina M e um de imunoglobulina G<sub>2a</sub>. A figura 23 identifica o desempenho da técnica de citometria de fluxo.



**Figura 23** – Imagem produzida pelo *Software Cell Quest/BD®* dos sobrenadantes de cultura dos clones selecionados utilizando kit CBA Flex (IgA, IgG e IgM)

Para todos os clones foi realizada a comprovação da monoclonalidade através de eletroforese em gel de ágar e de poliacrilamida das seis células selecionadas. No clone IgG<sub>2a</sub> realizamos as eletroforeses pré e pós purificação. Todos os clones estudados mostraram o mesmo padrão com a evidência da banda monoclonal (figura 24).



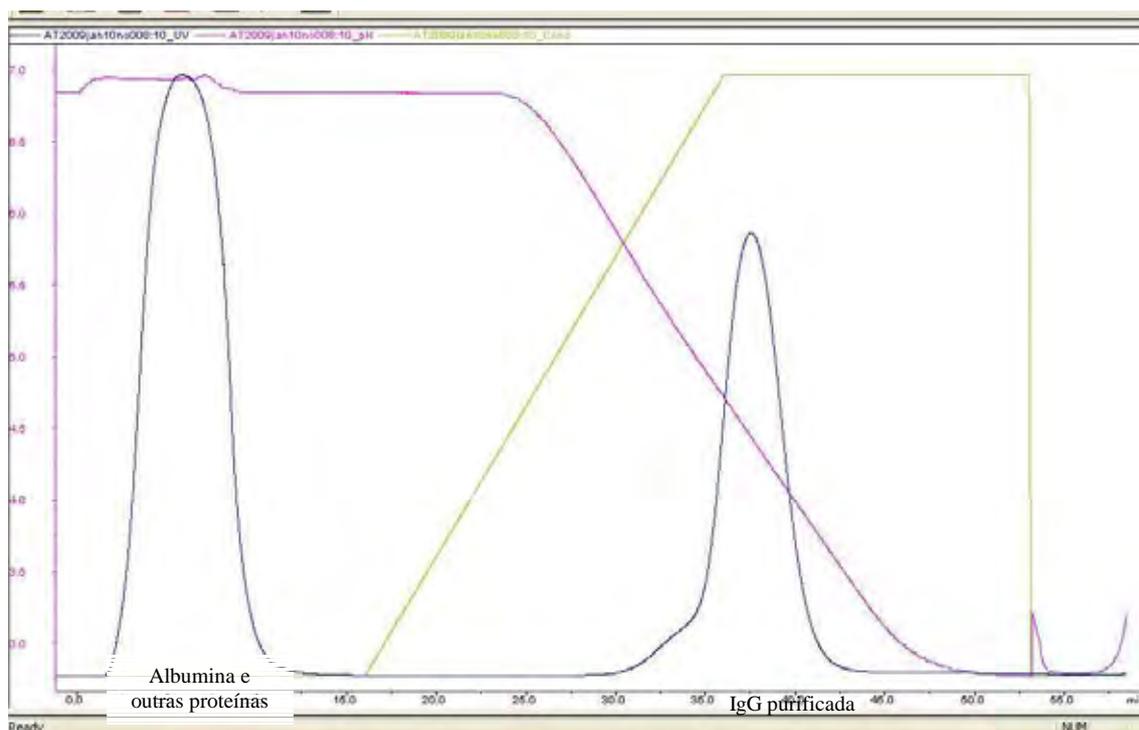
**Figura 24** – À esquerda eletroforese em gel de ágar, líquido ascítico (clone VIRSV 2-23A46); à direita eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), gradiente 4-15, dos clones selecionados; a = peso molecular Rainbow®; b = VIRSV2-84A54; c = VITRI 2-87A56; d = VITRI 2-87A74; e = VITRI 2-87A80; f = VITRI 2-56A80; g = VITRI 2-3A46; h = VITRI 2-3A46 (purificado); Coloração de *Coomassie*

A figura 24 (esquerda) representa o perfil eletroforético da ascite pré purificação com pico monoclonal demonstrado na seta além de outras proteínas presentes no LA em maior evidencia a albumina.

Na figura 24 (direita) é possível confirmar a presença de diferentes proteínas murinas, a banda monoclonal e constatar a eficiência da purificação.

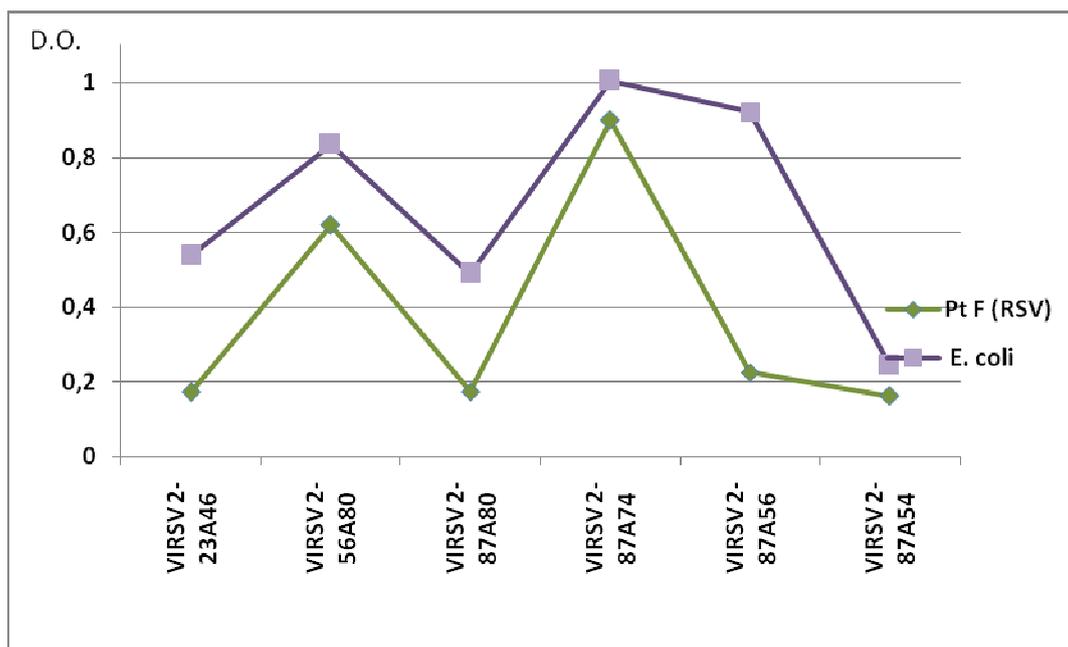
O líquido ascítico proveniente da expansão *in vivo* do clone VIRSV 2-23A46 foi purificado, demonstrando pureza da imunoglobulina obtida tendo rendimento de 1,45mg/mL.

A figura 25, aponta o pico primário de albumina (linha azul) e o secundário da imunoglobulina G puro (linha azul), obtido após eluição com pH inferior a 6.



**Figura 25** – Aspecto do *Software* do aparelho Akta Prime® durante a purificação do LA do clone VIRSV 2-23A46. Linha azul é a absorção de UV que caracteriza o primeiro pico de albumina e outras proteínas murinas e o segundo pico de imunoglobulina tipo IgG. A linha rosa representa o pH da reação. A linha verde é a concentração que varia de 0 a 100%, retornando para 0 após 53 minutos. No eixo x temos o tempo de purificação e no eixo y os valores de pH.

Os clones selecionados após *screening* em placas sensibilizadas com proteína F<sub>r</sub>, foram testados nas mesmas condições em placas preparadas com sobrenadante de *E. coli* (morte temperatura ambiente. A reação com o *coating* do extrato de *E. coli* apresentou um desempenho nitidamente superior com todos os clones testados (DO Elisa com *E.coli* > DO Elisa com Proteína F<sub>r</sub>) (gráfico 2).



**Gráfico 2** – Avaliação da densidade óptica (D.O.) dos clones retidos frente a proteína F<sub>r</sub> (verde) e sobrenadante de cultura de *E. coli* (roxo) (morte temperatura ambiente)

Diante destes resultados, avaliou-se por citometria de fluxo o desempenho dos seis anticorpos monoclonais com a bactéria íntegra e com a mesma bactéria após processo de permeabilização de membrana com saponina. Na coluna de imunofluorescência (IF), observa-se que os índices são considerados dentro da margem de negatividade. Estes dados indicam que os anticorpos monoclonais obtidos não reconhecem antígeno de membrana da *E. coli* (tabela 8).

Clone	N <sup>o</sup> eventos	% Gate	% IF
<b>E. coli Ctle neg</b>	19.648	99,98	0
<b>E. coli - IgM</b>	19053	99,96	0,04
<b>E. coli - IgG</b>	19291	99,87	0
<b>VIRSV 2-56A80</b>	47.808	99,73	0,27
<b>VIRSV 2-87A54</b>	48.035	99,66	0,33
<b>VIRSV 2-87A56</b>	46.832	97,5	2,47
<b>VIRSV 2-87A80</b>	47.590	99,64	0,36
<b>VIRSV 2-87A74</b>	47.323	98,78	1,2
<b>VIRSV 2-23A46</b>	52.051	100	3,29

**Tabela 8** – Avaliação da reatividade da *E. coli* com os anticorpos monoclonais obtidos (IF - imunofluorescência)

Na tabela 8 observa-se uma discreta diferença, incluindo a análise de percentagem de fluorescência dos controles IgM e IgG, que nesta análise já possuem índices mais elevados, porém dentro dos padrões de negatividade. No entanto, destacam-se os resultados obtidos com dois clones após permeabilização da membrana bacteriana: o VIRSV2-87A80 e VIRSV2-87A74 cuja positividade foi respectivamente 12,24 e 19,53% (tabela 9). Estes resultados apontam para um possível reconhecimento de proteína contaminante do processo de purificação da proteína F<sub>r</sub> por resina de afinidade, provavelmente uma endotoxina. Esses resultados são reforçados pelo fato de que estes clones correspondem ao protocolo de imunização sem a passagem por Triton X-114. Todos os híbridos construídos no protocolo VITRI, ou seja, após purificação por Triton X-114, não apresentaram desempenho satisfatório para seguirem as etapas de produção de anticorpos monoclonais. Provavelmente pelo fato de que a maior concentração de proteína existente na amostra seja representada por proteínas contaminantes.

Clone	N eventos	% Gate	% IF
<b>E. coli Ctle neg</b>	44.847	99,9	0,07
<b>E. coli - IgM</b>	43.980	100	1,1
<b>E. coli - IgG</b>	43.313	99,17	0,82
<b>VIRSV 2-56A80</b>	18.975	96,87	0,04
<b>VIRSV 2-87A54</b>	62.789	100	3,56
<b>VIRSV 2-87A56</b>	20.596	100	6,85
<b>VIRSV 2-87A80</b>	20.710	100	12,24
<b>VIRSV 2-87A74</b>	65.978	100	19,53
<b>VIRSV 2-23A46</b>	41.750	100	6,48

**Tabela 9** – Avaliação da reatividade da E. coli após permeabilização com saponina, frente aos anticorpos monoclonais obtidos. IF = imunofluorescência

O clone VIRSV 2-87A80 não teve bom desempenho nos testes ELISA, sendo sua densidade óptica baixa. Este clone não deverá ser explorado. No entanto, o clone VIRSV2-87A74 tem desempenho muito superior pelo método ELISA e métodos cinéticos como a cultura do RSV com adição de concentrações diferentes do referido anticorpo e avaliação do índice de apoptose deverá apontar sua eventual aplicabilidade

em futuros ensaios para a elaboração de testes rápidos. No entanto, sua reatividade com a *E. coli* permeabilizada pode apontar para um reconhecimento de endotoxinas ou reação cruzada.

Os ensaios de caracterização imunoquímica pela técnica de *Western blotting* não puderam ser considerados e novas transferências serão realizadas.

Testes adicionais em amostras de pacientes reagentes e não reagentes para RSV deverão caracterizar a especificidade dos clones obtidos.

## 5. Conclusões

- ✓ Foram obtidos 6 clones, **VIRSV 2-56A80**, **VIRSV 2-87A54**, **VIRSV 2-87A56**, **VIRSV 2-87A80**, **VIRSV 2-87A74**, **VIRSV 2-23A46** que reconhecem especificamente os preparados de proteína F recombinante;
- ✓ Os clones obtidos são 5 da classe IgM e um da classe IgG2a.
- ✓ Os clones apresentam um reconhecimento inespecífico de proteínas da *E. coli*.
- ✓ Não foi possível caracterizar os clones obtidos em função da dificuldade de se obter novas amostras de proteína F<sub>r</sub>.

## 6. Perspectivas

Os anticorpos obtidos deverão ser marcados com isotiocinato de fluoroceína e comporem um amplo teste epidemiológico em paralelo com o kit disponível em mercado respeitando a sazonalidade da doença.

Avaliação da indução da apoptose poderá ser feita em testes com cultura *in vivo* em laboratório de virologia.

Novos ensaios com *Western blotting* e técnicas de imunoprecipitação estão sendo realizadas no sentido de se identificar eventual reconhecimento dos anticorpos com a proteína recombinante ou não.

## 7. Referências Bibliográficas

AIDA, Y.; PABST, M. J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J. Immunol. Methods*, v. 132, p. 191-195, 1990.

AMANTÉA, L.S. SILVA, A.F. Bronquiolite Viral Aguda – um tema ainda controvertido. *Jornal de Pediatria*, v.74, supl.1, p.37-47, 1998.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; ABALIA, I.; RODRIGUEZ, E.; BILBAO, J.R.; UMARAN, A. Factores de virulencia y serogrupos o de *E. coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v. 13, p. 236-241, 1995.

BOREK, A.P. et al., Respiratory Syncytial Virus Detection by Remel Xpect, Binax Now RSV, Direct Immunofluorescent Staining, and Tissue Culture. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.3, p.1105-107, 2006.

CALEGARY, T. et al., Clinical-epidemiological evaluation of RSV infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.9, n.2, 2005.

CANDEIAS, J.A. Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.9, n.1, p. 27-30, 1967.

CHANOCK, R. et al., Recovery of infant with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *American Journal of Hygiene*, v.66, p.281, 1957.

CINTRA, O.A.; ARRUDA, E. Infecções Respiratórias Virais em Pacientes Imunodeprimidos. *Medicina*, v.32, p.129-37, 1999.

DEFFUNE, E. et al., Manual GMP-BPL dos laboratórios de Imunohematologia – Botucatu, HC, FM, UNESP, 2ª versão, p.134, 1996.

DEFFUNE, E. Obtention d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre le troisième composant du complément. Intérêt en immunohématologie. Paris, 1992. Tese Doutorado – Área Imunologia. Universidade Pierre et Marie Curie – VI.

DEVINCENZO, J.P. Natural infection of Infants with Respiratory Syncytial Vírus Subgroups A and B: A Study of Frequency, Disease, Severity, and Viral Load. *Pediatric Research*, v.56, n.6, 2004.

DIMITROV, D.S. Virus entry molecular mechanisms and biomedical applications. *NATURE REVIEWS*, v. 2, p. 109-22, 2004.

FARHAT, C.K. et al.,. Vacinas e o trato respiratório – o que fazer? *Jornal de Pediatria*, v.78, supl.2, 2002.

FISCHER, G.B.; MENDONÇA, P.C.J. Bronquiolite viral aguda. Em: Ferreira, O. Pneumologia, *Cadernos de Terapêutica*, 2a. ed. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 1991.

GARDNER, A.E.; KIMBERLY L.M.; DUTCH, R.E. A conserved region between the heptad repeats of paramyxovirus fusion proteins is critical for proper f protein folding. *Biochemistry*. v.46, n.17, 2007.

GOLIM, M.A, 2008. Obtenção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos de superfície de linfócitos b humanos para aplicação diagnostica e terapeutica (fase murina). Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

HACKING, D.; HULL, J. Respiratory Syncytial Virus – Viral Biology and the host Response. *Journal of Infection*, v.45, p.18-24, 2002.

HANCOCK, G.E. et al., CpG containig oligoxynucleotides are potent adjuvants fo parenteral vaccination with the fusion (F) protein of respiratory syncytial virus (RSV). *Vaccine*, v.19, p. 4874–882, 2001.

KEESLER, C.; SACHSE, K. Fator VIII: C inhibitor associated with monoclonal – antibody purified FVII concentrate. *Lancet*, v.335, p. 1403, 1990.

KOHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous Cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v.256, p.495-97, 1975.

KUROIWA, Y. et al., Compararison of an Immunochromatografhy Test with Multiplex Reverse Transcription-PCR for Rapid Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.10, p.4812-814, 2004.

LUISI, F. O papel da fisioterapia respiratória na bronquiolite viral aguda *Scientia Medica*, v. 18, n. 1, p. 39-4, 2008.

MATTHEY, S. et al.,. Rapid Detection de Respiratory Viroses by Using Pooled and Invidual Monoclonal Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, n.3, p.540-44, 1992.

MEJÍAS, A. et al. Comparative Effects of Two Neutralizing Anti-Respiratory Syncytial Virus (RSV) monoclonal antibodies in the Murine Model: Time versus Potency. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.49, n.11, p. 4700-707, 2005.

MOORE, P.E. et al.,. Respiratory syncytial virus infection reduces beta2-adrenergic responses in human airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v.35, n.5, p.559-64, 2006.

MORRIS, J.A. et al.,. Recovery of a cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.92, p.514, 1956.

NASCIMENTO, C.A. 2007. Detecção do vírus respiratório sincicial humano (HRSV) pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo.

NOGUEIRA, M.F. 2004. Estudo de paramyxovirus, mycoplasma e de bacilos gram-negativos no trato respiratório de serpentes *crotalus durissus terrificus* (Dissertação de Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

NUNES, I.F.S. 2004. Perfil epidemiológico das infecções causadas por vírus sincicial respiratório em crianças atendidas em hospital de fortaleza – CE. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Faculdade Medicina. OGRA, P.L. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. *Paediatric Respiratory Reviews*, v.5, p.119-26, 2004.

OMS. Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses: Memorandum from a WHO meeting. *Boletim da Organização Mundial da Saúde*, v.70, n.6, p.699-703, 1992.

---

PEREIRA, J.; LIMA-BROCARDI, BEITLER, G.A.; CHAMONE, D. A. F. Utilização de saponina em citometria de fluxo: uma alternativa fácil para permeabilização celular. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v.29, n.2, p.109-13, 2007

RODRIGUES, O.G.; et al., Infecções virais em crianças portadoras de doença respiratória aguda, atendidas em um Centro de Saúde Escola, em Belém, Pará, Brasil. *Pediatria*, v.26, supl.1, p.13-20, 2004.

SIDWELL, R.W.; BARNARD, D.L. Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. *Antiviral Research*, v.71, n.2-3, p.379-90, 2006.

SIQUEIRA, A.K, 2006. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, piometra e fezes de cães. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

THOMAZELLI, L.M.; VIEIRA, S.; LEAL, A.L.; SOUSA, T.S; OLIVEIRA, D.B.L.; GOLONO, M.A.; GILLIO, A.E.; STWIEN, K.E.; ERDMAN, D.D.; DURIGON, E.L. Vigilância de oito vírus respiratórios em amostras clínicas de pacientes pediátricos no sudeste do Brasil. *J. Pediatr.* v.83, n.5, 2007.

WHITEHEAD, S.S. et al., Replacement of the F and G of Respiratory Syncytial Virus (RSV) subgroup A with those of Subgroup B Generates Chimeric Live Attenuated RSV Subgroup B Vaccine Candidates. *Journal Of Virology*, v.73, n.12, p.9773-80, 1999.

Sociedade Brasileira de Pediatria site: [www.sbp.com.br](http://www.sbp.com.br), acesso em 30/09/2008.

[www.uptodate.com/patients](http://www.uptodate.com/patients), acesso em 06/01/2009.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: A nova frente da medicina.** Primeira ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p.35-48.

ZHAO, X. et al., Structural Characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, v.97, n.26, 14172-77, 2000.

---

ZLATEVA, K.T. et al., Genetic Variability and Molecular Evolution of the human Respiratory Syncytial Virus Subgroup B Attachment G Protein. *Journal of Virology*, v.79, n.14, p.9157-67, 2005

---