



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

MARINA DE LIMA FONTES

GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS DIRIGIDOS A CÉLULAS
PROSTÁTICAS METASTÁTICAS: CONFEÇÃO DE IMUNOSENSORES
ELETROQUÍMICOS

Araraquara
2021

MARINA DE LIMA FONTES

**GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS
DIRIGIDOS A CÉLULAS PROSTÁTICAS METASTÁTICAS:
CONFECCÃO DE IMUNOSENSORES ELETROQUÍMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Andrei Moroz

Araraquara

2021

F682g Fontes, Marina de Lima.
Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células
prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos /
Marina de Lima Fontes. – Araraquara: [S.n.], 2021.
136f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Andrei Moroz.

1. Câncer de próstata. 2. Anticorpos monoclonais murinos. 3.
Cidofosfamida. 4. Imunodiagnóstico. I. Moroz, Andrei, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Andrei Moroz, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 311027508-24 portador da cédula de identidade RG nº 34.657.773-1, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos" desenvolvida pelo(a) doutorando(a) **Marina de Lima Fontes** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Prof. Dr. Andrei Moroz

EXAMINADOR

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Marli Leite de Moraes, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 833416921-34 portador da cédula de identidade RG nº 895.266, doravante denominado **EXAMINADORA**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos" desenvolvida pelo(a) doutorando(a) **Marina de Lima Fontes** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

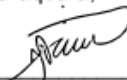
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Prof. Dra. Marli Leite de Moraes
EXAMINADOR

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Paulo Inácio da Costa, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 026551728-17 portador da cédula de identidade RG nº 14.231.969-5, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos" desenvolvida pelo(a) doutorando(a) **Marina de Lima Fontes** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

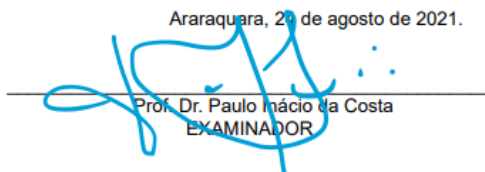
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 20 de agosto de 2021.



Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
EXAMINADOR

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Elenice Deffune, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 201045379-49 portador da cédula de identidade RG nº 971.522-3, doravante denominado **EXAMINADORA**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada;
e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos" desenvolvida pelo(a) doutorando(a) **Marina de Lima Fontes** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Profa. Dra. Elenice Deffune
EXAMINADOR

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Marjorie de Assis Golim, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 079. 286190738-00 portador da cédula de identidade RG nº 6710150, doravante denominado **EXAMINADORA**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada;
e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos" desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Prof.ª Dra. Marjorie de Assis Golim
EXAMINADOR

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Iracilda Zeppone Carlos, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 054037628-09 portador da cédula de identidade RG nº 9.472.247, doravante denominado **EXAMINADORA**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada;
e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos" desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Prof. Dra. Iracilda Zeppone Carlos
EXAMINADOR

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Eduardo Gabricho Fontes, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 079.468.938-84 portador da cédula de identidade RG nº16.384.469-1, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada;
e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009); firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos", desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Eduardo Gabricho Fontes', written over a grey rectangular background.

Eduardo Gabricho Fontes
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Lais Lima Fontes, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 472.517.568-46 portador da cédula de identidade RG nº 47.941.853-6, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada;
e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos" desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Lais de Lima Fontes
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Lucas Costa Taramelli, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 399.039.248-44 portador da cédula de identidade RG nº40.094.853-9, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada;
e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos", desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

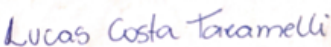
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Lucas Costa Taramelli
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Tamires Andreatto, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 416.640.648-50 portador da cédula de identidade RG nº 49.014.719-7, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada;
e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos", desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

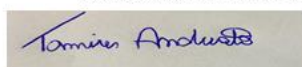
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Tamires Andreatto
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Tiago Argento Galbier, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 311.793.438-32 portador da cédula de identidade RG nº48.502.419-6, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos, desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Tiago Argento Galbier
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Bianca Dalbem, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 472.517.568-46 portador da cédula de identidade RG nº 54.688.350-3, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos" desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Bianca Dalbem dos Reis
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Lariane Teodoro Oliveira, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 415.211.128-35 portador da cédula de identidade RG nº45.838.048-9, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer “Informação Confidencial” a que tiver acesso da tese intitulada “Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos”, desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão “Informação Confidencial” abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada “Informação Confidencial” aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Lariane Teodoro Oliveira
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Hernane Barud, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 073.579.507-00 portador da cédula de identidade RG nº10.816.95-09, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada;
e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos" desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Hernane da Silva Barud
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Caroline Barcelos Costa Orlandi, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 012320786-03 portador da cédula de identidade RG nº55.683.373-9, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos", desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

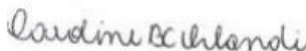
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Caroline Barcelos Costa Orlandi
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Larissa Naiara Carvalho Gonçalves, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 416419218-62 portador da cédula de identidade RG nº 45.247.050-X, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos", desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Larissa Naiara Carvalho Gonçalves
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Ana Carolina Moreira da Silva Pires, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 406.648.988-58, portador da cédula de identidade RG nº 39.258.572-8, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos", desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Ana Carolina Moreira da Silva Pires
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Junya de Lacorte Singulani, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 074.905.526-05, portador da cédula de identidade RG nº 13.778.717, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos", desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Junya de Lacorte Singulani
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Niura Madalena Bila, nacionalidade africana, inscrito no CPF/MF sob nº 0 240204628-79 , portador da cédula de identidade RG nº 0 V996839-R , doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos", desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021.



Niura Madalena Bila
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Carolina Orlando Vaso, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 403713898-01, portador da cédula de identidade RG nº 47417810-9, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada;

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos", desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

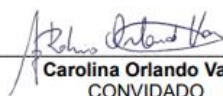
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 202



Carolina Orlando Vaso
CONVIDADO

TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

Franciny Mara de Lima Neves, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 042.268.581-07, portador da cédula de identidade RG nº 1.807.708, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso da tese intitulada "Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos", desenvolvida pela doutoranda **Marina de Lima Fontes**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 24 de agosto de 2021



Franciny Mara de Lima Neves
CONVIDADO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Geração de anticorpos monoclonais murinos dirigidos a células prostáticas metastáticas: confecção de imunossensores eletroquímicos

AUTORA: MARINA DE LIMA FONTES

ORIENTADOR: ANDREI MOROZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora, área: Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDREI MOROZ (Participação Virtual)

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP – Araraquara

Profa. Dra. MARLI LEITE DE MORAES (Participação Virtual)

Instituto de Ciência e Tecnologia / Universidade Federal de São Paulo - São José dos Campos

Profa. Dra. ELENICE DEFFUNE (Participação Virtual)

Departamento de Especialidades Cirúrgicas e Anestesiologia / Faculdade de Medicina - UNESP

Botucatu

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participação Virtual)

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP – Araraquara

Araraquara, 24 de agosto de 2021.

Dedicatória

Para aquela que sempre foi a minha guia e inspiração. A você mãe, que me ensinou a ser forte, corajosa e a lutar pelos meus sonhos. Meu amor por você transcende qualquer barreira. Você sempre viverá em mim.

Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram e participaram deste trabalho e, em especial:

À Deus por toda a sua amorosidade e por ter me amparado em todos os momentos felizes e desafiadores desta trajetória.

À minha família, em especial ao meu pai Eduardo, que deu o máximo de si por nós e por ter sempre sido meu maior exemplo de bondade, resiliência e luta. Pai, obrigada por ser quem é e por ter me ensinado tanto!

Às minhas irmãs Lais e Laura, pelo companheirismo, pelas trocas e por sempre estarem presentes em minha vida. Obrigada por todos os conselhos e apoio, sem vocês a vida não teria graça!

A minha vó/mãe Rosentina, pela grande mulher que é e por todo seu amor por nós.

Ao meu lindo e amado sobrinho Davi: quando você nasceu, tudo renasceu em mim. Neste 1 ano e meio que eu venho acompanhando suas descobertas, eu pude vivenciar tantas alegrias. Você me dá forças e calma pra seguir em frente.

Ao meu eterno namorado Lucas, por ser meu companheiro, parceiro e por ter sempre me apoiado e vibrado comigo em todas minhas decisões e conquistas. Te amo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Andrei Moroz, pela confiança, conhecimento compartilhado e por aceitar fazer parte desta caminhada. Minha eterna gratidão por ter me aberto as portas do LabmAb!

Às professoras Maria José Giannini e Ana Marisa Fusco Almeida, por abrirem as portas da proteômica e por todas as contribuições científicas.

Aos meus grandes amigos Tamires e Tiago. A amizade e lealdade de vocês é um presente de Deus. Obrigada por estarem sempre presentes!

Aos meus colegas e amigos que participaram ativamente desta conquista, em especial, a Is, Franciny, Kelvin, Breno, Bianca, Larissa, Carol Mineira, Carol Vaso, Lariane, Nathália, Niura, Carol Pires, Laranja e Panta. Obrigada por todos os cafés, encontros, partilhas diárias e por todo o apoio e ombro amigo.

Aos técnicos Cláudia, Paulo, Flávio, Ana e Matheus: muito obrigada por toda a ajuda!

Aos membros da banca examinadora por aceitarem participar deste momento e colaborarem com seus conhecimentos.

À Instituição de Ensino, ao programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à farmácia e a todos os funcionários do apoio administrativo.

À Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo (Processo: 2017/20404-0) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Mais uma vez, obrigada!

EPÍGRAFE

“Quem quiser ter um céu sem tempestades ou caminhos sem acidentes, não terá grande êxito na sua existência”. Augusto Cury

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é um dos cânceres com maior taxa de incidência no Brasil e no mundo. Até o momento não existem terapias efetivas e biomarcadores tumorais específicos para o câncer de próstata metastático resistente a castração. Esse fenótipo tumoral está associado com uma mortalidade superior a 50%. Nesse cenário, o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico que exibam elevada sensibilidade e especificidade para a detecção de células tumorais circulantes, antes mesmo da confirmação de novos focos metastáticos, tornou-se uma das grandes buscas das pesquisas oncológicas atuais. A geração dos testes *points of care*, com ênfase para os imunossensores eletroquímicos, revolucionou o campo da medicina diagnóstica, uma vez que estes dispositivos oferecem baixos limites de detecção, necessidade de baixos volumes de amostras, aliado à sua elevada especificidade e portabilidade. Sendo assim, o objetivo desse estudo focou-se na obtenção de AcMms reativos a biomarcadores de células tumorais prostáticas metastáticas por meio do emprego da técnica de imunização subtrativa de múltiplas tolerizações combinada a técnica de mascaramento de epítomos, e o posterior acoplamento destas biomoléculas na confecção dos imunossensores eletroquímicos. Para a execução do protocolo de imunização, utilizou-se células não tumorais prostáticas (RWPE-1) como tolerógeno e células prostáticas com potencial metastático (PC-3) como imunógeno. A técnica empregada consistiu em quatro ciclos de tolerização utilizando o fármaco ciclofosfamida (Cy), que atuou na depleção de linfócitos T e B reativos a epítomos comuns, imunodominantes, compartilhados entre ambas as linhagens. Durante a etapa de tolerização utilizando células RWPE-1, e posterior tratamento com a Cy nas doses de 200-150 mg/kg, constatou-se extensos efeitos adversos nos camundongos imunizados, levando ao óbito de 100% destes. A fim de aumentar a performance do protocolo, utilizou-se a concentração de 100 mg/kg de Cy, que garantiu a sobrevivência de 66,6% dos camundongos imunizados, e a indução da imunossupressão imunológica, conforme constatado pela diminuição acentuada do número de leucócitos circulantes/mm³ no sangue periférico, e a não reatividade dos anticorpos policlonais (pAbs) obtidos do soro frente as células RWPE-1 por ensaio de citometria de fluxo. No entanto, após a etapa de imunização com a linhagem tumoral, a reatividade dos pAbs foi confirmada por ambas as linhagens. Dos 756 híbridos gerados após a técnica de fusão celular, apenas 8 deles mantiveram-se reativos contra a linhagem metastática até o último *screening*. A clonagem celular levou a geração de quatro AcMms murinos que seguiram para os ensaios de caracterização. Através do ensaio de *immunoblotting* constatou-se o reconhecimento de proteínas com diferentes massas moleculares (45, 48, 55 e 62kDa) nos extratos proteicos da linhagem PC-3 e o mesmo não foi observado nos extratos da linhagem RWPE-1. Além disso, os AcMms derivados dos clones PC3SS 2-7A50 e PCS4-2-5C11 demonstraram uma demarcação difusa do citoplasma de células PC-3 em ensaio de imunofluorescência indireta. Os imunossensores eletroquímicos garantiram o reconhecimento de células PC-3, conforme observado pela alteração dos perfis voltamétricos, assim como pelo aumento substancial das diferenças das áreas (u.a.) dos voltamogramas. Desta maneira os protótipos desenvolvidos mostraram-se promissores para o diagnóstico de células tumorais metastáticas.

Palavras-chave: câncer de próstata; anticorpos monoclonais murinos; ciclofosfamida; imunodiagnóstico.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is one of the cancers with the highest incidence rate in Brazil and worldwide. Thus far, there are no effective therapies and specific tumor biomarkers for castration-resistant metastatic prostate cancer. This tumor phenotype is associated with approximately 50% of mortality. In this scenario, the development of novel diagnostic tools that exhibit high sensitivity and specificity for detecting circulating tumor cells, even before the confirmation of new metastatic foci, has become one of the most goals of current oncological research. The development of points of care devices, with more attention to electrochemical immunosensors, that revolutionized the field of diagnostic medicine by offer low detection limits, low sample volumes, and their exhibited high specificity and portability. Therefore, the purpose of this study was focused on obtaining murine monoclonal antibodies (mAbs) reactive to metastatic prostate cell biomarkers through the use of multiple tolerization subtractive immunization associated with epitope masking technique and subsequent the coupling of these biomolecules in electrochemical immunossensor development. For the execution of the immunization protocol, non-tumor prostatic cells (RWPE-1) were used as tolerogen and prostate cells with metastatic potential (PC-3) as immunogen. The technique included four cycles of tolerization using the cyclophosphamide (Cy), that deplete T and B lymphocytes reactive to common, immunodominant epitopes shared between both cell lines. During the tolerization step using RWPE-1 cells and treatment with cyclophosphamide (Cy) at doses of 200-150 mg/kg, extensive adverse effects were observed in the immunized mice, leading to 100% death of them. In order to increase technique performance, a concentration of 100 mg/kg of Cy was used, which allowed the survival of 66.6% of the immunized mice, and the induction of immunosuppression state, as evidenced by the marked decrease in the number of circulating leukocytes/mm³ in peripheral blood, and the non-reactivity of polyclonal antibodies (pAbs) obtained from serum against RWPE-1 cells by flow cytometry assay. However, after the immunization step with the tumor cells (PC-3), the reactivity of pAbs was confirmed for both cell lines. Of the 756 hybrids generated after the cell fusion technique, only 8 of them remained reactive against the metastatic tumor cell until the last screening. Cell cloning led to the generation of four murine mAbs that followed to characterization assays. It was confirmed the recognition of proteins with different molecular weights (45, 48, 55 and 62kDa) in the protein extracts from PC-3 cells, while the same was not observed in the extracts from RWPE-1 cells. Furthermore, murine mAbs derived from clones PC3SS 2-7A50 and PCS4-2-5C11 demonstrated a cytoplasm diffuse dyed of PC-3 cells in an indirect immunofluorescence assay. Electrochemical immunosensors were feasible to detect PC-3 cells, as observed in modification of cyclic voltammogram profiles, as well by the substantial increase in the differences in the areas (u.a.) of the voltammograms. In this way, the prototypes developed proved to be promising for the diagnosis of metastatic tumor cells.

Key-words: prostate cancer; murine monoclonal antibodies; cyclophosphamide; immunologic tests;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A próstata é uma glândula acessória exclusiva do sistema genital masculino. Sua localização se dá inferiormente a bexiga urinária, circundo toda a uretra proximal e parte da uretra distal (esquerda). A glândula pode ser dividida em três principais zonas: zona de transição, central e periférica (direita).48
- Figura 2.** Principais mecanismos biológicos associados com a progressão tumoral e o processo metastático.52
- Figura 3.** Os anticorpos são imunoglobulinas compostas por 2 tipos de cadeias polipeptídicas: cadeia pesada e cadeia leve. Cada imunoglobulina é formada pela ligação de 2 cadeias pesadas e 2 cadeias leves através de pontes dissulfeto. As porções representadas pelas regiões VH e VL é que determinam a ligação ao antígeno e a especificidade dos AcMs.57
- Figura 4.** Componentes básicos de um biossensor: elemento de reconhecimento, transdutor e o sistema eletrônico, que amplifica o sinal gerado e o transforma em dados que podem ser interpretados e mensurados.61
- Figura 5.** Eletrodo impresso de carbono (Modelo DS 110, *Metrohm*®) e seus 3 principais constituintes: eletrodo de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência.62
- Figura 6.** Protocolo MTSI empregando 4 ciclos de tolerização. A etapa de tolerização iniciou-se no dia 0 e foi até o dia 53. A etapa de imunização iniciou-se no dia 68, com o término no dia 96.66
- Figura 7.** Fusão celular usando o método da tecnologia de hibridomas.72
- Figura 8.** Técnica de clonagem celular por diluição limitante. A concentração de células depositadas em cada poço da placa de 96 poços foi de 0,75 células.74
- Figura 9.** Obtenção da solução de fibroína de seda. O preparo da solução de SF seguiu os seguintes passos: fragmentação dos casulos, remoção da sericina, dissolução das fibras de fibroína e por último, diálise e centrifugação para a remoção do excesso de sais e o ajuste da concentração do polímero.79
- Figura 10.** a) Linhagem epitelial de adenocarcinoma prostático de grau IV (PC-3, ATCC-1435™); b) Linhagem epitelial não tumoral da próstata (RWPE-1, BCRJ0389); c) Linhagem de mieloma murino (Sp2/0, BCRJ0227).81
- Figura 11.** a) Camundongo controle que recebeu apenas o veículo; b) Camundongo imunizado durante a etapa de tolerização com a Cy (200mg/kg). c) Camundongo com pronunciada curvatura corporal após tratamento com a Cy.83
- Figura 12.** Gel *SDS-PAGE* 12% dos pAbs purificados e digeridos com pepsina. Mk: marcador de massa molecular; IgG murina: IgG1 murino comercial (*Elabscience*™, E-AB-F09793A); E12: eluato 12 (1,12mg/mL); E13: eluato 13 (1,2 mg/mL); pAb dialisado; pAb digerido e pepsina.89
- Figura 13.** Extração total do baço localizado na cavidade abdominal, no hipocôndrio esquerdo entre a nona e décima segunda costelas (lado esquerdo). O órgão apresenta cor púrpura-avermelhada. Isolamento dos esplenócitos após processamento do órgão (lado direito).94

Figura 14. Controle de células mielomatosas murinas (Sp2/0): a esquerda trata-se das células vivas, logo após a fusão celular e a direita trata-se das células mortas após 3 dias da adição do aditivo HAT.....	96
Figura 15. Timectomia – extração total do timo localizado na porção superior do mediastino e posterior ao osso esterno (lado esquerdo). Isolamento dos timócitos após processamento do órgão (lado direito).	96
Figura 16. Micrografias demonstrando a geração de colônias de hibridomas após técnica de fusão celular. As imagens foram retiradas após (a) 7 dias, (b) 10 dias, (c) 12 dias e (d) 14 dias após a fusão celular.....	97
Figura 17. Seleção de clones únicos após técnica de diluição limitante: a) colônia única de hibridoma depositada no poço da placa de 96 poços após 4 dias da clonagem (20x); b) aumento do número de células derivadas de um único clone de hibridoma após 7 dias de cultivo em meio MC (100x).	101
Figura 18. Gel <i>SDS PAGE</i> 12% dos AcMms purificados sob condições desnaturantes. M: marcador de massa molecular (<i>BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder</i>) contendo proteínas de 235kDa-25kDa; Raia 1: IgG1 murino comercial; Raia 2: AcMm derivado do clone PC3SS 27A50; Raia 3: AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C2; Raia 4: AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C11; Raia 5: AcMm derivado do clone PC3S4-2-5E4; Raia 6: alíquota não ligada (<i>flow-through</i>) na coluna de imunoafinidade.	105
Figura 19. Gel <i>SDS-PAGE</i> 12% de ambos os extratos proteicos das linhagens PC-3 e RWPE-1. M: marcador de peso molecular (<i>BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder</i>) contendo proteínas de 235kDa-25kDa. Raia 1: extrato proteico da linhagem PC-3 sob condições não desnaturantes; Raia 2: extrato proteico da linhagem PC-3 sob condições desnaturantes; Raia 3: extrato proteico da linhagem RWPE-1 sob condições não desnaturantes; Raia 4: extrato proteico da linhagem RWPE-1 sob condições desnaturantes.....	107
Figura 20. <i>Western Blot</i> dos AcMms derivados dos clones PC3SS7A50, PC3S4-2-5C2, PC3S4-2-5C11 e PC3S4-2-5E4. M: marcador de peso molecular (<i>BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder</i>) contendo proteínas de 235kDa-25kDa. O AcMm derivado do clone PC3SS 2A750 demarcou uma proteína de aproximadamente 45kDa, enquanto o AcMm derivado do clone PC3SS-2-5C11 demarcou uma proteína de aproximadamente 62 kDa. Ambas as marcações foram específicas para os extratos da linhagem PC-3. Os demais AcMms derivados dos híbridos PC3S4-2-5C2 e PC3S4-2-5E4 levaram a marcações inespecíficas e inconclusivas. O anticorpo primário anti- β actina (<i>Elabscience™</i> , E-AB-30422) demarcou bandas de aproximadamente 43kDa em ambos os extratos proteicos. A revelação foi realizada pelo método quimioluminescente utilizando luminol na presença do anticorpo secundário <i>Goat anti-mouse</i> IgG peroxidase/HRP (<i>Elabscience™</i> , E-AB-1001).	108
Figura 21. Imunofluorescência indireta de células tumorais (PC-3) imunomarcadas com o AcMm derivado do clone PC3SS 2-7A50 (1:50): a) células PC-3 em campo claro; b) marcação nuclear em azul fluorescente utilizando <i>Hoechst™</i> ; c) imunomarcagem com o AcMm derivado do clone PC3S4-2 7A50, na presença do anticorpo secundário <i>Goat anti-mouse</i> IgG conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a imunomarcagem nuclear e a imunomarcagem com	

AcMm 7A50 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x. 110

Figura 22. Imunofluorescência indireta de células tumorais (PC-3) imunomarcadas com o AcMm derivado do clone PC3S4 2-5C11 (1:50): a) células PC-3 em campo claro; b) marcação nuclear em azul utilizando *Hoechst*TM; c) imunomarcação com o AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C11, na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a marcação nuclear e a imunomarcação com o AcMm 5C11 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x. 111

Figura 23. Imunofluorescência indireta de células não tumorais (RWPE-1) imunomarcadas com o AcMm derivado do clone PC3SS 2-7A50 (1:50): a) células RWPE-1 em campo claro; b) marcação nuclear em azul fluorescente utilizando *Hoechst*TM; c) imunomarcação com o AcMm derivado do clone PC3S4-2 7A50 na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a marcação nuclear e a imunomarcação com o AcMm 7A50 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x. 112

Figura 24. Imunofluorescência indireta de células não tumorais (RWPE-1) imunomarcadas com o AcMm derivado do clone PC3S4-2 5C11 (1:50). a) células RWPE-1 em campo claro; b) marcação nuclear em azul fluorescente utilizando *Hoechst*TM; c) imunomarcação com o AcMm derivado do clone PC3S4-2 5C11, na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a marcação nuclear e a imunomarcação com o AcMm 5C11 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x. 113

Figura 25. Imunofluorescência indireta de células tumorais (PC-3) imunomarcadas com o AcMm IgG murino anti-CD147 humano (*Elabscience*TM) (1:100). a) células PC-3 em campo claro; b) marcação nuclear em azul fluorescente utilizando *Hoechst*TM; c) imunomarcação com AcMm IgG anti-CD147 na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a marcação nuclear e a imunomarcação com o AcMm anti-CD147 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x. 114

Figura 26. Imunofluorescência indireta de células não tumorais (RWPE-1) imunomarcadas com o AcMm IgG anti-CD147 humano (*Elabscience*TM) (1:100). a) células RWPE-1 em campo claro; b) marcação nuclear em azul fluorescente de células RWPE-1 utilizando *Hoechst*TM; c) imunomarcação com AcMm IgG anti-CD147 na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a marcação nuclear e a imunomarcação com o AcMm anti-CD147 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x. 115

Figura 27. Teste de adsorção de células sobre filmes montados utilizando lâminas de quartzo. A adsorção das células PC-3 e A549 foi avaliada após 1 hora de incubação sob os filmes de SF/AcMms: a) Campo da lâmina contendo filmes de SF e AcMm derivado do clone PC3SS 2-7A50 na presença de células PC-3 após 3 lavagens consecutivas com PBS; b) Campo da lâmina contendo filmes de SF e AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C11 na presença de células PC-

3 após 3 lavagens consecutivas com PBS; c) Campo da lâmina contendo filmes de SF e AcMm derivado do clone PC3SS 2-7A50 na presença de células A549 após 3 lavagens consecutivas com PBS; d) Campo da lâmina contendo filmes de SF e AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C11 na presença de células A549 após 3 lavagens consecutivas com PBS.	116
Figura 28. Perfis voltamétricos dos SPCE modificados com os filmes de SF e os AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7A50 e PC3S4-2-5C11 em meio tampão fosfato pH 7.4. Velocidade de varredura 50 mV.s ⁻¹ . Foram construídos 2 imunossensores utilizando o AcMm PC3SS-2-7A50 (EA1 e EA2) e outros 2 imunossensores utilizando o AcMm PC3S4-2-5C11 (EB1 e EB2).	118
Figura 29. Perfis voltamétricos dos SPCE modificados com os filmes de SF e AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7A50 e PC3S4-2-5C11 na presença das células tumorais prostáticas PC-3 (EA1 e EB1) e células tumorais pulmonares A549 (EA2 e EB2) em meio tampão fosfato pH 7.4. Velocidade de varredura 50 mV.s ⁻¹	120
Figura 30. Perfis voltamétricos dos SPCE modificados com os filmes de SF e AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7A50 e PC3S4-2-5C11 na presença das células tumorais prostáticas PC-3 (EA3 e EB3) e células tumorais pulmonares A549 (EA4 e EB4) em meio tampão fosfato pH 7.4. Velocidade de varredura 50 mV.s ⁻¹	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reatividades (DOs) dos pAbs frente a linhagem não tumoral (RWPE-1) pelo ensaio de <i>whole-cell</i> ELISA. Os soros policlonais foram obtidos após 10 dias do término da 2ª e 4ª tolerização. O asterisco demarca os animais que vieram a óbito antes da coleta de sangue periférico.....	91
Tabela 2. Porcentagem de células PC-3 imunomarcadas com os anticorpos primários (pAbs) oriundos dos soros dos camundongos imunizados e dos controles não imunes. A mensuração da imunofluorescência foi conduzida a partir da ligação dos anticorpos primários com o anticorpo secundário <i>Goat anti-mouse</i> IgG conjugado com FITC (1:200) pelo ensaio de citometria de fluxo. Somente o animal 4 não passou pelo mascaramento de epítomos.	92
Tabela 3. Porcentagem de células RWPE-1 imunomarcadas com os anticorpos primários (pAbs) oriundos dos soros dos camundongos imunizados e controles não imunes. A mensuração da imunofluorescência foi conduzida a partir da ligação dos anticorpos primários com o anticorpo secundário <i>Goat anti-mouse</i> IgG conjugado com FITC (1:200) pelo ensaio de citometria de fluxo. Somente o animal 4 não passou pelo mascaramento de epítomos.....	92
Tabela 4. Reatividade dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 1º <i>screening</i> referente a fusão celular do animal 2. Os resultados apresentados tratam-se tanto dos híbridos que foram selecionados pela técnica de citometria de fluxo, assim como por <i>whole-cell</i> ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.	98
Tabela 5. Reatividade dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 2º <i>screening</i> referente a fusão celular do animal 2. Os resultados apresentados tratam-se dos híbridos que foram selecionados por <i>whole-cell</i> ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.....	98
Tabela 6. Reatividade dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 3º <i>screening</i> referente a fusão celular do animal 2. Os resultados apresentados tratam-se dos híbridos que foram selecionados por <i>whole-cell</i> ELISA e que seguiram para o estabelecimento do banco celular de trabalho. A leitura foi conduzida em 492 nm.	99
Tabela 7. Reatividade (DOs) dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 1º <i>screening</i> referente a fusão celular do animal 4. Os resultados apresentados tratam-se dos híbridos que foram selecionados por <i>whole-cell</i> ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.....	99
Tabela 8. Reatividade (DOs) dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 2º <i>screening</i> referente a fusão celular do animal 4. Os resultados apresentados tratam-se dos híbridos que foram selecionados por <i>whole-cell</i> ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.....	100
Tabela 9. Reatividade (DOs) dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 3º <i>screening</i> referente a fusão celular do animal 4. Os resultados apresentados tratam-se dos híbridos que foram selecionados por <i>whole-cell</i> ELISA e que seguiram para o estabelecimento do banco celular de trabalho. A leitura foi conduzida em 492 nm.	100
Tabela 10. Reatividade (DOs) dos AcMms secretados pelos clones de hibridomas durante o 1º <i>screening</i> . Os resultados apresentados foram obtidos através do ensaio de <i>whole-cell</i> ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.	102

Tabela 11. Reatividade (DOs) dos AcMms secretados pelos clones de hibridomas durante o 2º <i>screening</i> frente ambas as linhagens: RWPE-1 e PC-3. Os resultados apresentados foram obtidos através do ensaio de <i>whole-cell</i> ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.	103
Tabela 12. Resultados das concentrações em mg/mL dos eluatos derivados dos AcMms após a purificação em coluna de imunoafinidade. Os AcMms foram derivados dos clones PC3SS-2-7A50, PC3S4-2-5C2, PC3S4-2-5-C11 e PC3S4-2-5E4. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro de microplacas, modelo <i>Epoch</i> TM , com leitura em 260/280 nm.....	106
Tabela 13. Área dos voltamogramas (u.a.) dos SPCE modificados com SF e SF/AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7-A50 e PC3S4-2-5C11.	118
Tabela 14. Áreas dos voltamogramas (u.a.) na presença de células PC-3 e A549. As diferenças das áreas dos voltamogramas foram calculadas utilizando as áreas obtidas após a adsorção celular (A) subtraído das áreas dos voltamogramas após adsorção dos anticorpos (A ₀) sobre os eletrodos SPCE.	121
Tabela 15. Área dos voltamogramas (u.a.) dos SPCE modificados com SF/AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7-A50 e PC3S4-2-5C11 e após a adsorção de células PC-3 e A549. As diferenças das áreas dos voltamogramas foram calculadas utilizando as áreas obtidas após a adsorção de células (A) subtraído das áreas dos voltamogramas após a adsorção da SF/AcMms (A ₀) sobre os SPCE.	123

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Mensuração do peso dos camundongos BALB/c submetidos ao protocolo MTSI empregando a concentração de 200 mg/kg peso corporal de Cy. A pesagem foi realizada no início de cada tolerização e após 10 dias do seu término. A análise estatística demonstrou uma diferença significativa entre o grupo controle não imune quando comparado ao grupo imunizado ($p= 0,0001$). A análise estatística empregada foi o *One Way ANOVA* pós teste de Bonferroni..... 83
- Gráfico 2.** Mensuração do peso dos camundongos BALB/c submetidos ao protocolo MTSI empregando a concentração de 150 mg/kg de Cy. A pesagem foi realizada no início de cada tolerização e após 10 dias do seu término. A análise estatística demonstrou uma diferença significativa entre o grupo controle não imune quando comparado ao grupo imunizado ($p= 0,0009$). A análise estatística empregada foi o *One Way ANOVA* pós teste de Bonferroni. 84
- Gráfico 3.** Mensuração do peso dos camundongos BALB/c submetidos ao protocolo MTSI empregando a concentração de 100 mg/kg peso corporal de Cy. A pesagem foi realizada no início de cada tolerização e após 10 dias do seu término. Não houve diferença estatística significativa entre o grupo controle não imune em relação ao grupo imunizado. A análise estatística empregada foi o *One Way ANOVA* pós teste de Bonferroni..... 85
- Gráfico 4.** Curvas de sobrevivência estimadas pelo método de *Kaplan-Meier* em relação aos três diferentes protocolos de imunização utilizando diferentes concentrações de ciclofosfamida. A análise estatística através do teste de *Log-rank* demonstrou diferença estatisticamente significativa na porcentagem de sobrevivência entre as agendas de imunização que foram empregadas as concentrações de 200 mg/kg de Cy *versus* 100 mg/kg de Cy ($p= 0,131$) e entre as agendas empregando 150 mg/kg de Cy *versus* 100 mg/kg de Cy ($p= 0,0395$)..... 86
- Gráfico 5.** Contagem de leucócitos totais/mm³ em camundongos submetidos a três diferentes protocolos empregando as concentrações de 200, 150 e 100 mg/kg peso corporal de Cy. O n° de leucócitos totais/mm³ dos animais que receberam o fármaco foi comparado com a contagem de leucócitos dos animais controles da mesma agenda de imunização. A análise estatística empregando *ANOVA* pós teste de Bonferroni demonstrou diferença estatística significativa em todas as agendas. Grupos imunizados com as concentrações de 200 mg/kg e 150mg/kg ($p < 0,0001$); grupo imunizado com a concentração de 100mg/kg ($p = 0,0002$)..... 87
- Gráfico 6.** Mensuração do peso dos camundongos BALB/c durante a imunização com o imunógeno. A pesagem foi realizada no início de cada imunização e após 7 dias do seu término. A análise estatística demonstrou uma diferença significativa entre o grupo controle não imune quando comparado ao grupo imunizado ($p < 0,0001$). A análise estatística empregada foi o *One Way ANOVA* pós teste de Bonferroni. 90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Protocolo MTSI utilizando a concentração de 100 mg/kg Cy combinada a técnica de mascaramento de epítomos.	68
Quadro 2. Composição do gel de poliacrilamida composto por duas fases: gel de resolução (<i>running</i>) e o gel empilhamento (<i>stacking</i>).	76
Quadro 3. Constituintes do tampão de amostra (tampão dissociante) utilizado no preparo prévio da amostra a ser submetida a técnica de eletroforese.	76
Quadro 4. Dados das fusões celulares a partir da retirada do baço dos camundongos 1,2, 4 e 6 submetidos a técnica MTSI combinada ao mascaramento de epítomos. Somente o animal 4 não passou pelo mascaramento de epítomos.	95
Quadro 5. Dados referente ao número de poços retidos e que passaram por três <i>screenings</i> consecutivos durante a seleção de hibridomas estáveis e reativos ao imunógeno.	97

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMs – Anticorpos monoclonais;

AcMm – Anticorpo monoclonal murino;

ADCC - *Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity* / Citotoxicidade mediada por Células Dependente de Anticorpos;

AMACR - *Alfa metilacil CoA racemase*;

AR – *Androgen Receptor* / Receptor Androgênico;

ARV-7 - *Androgen Receptor Splicing Variant 7* / Variante do Receptor Androgênico 7;

$\alpha v\beta 3$ - *Alpha-v beta-3*;

ATCC - *The American Type Culture Collection*;

BMP-6 - *Bone Morphogenetic Protein-6* / Proteína Morfogênica do Osso-6;

BRCA2 - *Breast Cancer 2*;

BPE - *Bovine Pituitary Extract* / Extrato de Pituitária Bovina;

CAMs - *Cell adhesion molecules* / Moléculas de adesão celular;

CaP – Câncer de próstata;

CD45 - Cluster of Differentiation 45;

CDC - *Complement-Dependent Cytotoxicity* / Citotoxicidade Dependente de Complemento;

CDR - *Complementarity-Determining Region* / Região Determinante de Complementariedade;

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais;

CKs - *Cytokeratins* / Citoqueratinas

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

CRPC - *Castration-Resistant Prostate Cancer* / Câncer de próstata resistente à castração

CTCs – *Circulating Tumor Cells* / Células Tumorais Circulantes;

Cy – *Cyclophosphamide* / Ciclofosfamida;

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DOs – Densidades Ópticas;

EpCAM - *Epithelial cell adhesion molecule* / Molécula de adesão celular epitelial;

ET-1 - *Endothelin 1* / Endotelina 1;

ERG - *ETS-related gene*;

Fab – *Fragment antigen binding* / Fragmento de ligação ao antígeno;

Fc- *fragment crystallizable* / fragmento cristalizável;

FDA - *Food and Drug Administration* / Administração de Alimentos e Medicamentos;

FITC- *Fluorescein* / Fluoresceína;

HAT - *Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine*/ Hipoxantina-Aminopterina-Timidina;

HGPIN - *High-grade prostatic intraepithelial neoplasia* / Hiperplasia prostática intraepitelial de alto grau;

HGPRT- *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*/ Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase;

HLA-1 - *Human leukocyte antigen 1* / Antígeno leucocitário humano 1;

HPB – Hiperplasia prostática benigna;

HRP - *Horseradish peroxidase*;

HT - *Hypoxanthine-Thymidine*/ Hipoxantina-Timidina;

IDE - *Interdigitated electrodes* / Eletrodos interdigitados;

IgG- Imunoglobulina da classe G;

INCA – Instituto Nacional de Câncer;

IRRAS - *Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy* / Espectroscopia de reflexão absorção no infravermelho;

i.p – Intraperitoneal;

i.v – Intravenosa;

LbL – *Layer-by-layer* / Camada por camada;

MC – Meio Completo;

ME – Meio Enriquecido;

MEC – Matriz Extracelular;

MCRPC - *Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer* / Câncer de próstata Metastático Resistente à Castração;

MMPs - *Matrix Metalloproteinases* / Metaloproteinases de Matriz;

MTSI - *Multiple Tolerization Subtractive Immunization* / Imunização Subtrativa de Múltiplas Tolerizações;

NTSR1 - *Neurotensin receptor 1*;

OPD - *O-Phenylenediamine* / O-Fenilenodiamina;

pAbs - *polyclonal antibodies* / anticorpos policlonais;

PAP - *Prostatic Acid Phosphatase* / Fosfatase Ácida Prostática;

PARP-1 - (*Poly [ADP-ribose] polymerase 1*) / Poli (ADP-ribose) Polimerase 1;

PBS - *Phosphate Buffered Saline*/ Solução de Fosfato Tamponada;

PD-L1 - *Programmed Cell Death Ligand 1*/ Ligante de Morte Celular Programada 1;

PEI – Polietilenimina;

PI3K-AKT - *Phosphatidylinositol 3-kinase*/ Fosfatidilinositol 3-Quinase;

PCA3- *Prostate cancer antigen 3* / Gene 3 do Câncer de Próstata;

PLL – Poli-lisina;

PSA - *Prostate-Specific Antigen* / Antígeno Prostático Específico;

PSCA – *Prostate stem cell antigen* / Antígeno das Células Tronco Prostáticas;

PSMA – *Prostate-Specific membrane antigen* / Antígeno de Membrana Específico Prostático;

PTEN - *Phosphatase and Tensin Homolog* / Fosfatase Homóloga à Tensina;

RANKL - *Receptor Activator of Nuclear factor-kappa beta ligand* / Ligante de ativação do Receptor Nuclear NF-kappa β ;

rEGF – *Recombinant epidermal growth factor* / Fator de crescimento epidermal recombinante;

SCC - Sobrenadante de Cultura Celular;

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*/ Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio;

SF - *Silk Fibroin* / Fibroína de Seda;

SFB – Soro Fetal Bovino;

IS - Imunização Subtrativa;

SPF - *Specific Pathogen Free* / Livre de Patógenos;

SPCE – *Screen-Printed Carbon Electrode*/ Eletrodo Impresso de Carbono;

SPIDEs - *Screen-Printed Interdigitated Electrodes*/ Eletrodos Impressos Interdigitados;

TBS-T - *Tris Buffered Saline – Tween*;

TGF- β – *Transforming Growth Factor beta* /Fator de Crescimento Transformante beta;

TMPRSS₂ - *Transmembrane Serine Protease 2* / Serino protease Transmembrana 2 humana;

VC- Voltamogramas Cíclicos;

VEGFR - *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* / Receptor do fator de crescimento endotelial vascular;

VEGF-C - *Vascular Endothelial Growth Factor C* / Fator de Crescimento Endotelial Vascular C;

VEGF-D - *Vascular endothelial growth factor D* / Fator de Crescimento Endotelial Vascular D;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	46
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	47
2.1 Anatomia e fisiologia prostática	47
2.2 O câncer de próstata.....	48
2.2.1 Câncer de próstata metastático resistente à castração	51
2.3 Biomarcadores no diagnóstico do CaP	53
2.4 Anticorpos Monoclonais e Imunização Subtrativa	56
2.5 Biossensores.....	60
3. OBJETIVOS	64
3.1 Objetivo geral	64
3.2 Objetivos específicos	64
4. MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1 Expansão das linhagens celulares	65
4.2 Protocolo de Imunização - MTSI.....	65
4.2.1 Geração de (Fab) ₂ para a realização do protocolo MTSI combinado ao mascaramento de epítomos.....	67
4.2.2 Avaliação dos aspectos físicos e fisiológicos dos camundongos BALB/c	68
4.2.3 Avaliação da eficiência do protocolo subtrativo induzido pela Cy.....	69
4.3 Timectomia – Isolamento de <i>feeder cells</i>	70
4.4 Fusão celular – Tecnologia de hibridomas	70
4.5 Seleção dos hibridomas secretores de anticorpos reativos a linhagem tumoral prostática	72
4.6 Clonagem celular e seleção de hibridomas secretores de AcMms reativos a linhagem tumoral prostática	73
4.7 Expansão dos clones de hibridomas	74
4.7.1 Clarificação e purificação dos AcMms derivados dos clones de hibridomas	75
4.7.2 Verificação da eficiência da purificação dos AcMms por <i>SDS-PAGE</i>	75
4.8 Caracterização dos AcMs	77
4.8.1 Verificação do peso molecular aproximado dos antígenos reconhecidos pelos AcMms por <i>Western Blot</i>	77
4.8.2 Verificação da localização celular dos antígenos reconhecidos pelos AcMms por Imunofluorescência Indireta.....	78

4.9	Confecção dos imunossensores eletroquímicos.....	78
4.9.1	Extração e solubilização da fibroína de seda	78
4.9.2	Avaliação da adsorção celular em lâminas de quartzo.....	79
4.9.3	Montagem dos imunossensores eletroquímicos pela técnica LbL	80
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1	Aspectos morfológicos das linhagens celulares.....	81
5.2	Protocolo MTSI: avaliação dos aspectos físicos e fisiológicos dos camundongos BALB/c durante a tolerização	82
5.2.1	Protocolo MTSI: avaliação dos aspectos físicos durante a imunização dos camundongos com células PC-3 mascaradas utilizando (Fab) ₂	88
5.2.2	Verificação da eficiência dos protocolos subtrativos: durante a tolerização e após a imunização com o imunógeno.....	90
5.3	Fusão celular e <i>screening</i> dos hibridomas	94
5.4	Clonagem celular e <i>screening</i> dos clones de hibridomas	101
5.5	Avaliação da eficiência da purificação dos AcMms em coluna de imunoafinidade	104
5.6	Identificação dos pesos moleculares aproximados dos antígenos reconhecidos pelos AcMms.....	106
5.7	Identificação da localização celular dos antígenos reconhecidos pelos AcMms.....	109
5.8	Imunossensores eletroquímicos: avaliação da capacidade de detecção de células PC-3 utilizando a técnica de voltametria cíclica	115
6.	CONCLUSÕES.....	124
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
	ANEXO I.....	135
	ANEXO II.....	136

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é um dos cânceres com maior taxa de incidência e a sexta causa de mortes por câncer no mundo. Em 2020, o número de novos casos alcançou o marco de 1,41 milhões mundialmente, sendo 65.840 confirmados somente no Brasil. Apesar da maior parte dos pacientes serem diagnosticados com o CaP localizado, uma porcentagem destes casos (4-5%) evolui para um fenótipo tumoral denominado de câncer de próstata metastático resistente à castração (MCRPC). Para esse prognóstico não existem biomarcadores efetivos e terapias curativas, impactando diretamente na diminuição da sobrevivência dos pacientes. Nesse cenário, há uma busca incessante pelo desenvolvimento de novos dispositivos capazes de detectarem células metastáticas na corrente sanguínea antes mesmo da formação de focos metastáticos. A identificação precoce destas células possibilita melhorias na conduta clínica, especialmente voltada à implementação de terapias personalizadas e mais efetivas. Imunossensores eletroquímicos exibem diversas vantagens para serem explorados nesse contexto, uma vez que são plataformas ultrasensíveis, que oferecem medições rápidas, elevada especificidade, seletividade, reprodutibilidade e custo-benefício. Sendo assim, essa tese teve como objetivo a geração de anticorpos monoclonais murinos (AcMms) voltados à identificação de novos biomarcadores do MCRPC e a posterior aplicação destas moléculas na confecção de imunossensores eletroquímicos. Ademais, a técnica de imunização denominada imunização subtratativa de múltiplas tolerizações foi empregada como método inédito durante a geração de AcMms preferencialmente voltados a antígenos exclusivos da linhagem prostática PC-3.

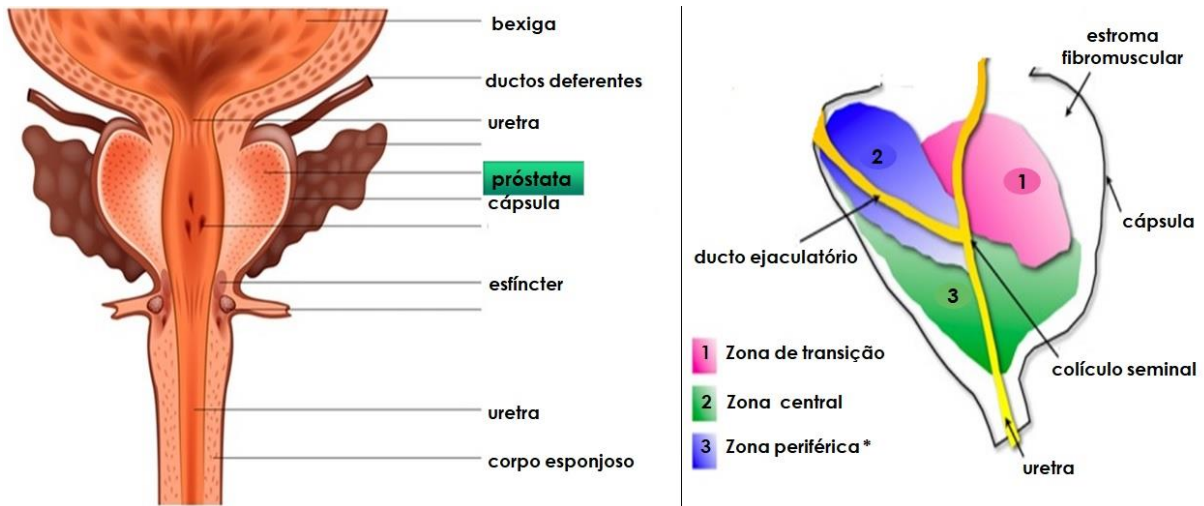
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia e fisiologia prostática

A próstata é um órgão genital masculino localizado na pelve, ficando sob a base do pênis, posicionada inferiormente à bexiga urinária e anteriormente ao reto. Apresenta aproximadamente três centímetros de comprimento e pesa, em média, 20 gramas, sendo majoritariamente composta por epitélio glandular (TANAGHO & MCANINCH, 2007). Anatomicamente pode ser dividida em três zonas distintas: zona periférica, zona central e zona de transição (McNEAL, 1981; AMIS, 1994; SCHAUER *et al.*, 2011). A zona periférica representa 70% do volume prostático, sendo o principal foco de desenvolvimento dos adenocarcinomas da próstata, seguido da zona central, formada predominantemente por ductos ejaculatórios, constituindo 25% do volume total e, por último, a zona de transição, que corresponde a aproximadamente 5% do seu volume e constitui a principal região de surgimento da hiperplasia prostática benigna (HPB) (SCHAUER *et al.*, 2011; LESLIE & SIREF, 2017). Funcionalmente, a próstata é responsável por secretar um terço do líquido seminal total, mantendo o pH alcalino do sêmen e favorecendo a motilidade dos espermatozoides após a ejaculação, bem como garantindo a viabilidade dos mesmos no canal vaginal (AMIS, 1994; SCHAUER *et al.*, 2011). A glândula prostática é andrógeno-dependente, ou seja, necessita particularmente de testosterona e seu principal metabólito, a di-hidrotestosterona, para que a proliferação e renovação celular tecidual sejam mantidas. Esse processo exige a expressão do receptor androgênico (AR), localizado tanto na porção de células estromais, como luminais do tecido, sendo esta porção também responsável pela secreção do antígeno específico da próstata (PSA) e da fosfatase ácida (PAP), ambas proteases dosadas no soro humano, como métodos preditivos para a detecção de pacientes com câncer de próstata (CaP) e em casos de monitoramento durante e pós-tratamento da malignidade (AMIS, 1994; VLACHOSTERGIOS *et al.*, 2017). A Figura 1

elucida a posição anatômica e as três diferentes zonas que constituem a glândula prostática.

Figura 1. A próstata é uma glândula acessória exclusiva do sistema genital masculino. Sua localização se dá inferiormente a bexiga urinária, circundo toda a uretra proximal e parte da uretra distal (esquerda). A glândula pode ser dividida em três principais zonas: zona de transição, central e periférica (direita).



Fonte: Adaptado de McNeal, (1981); Amis, (1994).

2.2 O câncer de próstata

O CaP é a malignidade mais comumente diagnosticada em homens, sendo a terceira causa de morte mais prevalente por câncer em homens (SONNENBURG & MORGANS, 2018). Nos EUA, as estimativas para o ano de 2020 foram de 191.930 novos casos e 33.330 mortes acometidas pela doença (SIEGEL *et al.*, 2020). No Brasil, com exceção do câncer de pele não-melanoma, o CaP possui as maiores taxas de incidência no sexo masculino, com 65.840 novos casos reportados no ano de 2020 (INCA, ESTIMATIVA, 2020). De acordo com o Instituto Nacional Americano do Câncer, todo homem americano possui um risco de 11,6% no desenvolvimento do CaP clinicamente significativo (LESLIE & SIREF, 2017).

Entre os principais fatores de risco relacionados com o desenvolvimento da doença, a idade, etnia e histórico familiar são frequentemente apontados. A incidência aumenta com o avanço da idade, afetando em 95% dos casos, homens acima dos 50 anos. Sabe-se que mais de 80% dos homens desenvolverão o CaP aos 80 anos de idade, mesmo que a malignidade se apresente indolente e tenha pouca influência na sobrevida dos pacientes (LESLIE *et al.*, 2017).

A etnia está diretamente relacionada com uma maior predisposição ao surgimento do adenocarcinoma de próstata, acometendo na maior parte dos casos homens negros, seguido de brancos, hispânicos e asiáticos, respectivamente. Levantamentos apontam que as taxas de incidência na população negra chegam a 158,3 casos diagnosticados a cada 100.000 homens

afrodescendentes e uma mortalidade duas vezes maior quando comparada a homens brancos (LESLIE *et al.*, 2017; RAWLA, 2019).

O histórico familiar também demonstra influência considerável nas taxas de desenvolvimento do CaP, visto que homens com parentes de primeiro grau (pai ou irmão) acometidos pela doença irão apresentar o dobro de susceptibilidade em manifestarem a patologia, quando comparados com a população em geral (LESLIE & SIREF, 2017). A hereditariedade genética associada a fatores ambientais, incluindo infecções, dieta e aumento do índice de massa corporal também contribuem para o aumento do número de casos (COONEY, 2017).

Dentre as alterações pré-malignas envolvidas com o desenvolvimento da malignidade, somente a neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (HGPIN) é aceita como fator preditor do CaP. Essa lesão demonstra uma atipia celular severa ao longo dos ductos prostáticos e ácinos, caracterizado histologicamente pela presença de células luminais coradas por hematoxilina, estratificação e contorno irregular nuclear, cromatina hipercromática e nucléolos proeminentes. Somado a esses achados, a confirmação da lesão se dá pela imunomarcagem tecidual, visando sobretudo a identificação da citoqueratina de alto peso molecular (34BE12) presente na porção basal do tecido e do marcador citoplasmático P504S, também conhecido como AMACR (*Alfa metilacil CoA racemase*). Ambos são observados na HGPIN, no entanto a perda do marcador 34BE12 foi relatada em 56% dos pacientes diagnosticados com a neoplasia. Levantamentos apontam que a confirmação de HGPIN em amostras de biópsias está associada com um risco de 25% na detecção do CaP em exames subsequentes (BOSTWICK & CHENG, 2012; ZHOU, 2018).

No que se refere ao adenocarcinoma prostático, este pode ser definido pela proliferação descontrolada das células tumorais, preferencialmente na zona periférica do órgão. As células tumorais multiplicam-se e crescem, espalhando-se ao redor do tecido, podendo atingir regiões extra capsulares ou permanecerem localizadas por décadas (DE MARZO *et al.*, 2003; LESLIE & SIREF, 2017). A presença de padrões glandulares atípicos observáveis no exame de biópsia, classifica a doença de acordo com o escore de *Gleason*, em baixo, médio ou alto risco de agressividade. A biópsia é somente recomendada após o exame de toque retal ter demonstrado áreas palpáveis endurecidas ou aspecto assimétrico da glândula, na presença de sintomas geniturinários e dosagens elevadas de PSA, comumente acima de 4 ng/mL (LESLIE *et al.*, 2017).

O escore de *Gleason* é graduado de 1 a 5, considerando o grau de diferenciação celular. A presença de células diferenciadas, que exibem a arquitetura tecidual semelhante ao tecido

saudável, recebem a pontuação 1, enquanto células que perdem gradativamente o fenótipo original, tornando-se indiferenciadas, recebem pontuações maiores, que aumentam de acordo com a magnitude da alteração observada. Devido a heterogeneidade do tecido prostático, a pontuação de *Gleason* é obtida pela soma dos dois padrões dominantes, chegando a uma pontuação máxima de 10. Quanto maior for o escore, pior será o prognóstico do paciente (LESLIE *et al.*, 2017).

Junto à esta classificação, o CaP tem seu estadiamento/extensão tumoral estabelecido por meio do sistema TNM (*Tumour, Node, Metastasis*). Esse sistema garante determinar a extensão da doença em tumor primário (estágio T), ausência ou presença do envolvimento de linfonodos (estágio N) e ausência ou presença de metástases (estágio M). Com base nesta diretriz, a conduta clínica pode prever as melhores estratégias de tratamento e evolução do CaP. O estadiamento se dá em quatro categorias, que vai de T1 a T4. Os estágios T1 e T2 determinam a presença do câncer confinado ao órgão, que geralmente representa 5% ou mais do tecido removido, acometendo um ou ambos os lados da próstata. A classificação T3 remete-se ao câncer que já atingiu regiões extracapsulares, podendo ou não ter alcançado as vesículas seminais, enquanto o estágio T4 é aquele onde as células cancerígenas já atingiram tecidos adjacentes, como o esfíncter uretral, o reto, a bexiga ou a parede pélvica (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015).

A habilidade dos tumores prostáticos de manterem sua proliferação e desenvolvimento mesmo na presença de níveis sub fisiológicos de testosterona circulante, constitui um dos principais fatores envolvidos com o avanço da doença. Esse fenômeno leva ao surgimento do fenótipo tumoral designado como câncer prostático resistente à castração (CRPC). Pacientes com essa condição clínica exibem um aumento expressivo dos níveis séricos de PSA durante a implementação da terapia antiandrogênica ou mesmo após a prostatectomia radical, sugerindo a ativação desregulada do AR (KARANTANOS *et al.*, 2013; LUGENG *et al.*, 2020). A taxa de pacientes que inicialmente apresentam o CaP primário sensível a hormonioterapia, que progridem e tornam-se resistentes à castração, seja ela química ou cirúrgica, é de aproximadamente 8 a 25% (SILVESTRI *et al.*, 2016; LESLIE & SIREF, 2017), com uma sobrevida média de 9 a 30 meses (KARANTANOS *et al.*, 2013; LUGENG *et al.*, 2020).

2.2.1 Câncer de próstata metastático resistente à castração

Apesar da incidência de metástases demonstrar uma taxa relativamente baixa (4-5%) em pacientes diagnosticados com CaP, os tumores que adquirem a capacidade de metastatizar, evoluem para o fenótipo tumoral denominado de câncer de próstata metastático resistente à castração (MCRPC). Esse fenótipo está associado com uma redução ainda maior nas taxas de sobrevivência, de 9 a 13 meses, com uma mortalidade superior a 50% (KIRBY *et al.*, 2011; LUGENG *et al.*, 2020). A metástase é um termo que se refere ao processo pela qual células malignas adquirem a capacidade de migrarem do tecido tumoral primário para um novo tecido/órgão, constituindo a formação de um tumor secundário. Esse processo requer a ativação de diferentes eventos biológicos induzidos pelas células tumorais e seu microambiente, dos quais são controlados pelo montante de anormalidades genéticas adquiridas ao longo da progressão tumoral (ARYA *et al.*, 2006).

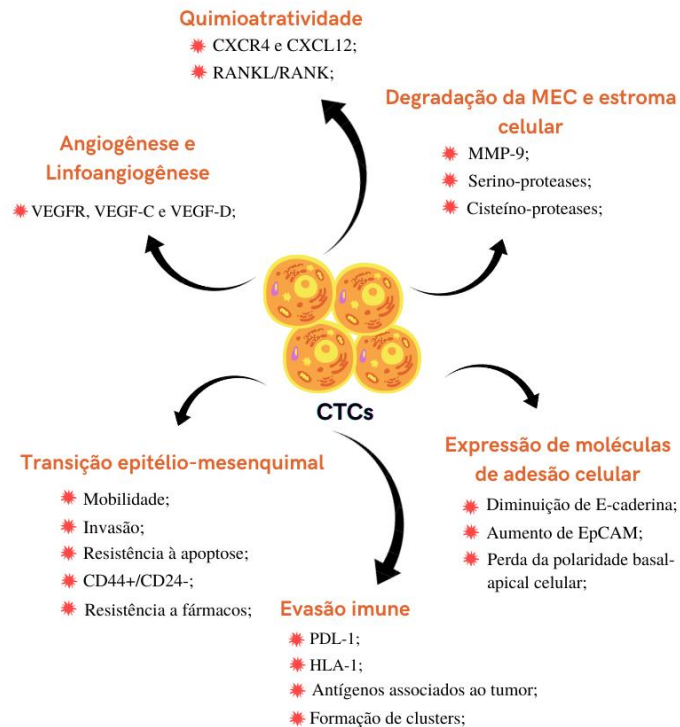
No MRCPC, o tecido ósseo é o principal sítio metastático diagnosticado em 80% dos casos, uma vez que a ligação entre o plexo venoso prostático que drena para as veias vertebrais, predispõe o direcionamento das células tumorais para esse órgão (COLEMAN, 2006; NORGAARD *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2017). No entanto, compostos quimioatrativos, incluindo a secreção de proteínas morfogênicas do osso (BMP-6), endotelina-1 (ET-1) e a expressão aumentada do ligante de ativação do receptor nuclear NF- κ B (RANKL) também participam desse processo (ARYA *et al.*, 2006; MARKIEWICZ & ZACZEK, 2017).

Dentre todas as alterações genéticas que foram desvendadas no MRCPC, a maior parte delas está associada a diferentes mutações no AR, abrangendo desde o ganho de função e sensibilidade aumentada a níveis baixos de andrógenos, bem como a afinidade por ligantes não androgênicos, ampliações, geração de novas variantes, desregulação de co-reguladores e aberrações pós-traducionais. Concomitantemente, outras vias que são independentes de AR, incluindo alterações na via PI3K-AKT (que possui papel na regulação da proliferação celular, sobrevivência e angiogênese) foi constatada em 100% dos tumores metastáticos e em 42% dos tumores prostáticos resistentes à castração. Defeitos em genes que promovem o reparo de danos no DNA, incluindo BRCA2 (*breast cancer 2*), TMPRSS₂ (*transmembrane serine protease 2*) fusionada a proteína ERG (*ETS-related gene*) e PARP-1 (*Poly [ADP-ribose] polymerase 1*) também são apontados como potenciais indutores da progressão tumoral (ARYA *et al.*, 2006; MARKIEWICZ & ZACZEK, 2017).

A figura 2 demonstra os principais eventos biológicos que ocorrem durante o processo metastático, possibilitando a entrada das células tumorais na corrente sanguínea e o posterior

direcionamento para órgãos distantes do seu local de origem. Uma vez que essas células conseguem atingir a circulação, elas são designadas como células tumorais circulantes (CTCs).

Figura 2. Principais mecanismos biológicos associados com a progressão tumoral e o processo metastático.



Fonte: elaborado pela própria autora

O processo metastático ocorre mediante a ativação de fatores pró-angiogênicos (VEGFR, VEGF-C e VEGF-D), que acarretam na indução da angiogênese e linfoangiogênese e conseqüentemente na formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos. A perda na expressão de moléculas de adesão celular (CAMs), em conjunto com a síntese de metaloproteinases de matriz (MMPs), serino-proteases e cisteíno proteases, atuam na degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC), possibilitando a subsequente invasão celular. Mecanismos de evasão imune são disparados, incluindo a baixa expressão de antígenos associados a tumores, a baixa expressão do antígeno leucocitário humano (HLA-1) e o aumento da expressão do ligante de morte celular programada 1 (PD-L1). O direcionamento destas células até o sítio secundário por gradientes quimiotáticos, garantem a entrada e a permanência das CTCs no sítio secundário. A diferenciação em tipos celulares específicos é mediada pela transformação

epitélio-mesenquimal, que dentre todas as suas atribuições, assegura a sobrevivência no tecido para o qual foram direcionadas (ARYA *et al.*, 2006; MARKIEWICZ & ZACZEK, 2017).

Apenas 1% das CTCs conseguem se estabelecer em órgãos secundários, mesmo havendo evidências que comprovem a presença destas células em diferentes tecidos, sem a capacidade de manifestar quaisquer alterações clínicas. Todavia, a identificação destas células é vista como um importante fator prognóstico, especialmente para a implementação de terapias mais personalizadas e eficientes, visando o aumento da sobrevida global dos pacientes (GALLETTI *et al.*, 2014; BRONCY & PATERLINI-BRÉCHOT, 2019).

Diferentes métodos para o isolamento das CTCs já foram descritos, incluindo a filtração por tamanho e a centrifugação por gradiente de densidade, embora apenas o CellSearch® foi aprovado até o momento pela agência americana de regulamentação de medicamentos (FDA). Essa plataforma baseia-se no isolamento e quantificação de CTCs por *beads* magnéticas conjugadas a um anticorpo reativo a molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), que se encontra superexpressa em células metastáticas. Aliado a esse método, são realizadas imunomarcações contra as citoqueratinas (CKs) 8,18 e 19 e ao marcador leucocitário CD45 (COSTA *et al.*, 2014; BRONCY & PATERLINI-BRÉCHOT, 2019).

Entretanto, o uso desta tecnologia ainda gera muitos questionamentos, uma vez que CTCs podem não expressar as CKs devido a transição epitélio-mesenquimal ou até mesmo pela diferenciação neuroendócrina. Considerando que sua presença na corrente sanguínea é rara, podendo chegar a uma única CTC em $1 \times 10^{6-9}$ células sanguíneas, há uma necessidade imediata pela descoberta de novos marcadores associados com a progressão de CTCs, sobretudo aliado a ferramentas de diagnóstico que sejam mais sensíveis e ofereçam limites mínimos de detecção (POTDAR & LOTEY, 2015; MICALIZZI *et al.*, 2017).

2.3 Biomarcadores no diagnóstico do CaP

Idealmente, o alvo tumoral deve apresentar como principais características: (1) possuir um papel essencial no estabelecimento e manutenção do fenótipo tumoral maligno; (2) apresentar-se pouco expresso ou ausente em órgãos e tecidos saudáveis; (3) ter a capacidade de ser reprodutível e mensurado em amostras clínicas de pacientes acometidos pela malignidade; (4) na redução/inibição de sua atividade antigênica, conduzir uma resposta clínica favorável a uma parcela significativa da população acometida pela doença (ROSS *et al.*, 2005).

No âmbito diagnóstico, os marcadores tumorais intimamente relacionados com a origem e desenvolvimento do tumor prostático e com o avanço da doença metastática são: o PSA e suas isoformas, a PAP, o antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), o antígeno de

células-tronco prostático (PSCA) e alguns marcadores moleculares, entre eles, o gene 3 do câncer de próstata (PCA3) e a *TMPRSS2* fusionada ao fator de transcrição ERG. Além destes, estão incluídos o PTEN e a variante do receptor androgênico (ARV-7) (KRETSCHMER & TILKI, 2017).

Discorrendo sobre esses marcadores, sabe-se que a dosagem de PSA sérico implementada desde 1986, permitiu um aumento considerável na detecção de pacientes com CaP, embora tenha se tornado um método superestimado na prática clínica, pois demonstra sensibilidade limitada, com um aumento considerável de biópsias desnecessárias, que conduz a achados de doença benigna e indolente e conseqüentemente ao sobretratamento (KRETSCHMER & TILKI, 2017). O exame 4Kscore® tem como princípio a mensuração das quatro formas metabolizáveis do PSA (PSA total, PSA livre, PSA intacto e a calicreína humana). No entanto, sua confiabilidade e segurança ainda são duvidosas, visto que as diferentes isoformas do PSA se elevam em condições não malignas da próstata, tais como inflamação, infecção, trauma e na HPB. Além disso, homens com o CaP podem apresentar níveis de PSA normais (STATTIN *et al.*, 2015; KRETSCHMER & TILKI, 2017).

A PAP, descoberta muito antes do PSA, tornou-se alvo da primeira imunoterapia voltada ao tratamento do CaP. *Sipuleucel-T* (Provenge®) aprovado pelo FDA em 2010, é indicado para pacientes com MCRPC. Trata-se de uma vacina baseada na infusão de células dendríticas autólogas, previamente ativadas frente a exposição de porções antigênicas derivadas da enzima PAP. A ideia central dessa terapia está na promoção de respostas imunes inatas e humorais efetivas, dirigidas contra as células tumorais. Todavia, essa terapia não permite a cura dos pacientes nesta condição, atuando somente no aumento da sobrevida global em 4,1 meses (HIGANO *et al.*, 2010).

O PSMA, cuja expressão se dá tanto no tecido prostático saudável, quanto tumoral, tem como função aumentar os níveis de folato na glândula, contribuindo para o seu crescimento, sobretudo na condição do adenocarcinoma prostático. Seu uso na prática clínica iniciou-se com o desenvolvimento do *Capromab* (ProstaScint®), um anticorpo monoclonal murino anti-PSMA, da classe IgG, que reconhece seu domínio intracelular. Essa molécula associada ao radioisótopo índio (In^{111}), funciona como um radiomarcador destinado a exames de imagem, tais como tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET-TC), que permite a detecção de metástases em tecidos moles. No CaP primário, o PSMA pode ser utilizado para o prognóstico da doença, uma vez que sua expressão aumentada predispõe maiores chances de recidivas. Entretanto, o PSMA também se eleva em casos de HGPIN, carcinoma de bexiga, esôfago e pâncreas (KIESS *et al.*, 2015; VLACHOSTERGIOS *et al.*, 2017).

O PSCA também foi cogitado como potencial alvo diagnóstico no MCRPC. O aumento progressivo de sua expressão ocorre à medida que o tumor adquire capacidade de invasão. Diferentes estudos clínicos demonstram o uso de anticorpos dirigidos contra o PSCA, tanto para o diagnóstico de metástases ósseas, assim como para cirurgias guiadas em pacientes submetidos a prostatectomia radical, a fim de detectar focos residuais de células tumorais (YU *et al.*, 2013; KNOWLES *et al.*, 2014; SONN *et al.*, 2016). Porém, esse antígeno, assim como o PSMA, não apresenta especificidade pelo tecido prostático, podendo ser detectado em tumores não prostáticos, tais como o carcinoma de bexiga e pâncreas (VLACHOSTERGIOS *et al.*, 2016).

O Progenesa® foi o primeiro teste molecular aprovado pelo FDA que mensura o RNA não codificante do PCA3 em amostras de urina de pacientes submetidos inicialmente ao exame de toque retal. O PCA3 tornou-se um importante biomarcador do CaP, atuando principalmente na modulação da atividade transcricional de receptores androgênicos e na manutenção das células tumorais em atividade proliferativa durante a terapia antiandrogênica. Além disso, diferente do PSA, o antígeno não se eleva em estados inflamatórios ou infecciosos da glândula (TOMLIS *et al.*, 2011; KRETSCHMER & TILKI, 2017). Entretanto, não foi encontrada relação significativa entre os níveis elevados de PCA3 e a agressividade tumoral (KRETSCHMER & TILKI, 2017).

Tomlins *et al.*, (2016) demonstraram que o fenótipo TMPRSS₂:ERG é expresso em mais de 50% dos casos de CaP, principalmente em pacientes jovens com a doença em estágio inicial. O principal papel desses genes está associado com a modulação do fator de crescimento transformante β (TGF- β), que atua em diferentes processos biológicos, entre eles, proliferação, diferenciação, migração, adesão e apoptose celular. Nesse contexto, o *Michigan Prostate Score* (MiPS) lançado em 2013, agrupa três biomarcadores antigênicos da próstata: PSA, PCA3 e os genes de fusão TMPRSS₂:ERG. Ademais, foi demonstrado que a presença dessa mutação gênica não possui ligação considerável com os riscos de recidiva a longo prazo e mortalidade aumentada do CaP (KRETSCHMER & TILKI, 2017).

O teste molecular que apresenta como marcadores gênicos o PTEN/TMPRSS₂:ERG, busca detectar o CaP em estágio inicial em pacientes inicialmente diagnosticados com HGPIN. A superexpressão do gene TMPRSS₂:ERG, somado a ausência de PTEN, indica uma maior agressividade tumoral. Todavia esse exame não demonstrou correlação significativa com a doença em estágio avançado, limitando seu uso (KRETSCHMER & TILKI, 2017; SHIPITSIN *et al.*, 2014a/2014b).

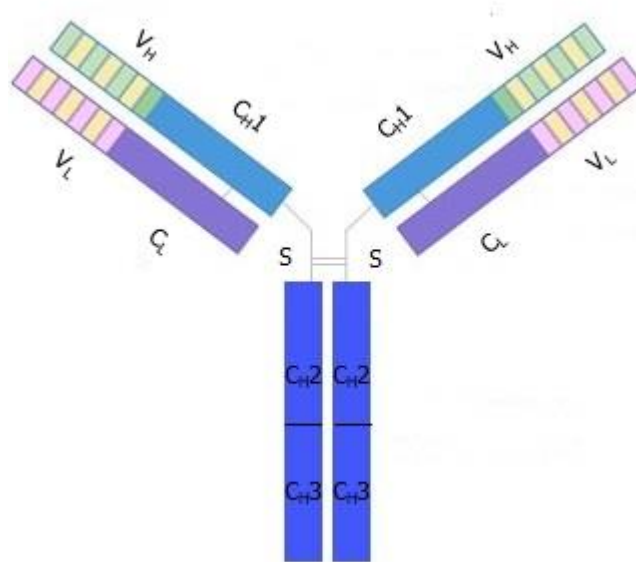
A expressão de AR-V7 por células tumorais da próstata em pacientes com MCRPC pode chegar a 15% dos casos, visto que em pacientes que fazem uso de abiraterona (fármaco de segunda geração, bloqueador da enzima CYP17), sua expressão pode atingir 55%. Nesse sentido, a presença desta variante correlaciona-se com um pior prognóstico, demonstrando resistência a terapia empregada. Porém ainda não está claro se a presença de ARV-7 está aliada ao aumento da resistência terapêutica ou representa uma sinalização ao estresse gerado no microambiente tumoral durante a terapia (ANTONARAKIS *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2019).

Fica evidente que os métodos propostos para o diagnóstico da doença tanto em seu estágio inicial, como avançado, ainda carecem de elevada sensibilidade e especificidade. Além disso, pouco se sabe sobre a validade desses exames na diminuição do número de biópsias realizadas indiscriminadamente, bem como na redução da morbidade vinculada ao MCRPC (KRETSCHMER & TILKI, 2017). Dessa maneira, muitos aspectos e marcadores fenotípicos do MCRPC ainda precisam ser desvendados.

2.4 Anticorpos Monoclonais e Imunização Subtrativa

Os anticorpos monoclonais (AcMs) são imunoglobulinas naturalmente produzidas pelo sistema de imune, mediante diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. Por serem originados de um único clone de linfócitos B, exibem especificidade por um único determinante antigênico. A arquitetura básica destas biomoléculas, cuja constituição se dá por 4 cadeias polipeptídicas, sendo duas delas pesadas (H, do inglês *Heavy*), e duas cadeias leves (L, do inglês *Light*), é representada na figura 3. As cadeias leves são compostas pelos domínios constante (C_L) e variável (V_L), enquanto as cadeias pesadas possuem 5 domínios ao todo, sendo estes: V_H, C_{H1}, região da dobradiça, C_{H2} e C_{H3}. A região variável composta por 110-130 aminoácidos garante a especificidade do anticorpo a determinada partícula antigênica. Em contrapartida, a região constante se repete entre todas as moléculas de anticorpo, diferindo somente entre diferentes classes. Essa estrutura é estabilizada por pontes dissulfeto (S) e interações não covalentes (JANEWAY *et al.*, 2001).

Figura 3. Os anticorpos são imunoglobulinas compostas por 2 tipos de cadeias polipeptídicas: cadeia pesada e cadeia leve. Cada imunoglobulina é formada pela ligação de 2 cadeias pesadas e 2 cadeias leves através de pontes dissulfeto. As porções representadas pelas regiões VH e VL é que determinam a ligação ao antígeno e a especificidade dos AcMs.



Fonte: elaborado pela própria autora

Com o advento da tecnologia de hibridomas originalmente publicada em 1975 pelos pesquisadores Georges Köhler e César Milstein, a geração de diferentes AcMs por células híbridas cultivadas *in vitro*, possibilitou a rápida disseminação destas moléculas a diferentes imunoenaios, incluindo os ensaios de imunoabsorção enzimática, *western blot*, citometria de fluxo e *cell sorting*. Além disso, os AcMs têm sido empregados em exames de imagem por meio da conjugação com diferentes moléculas, incluindo radioisótopos e fluoróforos. No setor terapêutico, lideram a quinta posição de fármacos com maior aprovação pela FDA. Estima-se que o mercado de AcMs alcançará o marco de 300 bilhões de dólares em 2025 (LU *et al.*, 2020).

A obtenção dos AcMs pelas técnicas clássicas de imunização é realizada na maior parte das vezes utilizando dado antígeno purificado, diferencialmente expresso em determinada doença. O emprego de técnicas laboriosas e dispendiosas, incluindo genômica, proteômica e metabolômica são necessárias, embora não potencializem o isolamento de componentes antigênicos com considerável imunogenicidade, ideal para a ativação de uma resposta imune humoral efetiva. Além disto, é sabido que resposta humoral é majoritariamente voltada ao reconhecimento de um número limitado de antígenos imunodominantes e imunogênicos (ZIJLSTRA *et al.*, 2003).

Sharpe *et al.*, (1985) demonstrou pela primeira vez que a tolerância neonatal poderia aumentar a seleção de anticorpos altamente específicos contra determinantes celulares de interesse. O principal conceito da técnica de imunização neonatal fundamenta-se no processo de imaturidade imunológica que estes animais se encontram durante os primeiros dias de vida, logo após o nascimento, não sendo capazes de distinguir o que é próprio (*self*) e não próprio (*non-self*) do organismo. Dessa maneira, quando o animal recém-nascido é exposto a um *pool* de antígenos, ativa-se um estado de tolerância imune contra estes determinantes antigênicos, que é mantido durante a vida adulta. A subsequente imunização, com um segundo antígeno, já na vida adulta, gera uma resposta imunológica capaz de reconhecê-lo de maneira eficiente, além de distingui-lo entre outros antígenos, mesmo que haja semelhanças fenotípicas entre eles.

A partir disso foram desenvolvidas técnicas de imunização baseadas na indução da tolerização, conhecidas como técnicas de imunização subtrativa (IS), que incluem a tolerização neonatal, a tolerância de zona alta e a tolerização induzida por um agente quimioterápico. Matthew & Sandrock (1987) propuseram o uso da ciclofosfamida (Cy) como modulador da resposta imune, uma vez que o seu principal metabólito, a mostarda fosforamida, atua na eliminação de células em proliferação, especificamente de células originadas da medula óssea, gerando um estado de imunossupressão celular. Dessa maneira, a Cy elimina linfócitos T e B estimulados por determinada partícula/antígeno imunogênico, bloqueando as respostas imunes (celular e humoral) geradas, que impedem a produção de anticorpos ou até mesmo a sua eliminação.

A IS induzida pela Cy requer o uso de dois antígenos que compartilham de algumas características fenotípicas (mesma origem tecidual), denominados de tolerógeno e imunógeno. Ambos são compostos imunogênicos capazes de ativarem o sistema imune. O tolerógeno refere-se a qualquer material antigênico utilizado durante o passo de tolerização, que não se pretende obter anticorpos, pois geralmente carregam determinantes antigênicos comumente expressos em diferentes tipos celulares, de pouco valor na progressão de doenças relevantes. Já o imunógeno pode ser entendido como uma substância antigênica utilizada durante a imunização, pós-tolerização, que se deseja obter os anticorpos, uma vez que expressam antígenos ocultos ou fracamente imunogênicos, comumente envolvidos com processos biológicos de importância clínica. Tanto o tolerógeno como o imunógeno podem ser representados como células inteiras, lisados de membrana celular, proteínas purificadas e peptídeos (DE ALMEIDA *et al.*, 2018).

O raciocínio por trás dessa técnica é que após a imunização com o tolerógeno, ocorrerá uma cascata de ativação da resposta imune inata e celular, que conduzirá a processos de

diferenciação, maturação e proliferação clonal de linfócitos T, B e células de memória. No entanto, com a administração da Cy em doses consecutivas, 24 e 48 horas após a imunização, é induzido um estado de imunossupressão celular, que impede a maturação e proliferação destes linfócitos. A imunização com o tolerógeno, repetidas vezes, seguido da administração da Cy, maximiza a tolerância imune contra diferentes epítomos antigênicos imunodominantes, resultando na eliminação de grande parte dos linfócitos reativos, de não interesse. Finalmente, após essa etapa, acredita-se que a imunização com o imunógeno, tais como células tumorais, aumentaria grandemente a probabilidade de ativação de linfócitos T e B, e conseqüentemente a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos secretores de anticorpos voltados a antígenos tumorais (DE ALMEIDA *et al.*, 2018).

Brooks *et al.*, (1993) foi o primeiro a demonstrar a eficiência da IS na obtenção de AcMs reativos contra determinantes antigênicos presentes na linhagem de carcinoma epidermóide humano metastática (M⁺Hep3). Nesse estudo, a linhagem não metastática do mesmo carcinoma (M⁻Hep3) foi utilizada durante a etapa de tolerização com a Cy, enquanto a linhagem metastática do mesmo carcinoma foi utilizada como imunógeno. Os AcMs obtidos foram capazes de inibir o processo metastático em modelo animal, mas foram incapazes de interferir no crescimento tumoral, demonstrando a elevada especificidade destas moléculas contra antígenos cuja expressão é observada somente em células metastáticas.

Estudos posteriores também constataram a eficiência da técnica de imunização subtrativa induzida pela Cy na obtenção de anticorpos relevantes e direcionados contra antígenos associados a diferentes processos de malignidade, virulência e potencial metastático, dos quais podemos destacar: Hooper *et al.*, (2003); Rasmussen & Ditzel (2009); Hamabashiri *et al.*, (2011); Yasumoto *et al.*, (2012) e Jin *et al.*, (2012).

Até o momento, nenhum estudo foi relatado quanto ao uso da SI induzida pela Cy com múltiplas etapas de tolerização (*Multiple Tolerization Subtractive Immunization*, MTSI) para a geração de anticorpos voltados a identificação de novos biomarcadores associados ao carcinoma prostático metastático.

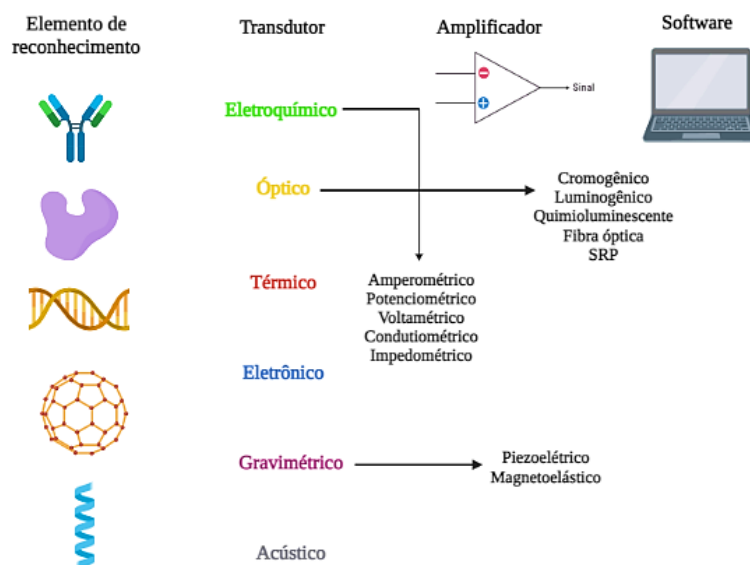
2.5 Biossensores

A micro e nanotecnologia possibilitaram o desenvolvimento de sensores portáteis, com medições rápidas, sem carecer de elevada seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade e custo-benefício. A portabilidade e miniaturização destes dispositivos permitiram o desenvolvimento dos testes *point-of-care*, também conhecidos como testes remotos. Na área médica, os testes remotos contribuem para a medição de analitos fisiologicamente importantes

e conseqüentemente para a melhoria da conduta clínica. A escolha do sensor ideal depende diretamente da natureza do analito a ser identificado (NARESH & LEE, 2021).

O biossensor é um dispositivo composto basicamente por três componentes: o elemento de reconhecimento, sendo este um componente biológico que atuará na ligação ao analito de interesse. Dentre os bioelementos que vem sendo explorados na construção de biossensores, podemos citar as enzimas, anticorpos, sondas de DNA/RNA, aptâmeros ou até mesmo nanopartículas. O transdutor é o segundo componente necessário para a confecção de um biossensor. Sua função está na conversão da energia química gerada durante a interação entre o analito-biorreceptor em um segundo sinal que pode ser detectado e mensurado. De acordo com o elemento de reconhecimento, estes são classificados em sensores enzimáticos, imunossensores, apta-sensores, sensores de células inteiras, e de acordo com os princípios de operação dos transdutores, eles passam a ser designados como sensores eletroquímicos, ópticos, térmicos, eletrônicos, gravimétricos e acústicos, respectivamente. O terceiro e não menos importante componente é o sistema eletrônico, que processa os sinais gerados pelo transdutor em dados que podem ser mensurados (BHALLA *et al.*, 2016). A figura 4 exemplifica os componentes básicos que compõem o biossensor:

Figura 4. Componentes básicos de um biossensor: elemento de reconhecimento, transdutor e o sistema eletrônico, que amplifica o sinal gerado e o transforma em dados que podem ser interpretados e mensurados.

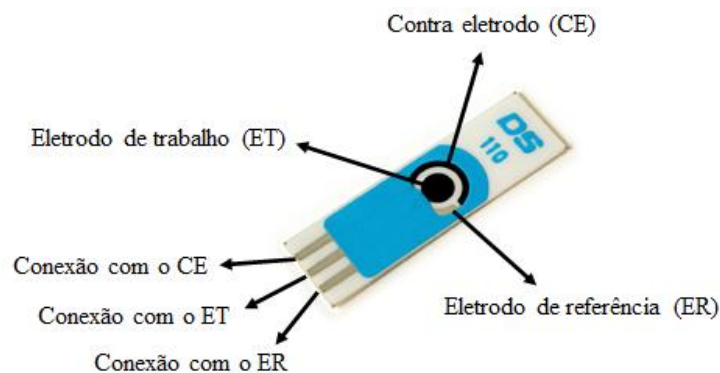


Fonte: elaborado pela própria autora

Os biossensores eletroquímicos demonstram um vasto campo de aplicação, especialmente por oferecem a necessidade de pequenos volumes de amostras, baixo custo de produção, respostas rápidas e boa performance. Os sinais eletroquímicos convertidos pelo transdutor após o biorreconhecimento podem ser detectáveis em termos de tensão, corrente, impedância ou capacitância. Levando em consideração os princípios de transdução de sinal, os biossensores eletroquímicos serão classificados em potenciométricos, amperométricos, condutimétricos, impedimétricos e voltamétricos (RICCI *et al.*, 2012).

A escolha da célula eletrolítica utilizada para a construção do biossensor eletroquímico vai ditar a sua sensibilidade, o custo de sua produção e a possibilidade de adotar diferentes métodos de imobilização. Os eletrodos disponíveis para essa aplicação são feitos de metais inertes, platina, ouro, fibra de carbono, grafeno ou carbono vítreo (PAL *et al.*, 2017). Os eletrodos impressos, especialmente os eletrodos impressos de carbono (SPCE) ganharam popularidade devido ao seu *design* simples, fácil produção, custo reduzido, necessidade de pequenos volumes do analito, e sensibilidade considerável em reações de oxirredução. A figura 5 representa um SPCE do modelo DS110, Metrohm®. Este modelo possui três constituintes principais, sendo eles: o eletrodo de trabalho, contra eletrodo e o eletrodo de referência. Somente o eletrodo de referência é composto por prata, enquanto os dois primeiros são compostos por carbono. O carbono possui como principais vantagens, excelente condutividade elétrica, redução da contaminação da superfície eletrolítica, elevada resistência mecânica e uma superfície sensora com maior rugosidade, proporcionando um aumento da área superficial, onde o bioelemento é depositado.

Figura 5. Eletrodo impresso de carbono (Modelo DS 110, Metrohm®) e seus 3 principais constituintes: eletrodo de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência.



Fonte: elaborado pela própria autora

Na maior parte dos casos, a biomolécula de reconhecimento é imobilizada em um revestimento adicionado acima do eletrodo de trabalho, tais como esferas magnéticas, partículas de ouro e polímeros. O revestimento geralmente é feito a partir da montagem de camadas ordenadas na superfície do eletrodo, que levam a formação de monocamadas automontadas. Isso é alcançado com o uso de partículas de ouro, embora o uso deste metal acabe afetando a produção em larga escala, por ser de fato mais caro. Métodos alternativos utilizando matrizes poliméricas oferecem diversos benefícios, uma vez que essas matrizes possuem redes porosas com elevada resistência mecânica e área superficial, facilitando a incorporação de biomoléculas (RICCI *et al.*, 2012). Esse revestimento inicial propicia um aumento tanto da sensibilidade, assim como da estabilidade das respostas analíticas.

A técnica denominada camada por camada (LbL) postulada por Decher *et al.*, (1992) é extensivamente utilizada para a montagem de filmes finos durante a fabricação de sensores biológicos, por ser um processo relativamente simples, econômico e que pode utilizar diferentes tipos de materiais, incluindo quitosana, fibroína de seda (*silk fibroin*, SF), polilisina (PLL), polietilenimina (PEI), entre outros. Os filmes podem ser formados não somente pela adsorção de espécies com cargas opostas sob um substrato sólido, mas também através de ligações covalentes, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (CAMPÀS & O' SULLIVAN, 2003).

Gonçalves *et al.*, (2016) demonstraram que a técnica LbL possibilitou a formação de filmes multicamadas de fibroína de seda sobre SPCE, que se mostrou eficaz na adsorção do peptídeo β -amilóide, mantendo sua estrutura secundária preservada. A detecção do peptídeo foi realizada pela adição de um anticorpo específico a este (10 ng/mL-1000ng/mL), que foi mensurado pela técnica de voltametria cíclica. Os resultados demonstraram a eficiência do imunossensor eletroquímico no reconhecimento do peptídeo, com um pico de oxidação da corrente em 0,3V, à medida que a concentração do anticorpo aumentou. As mesmas variações na corrente não foram constatadas com a adição do anticorpo sobre os eletrodos contendo somente filmes de fibroína. Na concentração de 10ng/mL, foi possível observar uma resposta linear ($R^2=0.98$) do reconhecimento, enquanto concentrações maiores do que 10ng/mL levaram ao saturamento dos sítios de ligação.

Recentemente, Soares *et al.*, (2019) publicaram um estudo no qual um biossensor eletroquímico contendo filmes de quitosana e nanotubos de carbono sobre um eletrodo interdigitado de ouro foi desenvolvido para a imobilização de uma sonda de DNA de fita simples, correspondente a sequência gênica do PCA3. A hibridização entre a sonda de cDNA complementar a sequência de PCA3 e a fita de DNA previamente imobilizada sobre os

eletrodos interdigitados (IDE) de ouro, foi confirmada com a espectroscopia de reflexão absorção no infravermelho (IRRAS). O biossensor apresentou elevada sensibilidade (0.128 nmol/L), constatado pelo método de impedância eletroquímica, bem como seletividade, sendo capaz de distinguir entre linhagens tumorais prostáticas (PC-3/LNCaP) e não prostáticas (HeLa) que continham níveis detectáveis ou não do biomarcador. Os pesquisadores ressaltaram que com o valor aproximado de cada unidade sensorial sendo de R\$3 a R\$4, as vantagens vistas na implementação desta plataforma para o rastreamento de pacientes com CaP localizado e progressivo são notavelmente superiores em relação às técnicas moleculares utilizadas atualmente.

Moscovici *et al.*, (2013) construíram um imunossensor eletroquímico utilizando eletrodos de vidro revestidos com partículas de ouro para a imobilização do anticorpo anti-EpCAM. O sinal eletroquímico gerado entre o anticorpo e as células tumorais metastáticas prostáticas (DU-145), foi mensurado pela técnica de voltametria de pulso diferencial, na presença do processo redox Fe^{3+}/Fe^{2+} . O imunossensor reconheceu de maneira específica células DU-145, enquanto não demonstrou nenhuma alteração significativa no sinal eletroquímico quando células U937 (derivadas de linfoma) foram depositadas sobre a superfície do eletrodo. O limite mínimo de detecção foi de oito células tumorais, com apenas 15 minutos de incubação. A utilização da plataforma para fins clínicos foi analisada frente à deposição de células DU-145, juntamente com células U937 em meio α -MEM suplementado com soro fetal bovino (SFB), no intuito de mimetizar fluidos biológicos/amostras complexas. Os resultados mostraram-se promissores, mantendo o mesmo limite de detecção relatado anteriormente.

Sendo assim, pode-se presumir que o isolamento aprimorado de células metastáticas baseado na tecnologia dos biossensores, especificamente os imunossensores, trata-se de uma das abordagens mais promissoras, tendo em vista as inúmeras vantagens destes dispositivos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Geração de anticorpos monoclonais murinos reativos a antígenos de células prostáticas metastáticas e a aplicação destes na confecção de imunossensores eletroquímicos.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a eficiência da técnica de imunização subtrativa de múltipla tolerizações induzida pela ciclofosfamida por meio da determinação da reatividade dos anticorpos policlonais oriundos do soro dos camundongos imunizados, frente as linhagens prostáticas não tumoral e tumoral.

b) Identificar os melhores hibridomas secretores de anticorpos reativos a linhagem prostática tumoral.

c) Identificar os clones de hibridomas de alta prioridade, secretores de AcMms reativos somente a linhagem epitelial prostática tumoral.

d) Realizar a caracterização dos AcMms purificados através das técnicas de *Western blot* e imunofluorescência indireta.

e) Investigar a possível aplicação diagnóstica dos dois melhores anticorpos na confecção de imunossensores eletroquímicos, destinados a detecção de células tumorais prostáticas que exibem potencial metastático.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Expansão das linhagens celulares

Antes de dar início ao protocolo de imunização, realizou-se o cultivo e a expansão das linhagens epiteliais prostáticas, denominadas como RWPE-1 (não-tumoral) e PC-3 (tumoral). A linhagem epitelial não-tumoral foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), enquanto a linhagem epitelial tumoral foi adquirida pela ATCC (*The American Type Culture Collection*), cedida pelo laboratório do prof. Dr. Sérgio Felisbino/IBB/UNESP. O meio de cultura destinado a expansão da linhagem RWPE-1 foi o *Keratinocyte-SFM* (*serum-free medium*), Gibco®, suplementado com o fator de crescimento epidermal recombinante (rEGF) e o extrato de pituitária bovina (BPE). Para a expansão da linhagem PC-3 foi utilizado o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), Gibco®, com 4500g/L de glicose, suplementado com 10% de SFB (Gibco®) e 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco®).

A linhagem de mieloma murino (Sp2/0) adquirida do BCRJ, foi expandida em paralelo com as linhagens prostáticas. O meio utilizado foi o mesmo citado anteriormente. Em relação aos hibridomas, estes foram expandidos em meio RPMI-1640 suplementado com diferentes aditivos, de acordo com protocolo descrito por Deffune (1992). Esse meio é denominado meio enriquecido (ME) e a posterior adição de SFB, leva-o a designação de meio completo (MC). O MC foi utilizado durante toda a etapa de estabelecimento dos híbridos após a fusão, clonagem e expansão celular.

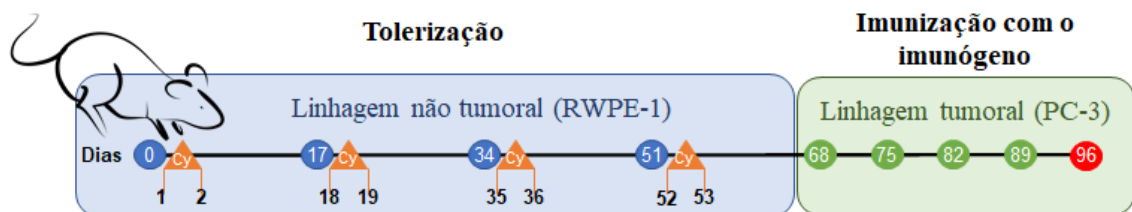
A linhagem de carcinoma pulmonar (A549) também adquirida da ATCC e gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Ana Marisa Fusco Almeida, foi expandida no mesmo meio utilizado para as linhagens PC-3 e de Sp2/0. Seu uso foi destinado para a verificação da especificidade dos imunossensores eletroquímicos, servindo como controle não específico. Todas as recomendações de manejo e cultivo celular postuladas pela ATCC, incluindo os parâmetros de temperatura e porcentagem de dióxido de carbono (CO₂), foram empregadas.

4.2 Protocolo de Imunização - MTSI

Foram utilizados 30 camundongos BALB/c isogênicos de 4-6 semanas de vida, de padrão genético SPF (*Specific Pathogen Free*), do Serviço de Biotério da PUSP-RP (Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto). O manejo destes roedores respeitou as diretrizes de integridade e de boas práticas postuladas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), aprovado pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da própria Instituição de Ensino (CEUA/FCF/CAr nº 27/2017) (anexo I).

Os animais foram alojados em gaiolas de 30 x 20 x 13 cm, revestidas com maravalha. Todos os animais, incluindo os controles não imunizados, receberam alimentação e água mineral autoclavada, sem quaisquer restrições. A limpeza das caixas e troca de maravalha foram feitas a cada dois dias. Após a ambientação dos animais, deu-se início ao protocolo MTSI. O número de células prostáticas íntegras utilizadas durante a imunização, assim como o número de ciclos de tolerização, concentração de ciclofosfamida administrada e os intervalos entre os ciclos, são elucidados na figura 6 abaixo:

Figura 6. Protocolo MTSI empregando 4 ciclos de tolerização. A etapa de tolerização iniciou-se no dia 0 e foi até o dia 53. A etapa de imunização iniciou-se no dia 68, com o término no dia 96.



Fonte: elaborado pela própria autora

Ampolas contendo as linhagens celulares prostáticas RWPE-1 e PC-3 foram descongeladas no momento do uso, com posterior lavagem em PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*), 1X pH 7.4. Inicialmente os camundongos BALB/c foram submetidos a etapa de tolerização, sendo imunizados por via intraperitoneal (i.p) no dia 0 com a linhagem RWPE-1, através do preparo de seringas de 1 mL, tipo insulina, contendo 2×10^6 células cada, solubilizadas em 200 μ L de PBS 1X. Os animais controles receberam apenas o veículo. Após a imunização com o tolerógeno, procedeu-se com a pesagem dos animais e com a determinação do volume necessário de ciclofosfamida (40 mg/mL) (*Sigma-Aldrich*®) a ser administrada, respeitando a concentração de 200 mg/kg-100 mg/kg por animal. A inoculação do fármaco foi realizada em duas doses consecutivas (24/48 horas) após a imunização. Essa etapa repetiu-se três vezes mais, com um espaçamento de 15 dias. Com o fim das etapas de tolerização, foi iniciado as subsequentes imunizações com a linhagem PC-3, em um intervalo de 7 dias cada. Após a última e quinta imunização ser realizada pela via intravenosa (i.v), prosseguiu-se com o sacrifício dos animais para a obtenção e processamento dos baços, e o isolamento dos linfócitos B que foram destinados a fusão celular e geração dos hibridomas.

4.2.1 Geração de (Fab)₂: protocolo MTSI combinado ao mascaramento de epítomos

Na tentativa de aumentar a eficiência da técnica MTSI, uma nova agenda de imunização utilizando a técnica MTSI combinada ao mascaramento de epítomos foi realizada. Para tal, realizou-se independentemente do protocolo original, a imunização de 3 camundongos BALB/c machos de 8-10 semanas de vida somente com a linhagem celular não tumoral (RWPE-1). Um total de 5 imunizações foram realizadas, todas por via i.p. As três primeiras ocorreram em intervalos de 15 dias, utilizando um total de 2×10^6 células por animal, em um volume de 200 μ L, emulsionadas com adjuvante de *Freund* completo (primeira imunização) e incompleto (imunizações subsequentes). As duas últimas imunizações foram realizadas somente com células diluídas em PBS 1X. Após o término desta etapa, prosseguiu-se com a sedação dos camundongos para posterior coleta de sangue cardíaco e obtenção do soro, contendo os anticorpos policlonais (pAbs).

Os pAbs foram submetidos a etapa de clarificação, purificação em coluna de imunoafinidade, diálise e digestão enzimática utilizando pepsina (*Sigma-Aldrich*®), sendo esta última previamente solubilizada em água ultrapura na concentração de 10 mg/mL. A proporção usada de pAbs em relação a enzima foi de 5:1. A digestão ocorreu sob temperatura de 37°C, pH 3.2 por 30 minutos. A reação foi interrompida com adição de NaOH 0.4M, até a solução atingir pH 7.2. A eficiência da digestão foi avaliada através da técnica de *SDS-PAGE*, a fim de verificar a presença de uma banda de 110 kDa, correspondente aos dois fragmentos de ligação ao antígeno - (Fab)₂. Uma segunda purificação foi realizada, desta vez para a obtenção dos fragmentos não ligados a coluna, na tentativa de eliminar os anticorpos que não foram digeridos e obter somente o fragmento de interesse (ARAÚJO, 2015). As frações foram quantificadas em espectrofotômetro de microplacas (modelo *Epoch*TM, com o aparato *Take3*TM) com leitura a 260/280.

Concomitante a etapa de obtenção dos (Fab)₂, um novo protocolo de imunização foi sendo executado conforme descrito no quadro 1.

Quadro 1. Protocolo MTSI utilizando a concentração de 100 mg/kg Cy combinada a técnica de mascaramento de epítomos.

Dia	Imunógeno	Via de ADM	Concentração
0	RWPE-1	(i.p)	2×10^6
1	Ciclofosfamida	(i.p)	100 mg/kg
2	Ciclofosfamida	(i.p)	100 mg/kg
17	RWPE-1	(i.p)	2×10^6
18	Ciclofosfamida	(i.p)	100 mg/kg
19	Ciclofosfamida	(i.p)	100 mg/kg
34	RWPE-1	(i.p)	2×10^6
35	Ciclofosfamida	(i.p)	100 mg/kg
36	Ciclofosfamida	(i.p)	100 mg/kg
51	RWPE-1	(i.p)	2×10^6
52	Ciclofosfamida	(i.p)	100 mg/kg
53	Ciclofosfamida	(i.p)	100 mg/kg
68	PC-3 mascaradas com (Fab) ₂	(i.p)	2×10^6
78	PC-3 mascaradas com (Fab) ₂	(i.p)	2×10^6
98	PC-3 mascaradas com (Fab) ₂	(i.p)	2×10^6
108	PC-3 mascaradas com (Fab) ₂	(i.p)	2×10^6
118	PC-3 mascaradas com (Fab) ₂	(i.p)	2×10^6

Fonte: elaborado pela própria autora

Os (Fab)₂ foram incubados juntamente com as células PC-3 quando o protocolo alcançou a etapa de imunização com o imunógeno. Para cada animal a ser imunizado, um total de 2×10^6 células foram incubadas com 5 ug de anticorpo (m/v) por um período de 1 hora, sob agitação. Após o término da incubação, foi realizado uma etapa de lavagem para a retirada dos (Fab)₂ que não se ligaram. Optou-se por realizar as imunizações com um espaçamento de 10 dias. A última imunização foi realizada pela via intravenosa, injetando um total de 100 µL de suspensão celular.

4.2.2 Avaliação dos aspectos físicos e fisiológicos dos camundongos BALB/c

No decorrer dos protocolos, realizou-se medições do peso dos roedores em intervalos de 5-10 dias após as tolerizações, juntamente com a avaliação da pelagem, ingestão de

água/ração e coloração das fezes. No dia 41, após 5 dias do término do 3º ciclo de tolerização, foi realizada a coleta de sangue periférico para a contagem do número de leucócitos/mm³ em câmara de Neubauer. Para tal, os animais foram alojados em contensor, prosseguindo-se com a coleta de 20uL de sangue da cauda de cada animal. A não coagulação do mesmo foi evitada utilizando ponteiros umedecidas com heparina sódica 5.000 U. I/ml (Hepamax-S™). O diluente de Turk foi adicionado ao sangue na razão de 1:20, respectivamente. Após a contagem do número de células totais, o número de leucócitos totais/mm³ foi obtido multiplicando o número de células contadas por 50.

4.2.3 Avaliação da eficiência do protocolo subtratativo induzido pela Cy

Nos dias 29 e 63, após 10 dias do término do 2º ciclo e 4º ciclo de tolerização, foram realizadas coletas de sangue periférico e posterior obtenção do soro contendo os pAbs, a fim de se avaliar a reatividade destes frente a célula não tumoral prostática pelo ensaio de *whole-cell* ELISA. O sangue coletado sem anticoagulante foi deixado em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas, com posterior centrifugação a 1500 rpm/4°C por 10 minutos. Os soros policlonais foram armazenados a -20°C até o momento da análise. Durante a imunização com o imunógeno (quarta agenda), um total de 5 amostras de soro de cada animal foram obtidas no intervalo de 7 dias entre cada imunização.

Com o fim do protocolo MTSI, realizou-se a punção cardíaca para a obtenção do sangue total do coração de todos os camundongos, com posterior separação do soro policlonal e análise da reatividade dos pAbs (anticorpos primários) contra as linhagens não tumoral e tumoral prostática através do ensaio de citometria de fluxo. Para esse ensaio, utilizou-se células inteiras incubadas com o soro policlonal de cada animal por 2 horas, sob agitação. Após o término desta primeira etapa, os tubos foram centrifugados para a retirada dos anticorpos que não se ligaram e em seguida, foi feita a adição do anticorpo comercial secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (*Elabscience*™, E-AB-1015) por um período de 40 minutos, protegido da luz. Após essa segunda incubação, prosseguiu-se com uma nova lavagem e manutenção dos tubos em geladeira, cada qual contendo 500 uL de solução para citometria (ISOTON) e 50 uL de paraformaldeído 4%. Como controle de autofluorescência, as células foram solubilizadas somente em solução ISOTON. Já para o preparo do controle positivo, ambas as linhagens foram inicialmente incubadas com um pAb sabidamente reativo a ambas as linhagens, seguido da incubação com o mesmo anticorpo comercial secundário, mencionado acima. Além disso, os pAbs provenientes dos soros dos dois camundongos que receberam apenas o veículo durante

as imunizações, foram incubados junto às células para servirem como controle isotópico da reação. A diluição utilizada para os pAbs foi de 1:500 e para o anticorpo secundário foi de 1:200. O equipamento utilizado para a análise dos resultados foi o BD FACSCanto™ (MOROZ, 2009).

4.3 Timectomia – Isolamento de *feeder cells*

Camundongos BALB/c de 3-4 semanas de vida foram submetidos a timectomia para a retirada do timo e isolamento de timócitos (*feeder cells*) destinados a fusão e clonagem celular (DEFFUNE, 1992). Antes de dar início ao procedimento cirúrgico, os camundongos foram mergulhados em solução de hipoclorito, um por vez, para a desinfecção do pelo. Estes foram então dispostos em uma superfície cirúrgica, na posição decúbito dorsal, para a exposição da caixa torácica. A incisão foi feita próximo ao diafragma, rompendo a musculatura que separa a cavidade abdominal da cavidade torácica. Desta incisão, retirou-se toda a porção tecidual das costelas e esterno, para facilitar a visualização do coração e posterior a este, o timo, sendo distinguido pela sua coloração branco-acinzentada característica. Após a remoção do órgão, este foi transferido para uma placa de Petri contendo meio RMPI 1640, prosseguindo com o isolamento dos timócitos com auxílio de seringa (26G) e agulha. O conteúdo celular foi transferido para um tubo cônico, procedendo com a centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos e posterior contagem do número de timócitos totais em câmara de Neubauer. O número de timócitos utilizados para a fusão foi de 1×10^5 células/poço, enquanto que para a clonagem, esse número foi de 2×10^5 células/poço.

4.4 Fusão celular – Tecnologia de hibridomas

A técnica de fusão celular foi realizada de acordo com as recomendações estabelecidas por Köhler & Milstein (1975) e adaptadas por Earley & Osterling, (1985). Anteriormente a fusão, o baço foi inicialmente removido da cavidade abdominal sob condições assépticas e transferido para uma placa de Petri, contendo RMPI 1640, prosseguindo-se assim, com a retirada dos esplenócitos de seu interior. Foram utilizadas seringas de 10 mL acopladas a agulhas de 26G. Uma das agulhas foi dobrada em formato de Z, servindo em um primeiro momento para a imobilização do tecido, enquanto a outra destinou-se a perfuração de toda a cápsula esplênica, bem como para aspirar o meio da placa e introduzi-lo delicadamente no órgão, permitindo-se assim, o desprendimento dos esplenócitos ali presentes. Após o

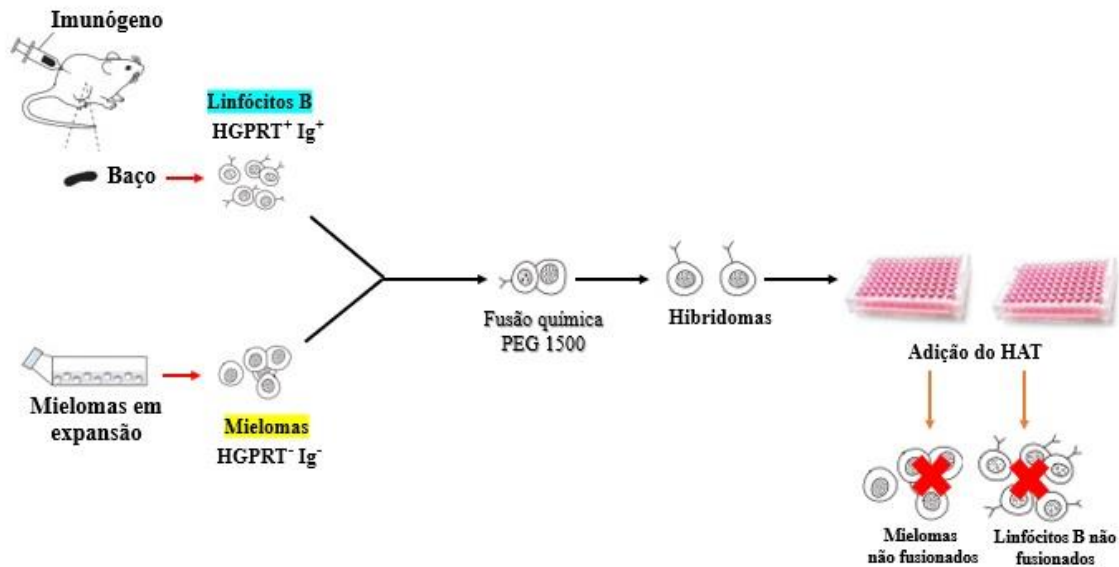
esvaziamento completo do mesmo, a agulha em formato de Z foi passada gentilmente acima da cápsula esplênica para a retirada das células que ainda permaneceram presas em sua borda.

Finalizado o procedimento, todo o conteúdo da placa foi aspirado pela seringa e transferido para tubo cônico, procedendo-se com a centrifugação a 1200 rpm durante 10 minutos. O *pellet* celular foi ressuspenso em ME e submetido a contagem em câmara de Neubauer para a determinação do número de esplenócitos totais. Simultaneamente, as células de mieloma murino (Sp2/0) que vinham sendo expandidas em cultura, aproximadamente dez dias antes, também foram contabilizadas. A proporção de esplenócitos *versus* mieloma foi de 5:1.

Ambas as células (esplenócitos + mieloma) foram acondicionadas em um mesmo tubo cônico, seguido da centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi completamente removido e o botão de células foi solto por meio de leves batidas em uma tampa de gaze. Feito isso, o composto polietilenoglicol (PEG 1500, Hybrimax™), utilizado como agente fusogênico, foi adicionado lentamente pela parede do tubo em um volume de 1 mL a cada 1×10^8 células totais. O tubo foi mantido sob movimentos circulares por 1 minuto, com posterior centrifugação por 3 minutos. Sem desligar a centrífuga, a rotação foi alterada de 1200 rpm para 1500 rpm nos dois minutos restantes. O volume de SFB utilizado foi de 5 mL a cada 1×10^8 células totais. O meio enriquecido foi adicionado em um volume de 19 mL a cada 1×10^8 células totais. Após delicada homogeneização da suspensão celular, as células recém fusionadas foram distribuídas em placas de 96 poços.

Decorridas 24 horas, adicionou-se MC acrescido de 20% de HAT (*Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine*), 50X, Gibco®. A figura 7 ilustra de maneira simplificada, a técnica de fusão celular:

Figura 7. Fusão celular usando o método da tecnologia de hibridomas.



Fonte: elaborado pela própria autora

No quarto dia pós-fusão celular, as placas foram condicionadas com os timócitos. A inspeção dos híbridos foi realizada diariamente para a verificação do crescimento de colônias contendo células translúcidas, característico de hibridomas em expansão. A troca de meio foi realizada a cada 48 horas e após 14 dias, o HAT foi substituído pelo suplemento HT (*Hypoxanthine-Thymidine*) até o vigésimo primeiro dia pós-fusão celular.

4.5 Seleção dos hibridomas secretores de anticorpos reativos a linhagem tumoral prostática

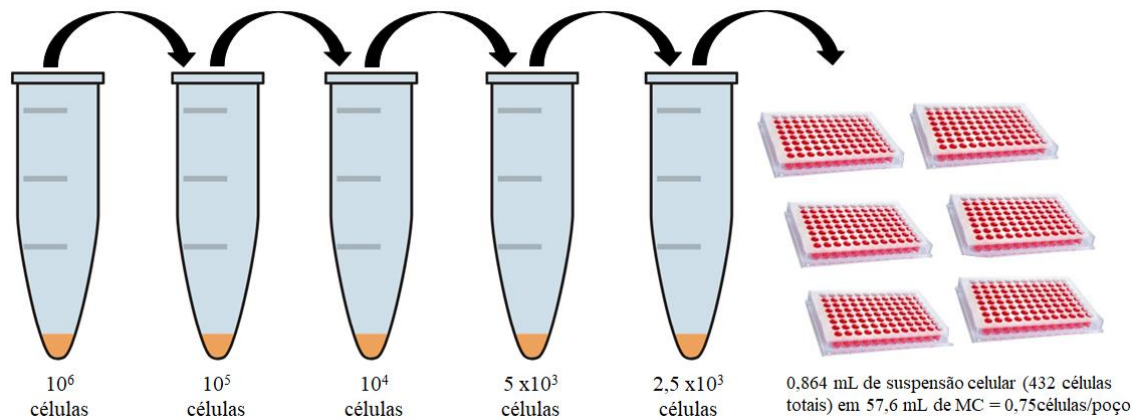
Os poços contendo hibridomas que demonstraram crescimento contínuo após 15 dias da fusão celular, foram selecionados para a avaliação da reatividade dos anticorpos presentes nos sobrenadantes de cultura celular (SCC) frente a linhagem PC-3 por meio da técnica de *whole-cell* ELISA e citometria de fluxo. Após a seleção dos poços, um por um, os sobrenadantes foram retidos por três dias sem a troca de meio. Simultaneamente, placas de ELISA de 96 poços (*Nunc Maxisorp*TM) foram recobertas com a suspensão celular derivada da linhagem PC-3, na concentração de 5×10^4 /poço e incubadas a 37°C, *overnight*. No dia seguinte os poços foram inspecionados para verificar se as células haviam aderido. Após a confirmação, retirou-se o meio de cultivo, prosseguindo com a incubação por 30 minutos com solução de glutaraldeído (0,05%) a 4°C. Seguiu-se com a etapa de lavagem dos poços com solução de PBS-Tween (0,05%) e incubação por 2 horas a 37°C com os SCC selecionados. Realizou-se nova

lavagem e incubação com *Goat anti-mouse* IgG peroxidase/HRP conjugated (*Elabscience*TM, E-AB-1001) na diluição de 1:4000, por 2 horas, a 37°C. Como controle positivo utilizou-se o anticorpo policlonal pré-fusão de um dos animais submetidos ao protocolo de imunização. Já como controle secundário, as células foram incubadas somente com o anticorpo secundário, enquanto que como controle isotípico, foi utilizado um anticorpo policlonal de um dos animais que receberam apenas o veículo. As diluições dos controles da reação foram de 1:1500. O controle dito como branco, foi aquele que havia somente células com adição da solução de revelação. A revelação do ensaio colorimétrico foi realizada utilizando o substrato orto-fenilenodiamina (OPD) solubilizado em citrato-fosfato-peróxido de hidrogênio, pH 4.8. A leitura foi conduzida em espectrofotômetro a 492 nm (ERDILE *et al.*, 2001). Os SCC foram testados em duplicata para a obtenção do valor da média e desvio padrão. O *cut-off* da reação foi determinado através da absorbância referente ao controle isotípico, multiplicado por 3. Hibridomas com valores acima do *cut-off* seguiram para mais dois *screenings*.

4.6 Clonagem celular e seleção de hibridomas secretores de AcMms reativos a linhagem tumoral prostática

Hibridomas secretores de anticorpos que mantiveram sua reatividade acima do *cut-off* estabelecido após três *screenings* consecutivos foram submetidos a clonagem celular por meio da técnica de diluição limitante (DEFFUNE, 1992; FRESHNEY, 2005). Primeiramente, as placas que receberiam os hibridomas foram condicionadas com timócitos. Adiante, o *pool* de hibridomas recolhidos dos frascos de cultura foi contabilizado e o número de células a ser depositado por poço da placa de 96 poços foi determinado para 0,75 células/poço. Para se chegar a essa concentração, foi realizado uma diluição seriada em meio de cultura enriquecido, conforme demonstrado na figura 8. Para cada hibridoma a ser clonado, utilizamos 6 placas de 96 poços. Com o término da clonagem, as placas foram mantidas em incubadora à 37°C e 5% de CO₂. A observação diária dos poços por microscopia foi realizada com o intuito de demarcar os poços que continham clones únicos e em crescente expansão, com posterior análise pelo ensaio de *whole-cell* ELISA, na seleção dos híbridos secretores de AcMs reativos a linhagem PC-3. O método usado foi o mesmo daquele descrito no item 3.5.

Figura 8. Técnica de clonagem celular por diluição limitante. A concentração de células depositadas em cada poço da placa de 96 poços foi de 0,75 células.



Fonte: elaborado pela própria autora

4.7 Expansão dos clones de hibridomas

Dentre todos os clones de hibridomas testados frente ao imunógeno, aqueles que apresentaram reatividade pela linhagem PC-3 foram expandidos de maneira gradativa, passando para placas de 24 poços, 6 poços, com posterior repique para frascos de 25cm². Neste momento, optou-se por realizar a adaptação dos hibridomas em meio com baixa porcentagem de SFB, uma vez que IgGs de origem bovina presentes no soro fetal também podem se ligar a proteína G, adsorvida na coluna de imunoafinidade, que foi utilizada na etapa de purificação dos anticorpos murinos.

Por esse motivo, os híbridos foram repicados sucessivamente em MC, com a diminuição progressiva do SFB, que passou de 10% para 7,5%, 5%, 3%, chegando-se ao limite de 2%. A adaptação foi feita em repiques realizados a cada 5-7 dias. Quando os clones se adaptaram completamente ao meio contendo apenas 2% de SFB, a expansão celular foi realizada em frascos de 75cm² e posteriormente em frascos de 175cm² (BERSON & FRIEDERICHS, 2008). No momento que estes frascos atingiram 90% de confluência, a troca de meio foi suspensa para uma maior retenção dos anticorpos secretados, principalmente durante a fase Lag/morte celular dos clones. Além disso, foi adquirido um SFB com baixa quantidade de IgGs bovinas (*Sigma-Aldrich*®, F1283), que também foi usado durante a expansão dos hibridomas e retenção dos anticorpos nos SCC.

No sétimo dia sem troca de meio, quando estes já aparentavam cor amarelada, característico de sua acidificação pela escassez de nutrientes e excesso de metabólitos, coletou-

se todo o conteúdo celular, seguido da centrifugação a 1500 rpm, por 10 minutos a 4°C, com posterior coleta dos sobrenadantes, que seguiram para as etapas de clarificação e purificação.

4.7.1 Clarificação e purificação dos AcMms derivados dos clones de hibridomas

A clarificação antecedeu a etapa de purificação para garantir que a eliminação de restos celulares ainda presente nos SCC. A execução desta etapa foi realizada centrifugando os SCC em uma rotação de 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Com o término, os SCC foram transferidos para novos tubos cônicos e armazenados em geladeira.

Inferindo que os AcMms secretados pelos clones pertenciam a classe IgG, utilizamos a coluna de imunoafinidade G (*HiTrap™ Protein G Sepharose High Performance - GE Healthcare*), de 1mL, que exibe ligação com todas as subclasses de IgG murina (AYABAY *et al.*, 2000). Foram utilizados os seguintes tampões durante a purificação: tampão de ligação: fosfato de sódio, 0,02 M, pH 7.0; tampão de eluição: glicina-HCl, 0,1 M, pH 2.7 e tampão de neutralização: Tris-HCl, 1M, pH 9.0. Após a filtração dos tampões em membrana de 0.45 µm, os SCC a serem purificados foram diluídos na razão 1:1 com o tampão de ligação. A solução foi vertida em aparato (*SUPER-LOOP*), acoplado ao sistema de cromatografia líquida – *ÄKTA Prime™*, junto à coluna de imunoafinidade.

A purificação foi iniciada lavando-se a coluna com 3 a 5 volumes de coluna com água destilada, seguido da etapa de equilíbrio com 5 volumes de coluna, desta vez com o tampão de ligação e posterior injeção da amostra. A taxa de fluxo foi regulada para 1mL/min durante toda a execução da técnica. Após a injeção de todo o volume correspondente a amostra, a coluna foi novamente lavada com 5 volumes do tampão de ligação e posteriormente realizou-se a eluição dos anticorpos ligados a coluna, com 10 volumes do tampão de eluição. As frações eluídas foram coletadas em volumes de 1mL cada, depositadas em microtubos contendo tampão de neutralização. Os eluatos foram quantificados em espectrofotômetro de microplacas. A mensuração do conteúdo proteico foi conduzida em espectrofotômetro através da leitura em 260/280 nm.

4.7.2 Verificação da eficiência da purificação dos AcMms por SDS-PAGE

A eficiência da purificação dos AcMms pela coluna de imunoafinidade foi avaliada através da determinação do perfil eletroforético dos anticorpos purificados pela técnica de eletroforese *SDS PAGE*, sob condições desnaturantes. O volume equivalente a 5 µg de proteína, foi adicionado em cada canaleta do mini-gel (*Bio-Rad™*) com dimensões de 8,3 x 10,2 cm e

espaçadores de 1,5mm. O mini-gel foi preparado em sistema descontínuo de acordo com Laemmli (1970). A composição do gel de empilhamento (*stacking gel*) a 4% e do gel de resolução/separação (*running gel*) a 12%, assim como o volume necessário dos reagentes para o preparo de cada mini-gel são descritos no Quadro 2:

Quadro 2. Composição do gel de poliacrilamida composto por duas fases: gel de resolução (*running*) e o gel empilhamento (*stacking*).

Composição dos géis	Volumes	
	Resolução (12%)	Empilhamento (4%)
Mix acrilamida + bisacrilamida 30%	4,0 mL	0,67 mL
Tris-HCl 1,5 mol. L ⁻¹ , pH 8,8	2,5 mL	0,0
Tris-HCl 1 mol. L ⁻¹ , pH 6,8	0,0	0,5 mL
SDS 10% (m/v)	0,1 mL	0,04 mL
N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamino (TEMED)	0,004 mL	0,004 mL
Persulfato de amônio 10% (m/v)	0,1mL	0,04 mL
H2O Milli-Q	3,3 mL	2,7 mL
Total	q.s.p 10 mL	q.s.p 4 mL

Fonte: elaborado pela autora

O tampão de amostra usado durante o preparo dos AcMms aplicados no gel, possui a seguinte composição, conforme representado no Quadro 3:

Quadro 3. Constituintes do tampão de amostra (tampão dissociante) utilizado no preparo prévio da amostra a ser submetida a técnica de eletroforese.

Composição do tampão dissociante	Volumes
Tris-HCl 1 mol. L ⁻¹ pH 6,8	0,8 mL
Glicerol P.A.	1,0 mL
SDS 10% (m/v)	2,0 mL
β-mercaptoetanol P.A.	0,5 mL
Água tipo Mili-Q (q.s.p)	10 mL

Fonte: elaborado pela própria autora

Os AcMms foram incubados junto ao tampão de amostra na razão 4:1, com posterior fervura a 100°C por 5 minutos. Os reservatórios da cuba foram preenchidos com o tampão de corrida a base de Tris (0,25 mol/L), glicina (1,92 mol/L) e SDS [0,1% (m/v)]. A corrida eletroforética foi conduzida a 80V para o gel de empilhamento e 100V para o gel de resolução. O padrão de peso molecular usado como marcador da corrida, indicando proteínas de massas

específicas foi o *BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder* (*ThermoFischer™*, 10748010). Com o término da corrida, o sistema foi cuidadosamente desmontado e submetido a coloração com *Comassie blue, overnight*. A composição do corante possui os seguintes reagentes: sulfato de amônio [8% (m/v)], ácido fosfórico [1,6% (m/v)], metanol:água (1:4) e comassie brilliant blue G250 [0,08% (m/v)]. No dia seguinte, o corante foi removido com banhos de solução descorante a base de ácido acético 10% e metanol 25%, em água destilada, trocados sucessivamente até a descoloração do gel.

4.8 Caracterização dos AcMms

4.8.1 Verificação do peso molecular aproximado dos antígenos reconhecidos pelos AcMms por *Western Blot*

Anteriormente ao ensaio de *Western Blot*, realizou-se o preparo do material antigênico/extrato celular das duas linhagens prostáticas, a saber, RWPE-1 e PC-3. Primeiramente as células foram expandidas em placas de 6 poços até atingirem confluência celular de 90%. Após isso, iniciou-se o processo de extração, lavando os poços 2x com PBS 1X gelado, seguido do descolamento das células com auxílio de *cell scraper* e posterior centrifugação de todo o conteúdo celular a 2000 rpm por 5 minutos. Os *pellets* celulares foram ressuspensos em tampão de lise celular NP40 (*Invitrogen™*) com adição de 1% (v/v) do coquetel de inibidores de proteases (*Sigma-Aldrich®*, P8340). A etapa seguinte consistiu na agitação do conteúdo celular em vórtex, que se repetiu duas vezes mais, 1 minuto cada, com incubações de 10 minutos no gelo entre cada agitação. Finalizado esse processo, as suspensões celulares foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e quantificados em espectrofotômetro com leitura a 562 nm utilizando *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*.

Os extratos antigênicos (35ug por raia) foram submetidos *SDS-PAGE*, seguido da transferência do conteúdo proteico para a membrana de nitrocelulose utilizando o aparelho *Amersham Biosciences® Mighty Small Transphor* a 0.4A por um período de 2 horas, em tampão de transferência contendo Tris (250mM) e glicina (1,92M), pH 8.5. Após a transferência, iniciou-se a incubação em solução de bloqueio, contendo 5% de leite mólico diluído em tampão Tris (50mM), NaCl (150mM) e Tween 20 0,1% (m/v) (TBS-T) pH 8.0, por 1 hora, sob agitação. Em seguida os eluatos de cada anticorpo foram incubados, *overnight*, a 4°C, na diluição 1:50. Com o término da etapa de incubação dos anticorpos primários, foram realizadas três lavagens com TBS-T. Nova incubação foi realizada utilizando o *Goat anti-mouse IgG peroxidase/HRP conjugated* (*Elabscience™*, E-AB-1001), diluído na concentração

de 1:5000. Todas as incubações foram realizadas utilizando a mesma solução de bloqueio descrita acima. A revelação foi feita por método quimioluminescente utilizando o kit *SignalFire™ ECL Reagent*, e as imagens foram registradas utilizando o equipamento *Chemidoc XRS (Bio-Rad™)*.

4.8.2 Verificação da localização celular dos antígenos reconhecidos pelos AcMms por Imunofluorescência Indireta

As células derivadas das linhagens RWPE-1 e PC-3 foram inicialmente cultivadas em poços da placa de 96 poços, na concentração de 2×10^4 , seguido da incubação por 48 horas em incubadora de CO₂ a 37°C. Após a adesão, realizou-se a lavagem com PBS 1X (três lavagens consecutivas) e a fixação com paraformaldeído 4%, 30 minutos a 4°C. Para garantirmos a permeabilização dos anticorpos primários, as células foram tratadas com *Triton X-100* (0,1%), por 15 minutos a 4°C. Nova etapa de lavagem com PBS 1X foi conduzida, seguido da incubação com BSA 2% por 1 hora, a 4°C. Para a marcação do núcleo celular, foi realizado a marcação com Hoechst 33342 (*ThermoFisher™*, 62249) na concentração de 1µg/mL por 30 minutos, protegido da luz, em temperatura ambiente (TA). Uma terceira lavagem foi realizada para então iniciarmos a incubação com os anticorpos primários, na diluição (1:20), protegidos da luz, *overnight*, a 4°C. O controle positivo usado durante o imunoenensaio foi o anticorpo murino da classe IgG anti-CD147 humano (*Elabscience™*, E-AB-F1056A) na diluição de 1:100. Decorrido a incubação, realizou-se uma quarta lavagem e seguiu-se com a incubação com o anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (*Elabscience™*, E-AB-1015), na diluição 1:100, por 1 hora, TA. A visualização das células e captura das imagens foram conduzidas em microscópio de fluorescência (*Eclipse 3000, Nikon*) em aumento de 20x.

4.9 Confeção dos imunossensores eletroquímicos

4.9.1 Extração e solubilização da fibroína de seda

Casulos derivados do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) foram adquiridos da BRATAC S.A, Bastos/SP e cedidos pelo laboratório do Prof. Dr. Sidney Ribeiro do Instituto de Química de Araraquara/UNESP. Os casulos foram cortados e adicionados em uma solução de Na₂CO₃ 0,02M, durante 30 minutos a 100°C, para a remoção da sericina. Em seguida, as fibras foram retiradas da solução e submetidas a banhos de água destilada (3 vezes, 20 minutos cada) para a retirada do excesso de sais, e então, foram deixadas em estufa a 60°C por 24 horas. Após a determinação da massa seca das fibras, estas foram adicionadas em solução ternária de CaCl₂-

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (1:2:8 molares) a 85°C , para a dissolução dos fios de SF. A solução líquida de SF foi posteriormente vertida em membrana de celulose (3500 MWCO) para dar início a etapa de diálise, que foi realizada por meio de trocas diárias de água (3 trocas no primeiro dia) e mais 2 trocas no segundo dia), sob agitação, por 48 horas. A solução dialisada foi então centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C . A concentração final da dispersão aquosa de SF foi determinada vertendo-se 5 mL da solução em placas de Petri de poliestireno de 60x15 mm de diâmetro. Após a completa evaporação, determinou-se o valor da massa seca remanescente. Essa dispersão foi diluída em água ultrapura para o ajuste da concentração final em 0,2 % (m/v) (ROCKWOOD *et al.*, 2011). O esquema da obtenção da solução de SF foi representado na figura 9.

Figura 9. Obtenção da solução de fibroína de seda. O preparo da solução de SF seguiu os seguintes passos: fragmentação dos casulos, remoção da sericina, dissolução das fibras de fibroína e por último, diálise e centrifugação para a remoção do excesso de sais e o ajuste da concentração do polímero.



Fonte: elaborado pela própria autora

4.9.2 Avaliação da adsorção celular em lâminas de quartzo

Após a obtenção da solução de SF a 0,2% (m/v), prosseguiu-se com o teste de adsorção das células em lâminas de quartzo. Inicialmente os filmes de SF e AcMms (20ug/mL) foram depositados sobre a superfície das lâminas, um por vez, por um período de 1 hora cada, seguido da lavagem com PBS 1X (3 lavagens consecutivas), e posterior secagem utilizando ar comprimido. Finalizado essa etapa, foi adicionado células inteiras PC-3 ($1 \times 10^6/\text{mL}$) e células

tumorais pulmonares A549 (1×10^6 /mL), separadamente, variando os tempos de incubação por 30 minutos, 45 minutos e 1 hora. Após isso, as lâminas foram dispostas no microscópio invertido de contraste de fase (Zeiss™) e analisadas quanto a presença de células adsorvidas (BHAKTA *et al.*, 2016).

4.9.3 Montagem dos imunossensores eletroquímicos pela técnica LbL

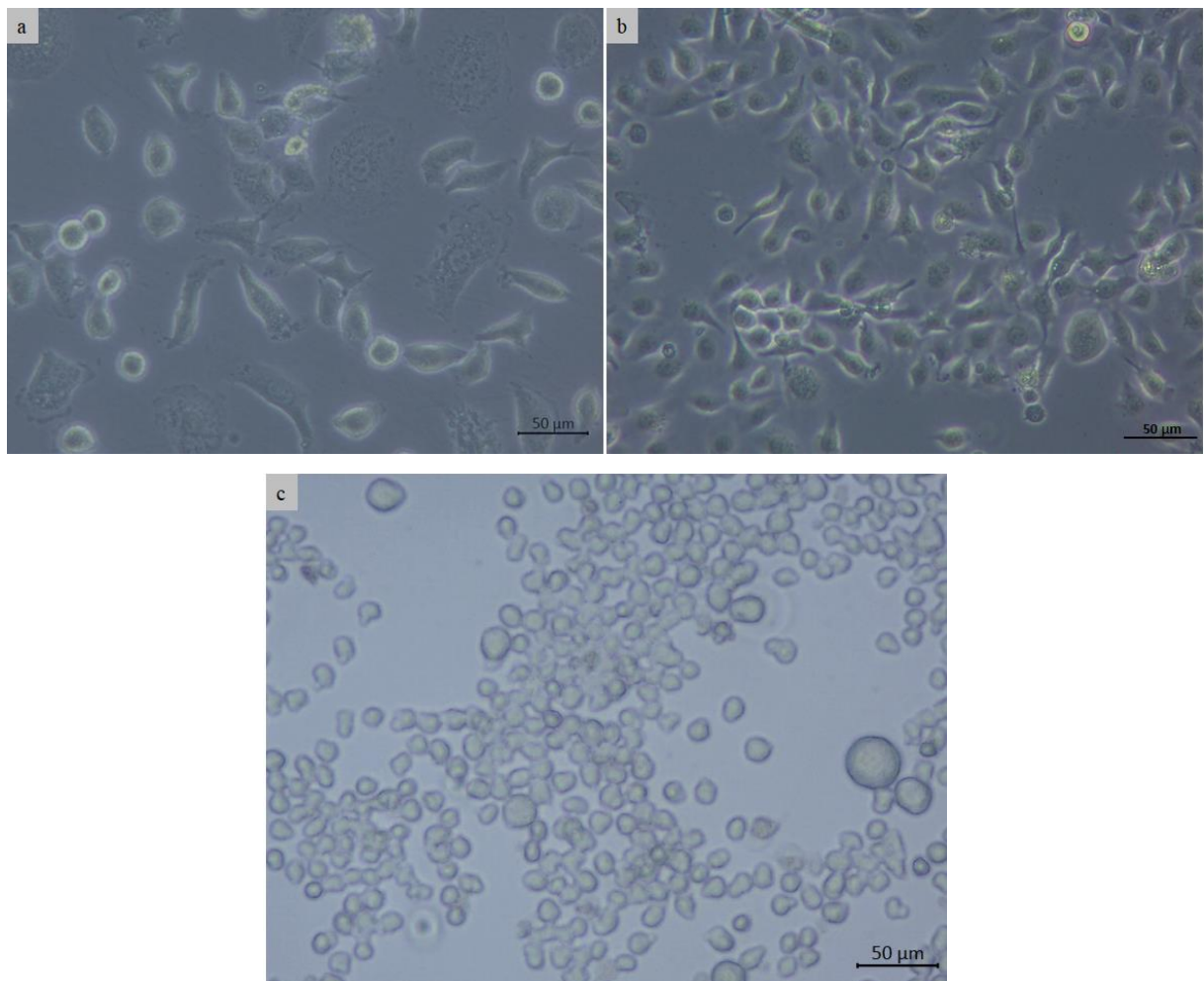
Os SPCE DS110 foram cedidos pela Prof^a Marli Leite de Moraes, dos quais foram adquiridos da Metrohm (Dropsens®). Primeiramente foi realizado a montagem do sistema, conectando cada SPCE ao bipotenciostato/galvanostato μ Stat 400 (DropSens, SL, Oviedo, Espanha). A modificação inicial da superfície do eletrodo de trabalho ocorreu através da deposição de uma gota da solução de SF (0,2% m/v) por 1 hora. Durante esse período de incubação, adicionou-se 5-10 μ L de SF para que não houvesse a secagem do biopolímero na superfície. Após decorrido o tempo de incubação, realizou-se a lavagem da superfície eletrolítica com PBS 1X (2 lavagens consecutivas), com posterior secagem utilizando ar comprimido. O mesmo procedimento foi realizado com os AcMms (20 μ g/mL) reativos a linhagem tumoral prostática. Com a finalização da montagem dos filmes sobre os eletrodos, iniciou-se então a deposição de células PC-3 (1×10^6 /mL) previamente diluídas em PBS 1X. Para garantir uma melhor deposição das células sobre a superfície do imunossensor, foi realizado 5 etapas de homogeneização (a cada 10 minutos), durante 1 hora de incubação. O método eletroquímico utilizando voltametria cíclica foi empregado para a avaliação da variação da corrente sob um potencial aplicado (-0,6V a +0,6V), em uma velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. Esse método teve como finalidade determinar a capacidade de adsorção tanto dos filmes de SF e anticorpos sob a superfície do eletrodo de trabalho, bem como para a verificação da efetividade do imunossensores no reconhecimento de células tumorais prostáticas. Células A549 também foram utilizadas durante a verificação da capacidade de reconhecimento. O Dropview foi usado como interface para as análises mencionadas. Os voltamogramas cíclicos (VCs) e suas respectivas áreas foram determinados através do OriginPro 9.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aspectos morfológicos das linhagens celulares

As micrografias das linhagens epiteliais prostáticas e de mieloma murino expandidas em cultura foram exibidas na figura 10:

Figura 10. a) Linhagem epitelial de adenocarcinoma prostático de grau IV (PC-3, ATCC-1435™); b) Linhagem epitelial não tumoral da próstata (RWPE-1, BCRJ0389); c) Linhagem de mieloma murino (Sp2/0, BCRJ0227).



Fonte: elaborado pela própria autora

Referente aos aspectos morfológicos, as células tumorais prostáticas exibem um padrão de crescimento difuso, atipia celular, tamanhos variados, com núcleo e nucléolo anormais, característico de células malignas, que crescem sobrepostas umas às outras. Tratando-se da linhagem epitelial não tumoral RWPE-1, pode-se observar um crescimento ordenado de células justapostas e tamanhos semelhantes, com núcleo e nucléolo normais, que ao contrário das células cancerígenas, apresentam inibição por contato.

A escolha da linhagem PC-3 como imunógeno, deu-se a partir de um compilado de achados na literatura que confirmaram a expressão de um vasto repertório de produtos antigênicos (PSCA, $\alpha\beta3$, NTSR1, PTEN, pentraxina 3, folicatina, TGF- β , serpina B3, ERG1-TMPRSS₂, BRCA1/BRCA2 e MMP9) presentes nesta linhagem, dos quais se encontram superexpressos ou com suas funções reduzidas. Mutações nestas moléculas se associam com o fenótipo metastático agressivo, equiparando-se aos diferentes fenótipos tumorais da próstata que foram descritos por diversos pesquisadores (LIU *et al.*, 2008; TAYLOR *et al.*, 2012; MOROZ *et al.*, 2013; QI *et al.*, 2015; ROBINSON *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2016).

Já a linhagem de mieloma murino Sp2/0, originalmente obtida de um tumor de plasmócito, demonstra um formato de células linfoblásticas com crescimento em suspensão, embora é possível observar a sua capacidade de aderir levemente ao plástico. Além disso, é importante salientar que o parceiro de fusão não secreta imunoglobulinas no SCC e é sensível ao suplemento HAT.

5.2 Protocolo MTSI: avaliação dos aspectos físicos e fisiológicos dos camundongos BALB/c durante a tolerização

A repetição dos ciclos de tolerização tiveram como principal finalidade garantir o maior mapeamento de antígenos imunodominantes expressos pela linhagem não tumoral prostática, culminando com a eliminação de mais linfócitos T e B *naive* e células de memória reativos a estes antígenos e consequentemente, induzindo o estado de tolerância antigênica (DE ALMEIDA *et al.*, 2018). No entanto, depois de passados três dias do término do 2º ciclo de tolerização, utilizando a dose máxima de 200 mg/kg de Cy, os camundongos sujeitos a agenda de imunização, demonstraram notável piloereção, perda de pelo na região do dorso e uma súbita perda de peso, levando a uma debilidade geral do estado físico destes animais, evidenciado pela arqueadura corporal pronunciada. A figura 11 demonstra as alterações físicas aparentes observadas nos camundongos submetidos ao protocolo subtrativo. No dia 26, sete dias após o término do 2º ciclo, ocorreu o óbito de quatro camundongos, restando somente os animais A3 e A5, junto aos dois controles. Entretanto o A5 também faleceu com o término do 4º ciclo de tolerização, enquanto o A3 faleceu antes da terceira imunização com o imunógeno.

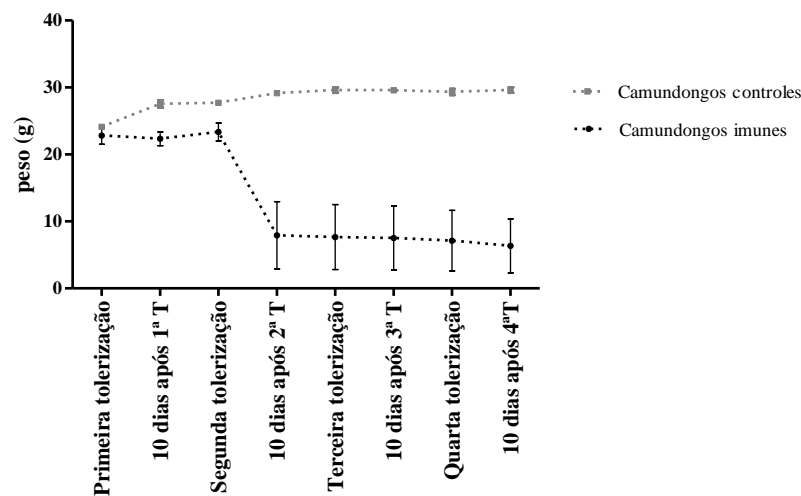
Figura 11. a) Camundongo controle que recebeu apenas o veículo; b) Camundongo imunizado durante a etapa de tolerização com a Cy (200mg/kg). c) Camundongo com pronunciada curvatura corporal após tratamento com a Cy.



Fonte: elaborado pela própria autora

No gráfico 1, pode-se observar uma queda brusca no peso dos animais submetidos ao protocolo MTSI. A análise estatística demonstrou diferença significativa ($p = 0,0001$) entre o grupo imunizado em relação ao grupo controle não imune. O aumento do desvio padrão se deve a diferença do peso dos camundongos, visto que aqueles que morreram foram mantidos no cálculo, com o peso anulado.

Gráfico 1. Mensuração do peso dos camundongos BALB/c submetidos ao protocolo MTSI empregando a concentração de 200 mg/kg peso corporal de Cy. A pesagem foi realizada no início de cada tolerização e após 10 dias do seu término. A análise estatística demonstrou uma diferença significativa entre o grupo controle não imune quando comparado ao grupo imunizado ($p = 0,0001$). A análise estatística empregada foi o *One Way ANOVA* pós teste de Bonferroni.

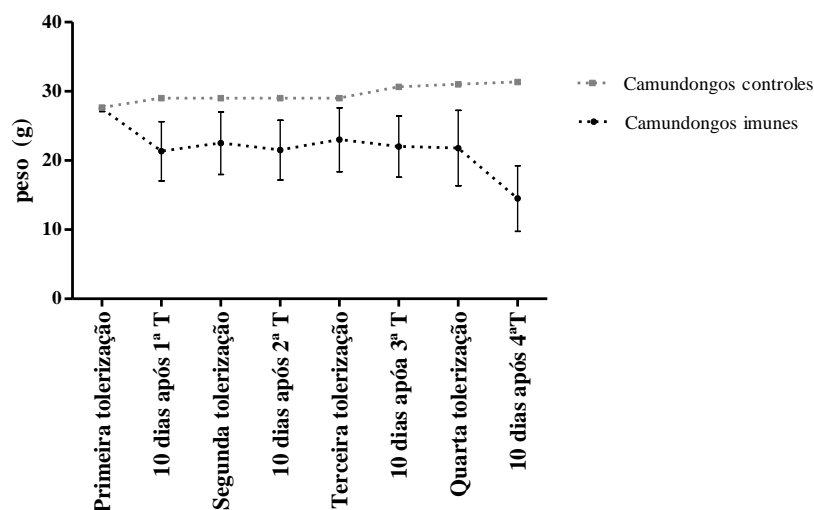


Fonte: elaborado pela própria autora

Com o óbito de 100% destes animais, iniciou-se uma segunda agenda de imunização, desta vez reduzindo a concentração de Cy para 150 mg/kg. Essa decisão foi baseada no estudo publicado por (HUYAN *et al.*, 2011), que constatou que doses superiores a 175 mg/kg peso corporal de Cy são responsáveis por uma deterioração geral do bem-estar e saúde dos camundongos tratados, impedindo a sobrevivência a longo prazo, enquanto a administração do fármaco na concentração de 150 mg/kg garante a imunossupressão esperada, sem ocasionar os mesmos efeitos de maneira tão exacerbada.

Durante a execução da agenda empregando 150 mg/kg de Cy, constatou-se a perda progressiva de peso e das mesmas alterações físicas relatadas anteriormente. O gráfico 2 demonstra a mensuração dos pesos de cada animal realizada ao longo da etapa de tolerização. A perda média de peso após o 1º ciclo de tolerização foi de 3,5 gramas e após o 4º ciclo de 5,5 gramas. Isso acarretou na morte de todos os animais, impossibilitando a continuidade do protocolo. A análise estatística demonstrou diferença significativa ($p = 0,0009$) entre o grupo imunizado em relação ao grupo controle não imune.

Gráfico 2. Mensuração do peso dos camundongos BALB/c submetidos ao protocolo MTSI empregando a concentração de 150 mg/kg de Cy. A pesagem foi realizada no início de cada tolerização e após 10 dias do seu término. A análise estatística demonstrou uma diferença significativa entre o grupo controle não imune quando comparado ao grupo imunizado ($p = 0,0009$). A análise estatística empregada foi o *One Way ANOVA* pós teste de Bonferroni.

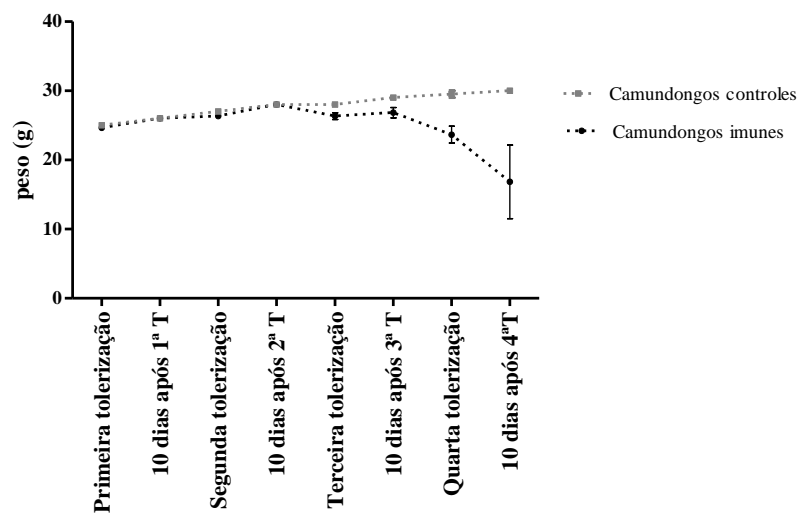


Fonte: elaborado pela própria autora

A vista dos fatos ocorridos, propusemos iniciar uma terceira agenda de imunização, utilizando uma concentração de 100 mg/kg peso corporal de Cy, repetindo as quatro etapas de

tolerização, combinada ao mascaramento de epítomos, conforme detalhado no item 3.2.1. A terceira agenda de imunização garantiu a sobrevivência de 4 animais dos 6 imunizados, junto aos 2 controles não imunes, visto que as duas mortes que ocorreram se deram após 5 dias do término da quarta tolerização. O gráfico 3 demonstra a mensuração do peso dos camundongos submetidos a quarta agenda. Empregando a mesma análise estatística descrita acima, não constatamos diferença significativa entre o peso do grupo controle não imune quando comparado ao grupo imunizado.

Gráfico 3. Mensuração do peso dos camundongos BALB/c submetidos ao protocolo MTSI empregando a concentração de 100 mg/kg peso corporal de Cy. A pesagem foi realizada no início de cada tolerização e após 10 dias do seu término. Não houve diferença estatística significativa entre o grupo controle não imune em relação ao grupo imunizado. A análise estatística empregada foi o *One Way ANOVA* pós teste de Bonferroni.



Fonte: elaborado pela própria autora

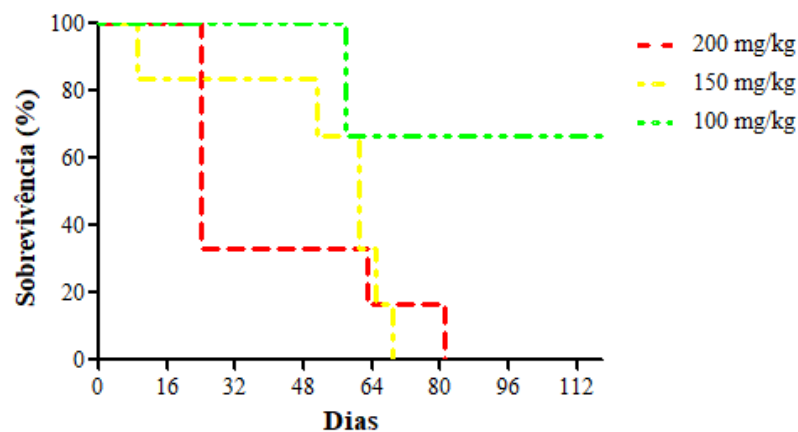
As análises de sobrevivência dos camundongos BALB/c submetidos a técnica MTSI empregando diferentes concentrações da Cy (200 mg/kg-100mg/kg), demonstraram a clara relação entre a queda de peso e mortalidade utilizando maiores doses do fármaco. Os dados são demonstrados no gráfico 4. Pode-se verificar que durante a execução da primeira agenda utilizando a dose de 200 mg/kg de Cy, ocorreu uma queda considerável de mortes (66,66%) no início do protocolo (dia 24), levando a manutenção de apenas 33,33% dos animais vivos, que

perdurou até o dia 63, com a ocorrência de um segundo decaimento, com apenas 16,67% de animais sobreviventes, e 100% de mortalidade no dia 81, com a constatação do último óbito.

Em relação a segunda agenda utilizando a concentração de 150 mg/kg de Cy, a porcentagem de sobrevivência se manteve em 83,33% até o dia 50, que passou para 66,66% no dia 51, 33,33% no dia 61, e 100% de mortalidade devido ao último óbito no dia 69. Entretanto, com a implementação da terceira agenda (100 mg/kg de Cy), a porcentagem de sobrevivência permaneceu em 100% até o dia 58, onde ocorreu 2 óbitos, levando ao decaimento para 66,66% que se manteve até o final da execução da agenda de imunização (dia 118). Desta forma, a sobrevida geral estimada pelo método de *Kaplan-Meier* foi de 66,66% em camundongos submetidos ao protocolo MTSI utilizando a concentração de 100 mg/kg de Cy.

Pela análise estatística aplicando o teste de *Log-rank*, foi possível verificar diferença estatisticamente significativa em relação as curvas de sobrevivência entre a primeira e terceira agenda ($p= 0,131$) e entre a segunda e terceira agenda ($p= 0,0395$). Não houve diferença estatística entre as curvas de sobrevivência da primeira e segunda agenda de imunização.

Gráfico 4. Curvas de sobrevivência estimadas pelo método de *Kaplan-Meier* em relação aos três diferentes protocolos de imunização utilizando diferentes concentrações de ciclofosfamida. A análise estatística através do teste de *Log-rank* demonstrou diferença estatisticamente significativa na porcentagem de sobrevivência entre as agendas de imunização que foram empregadas as concentrações de 200 mg/kg de Cy *versus* 100 mg/kg de Cy ($p= 0,131$) e entre as agendas empregando 150 mg/kg de Cy *versus* 100 mg/kg de Cy ($p= 0,0395$).

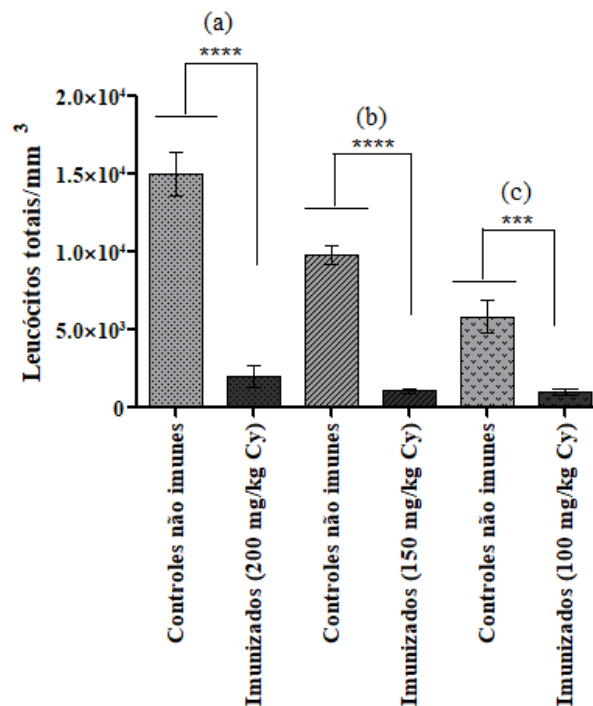


Fonte: elaborado pela própria autora

Para a verificação da imunossupressão causada pela administração da Cy, realizou-se a contagem de leucócitos totais circulantes/mm³ do sangue periférico, conforme demonstrado no gráfico 5. Por meio da análise estatística, aplicando o ANOVA pós teste de Bonferroni, demonstrou-se a diferença significativa entre o número de leucócitos circulantes entre os grupos

imunizados de cada agenda de imunização quando comparados com os seus respectivos controles não imunes, destacando que mesmo com o uso de uma menor (100 mg/kg), o estado de imunossupressão foi alcançado. Vale ressaltar que camundongos, incluindo a linhagem BALB/c, possuem como população predominante de glóbulos brancos, os linfócitos, que perfazem 70% de todos os leucócitos circulantes (SANTOS *et al.*, 2016). A análise estatística dos dois primeiros protocolos que foram empregadas as concentrações de 200 mg/kg e 150 mg/kg, demonstraram um valor de $p < 0,0001$ em relação aos controles não imunes, enquanto que para o protocolo empregando a concentração de 100 mg/kg, o valor de $p = 0,0002$.

Gráfico 5. Contagem de leucócitos totais/mm³ em camundongos submetidos a três diferentes protocolos empregando as concentrações de 200, 150 e 100 mg/kg peso corporal de Cy. O nº de leucócitos totais/mm³ dos animais que receberam o fármaco foi comparado com a contagem de leucócitos dos animais controles da mesma agenda de imunização. A análise estatística empregando ANOVA pós teste de Bonferroni demonstrou diferença estatística significativa em todas as agendas. Grupos imunizados com as concentrações de 200 mg/kg e 150mg/kg ($p < 0,0001$); grupo imunizado com a concentração de 100mg/kg ($p = 0,0002$).



Fonte: elaborado pela própria autora

Isso demonstra que a Cy de fato atuou na depleção destas células. Além disso, podemos notar uma clara distinção entre a contagem de leucócitos dos grupos controles. Isso pode ocorrer porque diferentes ninhadas exibem alterações nas contagens hematológicas. Somado a isso, temos o estresse do ambiente, que inclui o barulho, luminosidade, temperatura e variação no

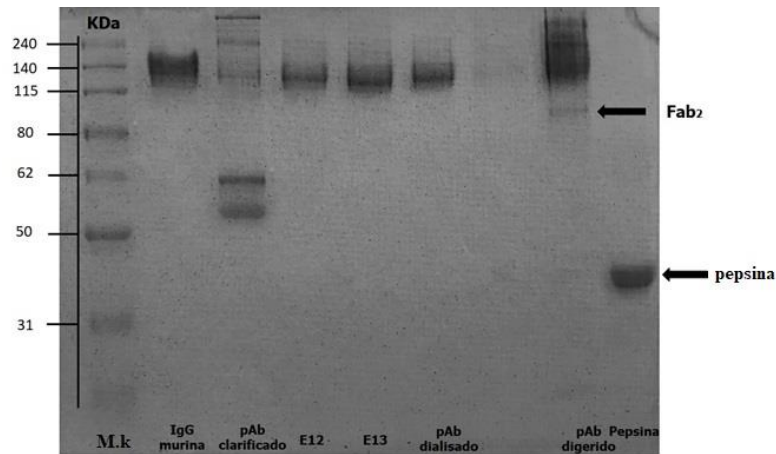
tempo de coleta, que podem afetar grandemente o número de células circulantes (ARAÚJO *et al.*, 2015).

5.2.1 Protocolo MTSI: avaliação dos aspectos físicos durante a imunização dos camundongos com células PC-3 mascaradas utilizando (Fab)₂

Dando continuidade a terceira agenda de imunização, os quatro camundongos que se mantiveram vivos após o término da etapa de tolerização, seguiram para a etapa de imunização com o imunógeno (PC-3), utilizando a técnica de mascaramento de epítomos. A técnica baseia-se na obtenção de pAbs oriundos do soro de camundongos BALB/c imunizados com a linhagem não tumoral. Esses anticorpos são reativos a antígenos presentes tanto no tolerógeno quanto no imunógeno. A subsequente incubação dos pAbs junto as células tumorais (imunógeno), tem como finalidade promover a interação antígeno-anticorpo, bloqueando sítios antigênicos comuns, compartilhados. Dessa forma, presume-se que a resposta celular e humoral seja direcionada contra epítomos ocultos ou fracamente imunogênicos (GOLDSTEIN & FISHER, 2007; BOWDISH *et al.*, 2007). A digestão com dos pAbs com pepsina teve como finalidade impedir a ativação de mecanismos de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) ou até mesmo mecanismos de citotoxicidade dependente de complemento (CDC), que poderiam diminuir o sucesso da técnica. A eliminação de fragmentos cristalizáveis (Fc) presentes nas moléculas de anticorpo por meio da digestão enzimática, impedem que essas funções celulares sejam ativadas (KINMAN & POMPARO, 2019).

Referindo-se a obtenção dos (Fab)₂, o gel *SDS-PAGE* (Figura 12), evidencia os pesos moleculares dos pAbs submetidos a diferentes etapas de processamento: a clarificação do soro policlonal, os eluatos obtidos após purificação, os pAbs dialisados após término da purificação e também os fragmentos obtidos após a digestão. A corrida foi conduzida sob condições não desnaturantes.

Figura 12. Gel SDS-PAGE 12% dos pAbs purificados e digeridos com pepsina. Mk: marcador de massa molecular; IgG murina: IgG1 murino comercial (*Elabscience*TM, E-AB-F09793A); E12: eluato 12 (1,12mg/mL); E13: eluato 13 (1,2 mg/mL); pAb dialisado; pAb digerido e pepsina.

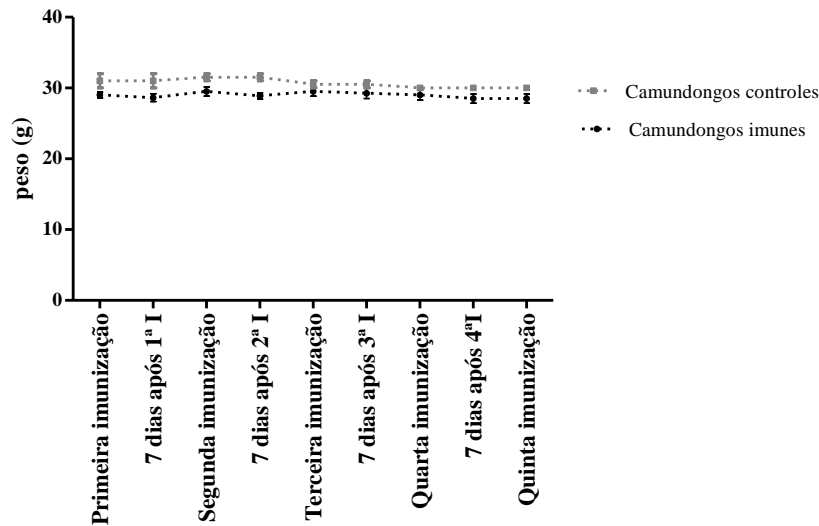


Fonte: elaborado pela própria autora

Pode-se notar que a etapa de purificação garantiu a obtenção dos pAbs (eluatos 12 e 13) sem a presença de nenhum outro interferente proteico, com uma única banda de aproximadamente 150kDa, equivalente a molécula inteira de anticorpo da classe IgG. No entanto, após a digestão enzimática, uma sutil banda equivalente a 110kDa foi observada, conforme representado pela seta (representado pela seta). Devido a baixa eficiência na geração de (Fab)₂, optou-se por realizar uma nova digestão, seguido de uma segunda etapa de purificação, a fim de obter-se somente os fragmentos que não se ligaram a coluna de imunoafinidade. Após a quantificação destes fragmentos, a concentração obtida foi de 0,073 mg/mL. Não foi possível repetir o protocolo de geração de (Fab)₂, sendo assim, utilizou-se os (Fab)₂ obtidos, mesmo com baixo rendimento.

Concomitantemente, a pesagem dos camundongos se manteve a cada imunização com o imunógeno. Constatou-se uma ligeira diminuição de peso durante as imunizações, que pode ser associado com as repetidas coletas de sangue realizadas. Ainda assim, não houve a verificação de efeitos deletérios aparentes, possibilitando a manutenção destes até o final da agenda. O gráfico 6 demonstra a pesagem dos camundongos que foi conduzida durante toda a etapa de imunização com a linhagem PC-3, utilizando células pré-tratadas com fragmentos (Fab)₂. A análise estatística realizada demonstrou diferença significativa ($p < 0,0001$) entre o grupo imunizado em relação ao grupo controle não imune.

Gráfico 6. Mensuração do peso dos camundongos BALB/c durante a imunização com o imunógeno. A pesagem foi realizada no início de cada imunização e após 7 dias do seu término. A análise estatística demonstrou uma diferença significativa entre o grupo controle não imune quando comparado ao grupo imunizado ($p < 0,0001$). A análise estatística empregada foi o *One Way ANOVA* pós teste de Bonferroni.



Fonte: elaborado pela própria autora

5.2.2 Verificação da eficiência dos protocolos subtrativos: durante a tolerização e após a imunização com o imunógeno

No que diz respeito a avaliação da reatividade dos pAbs durante a etapa de tolerização contra a linhagem tumoral (RWPE-1), foi confirmado que em todas as agendas empregando diferentes concentrações da Cy, os pAbs não demonstraram reatividade contra o tolerógeno. Na Tabela 1, apresentamos as densidades ópticas (DOs) obtidas do soro de cada animal imunizado e seus respectivos controles não imunes por ensaio de *whole-cell* ELISA. Podemos confirmar a não reatividade dos soros policlonais através da diferença significativa entre o controle positivo (que reconhece a célula tolerogênica) quando comparado aos soros dos animais que passaram pelos protocolos subtrativos utilizando Cy.

Tabela 1. Reatividades (DOs) dos pAbs frente a linhagem não tumoral (RWPE-1) pelo ensaio de *whole-cell* ELISA. Os soros policlonais foram obtidos após 10 dias do término da 2ª e 4ª tolerização. O asterisco demarca os animais que vieram a óbito antes da coleta de sangue periférico.

Soro policlonal	Protocolo de imunização utilizando 200 mg/kg de Cy (492 nm)		Protocolo de imunização utilizando 150 mg/kg de Cy (492 nm)		Protocolo de imunização utilizando 100 mg/kg de Cy (492 nm)	
	2ª tolerização	4ª tolerização	2ª tolerização	4ª tolerização	2ª tolerização	4ª tolerização
Controle positivo	3.55 ± 0.08	3.55 ± 0.08	3.55 ± 0.08	3.55 ± 0.08	3.55 ± 0.08	3.55 ± 0.08
Controle negativo	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.03
Controle secundário	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
Controle não imune 1	0.08 ± 0.03	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.05
Controle não imune 2	0.05 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.04	0.02 ± 0.02
Camundongo imune 1	*	*	0.05 ± 0.05	*	0.13 ± 0.08	0.03 ± 0.01
Camundongo imune 2	*	*	0.00 ± 0.00	*	0.03 ± 0.05	0.03 ± 0.01
Camundongo imune 3	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.02	*
Camundongo imune 4	*	*	0.02 ± 0.00	*	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.00
Camundongo imune 5	0.04 ± 0.02	0.13 ± 0.02	*	*	0.06 ± 0.01	*
Camundongo imune 6	*	*	0.00 ± 0.00	*	0.03 ± 0.04	0.00 ± 0.00

Fonte: elaborado pela própria autora

Pelo fato dos animais submetidos as duas primeiras agendas (200 mg/kg-150 mg/kg de Cy) não terem sobrevivido até o final do protocolo, não foi possível obter os pAbs circulantes que seriam gerados pela imunização entre ambas as células: não tumoral e tumoral. Dessa maneira foram apresentados somente os dados da reatividade dos pAbs obtidos após término da quarta agenda de imunização, referente ao protocolo subtrativo combinado a técnica de mascaramento de epítomos. Os dados referentes aos histogramas foram computados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Porcentagem de células PC-3 imunomarcadas com os anticorpos primários (pAbs) oriundos dos soros dos camundongos imunizados e dos controles não imunes. A mensuração da imunofluorescência foi conduzida a partir da ligação dos anticorpos primários com o anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (1:200) pelo ensaio de citometria de fluxo. Somente o animal 4 não passou pelo mascaramento de epítomos.

Reatividade dos pAbs	A1	A2	A4	A6
Controle de autofluorescência	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Controle positivo	3,3%	3,3%	3,3%	3,3%
Controle negativo	2%	2%	2%	2%
Controle secundário	6%	6%	6%	6%
Controle não imune 1	2,6%	2,6%	2,6%	2,6%
Camundongo imune 2	4,3%	4,3%	4,3%	4,3%
Camundongo imune 1ª coleta	82,6%	56,8%	36,7%	98,1%
Camundongo imune 2ª coleta	26,6%	95,8%	80,4%	98,5%
Camundongo imune 3ª coleta	95,8%	93,5%	73,4%	97,8%
Camundongo imune 4ª coleta	95%	96,6%	83%	99,1%
Camundongo imune 5ª coleta	80,3%	56%	98,6%	98,7%

Fonte: elaborado pela própria autora

Tabela 3. Porcentagem de células RWPE-1 imunomarcadas com os anticorpos primários (pAbs) oriundos dos soros dos camundongos imunizados e controles não imunes. A mensuração da imunofluorescência foi conduzida a partir da ligação dos anticorpos primários com o anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (1:200) pelo ensaio de citometria de fluxo. Somente o animal 4 não passou pelo mascaramento de epítomos.

Reatividade dos pAbs	A1	A2	A4	A6
Controle de autofluorescência	5%	5%	5%	5%
Controle positivo	99,4%	99,4%	99,4%	99,4%
Controle negativo	18,4%	18,4%	18,4%	18,4%
Controle secundário	2,4%	2,4%	2,4%	2,4%
Controle não imune 1	18,2%	18,2%	18,2%	18,2%
Camundongo imune 2	24,8%	24,8%	24,8%	24,8%
Camundongo imune 1ª coleta	43,6%	95,8%	38,6%	97%
Camundongo imune 2ª coleta	48,5%	95,4%	45,9%	93,7%
Camundongo imune 3ª coleta	41,3%	94,4%	46,1%	93,3%
Camundongo imune 4ª coleta	96%	98,3%	56,1%	29,3%
Camundongo imune 5ª coleta	28,7%	97,5%	77,5%	95,8%

Fonte: elaborado pela própria autora

No que diz respeito a avaliação da reatividade dos pAbs contra a linhagem tumoral, constatou-se uma média de 83,4% de células imunomarcadas após a quinta e última

imunização. Por outro lado, quando se avaliou os mesmos soros policlonais frente a linhagem não tumoral, a média de células imunomarcadas foi de 74,87%, muito similar ao que foi demonstrado para a linhagem PC-3. O soro do camundongo 1 foi o único que apresentou uma resposta diminuída frente a linhagem RWPE-1, com uma porcentagem de células imunomarcadas de apenas 28,7% após a última imunização. Diante desses resultados, presume-se que o estado de tolerância induzido pela Cy não foi suficiente para a depleção ou indução do estado de anergia da maior parte dos linfócitos T e B reativos a epítomos dominantes e comuns compartilhados entre ambas as linhagens. Denota-se que células tumorais demonstram uma elevada complexidade antigênica, e nesse sentido, existem muitas lacunas a serem superadas frente a mecanismos imunomodulatórios envolvidos com a capacidade do sistema imune em reconhecer antígenos tumorais. A presença de mutações em uma diversidade de epítomos presentes nestas células, predispõe mudanças em seus níveis de expressão, que acabam dificultando ainda mais o processo de reconhecimento por parte dos linfócitos T e B.

Rasmussen e Ditzel (2009) demonstraram a eficiência do emprego da IS na geração de 4 clones de hibridomas secretores de anticorpos reativos a linhagem celular M-4A4, derivada da linhagem de carcinoma mamário MDA-MB-435 e não reativos a linhagem usada como tolerógeno, NM-2C5 (derivada da mesma linhagem de carcinoma mamário), que diferem na capacidade de causar metástase. O que chama atenção neste estudo e também no estudo de Brooks *et al.*, (1993), é que tanto o tolerógeno quanto o imunógeno possuíam o mesmo parentesco, ou seja, foram originados de uma mesma linhagem e de um mesmo indivíduo.

Acredita-se que o insucesso da geração de AcMms preferencialmente voltados ao reconhecimento de epítomos da linhagem PC-3 possa ter ocorrido não somente pelas discrepâncias fenotípicas encontradas nas linhagens RWPE-1 e PC-3, mas estas linhagens foram estabelecidas a partir de indivíduos diferentes, de idades e etnias diferentes, o que pode ter sido mais um fator que dificultou a modulação da resposta imune induzida pela Cy, visto que as diferenças genotípicas entre ambas as linhagens são ainda mais discrepantes.

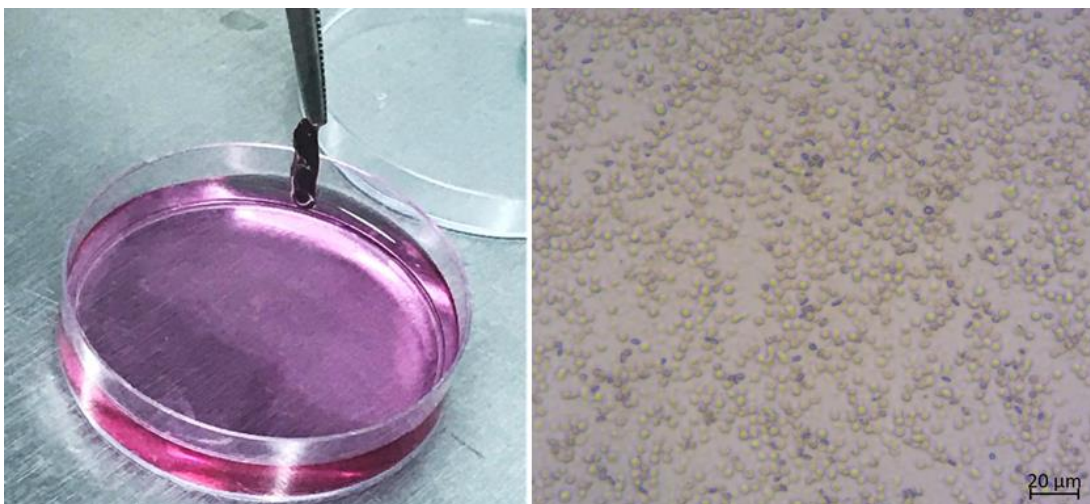
Somado a isso, o mascaramento de epítomos pode não ter sido satisfatório durante a etapa de imunização com a linhagem PC-3 devido as deficiências no controle da digestão dos pAbs e geração de (Fab)₂. A geração de poucos (Fab)₂ íntegros e estáveis pode ter impedido o bloqueio de antígenos majoritariamente dominantes por meio da interação antígeno-anticorpo. Diante dos resultados analisados, pode-se concluir que a implementação da técnica de mascaramento de epítomos associada ao protocolo subtrativo não garantiu um efeito potencializador na indução da tolerância imune contra antígenos comuns presentes nas duas linhagens.

Tratando-se do controle positivo para as células PC-3 (tabela 3), observou-se uma baixa porcentagem de células imunomarcadas (3,3%). Acredita-se que por ter sido usado uma alíquota de pAb com uma coloração semelhante a um soro hemolisado, os anticorpos deveriam estar degradados, o que impediu a ligação destes aos antígenos das células tumorais. Embora tenha sido usado o mesmo soro policlonal como controle positivo para as células RWPE-1, neste caso utilizou-se uma alíquota diferente que garantiu a constatação de uma elevada porcentagem de células imunomarcadas (99,4%).

5.3 Fusão celular e *screening* dos hibridomas

Embora os resultados obtidos dos soros policlonais não tenham demonstrado a eficácia esperada frente a geração de anticorpos preferencialmente reativos a célula tumoral, a fusão celular foi realizada com o intuito de selecionarmos hibridomas e posteriormente, clones de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais voltados ao reconhecimento do imunógeno. A figura 13 demonstra o órgão esplênico retirado sob condições assépticas, com o posterior isolamento dos esplenócitos presentes em seu interior.

Figura 13. Extração total do baço localizado na cavidade abdominal, no hipocôndrio esquerdo entre a nona e décima segunda costelas (lado esquerdo). O órgão apresenta cor púrpura-avermelhada. Isolamento dos esplenócitos após processamento do órgão (lado direito).



Fonte: elaborado pela própria autora

O quadro 4 sumariza os dados obtidos das fusões celulares que foram realizadas a partir da retirada do baço de cada animal submetido ao protocolo subtrativo:

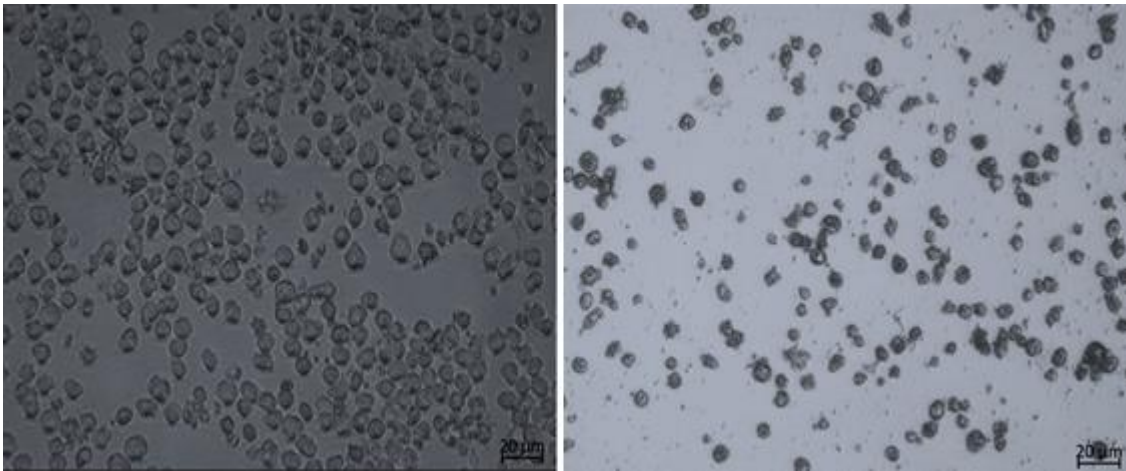
Quadro 4. Dados das fusões celulares a partir da retirada do baço dos camundongos 1,2, 4 e 6 submetidos a técnica MTSI combinada ao mascaramento de epítomos. Somente o animal 4 não passou pelo mascaramento de epítomos.

	Animal 1	Animal 2	Animal 4	Animal 6
Nº de linfócitos	7,6x10 ⁷	5,2x10 ⁷	7,5x10 ⁷	6x10 ⁷
Nº de mielomas	1,52x10 ⁷	1,04x10 ⁷	1,5x10 ⁷	1,2x10 ⁷
Nº de células totais	9,12x10 ⁷	6,24x10 ⁷	9x10 ⁷	7,2x10 ⁷
Volume de PEG	912µL	624µL	900µL	720µL
Volume de SFB	4,56mL	3,12mL	4,5mL	3,6mL
Volume de ME	17,33mL	11,86mL	17,1mL	13,68mL
Nº de poços plaqueados	218	149	216	173

Fonte: elaborado pela própria autora

O aditivo HAT adicionado aos poços com células recém-fusionadas teve como função selecionar apenas híbridos originados da fusão entre esplenócito + mieloma, impedindo a proliferação de mielomas não fusionados ou fusionados entre si. Isso é possível, pois a linhagem Sp2/0 não possui a enzima HGPRT (*Hipoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*), necessária para a conversão de hipoxantina e timidina presentes no meio, em nucleotídeos e timidilato. Devido a presença de aminopterina no meio HAT, ocorre a ativação de uma via alternativa, chamada de via de salvamento (*salvage*), a qual células, tais como os esplenócitos, conseguem utilizar devido a presença da enzima HGPRT, diferentemente das células de mieloma que não o fazem, pela falta da mesma. Os nucleotídeos e timidilato gerados após a metabolização são aqueles que irão compor a cadeia de DNA e garantir que a divisão celular seja mantida. Dessa maneira, somente os híbridos originados da fusão entre mieloma e esplenócitos conseguem propagar-se em cultivo. Os linfócitos B que não se fusionaram, morrerão em aproximadamente 7 dias após a fusão, uma vez que essas células exibem um tempo de vida limitado. Na Figura 14 pode-se observar não somente os aspectos morfológicos das células de mieloma anteriormente a adição do HAT, como também a morte destas células após a adição do aditivo HAT.

Figura 14. Controle de células mielomatosas murinas (Sp2/0): a esquerda trata-se das células vivas, logo após a fusão celular e a direita trata-se das células mortas após 3 dias da adição do aditivo HAT.



Fonte: elaborado pela própria autora

Os timócitos adicionados aos poços serviram como importantes mediadores do aumento da capacidade proliferativa dos híbridos recém-formados, por serem fontes de citocinas e fatores de crescimento (Figura 15).

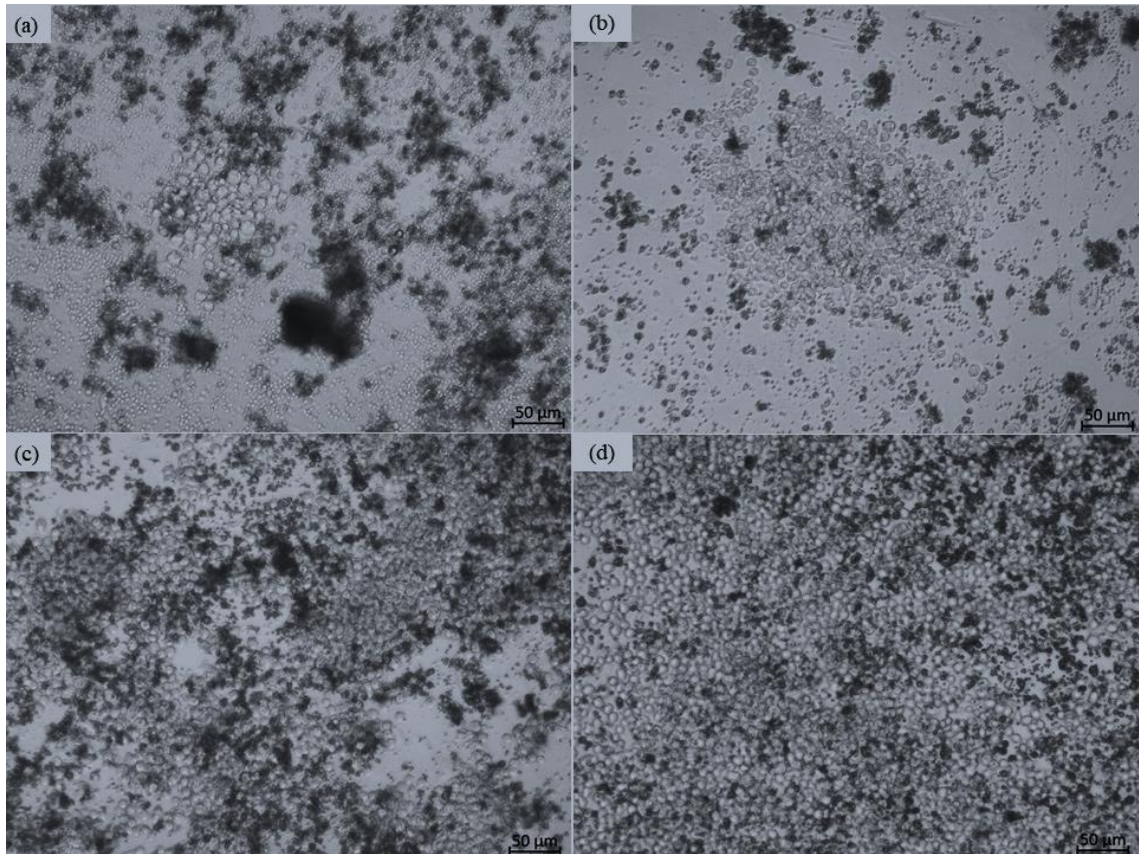
Figura 15. Timectomia – extração total do timo localizado na porção superior do mediastino e posterior ao osso esterno (lado esquerdo). Isolamento dos timócitos após processamento do órgão (lado direito).



Fonte: elaborado pela própria autora

Após 7 dias da fusão celular, verificou-se a formação das primeiras colônias de hibridomas (Figura 16) e no 10º dia iniciou-se a seleção dos poços contendo hibridomas em crescente expansão, cujos SCC foram testados contra o imunógeno.

Figura 16. Micrografias demonstrando a geração de colônias de hibridomas após técnica de fusão celular. As imagens foram retiradas após (a) 7 dias, (b) 10 dias, (c) 12 dias e (d) 14 dias após a fusão celular.



Fonte: elaborado pela própria autora

O quadro 5 traz o número de poços retidos da fusão derivada de cada camundongo e também o número de hibridomas que passaram por cada um dos três *screenings*.

Quadro 5. Dados referente ao número de poços retidos e que passaram por três *screenings* consecutivos durante a seleção de hibridomas estáveis e reativos ao imunógeno.

<i>Screening</i> dos hibridomas	Camundongo 1	Camundongo 2	Camundongo 4	Camundongo 6
Nº de poços retidos	44	136	116	14
Nº de hibridomas reativos após o 1º <i>screening</i>	0	10	18	0
Nº de hibridomas reativos após o 2º <i>screening</i>	0	5	4	0
Nº de hibridomas reativos após o 3º <i>screening</i>	0	5	3	0

Fonte: elaborado pela própria autora

Pode-se verificar a partir dos resultados apresentados no quadro acima que o número de hibridomas retidos derivados da fusão celular de cada animal foi discrepante. Isso ocorreu porque uma grande quantidade de poços apresentou contaminação bacteriana devido a quedas de energia que ocorreram durante as manipulações. Infelizmente muitos poços que seriam testados tiveram que ser descartados.

As Tabelas 4, 5 e 6 trazem os resultados da reatividade dos híbridos derivados da fusão celular do camundongo 2, que mantiveram sua reatividade pelo imunógeno durante os três *screenings* consecutivos.

Tabela 4. Reatividade dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 1º *screening* referente a fusão celular do animal 2. Os resultados apresentados tratam-se tanto dos híbridos que foram selecionados pela técnica de citometria de fluxo, assim como por *whole-cell* ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.

Hibridomas derivados da fusão do camundongo 2	Porcentagem de células PC-3 imunomarcadas	Hibridomas derivados da fusão do camundongo 2	DOs obtidas em 492 nm
Controle de autofluorescência	0,1%	Branco	0,071 ± 0,006
Controle positivo	82,4%	Controle positivo	0,857 ± 0,028
Controle negativo	28,9%	Controle negativo	0,192 ± 0,020
Controle secundário	12,1%	Controle secundário	0,068 ± 0,000
PC3S4-2-2	50,1%	PC3S4-2-9	0,648 ± 0,041
PC3S4-2-4	83%	PC3S4-2-3-10	0,745 ± 0,016
PC3S4-2-5	55,4%	PC3S4-2-2-12	0,760 ± 0,067
PC3S4-2-6	47%	PC3S4-2-6	0,378 ± 0,002
PC3S4-2-12	42,7%		
PC3S4-2-10	80,4%		

Fonte: elaborado pela própria autora

Tabela 5. Reatividade dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 2º *screening* referente a fusão celular do animal 2. Os resultados apresentados tratam-se dos híbridos que foram selecionados por *whole-cell* ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.

Hibridomas derivados da fusão do camundongo 2	DOs obtidas em 492 nm
Branco	0,072 ± 0,005
Controle positivo	0,412 ± 0,070
Controle negativo	0,081 ± 0,002
Controle secundário	0,073 ± 0,000
PC3S4-2-5	0,344 ± 0,004
PC3S4-2-12	0,553 ± 0,030
PC3S4-2-9	0,268 ± 0,053
PC3S4-2-10	0,396 ± 0,033
PC3S4-2-12	0,261 ± 0,024

Fonte: elaborado pela própria autora

Tabela 6. Reatividade dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 3º *screening* referente a fusão celular do animal 2. Os resultados apresentados tratam-se dos híbridos que foram selecionados por *whole-cell* ELISA e que seguiram para o estabelecimento do banco celular de trabalho. A leitura foi conduzida em 492 nm.

Hibridomas derivados da fusão do camundongo 2	DOs obtidas em 492 nm
Branco	0,071 ± 0,006
Controle positivo	0,689 ± 0,008
Controle negativo	0,170 ± 0,021
Controle secundário	0,081 ± 0,032
PC3S4-2-5	0,669 ± 0,018
PC3S4-2-12	0,560 ± 0,010
PC3S4-2-9	0,601 ± 0,012
PC3S4-2-10	0,303 ± 0,031
PC3S4-2-2-12	0,427 ± 0,024

Fonte: elaborado pela própria autora

As Tabelas 7, 8 e 9 se referem aos hibridomas que passaram pelos três *screenings* consecutivos referente ao animal 4.

Tabela 7. Reatividade (DOs) dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 1º *screening* referente a fusão celular do animal 4. Os resultados apresentados tratam-se dos híbridos que foram selecionados por *whole-cell* ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.

Hibridomas derivados da fusão do camundongo 4	DOs obtidas em 492 nm	Hibridomas derivados da fusão do camundongo 4	DOs obtidas em 492 nm
Branco	0,068 ± 0,006	PC3S4-4-11	0,292 ± 0,020
Controle positivo	0,428 ± 0,004	PC3S4-4-8	0,370 ± 0,014
Controle negativo	0,082 ± 0,000	PC3S4-4-11	0,515 ± 0,053
Controle secundário	0,058 ± 0,000	PC3S4-4-7	0,327 ± 0,033
PC3S4-4-5	0,258 ± 0,063	PC3S4-4-6	0,254 ± 0,067
PC3S4-4-7	0,317 ± 0,083	PC3S4-4-2-2	0,226 ± 0,000
PC3S4-4-2	0,278 ± 0,043	PC3S4-4-2-10	0,229 ± 0,000
PC3S4-4-8	0,421 ± 0,009	PC3S4-4-2-2	0,357 ± 0,041
PC3S4-4-12	0,793 ± 0,093	PC3S4-4-2-11	0,343 ± 0,000
PC3S4-4-1	1,063 ± 0,051	PC3S4-4-2-6	0,273 ± 0,019
PC3S4-4-14	0,365 ± 0,016	PC3S4-4-2-9	0,357 ± 0,019

Fonte: elaborado pela própria autora

Tabela 8. Reatividade (DOs) dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 2° *screening* referente a fusão celular do animal 4. Os resultados apresentados tratam-se dos híbridos que foram selecionados por *whole-cell* ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.

Hibridomas derivados da fusão do camundongo 4	DOs obtidas em 492 nm
Branco	0,091 ± 0,007
Controle positivo	1,10 ± 0,234
Controle negativo	0,078 ± 0,020
Controle secundário	0,060 ± 0,031
PC3S4-4-1	0,227 ± 0,060
PC3S4-4-7	0,207 ± 0,008
PC3S4-4-8	0,214 ± 0,023
PC3S4-4-11	0,303 ± 0,031

Fonte: elaborado pela própria autora

Tabela 9. Reatividade (DOs) dos anticorpos secretados pelos hibridomas durante o 3° *screening* referente a fusão celular do animal 4. Os resultados apresentados tratam-se dos híbridos que foram selecionados por *whole-cell* ELISA e que seguiram para o estabelecimento do banco celular de trabalho. A leitura foi conduzida em 492 nm.

Hibridomas derivados da fusão do camundongo 4	DOs obtidas em 492 nm
Branco	0,055 ± 0,004
Controle positivo	0,561 ± 0,021
Controle negativo	0,086 ± 0,000
Controle secundário	0,067 ± 0,020
PC3S4-4-8	0,666 ± 0,069
PC3S4-4-1	0,680 ± 0,027
PC3S4-4-11	0,373 ± 0,010

Fonte: elaborado pela própria autora

Fica evidente também que a quantidade de híbridos que conseguem manter sua estabilidade e capacidade de secretar anticorpos que se mantêm reativos ao imunógeno até o terceiro *screening* é muito baixa, sendo esse fator parcialmente dependente das condições de cultivo e manejo das células. Uma vez que precisamos manter os poços retidos sem a troca de meio por 3 dias durante cada *screening*, muitas células começam a morrer em cultura, e aquelas que são repicadas para poços maiores com o intuito de realizarmos os *screenings* seguintes, devem se recuperar para então passar por uma nova cessação do meio. Esse processo acaba acarretando na morte de muitos híbridos, que poderiam estar secretando anticorpos de interesse.

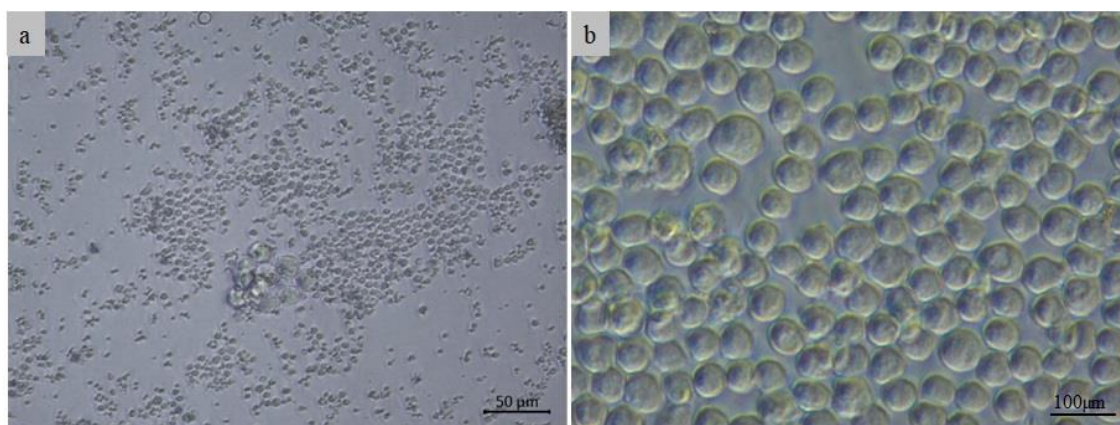
Além disso, devido as perdas cromossômicas tardias que podem ocorrer durante a expansão destas células, muitos destes híbridos podem sucumbirem e pararem de secretar anticorpos reativos ao imunógeno. Diante desses resultados, é notório que um dos maiores desafios em se cultivar hibridomas está na instabilidade destas células de se manterem viáveis e funcionais.

Dos 8 híbridos que foram retidos para a clonagem celular, 4 deles, a saber PC3S4-2-5, PC3S4-2-10, PC3S4-2-12 e o PC3S4-4-11 foram expandidos para a etapa de clonagem celular.

5.4 Clonagem celular e *screening* dos clones de hibridomas

Após os hibridomas selecionados atingirem viabilidade de 90%, estes foram submetidos a técnica de diluição limitante. A figura 17 demonstra um dos poços da placa de 96 poços contendo um clone único e seu crescimento progressivo ao longo dos dias de cultivo.

Figura 17. Seleção de clones únicos após técnica de diluição limitante: a) colônia única de hibridoma depositada no poço da placa de 96 poços após 4 dias da clonagem (20x); b) aumento do número de células derivadas de um único clone de hibridoma após 7 dias de cultivo em meio MC (100x).



Fonte: elaborado pela própria autora

Em relação aos clones únicos derivados do híbrido PC3S4-2-5, foi possível selecionar 91 clones únicos de 133 poços que continham híbridos depositados, enquanto que em relação ao híbrido PC3S4-2-10, selecionou-se 58 clones únicos de 147 poços que continham células em pleno crescimento. Já em relação ao híbrido PC3S4-4-11, foi possível selecionar 104 clones únicos de 150 poços contendo hibridomas. O híbrido PC3S4-2-12 não respondeu as condições de cultivo e infelizmente não conseguimos realizar o estabelecimento desta linhagem para prosseguirmos com a clonagem. A tabela 10 traz os resultados da reatividade dos clones únicos que se mostraram reativos a linhagem PC-3.

Tabela 10. Reatividade (DOs) dos AcMms secretados pelos clones de hibridomas durante o 1º *screening*. Os resultados apresentados foram obtidos através do ensaio de *whole-cell* ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.

Clones derivados dos híbridos PC3S4-2-5, PC3S4-2-10 e PC3S4-4-11	DOs obtidas em 492 nm
Branco	0,06 ± 0,004
Controle positivo	1,82 ± 0,003
Controle negativo	0,31 ± 0,007
Controle secundário	0,09 ± 0,002
PC3S4-2-5C2	1,60 ± 0,015
PC3S4-2-5C3	2,18 ± 0,002
PC3S4-2-5C11	1,60 ± 0,004
PC3S4-2-5E2	0,92 ± 0,001
PC3S4-2-5E4	1,45 ± 0,020
PC2S4-2-5E8	1,15 ± 0,002
PC3S4-2-5F3	1,82 ± 0,002
PC3S4-2-5F10	0,87 ± 0,004
PC3S4-2-5G9	1,17 ± 0,008
PC3S4-2-10C12	0,45 ± 0,002
PC3S4-2-10D1	1,19 ± 0,003
PC3S4-2-10D9	0,60 ± 0,010
PC3S4-2-10E11	1,89 ± 0,003
PC3S4-4-11D4	0,53 ± 0,015

Fonte: elaborado pela própria autora

A partir disso, os clones de hibridomas listados acima foram repicados para poços de uma placa de 24 poços e após recuperação da viabilidade, foi realizado nova retenção dos SCC para a testagem contra ambas as linhagens: RWPE-1 e PC-3. A tabela 11 traz os resultados obtidos pelo ensaio de *whole-cell* ELISA.

Tabela 11. Reatividade (DOs) dos AcMms secretados pelos clones de hibridomas durante o 2º *screening* frente ambas as linhagens: RWPE-1 e PC-3. Os resultados apresentados foram obtidos através do ensaio de *whole-cell* ELISA. A leitura foi conduzida em 492 nm.

Clones derivados dos híbridos PC3S4-2-5, PC3S4-2-10 e PC3S4-4-11	DOs obtidas em 492 nm	
	RWPE-1	PC-3
Branco	0,07 ± 0,007	0,08 ± 0,005
Controle positivo	0,97 ± 0,004	0,98 ± 0,003
Controle negativo	0,14 ± 0,006	0,13 ± 0,006
Controle secundário	0,16 ± 0,003	0,15 ± 0,002
PC3S4-2-5C2	1,73 ± 0,010	1,49 ± 0,002
PC3S4-2-5C3	1,27 ± 0,003	1,25 ± 0,002
PC3S4-2-5C11	1,56 ± 0,001	1,58 ± 0,002
PC3S4-2-5E2	0,48 ± 0,011	-
PC3S4-2-5E4	1,59 ± 0,030	1,59 ± 0,009
PC2S4-2-5E8	1,16 ± 0,005	1,06 ± 0,004
PC3S4-2-5F3	1,29 ± 0,007	1,26 ± 0,005
PC3S4-2-5G9	1,23 ± 0,012	1,29 ± 0,004
PC3S4-4-11D4	0,60 ± 0,015	-

Fonte: elaborado pela própria autora

Dos 9 SCC testados derivados dos clones de hibridomas, apenas 7 deles mantiveram suas reatividades frente a linhagem PC-3. No entanto, nenhum dos AcMms exibiu reatividade somente pela linhagem tumoral. A mesma reatividade foi observada frente as células não tumorais. Yasumoto *et al* (2012) demonstraram que o emprego da IS possibilitou a geração de um AcM (2P-1-2-1) que demarcou por meio do ensaio de imunohistoquímica, tanto porções do tecido pancreático acinar não neoplásico, quanto acinar neoplásico. O estudo ressaltou que o AcM demonstrou 100% de especificidade pelas células acinares do tecido pancreático, uma vez que não houve a constatação de nenhuma demarcação em amostras teciduais de carcinomas neuroendócrinos e carcinomas ductais do mesmo órgão.

Nesse sentido, podemos prever que embora os AcMms obtidos pela MTSI combinado ao mascaramento de epítomos não terem demonstrado reatividade exclusiva pela linhagem tumoral metastática, pode-se chegar a resultados satisfatórios quando os mesmos AcMms forem testados frente a diferentes amostras clínicas teciduais de carcinoma prostático, apresentando diferentes escores de *Gleason*. Esses ensaios seriam de extrema importância para avaliação do comportamento *in vivo* destas biomoléculas e para a determinação da capacidade de

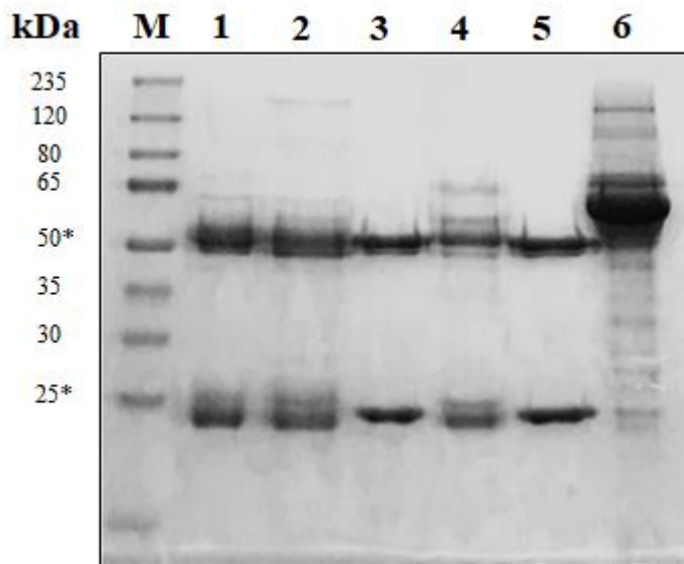
reconhecimento de espécimes clínicos prostáticos e até mesmo de um fenótipo tumoral específico. Infelizmente a técnica de IH não foi possível de ser realizada diante dos acontecimentos da pandemia.

Tratando-se do desenvolvimento dos imunossensores, esses AcMms continuam sendo interessantes para a sua confecção, uma vez que o desenvolvimento de um imunossensor capaz de detectar células malignas exclusivas da próstata e não reagir frente a células malignas de outro tecido/órgão, continua sendo de grande valia, cumprindo com a função para qual foram delineados.

5.5 Avaliação da eficiência da purificação dos AcMms em coluna de imunoafinidade

Os híbridos PC3S4-2-5C2, PC3S4-25C11 e o PC3S4-2-5E4 foram selecionados para serem expandidos, purificados e posteriormente caracterizados. Junto a estes clones de hibridomas, o clone PC3SS-2-7A50 também passou pelas caracterizações. Esse clone foi originado de protocolos de imunização subtrativa de nosso grupo e demonstrou reatividade comprovada frente a linhagem tumoral (anexo II). A Figura 18 exibe o perfil eletroforético dos anticorpos purificados, evidenciando a presença de 2 bandas características das cadeias pesadas e leves das imunoglobulinas pertencentes a classe IgG, sendo estas de 50 kDa e 25 kDa, respectivamente. Foi confirmado o sucesso da purificação dos anticorpos, com a eliminação de quaisquer interferentes proteicos que pudessem influenciar nas etapas seguintes.

Figura 18. Gel SDS PAGE 12% dos AcMms purificados sob condições desnaturantes. M: marcador de massa molecular (*BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder*) contendo proteínas de 235kDa-25kDa; Raia 1: IgG1 murino comercial; Raia 2: AcMm derivado do clone PC3SS 27A50; Raia 3: AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C2; Raia 4: AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C11; Raia 5: AcMm derivado do clone PC3S4-2-5E4; Raia 6: alíquota não ligada (*flow-through*) na coluna de imunoafinidade.



Fonte: elaborado pela própria autora

A mensuração do conteúdo proteico foi demonstrada na tabela 12. Pode-se constatar que a concentração obtida dos eluatos condiz com o tipo de cultivo realizado (cultivo estático). Embora as concentrações dos AcMms obtidas foram baixas, foram suficientes para a realização dos imunoenaios, uma vez que essas biomoléculas são altamente seletivas e específicas e não requerem diluições tão baixas para seu uso. Além disso, diferentes diluições geralmente são necessárias para a eliminação de possíveis *backgrounds* que são indesejados durante a interpretação dos resultados.

Tabela 12. Resultados das concentrações em mg/mL dos eluatos derivados dos AcMms após a purificação em coluna de imunoafinidade. Os AcMms foram derivados dos clones PC3SS-2-7A50, PC3S4-2-5C2, PC3S4-2-5C11 e PC3S4-2-5E4. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro de microplacas, modelo *Epoch™*, com leitura em 260/280 nm.

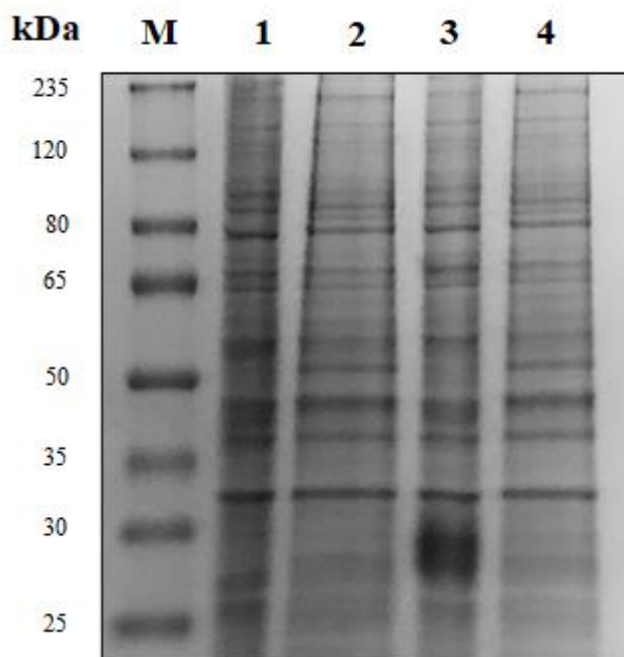
PC3SS 2-750		PC3S4-2-5C2		PC3S4-2-5C11		PC3S4-2-5E4	
Eluatos	mg/mL	Eluatos	mg/mL	Eluatos	mg/mL	Eluatos	mg/mL
E12	0,065	E12	0,080	E12	0,056	E12	0,027
E13	0,015	E13	0,010	E13	0,063	E13	0,173
E14	0,179	E14	0,045	E14	0,242	E14	0,138
E15	0,023	E15	0,270	E15	0,124	E15	0,015
E16	0,045	E16	0,235	E16	0,030	E16	0,001

Fonte: elaborado pela própria autora

5.6 Identificação dos pesos moleculares aproximados dos antígenos reconhecidos pelos AcMms

Previamente ao *immunoblotting*, foi realizado a corrida dos extratos proteicos de ambas as linhagens celulares, a fim de verificar-se o perfil proteico e a integridade dos mesmos. Na Figura 19 foi demonstrado o gel *SDS-PAGE* dos extratos celulares das linhagens PC-3 e RWPE-1 sob condições não desnaturantes e desnaturantes. A presença de diferentes proteínas exibindo diferentes massas moleculares (235-25 kDa) foram observadas tanto para os extratos de células PC-3, como para os extratos de células RWPE-1. A similaridade dos perfis proteicos também foi constatada entre ambas as células.

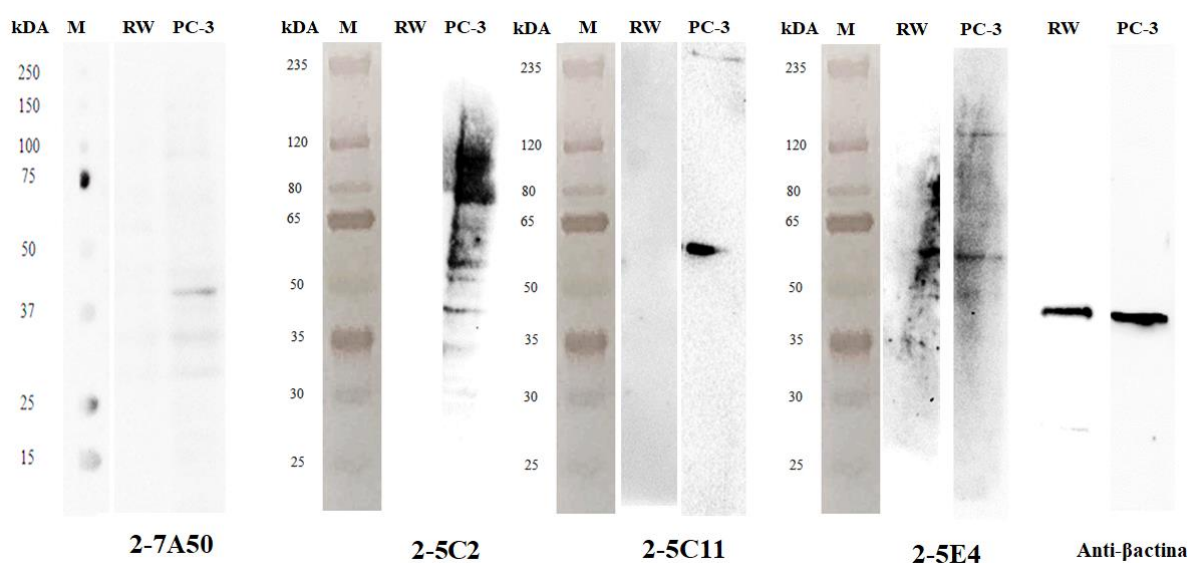
Figura 19. Gel *SDS-PAGE* 12% de ambos os extratos proteicos das linhagens PC-3 e RWPE-1. M: marcador de peso molecular (*BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder*) contendo proteínas de 235kDa-25kDa. Raia 1: extrato proteico da linhagem PC-3 sob condições não desnaturantes; Raia 2: extrato proteico da linhagem PC-3 sob condições desnaturantes; Raia 3: extrato proteico da linhagem RWPE-1 sob condições não desnaturantes; Raia 4: extrato proteico da linhagem RWPE-1 sob condições desnaturantes.



Fonte: elaborado pela própria autora

Em relação aos resultados observados pelos *immunoblottings*, verificou-se que o AcMm derivado do clone PCSS 2-7A50 reconheceu uma proteína de aproximadamente 45 kDa no extrato proteico da linhagem PC-3, mas a mesma imunomarcação não foi constatada no extrato proteico de células não tumorais da linhagem RWPE-1. Já os AcMms derivados dos clones PC3S4-2-5C2, PC3S4-2-5C11 e PC3S4-2-5E4 demarcaram proteínas nos extratos proteicos da linhagem PC-3 de aproximadamente 48kDa/55kDa (para o clone PC3S4-2-5C2) e 62kDa (para os dois últimos), visto que somente o AcMm PC3S4-2-5E4 exibiu uma possível marcação nos extratos de células RWPE-1, embora o arraste da marcação tenha impossibilitado a confirmação do peso molecular da proteína reconhecida (Figura 20).

Figura 20. *Western Blot* dos AcMms derivados dos clones PC3SS7A50, PC3S4-2-5C2, PC3S4-2-5C11 e PC3S4-2-5E4. M: marcador de peso molecular (*BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder*) contendo proteínas de 235kDa-25kDa. O AcMm derivado do clone PC3SS 2A750 demarcou uma proteína de aproximadamente 45kDa, enquanto o AcMm derivado do clone PC3SS-2-5C11 demarcou uma proteína de aproximadamente 62 kDa. Ambas as marcações foram específicas para os extratos da linhagem PC-3. Os demais AcMms derivados dos híbridos PC3S4-2-5C2 e PC3S4-2-5E4 levaram a marcações inespecíficas e inconclusivas. O anticorpo primário anti- β actina (*Elabscience™*, E-AB-30422) demarcou bandas de aproximadamente 43kDa em ambos os extratos proteicos. A revelação foi realizada pelo método quimioluminescente utilizando luminol na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG peroxidase/HRP* (*Elabscience™*, E-AB-1001).



Fonte: elaborado pela própria autora

A imunomarcação com o anticorpo anti- β -actina (em ambos os extratos proteicos), confirma que todas as etapas foram bem sucedidas, embora o emprego de maiores diluições dos anticorpos poderia acarretar em marcações mais específicas, das quais não foram conclusivas tratando-se dos AcMs murinos derivados dos clones PC3S4-2-5C2 e PC3S4-2-5E4.

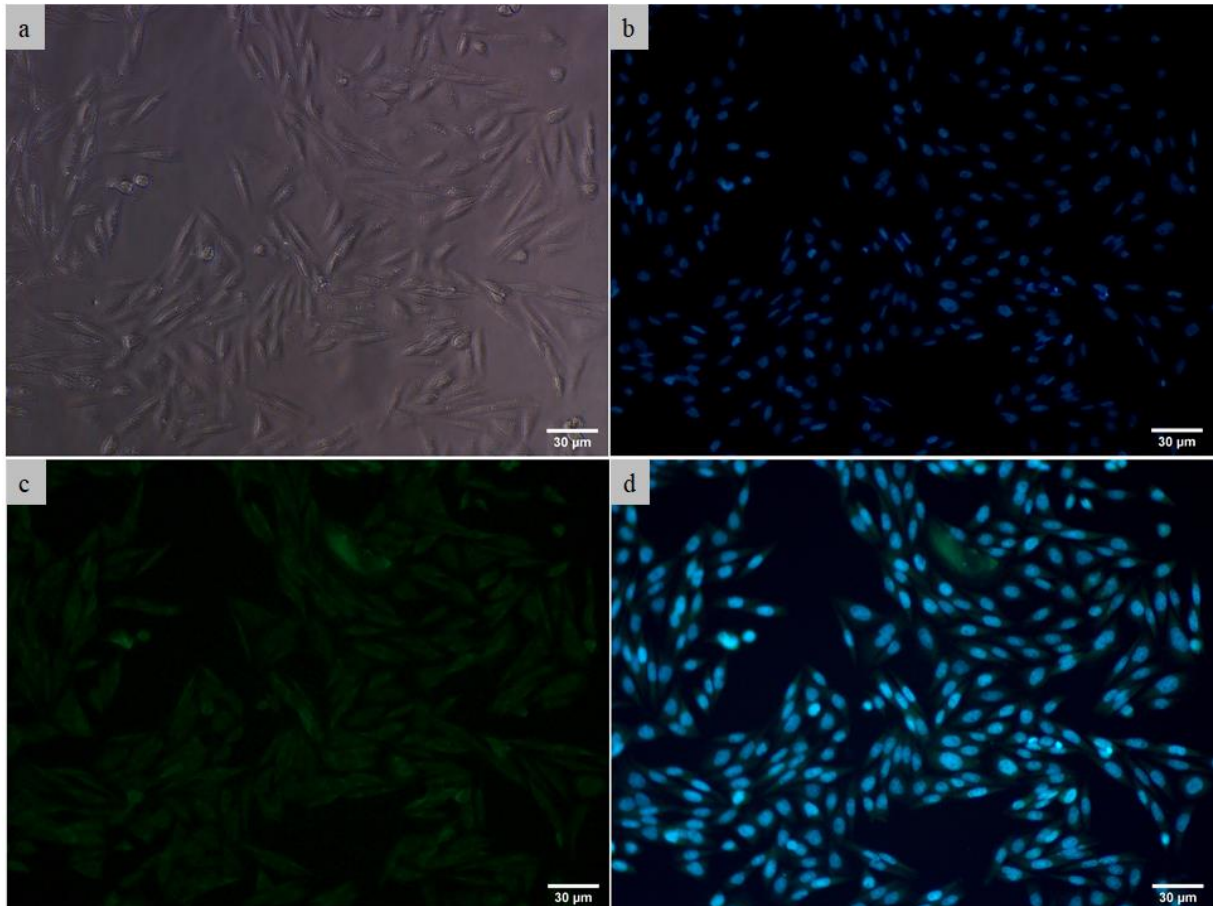
Mesmo que os *blottings* permitiram a identificação do peso aproximado dos biomarcadores reconhecidos pelos diferentes AcMms, a determinação da classe proteica pertencente a estes antígenos e a compreensão dos mesmos com o processo tumoral, seria possível somente através da proteômica dos AcMms. A análise proteômica garantiria a determinação das sequências peptídicas presentes nas regiões determinantes de complementariedade (CDR), encontradas na extremidade N-terminal da porção (Fab)₂ dos AcMms e através da conversão destas sequências peptídicas em espectros de massas, seria possível a determinação da estrutura química das sequências de aminoácidos e a posterior verificação da existência dos biomarcadores antigênicos em bancos de dados, incluindo o

Mascot Essa etapa não foi realizada no presente estudo, porém poderia ser escopo de análises futuras.

5.7 Identificação da localização celular dos antígenos reconhecidos pelos AcMms

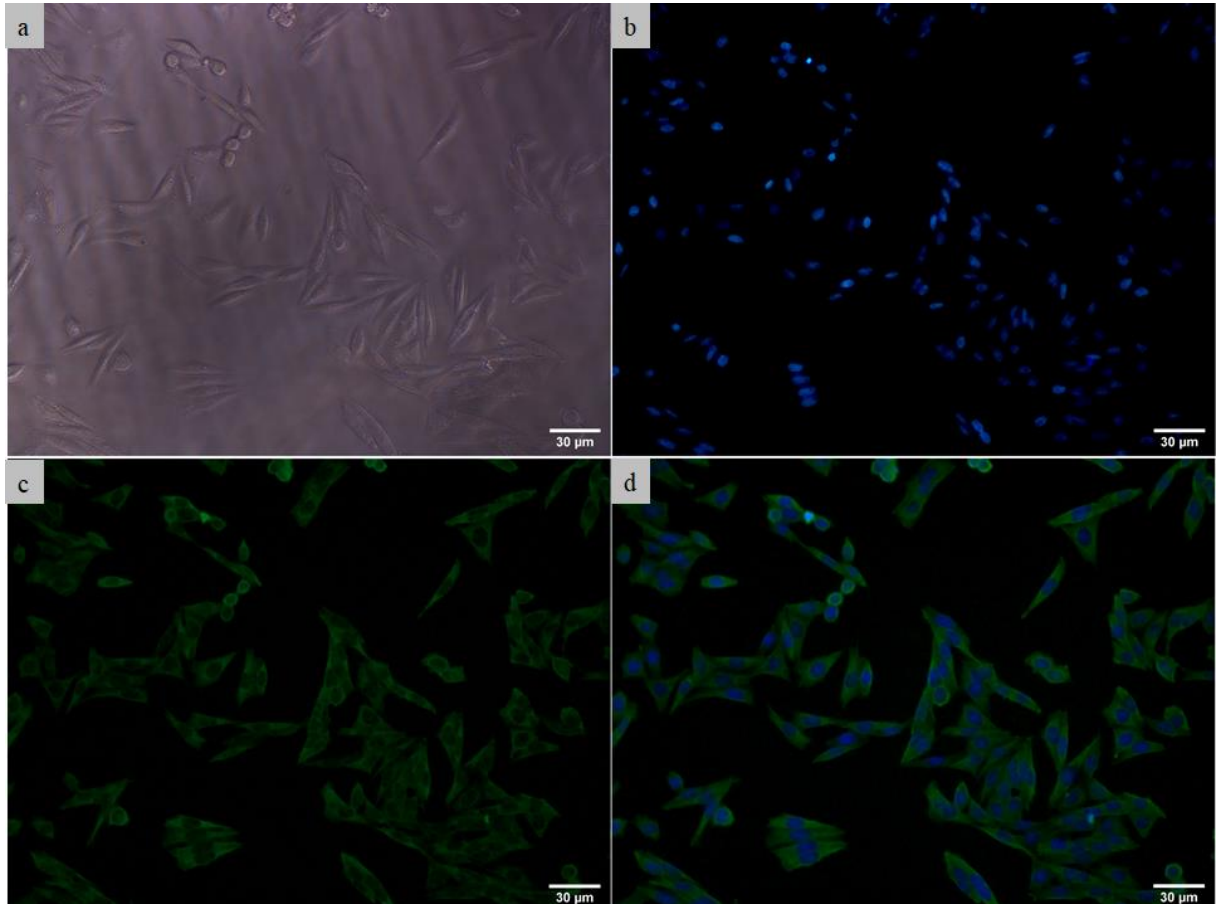
Diante dos resultados apresentados através das micrografias de imunofluorescência de ambas as linhagens celulares frente aos diferentes AcMms derivados dos clones PCSS 2-7A50 (Figura 21) e PC3S4-2-5C11 (Figura 22), pode-se verificar a demarcação difusa do citoplasma de células PC-3, dos quais foram revelados com o anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG* conjugado com FITC. Embora as imunizações tenham sido realizadas com células íntegras, induzindo preferencialmente a geração de anticorpos contra antígenos da membrana celular, é válido lembrar que estas células passam por um processo de desintegração e processamento antigênico durante o reconhecimento por células apresentadoras de antígenos, o que permite a exposição e apresentação de antígenos intracelulares, elicitando uma resposta humoral frente a estes antígenos. Para os outros AcMms derivados dos clones PC3S4-2-5C2 e PC3S4-2-E4 não foram observadas nenhuma fluorescência aparente, por isso as imagens de fluorescência não foram apresentadas.

Figura 21. Imunofluorescência indireta de células tumorais (PC-3) imunomarcadas com o AcMm derivado do clone PC3SS 2-7A50 (1:50): a) células PC-3 em campo claro; b) marcação nuclear em azul fluorescente utilizando *Hoechst*TM; c) imunomarkação com o AcMm derivado do clone PC3S4-2 7A50, na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG* conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a imunomarkação nuclear e a imunomarkação com AcMm 7A50 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x.



Fonte: elaborado pela própria autora

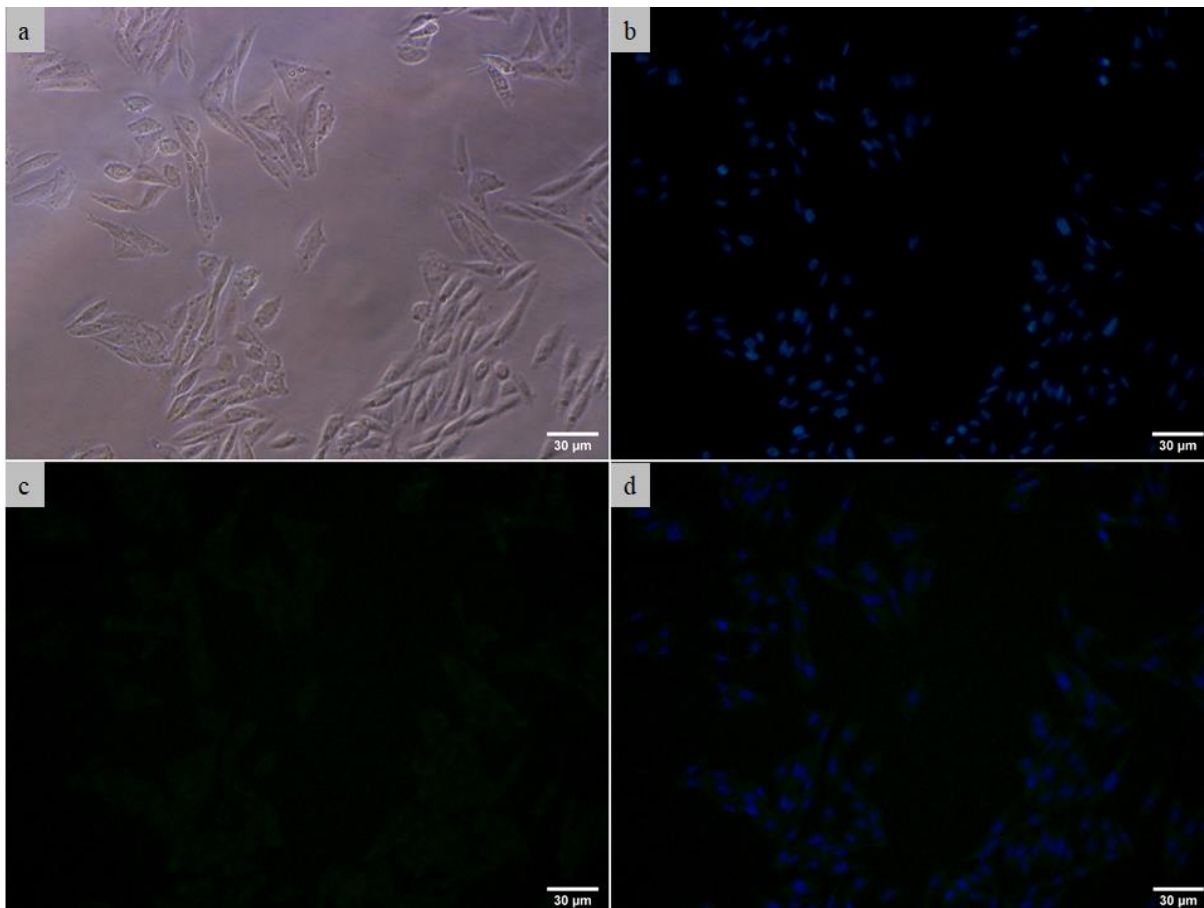
Figura 22. Imunofluorescência indireta de células tumorais (PC-3) imunomarcadas com o AcMm derivado do clone PC3S4 2-5C11 (1:50): a) células PC-3 em campo claro; b) marcação nuclear em azul utilizando *Hoechst*TM; c) imunomarkação com o AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C11, na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a marcação nuclear e a imunomarkação com o AcMm 5C11 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x.



Fonte: elaborado pela própria autora

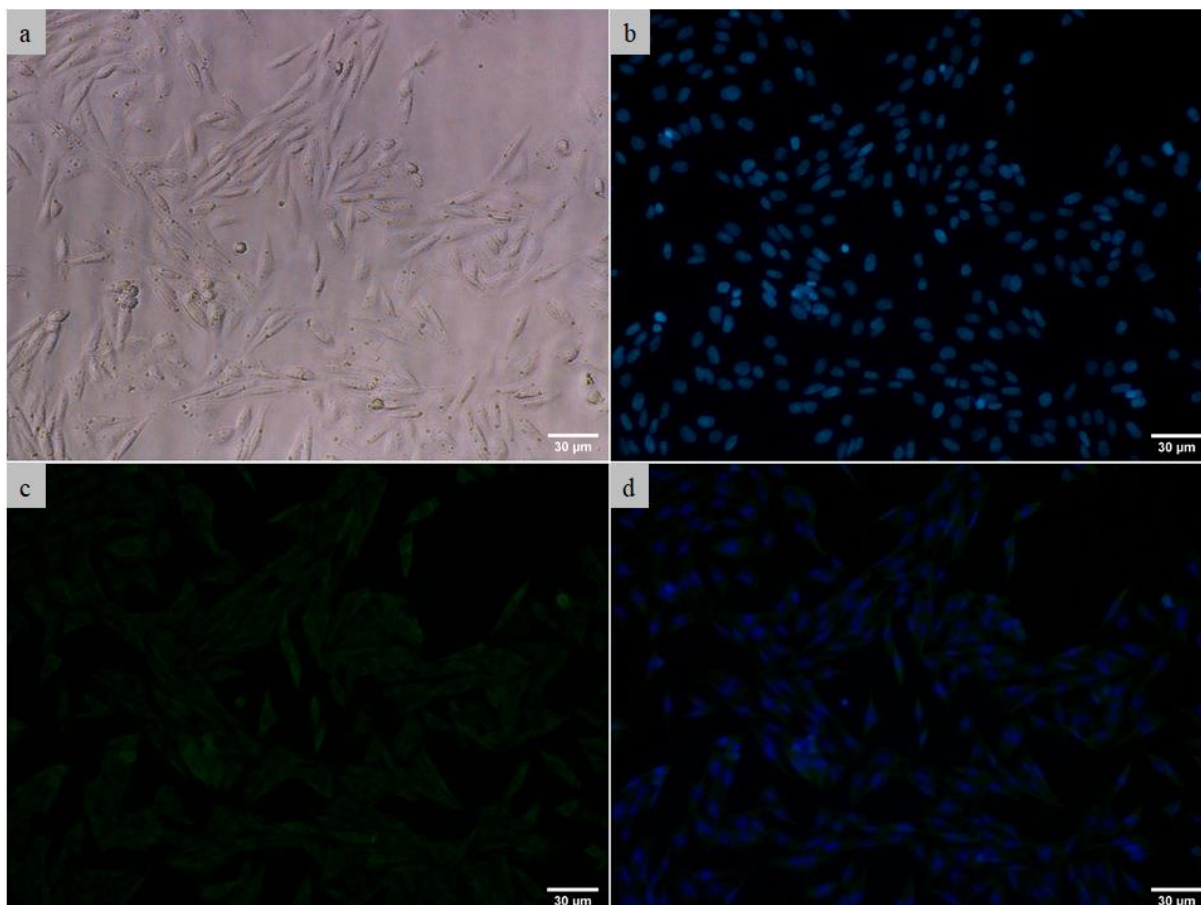
A imunomarkação com o AcMm derivado do clone PC3SS 2-7A50 foi observada somente em células PC-3 e não em células RWPE-1 (Figura 23), enquanto que com o AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C11, houve a imunomarkação de células PC-3 e um *background* em relação as células RWPE-1 (Figura 24).

Figura 23. Imunofluorescência indireta de células não tumorais (RWPE-1) imunomarcadas com o AcMm derivado do clone PC3SS 2-7A50 (1:50): a) células RWPE-1 em campo claro; b) marcação nuclear em azul fluorescente utilizando *Hoechst*TM; c) imunomarcagem com o AcMm derivado do clone PC3S4-2 7A50 na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG* conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a marcação nuclear e a imunomarcagem com o AcMm 7A50 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x.



Fonte: elaborado pela própria autora

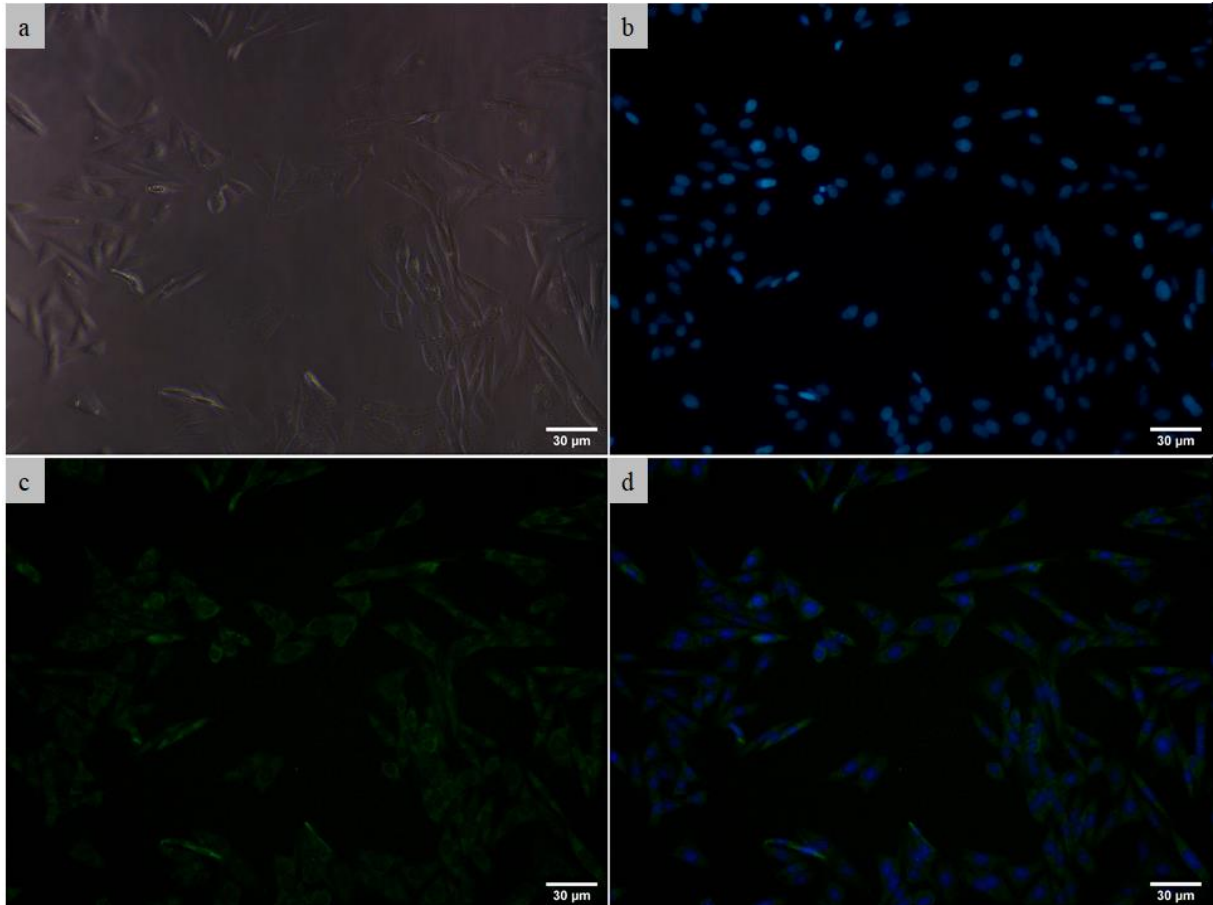
Figura 24. Imunofluorescência indireta de células não tumorais (RWPE-1) imunomarcadas com o AcMm derivado do clone PC3S4-2 5C11 (1:50). a) células RWPE-1 em campo claro; b) marcação nuclear em azul fluorescente utilizando *Hoechst*TM; c) imunomarkação com o AcMm derivado do clone PC3S4-2 5C11, na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a marcação nuclear e a imunomarkação com o AcMm 5C11 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x.



Fonte: elaborado pela própria autora

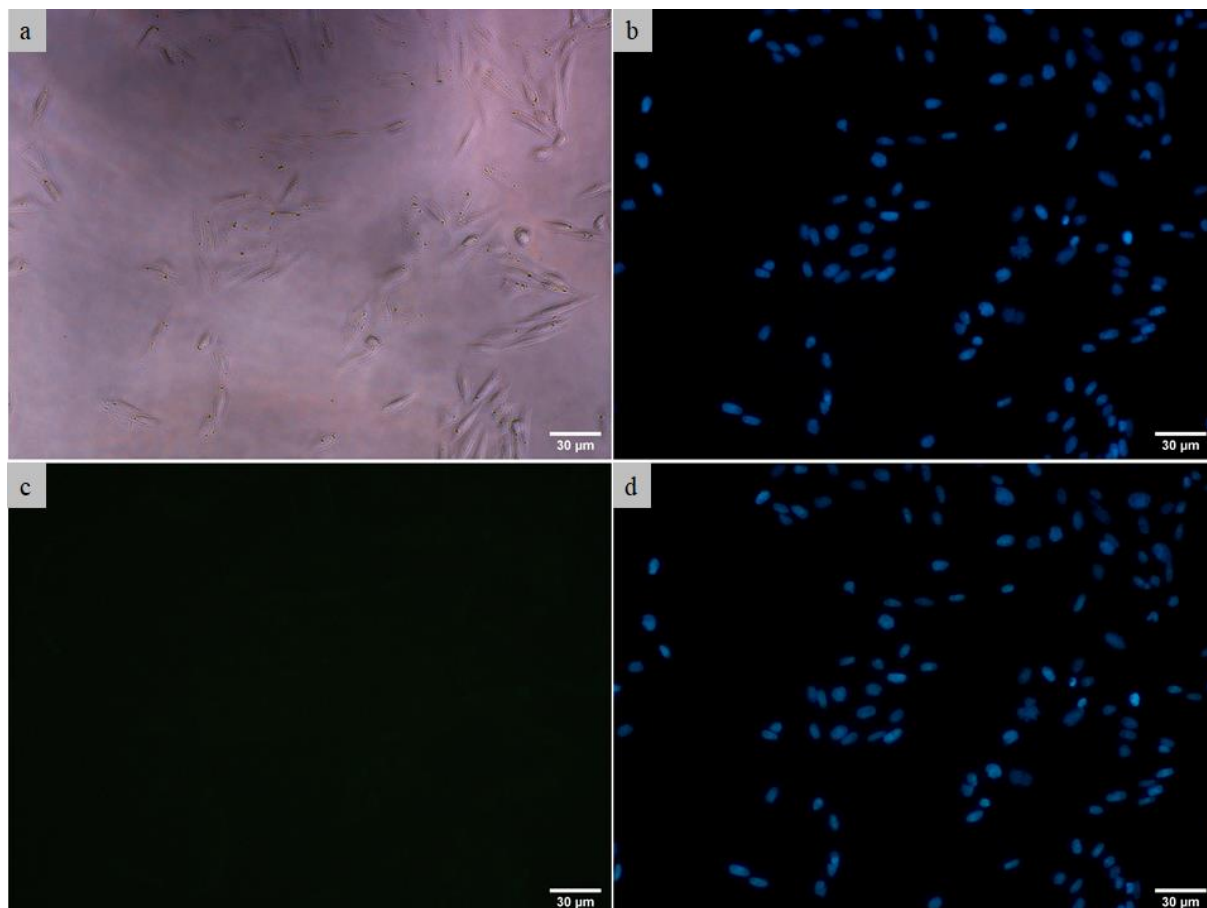
Além disso, realizou-se a imunomarkação em ambas as células com o anticorpo primário anti-CD147 humano. Como observado nas micrografias demonstradas na Figura 25, a imunomarkação da proteína CD147 em células PC-3 foi bem evidente, porém a mesma fluorescência não foi constatada em células RWPE-1 (Figura 26). CD147 é uma proteína transmembrana também conhecida como indutor de matriz extracelular de metaloproteinases, expressa em diversos tipos celulares tumorais, incluindo células tumorais do tecido prostático, especialmente em células que exibem potencial invasivo. Seu papel está associado com o aumento da capacidade proliferativa (WANG *et al.*, 2006).

Figura 25. Imunofluorescência indireta de células tumorais (PC-3) imunomarcadas com o AcM IgG murino anti-CD147 humano (*Elabscience™*) (1:100). a) células PC-3 em campo claro; b) marcação nuclear em azul fluorescente utilizando *Hoechst™*; c) imunomarcação com AcMm IgG anti-CD147 na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG* conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a marcação nuclear e a imunomarcação com o AcMm anti-CD147 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x.



Fonte: elaborado pela própria autora

Figura 26. Imunofluorescência indireta de células não tumorais (RWPE-1) imunomarcadas com o AcMm IgG anti-CD147 humano (*Elabscience™*) (1:100). a) células RWPE-1 em campo claro; b) marcação nuclear em azul fluorescente de células RWPE-1 utilizando *Hoechst™*; c) imunomarcação com AcMm IgG anti-CD147 na presença do anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG* conjugado com FITC (1:100). d) Sobreposição entre a marcação nuclear e a imunomarcação com o AcMm anti-CD147 revelado com FITC. As micrografias foram retiradas em microscópio de fluorescência Eclipse 3000, *Nikon*, com aumento de 20x.



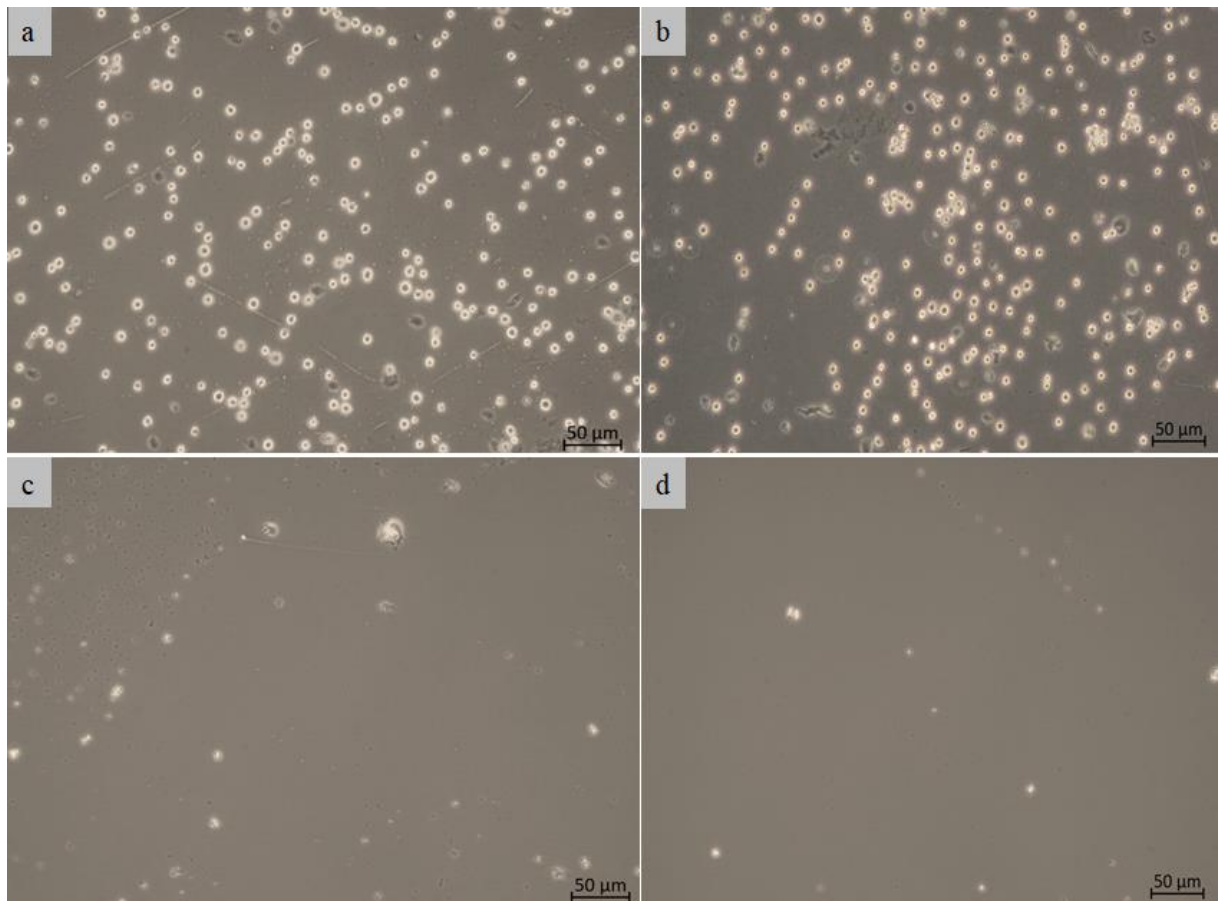
Fonte: elaborado pela própria autora

5.8 Imunossensores eletroquímicos: avaliação da capacidade de detecção de células PC-3 utilizando a técnica de voltametria cíclica

Anteriormente a montagem dos imunossensores, o teste de adsorção em lâminas de quartzo permitiu a determinação do tempo ideal de incubação com as células tumorais prostáticas para eliminarmos possíveis resultados falsos positivos durante a adsorção das mesmas sob os filmes de SF e AcMms. Conforme demonstrado na Figura 27, constatou-se a presença das células PC-3 adsorvidas sobre a área de montagem dos filmes de SF/AcMms derivados dos clones PC3SS 2-7A50 e PC3S4-2-5C11. No entanto, quando células não específicas (A549) foram testadas sob as mesmas condições, não foi observada a presença

destas sobre a área de deposição dos filmes. Em relação ao tempo de incubação, padronizamos nossos ensaios para 1 hora de incubação, tanto em relação a adsorção dos filmes de SF e AcMms, bem como para a etapa de adsorção das células.

Figura 27. Teste de adsorção de células sobre filmes montados utilizando lâminas de quartzo. A adsorção das células PC-3 e A549 foi avaliada após 1 hora de incubação sob os filmes de SF/AcMms: a) Campo da lâmina contendo filmes de SF e AcMm derivado do clone PC3SS 2-7A50 na presença de células PC-3 após 3 lavagens consecutivas com PBS; b) Campo da lâmina contendo filmes de SF e AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C11 na presença de células PC-3 após 3 lavagens consecutivas com PBS; c) Campo da lâmina contendo filmes de SF e AcMm derivado do clone PC3SS 2-7A50 na presença de células A549 após 3 lavagens consecutivas com PBS; d) Campo da lâmina contendo filmes de SF e AcMm derivado do clone PC3S4-2-5C11 na presença de células A549 após 3 lavagens consecutivas com PBS.



Fonte: elaborado pela própria autora

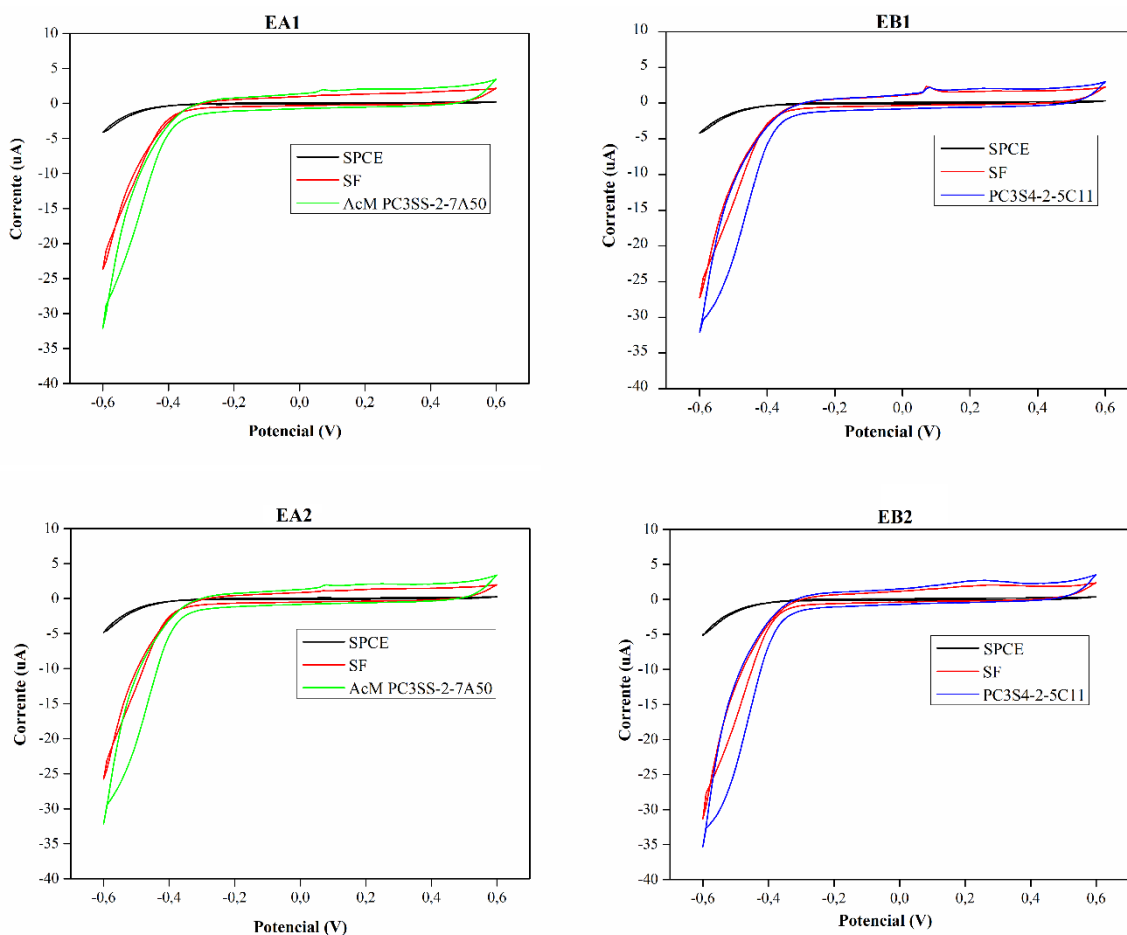
Embora todos os AcMms (PC3SS-2-7A50, PC3S4-2-5C2, PC3S4-2-5C11 e PC3S4-2-5E4) tenham sido explorados durante a confecção dos imunossensores, apenas os AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7A50 e PC3S4-2-5C11 exibiram resultados plausíveis que foram detalhados nesse estudo.

A escolha da SF como matriz de revestimento da superfície eletrolítica dos SPCE foi pautada levando-se em consideração as propriedades físico-químicas encontradas neste biopolímero, incluindo excelente estabilidade térmica, biocompatibilidade, sobretudo a facilidade de produção, bem como seu baixo custo, o que possibilita a sua aplicação em diversos setores da biotecnologia, incluindo o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos e na funcionalização de dispositivos, servindo como matriz para a imobilização de biomoléculas (NGUYEN *et al.*, 2019). Diversos trabalhos demonstraram as inúmeras vantagens na utilização da SF durante a imobilização e manutenção da estabilidade de peptídeos antigênicos oriundos de vírus, peptídeos β -amilóides envolvidos com a doença de Alzheimer e notavelmente na adsorção de anticorpos específicos a antígenos brutos de *T. saginata*, causadora da cisticercose bovina [OLIVEIRA, (2014); GONÇALVES *et al.*, (2016); LIMA *et al.*, (2018)].

Nesse interim, a deposição dos AcMms sobre a superfície eletrolítica revestida com a SF foi realizada através da técnica LbL por meio do processo de adsorção física. No entanto, é importante salientar que esse processo não controla a imobilização orientada dos anticorpos, no sentido de mantê-los em posição vertical, com a região (Fab)₂ voltada para cima. Deste modo, a adsorção de anticorpos com orientações aleatórias sob a superfície eletrolítica, pode responder de maneira indesejada durante o reconhecimento do analito de interesse.

A determinação da eficiência de montagem dos imunossensores foi conduzida através da técnica de voltametria cíclica, onde o processo de adsorção foi acompanhado pelo perfil de cada voltamograma e pela mudança de densidade eletrônica condizente com a área dos voltamogramas. A Figura 28 demonstra os voltamogramas dos filmes de SF e SF/AcMms sobre os eletrodos puros. Os eletrodos foram recobertos com PBS 1X para a obtenção dos VCs.

Figura 28. Perfis voltamétricos dos SPCE modificados com os filmes de SF e os AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7A50 e PC3S4-2-5C11 em meio tampão fosfato pH 7.4. Velocidade de varredura $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Foram construídos 2 imunossensores utilizando o AcMm PC3SS-2-7A50 (EA1 e EA2) e outros 2 imunossensores utilizando o AcMm PC3S4-2-5C11 (EB1 e EB2).



Fonte: elaborado pela própria autora

A voltametria cíclica usada no monitoramento do recobrimento da superfície dos SPCE com os filmes de SF e SF/AcMms trata-se da técnica mais comumente aplicada para adquirir informações qualitativas e quantitativas sobre os processos eletroquímicos. O princípio fundamental do funcionamento da voltametria cíclica consiste na aplicação de um potencial inicial (E_i) crescente até um potencial final (E_f), onde a varredura inicia-se no sentido direto e a partir disso, o potencial aplicado é decrescente, fazendo com que a varredura ocorra no sentido inverso até atingir o potencial inicial (potencial de inversão). O processo se repete várias vezes formando uma onda triangular de corrente *versus* potencial. O número de repetições é chamado de número de ciclos. Esta técnica fornece informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (BARD & FAULKNER, 2001; BRETT & BRETT, 1993).

A área dos eletrodos puros apresentou variação de 0,09-0,16 u.a (unidades arbitrárias), e uma média de $0,12 \pm 0,03$ u.a. Essas variações são inerentes ao processo de produção destes dispositivos. Todavia, observou-se um aumento da área dos VCs após o recobrimento dos eletrodos com SF, obtendo-se uma média de $1,54 \pm 0,032$ u.a. Já em relação a deposição dos do AcMm PC3SS4-2-7A50 sobre os filmes de SF, constatou-se uma média de $3,06 \pm 0,36$ u.a nos eletrodos EA1 e EA2 e de $3,64 \pm 0,37$ para os eletrodos EB1 e EB2 contendo o AcMm PC3S4-2-5C11. O aumento das áreas dos voltamogramas pode ser atribuído a adsorção dos materiais, isto é, da SF sobre o eletrodo e dos AcMms sobre a SF. A Tabela 13 apresenta os valores das áreas dos voltamogramas.

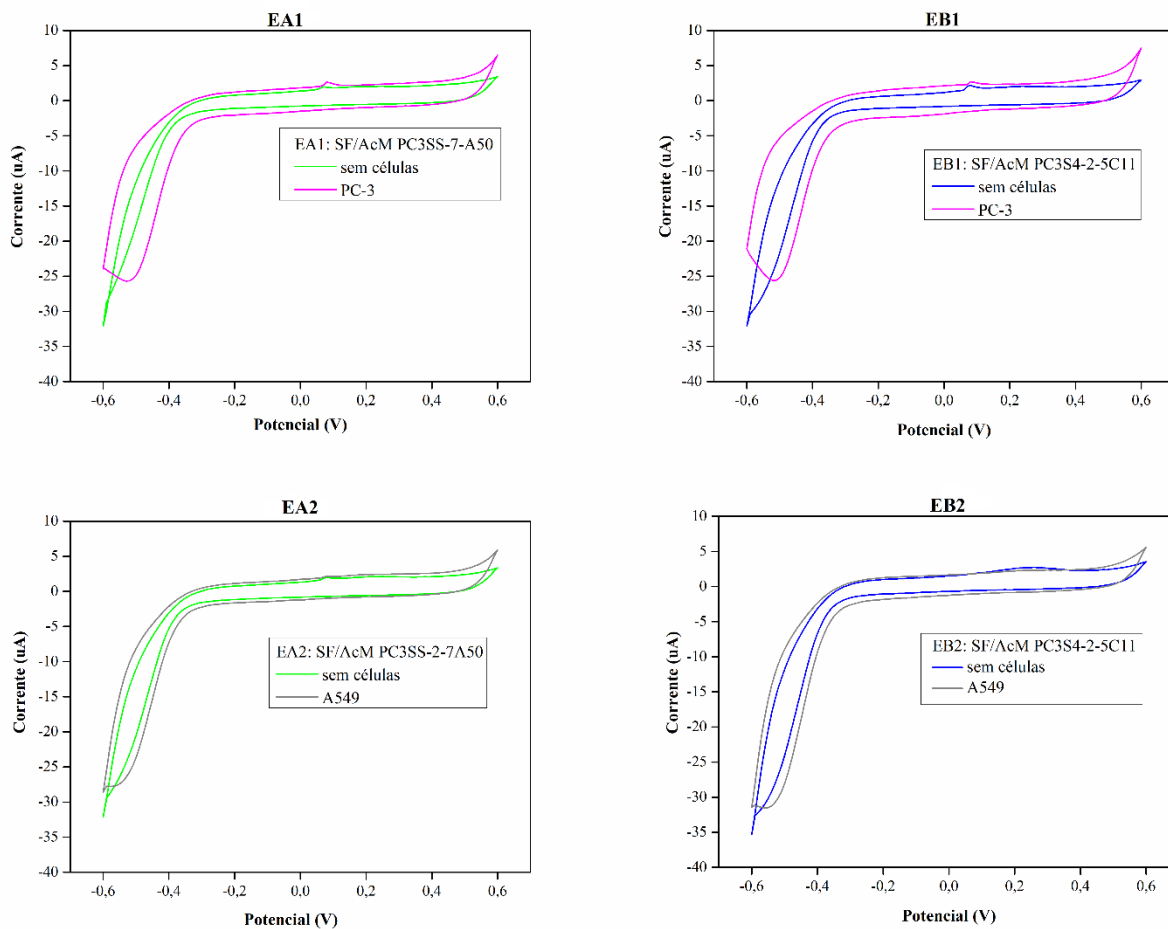
Tabela 13. Área dos voltamogramas (u.a.) dos SPCE modificados com SF e SF/AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7-A50 e PC3S4-2-5C11.

SPCE	Área dos voltamogramas		
	SPCE puro	SF	SF/AcMms
EA1 SF/PC3SS-2-7A50	0,09	1,24	2,80
EA2 SF/PC3SS-2-7A50	0,11	1,44	3,31
EB1 SF/PC3S4-2-5-C11	0,12	1,64	3,37
EB2 SF/PC3S4-2-5-C11	0,16	2,0	3,9

Fonte: elaborado pela própria autora

Quando se avaliou a capacidade de reconhecimento das células tumorais pelos imunossensores pela interação antígeno-anticorpo (Figura 29), verificou-se uma mudança tanto nos perfis dos voltamogramas, assim como no aumento das áreas dos mesmos na presença de células tumorais PC-3 (EA1 e EB1), enquanto que na presença das células não específicas A549, estas mudanças não foram constatadas (EA2 e EB2).

Figura 29. Perfis voltamétricos dos SPCE modificados com os filmes de SF e AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7A50 e PC3S4-2-5C11 na presença das células tumorais prostáticas PC-3 (EA1 e EB1) e células tumorais pulmonares A549 (EA2 e EB2) em meio tampão fosfato pH 7.4. Velocidade de varredura $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Fonte: elaborado pela própria autora

Para os imunossensores utilizando o AcMm PC3SS-2-7A50, foi possível constatar uma diferença nas áreas dos voltamogramas 10 vezes maior para as células PC-3 (1,73 u.a.) em relação a presença de células A549 (0,16 u.a.). Isso demonstra que o imunossensor demonstrou especificidade para as células PC-3, corroborando com os ensaios de adsorção celular utilizando lâminas de quartzo que não demonstraram a presença de células A549 sobre os filmes de SF/AcMm. Já para os imunossensores utilizando o AcMm PC3S4-2-5C11, observou-se exclusivamente a detecção de células PC-3, com uma diferença na área do voltamograma de 1,43 u.a., enquanto que na presença de células A549, o valor foi negativo, anulando-se (Tabela 14).

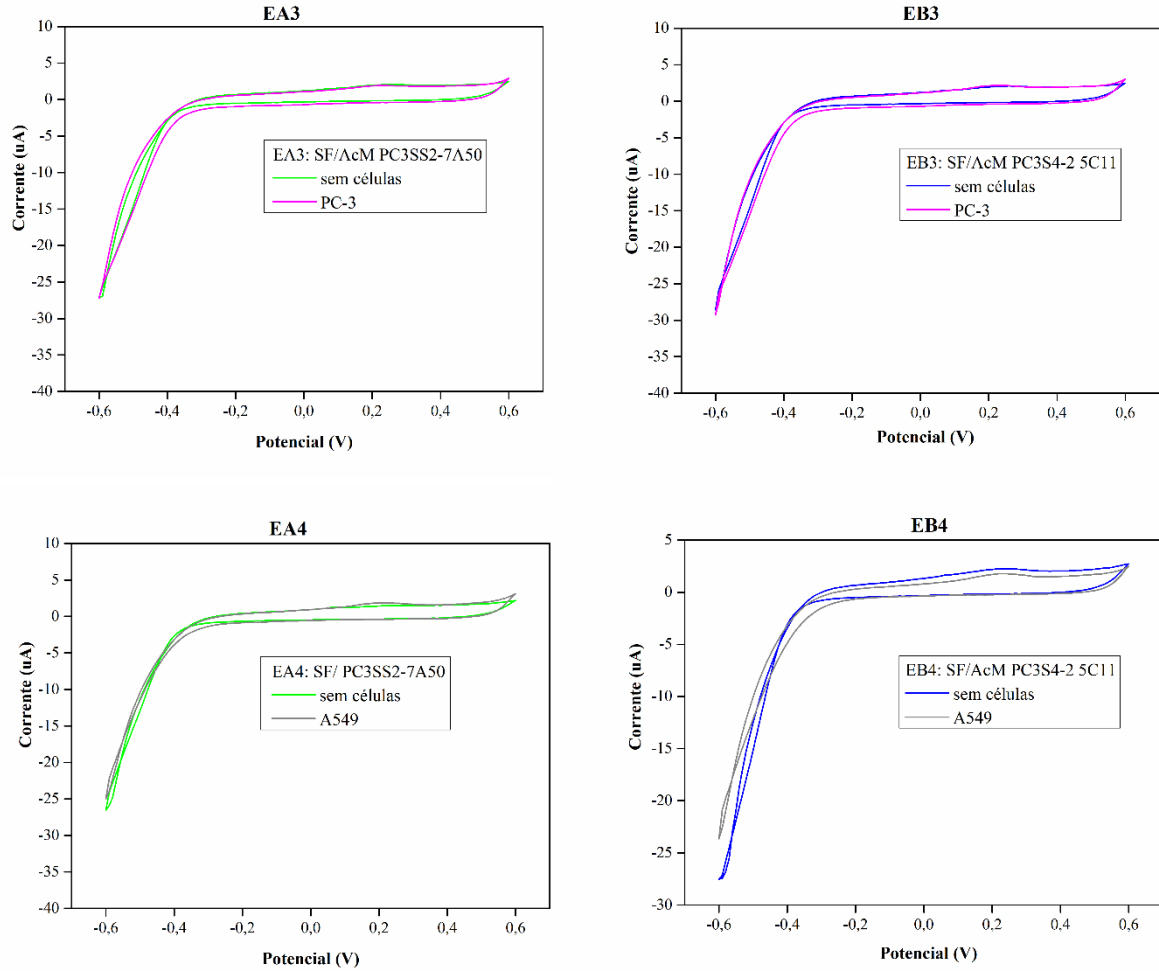
Tabela 14. Áreas dos voltamogramas (u.a.) na presença de células PC-3 e A549. As diferenças das áreas dos voltamogramas foram calculadas utilizando as áreas obtidas após a adsorção celular (A) subtraído das áreas dos voltamogramas após adsorção dos anticorpos (A₀) sobre os eletrodos SPCE.

SPCE	Diferença da área dos voltamogramas (A-A ₀)	
	PC-3	A549
EA1 SF/PC3SS-2-7A50	1,73	-
EA2 SF/PC3SS-2-7A50	-	0,16
EB1 SF/PC3S4-2-5-C11	1,43	-
EB2 SF/PC3S4-2-5-C11	-	-0,41

Fonte: elaborado pela própria autora

Foram conduzidos novos ensaios de montagem dos imunossensores, desta vez realizando a deposição dos substratos de forma direta sobre os SPCE (Figura 30), isto é, o recobrimento dos eletrodos com SF e com os AcMms sem a medição dos VCs entre as adsorções. Neste caso, a média das áreas dos voltamogramas sobre os eletrodos EA3 e EA4 contendo os filmes de SF/AcMm PC3SS-27A50 foi de $1,59 \pm 0,35$ e de $1,80 \pm 0,06$ para os eletrodos EB3 e EB4 contendo os filmes de SF/AcMm PC3S4-2-5C11. Essa diminuição nas áreas dos voltamogramas na presença dos filmes de SF/AcMms sobre a superfície eletrolítica pode ter ocorrido frente a adsorções menos eficientes dos materiais. No entanto, quando as células PC-3 foram depositadas sobre os imunossensores contendo os AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7A50 e PC3S4-2-5C11, foi possível a constatação do reconhecimento destas células, com diferenças nos valores das áreas de cada voltamograma de 0,51 u.a. e 0,47 u.a., respectivamente. Somente o imunossensor contendo o AcMm PC3SS-2-7A50 demonstrou a possível adsorção de células A549, com uma diferença de área de 0,18 u.a., embora esse valor tenha sido 2,83 vezes menor quando comparado a adsorção de células PC-3.

Figura 30. Perfis voltamétricos dos SPCE modificados com os filmes de SF e AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7A50 e PC3S4-2-5C11 na presença das células tumorais prostáticas PC-3 (EA3 e EB3) e células tumorais pulmonares A549 (EA4 e EB4) em meio tampão fosfato pH 7.4. Velocidade de varredura $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Fonte: elaborado pela própria autora

A tabela 15 demonstra as áreas de cada voltamograma referente a deposição dos filmes de SF/AcMms e a diferença das áreas dos voltamogramas após a adsorção das células tumorais.

Tabela 15. Área dos voltamogramas (u.a.) dos SPCE modificados com SF/AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7-A50 e PC3S4-2-5C11 e após a adsorção de células PC-3 e A549. As diferenças das áreas dos voltamogramas foram calculadas utilizando as áreas obtidas após a adsorção de células (A) subtraído das áreas dos voltamogramas após a adsorção da SF/AcMms (A_0) sobre os SPCE.

SPCE	Área dos voltamogramas (u.a.)		Diferença da área dos voltamogramas (A-A ₀)	
	SPCE puro	SF/AcMms	PC-3	A549
EA1 SF/PC3SS-2-7A50	0,13	1,84	0,51	-
EA2 SF/PC3SS-2-7A50	0,09	1,34	-	0,18
EB1 SF/PC3S4-2-5-C11	0,10	1,84	0,47	-
EB2 SF/PC3S4-2-5-C11	0,09	1,75	-	-0,24

Fonte: elaborado pela própria autora

Fica evidente que mesmo havendo diferenças nas áreas dos voltamogramas após a adsorção de células PC-3, o segundo método explorado para a montagem dos imunossensores não foi adequado, visto que as áreas dos voltamogramas tiveram uma redução significativa quando comparado ao primeiro método utilizado durante a deposição de cada material e sua subsequente análise por voltametria cíclica, onde os valores de recobrimento das superfícies contendo filmes de SF e AcMms foram pelo menos 2 vezes maiores. Dessa maneira, tendo em vista a utilização dos SPCE, o melhor método de montagem dos imunossensores foi utilizando o recobrimento das superfícies eletrolíticas com a medição dos VCs a cada deposição dos materiais.

A performance destes dispositivos analíticos pode ser alterada não somente pela escolha do transdutor utilizado, mas também pelo método eletroquímico empregado durante a conversão dos sinais biológicos em sinais elétricos, havendo dessa forma, a necessidade de explorar o uso de novos dispositivos, incluindo, os IDE que poderiam oferecer medidas analíticas mais precisas e reprodutíveis para a detecção de células inteiras, quando comparado com os SPCE.

6. CONCLUSÕES

O emprego do protocolo MTSI utilizando a Cy nas concentrações de 200 -150 mg/kg peso corporal não se mostraram favoráveis frente aos efeitos deletérios que causaram nos camundongos BALB/c, o que nos levou a modificar a dose de Cy para 100 mg/kg e combiná-la a técnica subtrativa de mascaramento de epítomos, a fim de aumentar a eficiência da mesma.

A supressão da resposta imune durante a tolerização foi alcançada, utilizando as diferentes concentrações de Cy (200-100 mg/kg), conforme demonstrado pela contagem de leucócitos totais/mm³, bem como através dos ensaios de *whole cell* ELISA, por meio da verificação da reatividade dos pAbs obtidos após 10 dias da 2^a e 4^a tolerização. No entanto, após o término do protocolo, a reatividade dos pAbs foi constatada frente as duas linhagens: RWPE-1 e PC-3. Acredita-se que grande parte dos epítomos comuns/compartilhados possam de fato não terem sido mapeados, processados e posteriormente eliminados durante as tolerizações. A complexidade antigênica presente em células tumorais, impede que uma resposta imune humoral seja ativada frente a antígenos tumorais que exibem alterações em seus níveis de expressão. Aliado a isso, o baixo rendimento dos (Fab)₂ utilizados durante o mascaramento das células PC-3, pode não ter contribuído na otimização da técnica, visando a geração de AcMms prioritariamente reativos a antígenos tumorais.

As fusões celulares levaram a geração de 756 híbridos. Destes 756 híbridos apenas 310 foram testados durante o 1^o *screening* para a verificação da reatividade dos anticorpos presentes nos SCC frente a célula PC-3. O número reduzido de híbridos testados durante o 1^o *screening* se deu devido as contaminações celulares que ocorreram. Destes 310 híbridos apenas 8 deles mantiveram-se reativos contra a linhagem tumoral metastática até o 3^o e último *screening*. Foram realizadas 3 clonagens celulares, das quais resultaram na seleção de 8 clones únicos que se mostraram reativos frente a célula PC3 durante os dois *screenings* realizados. No entanto, a reatividade frente a célula RWPE-1 também foi constatada.

Os clones PC3SS-2-7A50, PC3S4-2-5C2, PCS4-2-5C11 e PC3S4-2-5E4 foram expandidos em maior escala para a purificação dos AcMms, que foram posteriormente caracterizados. A técnica de *SDS-PAGE* confirmou o sucesso da purificação, com a presença das duas bandas características da imunoglobulina da classe IgG (25kDa e 50kDa) nos eluatos dos diferentes AcMms.

Através do ensaio de *immunoblotting* foi possível constatar o reconhecimento por parte dos AcMms de diferentes proteínas exibindo diferentes massas moleculares nos extratos proteicos da linhagem tumoral PC-3. Ficou evidente a presença de uma marcação específica

em 45kDa e 62kDa nos extratos proteicos da célula PC-3 quando os AcMms derivados dos clones PC3SS-2-7A50 e PCS4-2-5C11 foram utilizados. Além disso, pelo imunoenensaio de imunofluorescência indireta, estes mesmos AcMms demarcaram a porção citoplasmática de células PC-3, dos quais foram revelados pelo anticorpo secundário *goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC.

Em relação a confecção dos imunossensores eletroquímicos, constatou-se através do perfil dos voltamogramas cíclicos e através da determinação das áreas de cada voltamograma, o recobrimento dos filmes de SF/AcMs murinos sobre a superfície eletrolítica dos SPCE, além da confirmação de um aumento substancial da diferença das áreas dos voltamogramas na presença de células PC-3. Esse resultado foi constatado em ambos os imunossensores utilizando os AcMms PC3SS-2-7A50 e PCS4-2-5C11. Na presença de células A549 observou-se uma diferença na área do voltamograma de 0,16 u.a., quando utilizou-se o anticorpo PC3SS-2-7A50, embora essa área foi 10 vezes menor em relação a adsorção de células PC-3. Tratando-se do AcMm PC3S4-2-5C11, a diferença da área do voltamograma só foi constatada na presença de células PC-3 e não na presença de células A549. Esses resultados corroboraram com o ensaio de adsorção celular utilizando lâminas de quartzo, onde não se constatou a presença de células A549 sobre os filmes de SF/AcMms.

Logo, através dessa tese foi possível demonstrar a validade dos AcMms obtidos por meio da técnica de imunização subtrativa combinada ao mascaramento de epítomos, no reconhecimento de antígenos proteicos expressos por células PC-3, somado a identificação destas proteínas na porção citoplasmática destas mesmas células. Aliado a isso, a confecção dos imunossensores eletroquímicos demonstrou a capacidade de detecção das células tumorais metastáticas PC-3, com diferenças nas áreas dos voltamogramas após a adsorção celular. Dessa maneira, esses resultados preliminares conseguiram demonstrar a efetividade dos imunossensores no reconhecimento de células exclusivas da próstata.

No entanto, a fim de garantir uma melhor performance e reprodutibilidade destes AcMms acoplados a superfície eletrolítica, outros dispositivos poderiam ser explorados, incluindo os eletrodos impressos interdigitados (SPIDEs) que apresentam vantagens superiores na detecção de células inteiras quando comparados aos eletrodos impressos (MORAES *et al.*, 2019). A determinação do limite de detecção, reprodutibilidade e especificidade dos imunossensores utilizando os AcMms obtidos neste estudo, frente ao reconhecimento de células tumorais em amostras complexas, incluindo sangue de pacientes com carcinoma metastático, poderia levar a geração de uma nova tecnologia de grande impacto social, econômico e tecnológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIS, E.S. Anatomy and Physiology of the Prostate. In: LANG E.K. (eds) **Radiology of the Lower Urinary Tract**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. (Medical Radiology. Diagnostic Imaging and Radiation Oncology).

ANTONARAKIS, E. S. *et al.* AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer: **N Engl J Med**, v.371, p. 1028-1038, 2014.

ARAÚJO, A.E.V. **Obtenção e caracterização de fragmentos F(ab')₂ obtidos a partir de anticorpos monoclonais murinos anti-PBP2 α de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA)**. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação de Mestrado - Tecnologia de Imunobiológicos. Instituto de tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manquinhos.

ARAÚJO, F. T. M., *et al.* Establishment of reference values for hematological and biochemical parameters of mice strains produced in the animal facility at Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz - Minas Gerais. **R. Soc. bras. Ci. Anim. Lab.** v.3, n. 2, p. 95-102, 2015.

ARYA, M. *et al.* The metastatic cascade in prostate cancer: **Surg Oncol.** v.3, p. 117-28, 2006.

AYABAY, C., IMIR, T. Development of a rapid, single-step procedure using protein G affinity chromatography to deplete fetal calf serum of its IgG and to isolate murine IgG1 monoclonal antibodies from supernatants of hybridoma cells. **J Immunol Methods**, v. 233, n. 1-2 , p. 77-81, 2000.

BERSON, R. E., FRIEDERICHS, G. A self-feeding roller bottle for continuous cell culture. **Biotechnol Prog**, v. 24, p. 154-157, 2008.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Method- Fundamentals and Applications**. 2nd. ed. New York: JOHN WILEY, 2001.

BOWDISH, K. S. *et al.* Antibodies against cancer produced using masked cancer cells as immunogen: Granted Patent, <https://www.lens.org/lens/patent/029-860-685-177-055/fulltext>, 2007.

BOSTWICK, D.; CHENG, L. Precursors of prostate cancer: **Histopathology**. v. 60, p. 4-27, 2012.

BHAKTA, S. A. *et al.* Protein Adsorption onto Nanomaterials for the Development of Biosensors and Analytical Devices: A Review. **Anal Chim Acta**. v. 872, p. 7–25, 2015.

BHALLA, N. *et al.* Introduction to biosensors. **Essays Biochem**. v. 1, p. 1–8, 2016.

BRETT, C.; BRETT, A. **Electrochemistry**: principles, methods, and applications. 2nd. ed. New York: Oxford University, 1993.

BROOKS, P. C. *et al.* Subtractive immunization yields monoclonal antibodies that specifically inhibit metastasis: **J Cell Biol**, v. 122, n. 6, p. 1351-1359, 1993.

BRONCY, L.; PATERINI-BRÉCHOT, P. Clinical Impact of Circulating Tumor Cells in Patients with Localized Prostate Cancer. **Cells**, v. 8, n. 7, 676, 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8070676>.

CAMPÀS, M.; O’SULLIVAN, C. Layer-by-Layer Biomolecular Assemblies for Enzyme Sensors, Immunosensing, and Nanoarchitectures. **Analytical Letters**, v. 36, n. 12, p. 2551-2569, 2003. <https://doi.org/10.1081/AL-120024632>.

COLEMAN, R. E. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. **Clin Cancer Res**, v. 36, n. 12, p. 6243-6249, 2006.

COONEY, K. A. Inherited Predisposition to Prostate Cancer: From Gene Discovery to Clinical Impact: **Trans Am Clin Climatol Assoc**. v. 128, p.14-23, 2017.

COSTA, C. *et al.* Biosensors for the Detection of Circulating Tumour Cells: **Sensors**, v. 14, p. 4856-4875, 2014.

DECHER, G *et al.* Buildup of ultrathin multilayer films by a selfassembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin. Solid Films**. v. 210-211, parte 2, p, 831-835, 1992.

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

DE ALMEIDA, R. *et al.* Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies: **MAbs**, v.10, n.1, p. 46-54, 2018.

DE MARZO, A. M. *et al.* Human prostate cancer precursors and pathobiology: **Urology**, v. 62, p.55-62, 2003.

CHEN, Z. Y. *et al.* ARV-7: A biomarker for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: **Zhonghua Nan Ke Xue**. v. 2, p.172-176, 2019.

EARLEY, E. M., OSTERLING, M.C. Fusion of mouse-mouse cells to produce hybridomas secreting monoclonal antibody. **J Tissue Cult Methods**, v. 9, p.141-46, 1985.

ERDILE, L. F. *et al.* Whole cell ELISA for detection of tumor antigen expression in tumor samples: **J Immunol Methods**, v. 1-2, p. 47-53, 2001.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a manual of basic techniques. 5th. ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

GAO, T., *et al.* The association of Phosphatase and tensin homolog (PTEN) deletion and prostate cancer risk: A meta-analysis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p.114–121, 2016.

GALLETTI, G., *et al.* Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer Diagnosis and Monitoring: An Appraisal of Clinical Potential: **Mol Diagn Ther**. v. 4, p. 389–402, 2014.

GOLDSTEIN, N. I., FISHER P.B. Surface-epitope masking (SEM): an immunological subtraction approach for developing monoclonal antibodies targeting surface-expressed molecules: **Methods Mol Biol**, v.383, p. 245-58, 2007.

GONG, Y., *et al.* Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Natural Inhibitors in Prostate Cancer Progression. **Cancers**, v. 6, p. 1298-1327, 2014.

GONÇALVES, J. M. *et al.* Immunosensor for diagnosis of Alzheimer disease using amyloid- β 1-40 peptide and silk fibroin thin films. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 338-342, 2016.

HAMABASHIRI, M. *et al.* Novel monoclonal antibodies against pancreatic juice from pancreatic cancer patients and their possible application in differential diagnosis: **Int J Mol Med**, v.4, p.599-603, 2011.

HIGANO, C.S.; SMALL E.J.; SCHELLHAMMER, P. *et al.* Sipuleucel-T. **Nat Rev Drug Discov.** v. 9, n. 7, p. 513-514, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrd3220>.

HOOPER, J. D. *et al.* Subtractive immunization using highly metastatic human tumor cells identifies SIMA135/CDCP1, a 135 kDa cell surface phosphorylated glycoprotein antigen: **Oncogene**, v.12, p. 1783-94, 2003.

HUYAN, X-H., *et al.* Immunossuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v.11, p. 1293-1297, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Câncer de próstata – Estimativa 2020. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>. Acesso em: 19 jul. 2021.

JANEWAY, C. A., *et al.* The Immune System in Health and Disease. Immunobiology, 5th edition, New York: **Garland Science**, 2001.

JIN, M. *et al.* A Rapid Subtractive Immunization Method to Prepare Discriminatory Monoclonal Antibodies for Food E. coli O157:H7 Contamination: **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p.313-352, 2012.

KARANTANOS, T. *et al.* Understanding the mechanisms of androgen deprivation resistance in prostate cancer at the molecular level: **Eur Uol**, v. 67, p.470-479, 2015.

KIESS, A. P. *et al.* Prostate-specific membrane antigen as a target for cancer imaging and therapy: **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v.3, p. 241–268, 2015.

KINMAN, A.W.L., POMPANO, R.R. Optimization of Enzymatic Antibody Fragmentation for Yield, Efficiency, and Binding Affinity. **Bioconjug Chem**, v. 3, p. 800–807, 2019.

KIRBY, M., *et al.* Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review: **Int J Clin Pract**, v.11, p.1180-92, 2011

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p.495-497, 1975.

KNOWLES, S. M. *et al.* Quantitative Immuno PET of Prostate Cancer Xenografts with ⁸⁹Zr- and ¹²⁴I-Labeled Anti-PSCA A11 Minibody. **J Nucl Med March**, v. 55, n. 3, p. 452-459, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.120873>.

KRETSCHMER, A.; TILKI, D. Biomarkers in prostate cancer – Current clinical utility and future perspectives: **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v.120, p. 180–193, 2017.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LIMA, L. R. *et al.* Electrical Immunosensor Made with Antigenic Peptide NS5A-1 Immobilized onto Silk Fibroin for Diagnosing Hepatitis C: **J. Braz. Chem. Soc.** v. 29, p. 2054-2059, 2018.

LI, T. T. *et al.* Impact of subsequent metastases on costs and medical resource use for prostate cancer patients initially diagnosed with localized disease. **Cancer**, v. 123, n. 18, p. 3591-3601, 2017. doi: 10.1002/cncr.30784, 2017.

LIU, Z.; WANG, F, CHEN, X. Integrin $\alpha\beta$ 3-Targeted Cancer Therapy. **Drug Dev Res.**, v.6, p. 329– 339, 2008.

LESLIE, S. W.; SIREF, L. E. [Updated 2018 Jan 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/>.

LU, R-M., *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of Biomedical Science**, 2020.

LUGENG, H., *et al.* Metastatic castration-resistant prostate cancer: Academic insights and perspectives through bibliometric analysis: **Medicine**, v. 99, p. e19760, 2020.

MARKIEWICZ, A.; ZACZEK, A. J. The Landscape of Circulating Tumor Cell Research in the Context of Epithelial-Mesenchymal Transition: **Pathobiology**, v. 84, p. 264-283, 2017.

MATTHEW, W. D.; SANDROCK, A.W. Cyclophosphamide treatment used to manipulate the immune response for the production of monoclonal antibodies: **J Immunol Methods**, v. 100, p. 73-82, 1987.

- MCNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate: **Prostate**, v, 2, p. 35-49, 1981.
- MICALIZZI, D.S. *et al.* A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology: **Genes Dev.** v.18, p. 1827–1840, 2017.
- MORAES, M. L. *et al.* Immunosensor for the Diagnostics of Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA) Based on Immobilization of a Monoclonal Antibody on a Layer of Silk Fibroin: **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, p. 3772–3776, 2019.
- MOROZ, A. **Avaliação de novas propostas em arcabouços tridimensionais (3D) para cultura de células-tronco mesenquimais e condrogênese.** 80 fls, 2009. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu.
- MOROZ, A., *et al.* Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 430, p. 1319-21, 2013.
- MOSCOVICI, M. *et al.* Rapid and specific electrochemical detection of prostate cancer cells using an aperture sensor array: **Lab on a Chip**, v. 13, n. 5, p. 940-946, 2013.
- NARESH, V., LEE, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. **Sensors**, v. 21, n. 4, p.1109, 2021. <https://doi.org/10.3390/s21041109>
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI) 2015. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>. Acesso em: 19 jul. 021.
- NORGAARD, M. J. A. O. *et al.* Skeletal related events, bone metastasis and survival of prostate cancer: a population based cohort study in Denmark (1999 to 2007): **Journal of Urology**, v. 184, p.162–167, 2010.
- NGUYEN, A.T. *et al.* Crystal Networks in Silk Fibrous Materials: From Hierarchical Structure to Ultra Performance. **Small**. v. 11, p. 1039–1054, 2015.
- OLIVEIRA, J. C. V. **Desenvolvimento de imunossensor baseado na imobilização de anticorpo monoclonal em fibroína da seda para diagnóstico da cisticercose bovina.** Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp. Botucatu, 2014. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/123277/000826915.pdf?sequence=12014>.

PAL, M.; KHAN, R. Graphene oxide layer decorated gold nanoparticles based immunosensor for the detection of prostate cancer risk factor. **Analytical Biochemistry**, v. 536, p. 51-58, 2017.

POTDAR, P.D.; LOTEY, N.K. Role of circulating tumor cells in future diagnosis and therapy of cancer. **J Cancer Metastasis Treat**, v.1, p. 44-56, 2015.

QI, M., *et al.* Overexpression of ETV4 is associated with poor prognosis in prostate cancer: involvement of uPA/uPAR and MMPs. **Tumour Biol**, v. 5, p. 3565-3572, 2015.

RASMUSSEN, N.; DITZEL, H. J. Scanning the cell surface proteome of cancer cells and identification of metastasis-associated proteins using a subtractive immunization strategy. **J Proteome Res**. v.11, p.5048-5059, 2009.

RICCI, F. *et al.* A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors: **Electrochimica Acta**. v. 84, p. 74-83, 2012. doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.033.

ROBINSON, D., *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. **Cell**, v. 161, p. 1215–1228, 2015.

ROSS, J. S. *et al.* Antibody-based therapeutics: focus on prostate cancer: **Cancer Metastasis Rev**, v. 24, p.521–537, 2005.

ROCKWOOD, D. N. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin: **Nature protocols**, v. 6, p.1612, 2011.

SANTOS, E.W. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice: **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 53, p. 138-145, 2016

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer Statistics. **CA Cancer J. Clin.** v. 70, n. 1, p. 7-30, 2020. doi. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>.

SILVESTRI, I. *et al.* A Perspective of Immunotherapy for Prostate Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 8, n.7, 64, 2016. <https://doi.org/10.3390/cancers8070064>.

SOARES, J. C. *et al.* Detection of the Prostate Cancer Biomarker PCA3 with Electrochemical and Impedance-Based Biosensors: **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 11, p. 46645–46650, 2019.

SONN, G. A. *et al.* Fluorescent Image-Guided Surgery with an Anti-Prostate Stem Cell Antigen (PSCA) Diabody Enables Targeted Resection of Mouse Prostate Cancer Xenografts in Real-Time: **Clin Cancer Res**, v.6, p. 1403–1412, 2016.

SONNENBURG, D. W.; MORGANS, A. K. Emerging Therapies in Metastatic Prostate Cancer: **Curr Oncol Rep**. v.20, n.6, p.46, 2018.

SCHAUER, I.G.; ROWLEY, D. R. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia: **Differentiation**, v.82, p. 200–210, 2011.

SHARPE, R.J. *et al.* Neonatal tolerance increases efficacy of antisera production. **Med Hypotheses**, v. 17, p. 265-70, 1985.

SHIPITSIN, M., *et al.* Automated quantitative multiplex immunofluorescence in situ imaging identifies phospho-S6 and phospho-PRAS40 as predictive protein biomarkers for prostate cancer lethality: **Proteome Sci**, v.12. p. 40, 2014a.

SHIPITSIN, M., *et al.* Identification of proteomic biomarkers predicting prostate cancer aggressiveness and lethality despite biopsy-sampling error: **Br. J. Cancer**, v.111, n.6, p. 1201–1212, 2014b.

STATTIN, P. *et al.* Improving the specificity of screening for lethal prostate cancer using prostate-specific antigen and a panel of kallikrein markers: a nested case-control study. **Eur Urol**, v. 68, p. 207–213, 2015.

TANAGHO, E. A.; MCANINCH, J. W. **Urologia Geral de Smith**. 16. ed.- Barueri, SP: Manole, 2007. p 406-414.

TAYLOR, R. M. *et al.* Prostate Cancer Targeting Motifs: Expression of $\alpha v \beta 3$, Neurotensin Receptor1, Prostate Specific Membrane Antigen, and Prostate Stem Cell Antigen in Human Prostate Cancer Cell Lines and Xenografts. **The Prostate**, v. 72, p. 523-532, 2012.

TOMLIS, S. A. *et al.* Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. **Sci Transl Med**, v. 3, n. 94, 2 94ra72. 2011. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001970>.

TOMLINS, S. A. *et al.* Urine TMPRSS2:ERG plus PCA3 for individualized prostate cancer risk assessment: **Eur. Urol**, v.70, n.1,p. 45–53, 2016.

VLACHOSTERGIOS, P.J. *et al.* Antibody therapeutics for treating prostate cancer: where are we now and what comes next?: **Expert Opin Biol Ther**, v. 17, p.135-149, 2017.

WANG, L. *et al.* Inhibition of CD147 expression reduces tumor cell invasion in human prostate cancer cell line via RNA interference: **Cancer Biology & Therapy**, v. 6, p. 608-614, 2006.

YASUMOTO, M. *et al.* The utility of a novel antibody in the pathological diagnosis of pancreatic acinar cell carcinoma: **J Clin Pathol**, v.65, p.327-32, 2012.

YU, C. Y. *et al.* Comparative performance of PET tracers in biochemical recurrence of prostate cancer: a critical analysis of literature: **Am J Nucl Med Mol Imaging**, v.6, p. 580–601, 2014.

ZIJLSTRA, A. *et al.* Targeting the proteome/epitome, implementation of subtractive immunization: **Biochem and Biophys Res Commun**, v. 303, p. 733–744, 2003.

ZHOU, M. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate: **Modern Pathology**, v. 31, p. 71–79, 2018.

ANEXO I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Câmpus de Araraquara



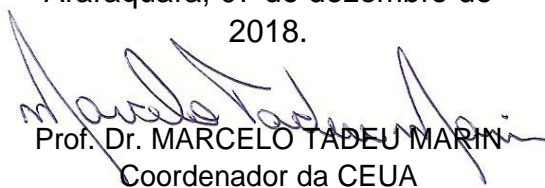
Parecer nº 52/2018 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 05 de dezembro de 2018, analisou e aprovou o pedido de alteração do protocolo CEUA/FCF/CAr nº 27/2017 para uso de animais na pesquisa "Desenvolvimento de imunossensor para detecção de células prostáticas tumorais circulantes utilizando anticorpos monoclonais", apresentado pela pesquisadora Marina de Lima Fontes.

Desta forma, fica revogado o parecer anterior atribuído a este protocolo, tornando-se vigente a autorização conforme descrição abaixo.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro de 2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico Balb/c
Nº de Animais	30
Peso/Idade	24 animais: 5 semanas / 20g 6 animais: 20 dias / 16g
Sexo	Macho
Origem	CEMIB / Campinas - SP

Araraquara, 07 de dezembro de
2018.


Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN
Coordenador da CEUA

ANEXO II

Legenda: Histogramas demonstrando a porcentagem de células PC-3 imunomarcadas: a) controle de autofluorescência; b) controle positivo utilizando o anticorpo anti-CD86 conjugado com PE (ficoeritrina); c) controle secundário utilizando *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC; d) células PC-3 imunomarcadas com o AcM murino derivado do clone PC3SS-2A750, e contabilizadas pela imunomarcação secundária utilizando *Goat anti-mouse* IgG conjugado com FITC.

