

DANIELLA MOREIRA

**PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL
REATIVO COM LEVEDURAS DO GÊNERO
*CANDIDA***



Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, Área de Concentração em Biopatologia Bucal

Orientadora: Prof^a Adj. Carmelinda Schmidt Unterkircher

São José dos Campos
2001

TD 6

MSL3 p

L1443

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI, A. B.; SILVA, E. A. Manual para elaboração de monografias: estrutura de trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC, 2000. 81p.

MOREIRA, D. Produção de anticorpo monoclonal reativo com leveduras do gênero *Candida*. 2001. 96f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a Dr^a Carmelinda Schmidt Unterkircher, agradeço por acolher-me nesta Universidade, por ensinar-me os passos e técnicas da Imunologia, acompanhando-me em todos os momentos, sempre disposta a recomeçar cada etapa desta pesquisa em prol de um trabalho digno e transparente. A você, PROFESSORA, meu sincero agradecimento, admiração e respeito.

Este trabalho é dedicado...

Ao meu marido Vital

Por compreender minhas ausências durante a realização deste trabalho.

Pelo apoio, incentivo e carinho sempre constantes e incondicionais.

Aos meus pais Regina e Benedito

Pela presença intensa e por representarem o espírito de amor verdadeiro e sincero, incentivando minha caminhada com coragem e determinação nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa da Diretora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof^ª. Titular Maria Amélia Máximo Araújo.

Ao Programa de Biopatologia Bucal, na pessoa de sua Coordenadora Prof^ª. Adjunta Yasmin Rodarte Carvalho e sua equipe de professores que nos propiciaram apoio e ensino de qualidade, necessários à formação científica.

À Prof^ª. Adjunta Carmelinda Schmidt Unterkircher que não mediu esforços para disponibilizar os meios necessários à realização deste trabalho.

Ao Prof. Adjunto Antonio Olavo Cardoso Jorge, por idealizar e sugerir o curso de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, colaborando efetivamente para o aprimoramento do mesmo.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Blumer Rosa e Prof. Adjunto Luiz Antonio Guimarães Cabral, pela amizade, solidariedade e orientações no decorrer do curso de Pós-Graduação.

À Emília Angela L. Arisawa (Mirela), pela amizade e solidariedade em todos os momentos, propiciando um convivência harmoniosa e alegre.

Aos amigos Antonio, Fujiko e Mariella, companheiros solidários do laboratório de Imunologia, que jamais serão esquecidos, e aos amigos, Fábio e Luciane, cujos laços de amizade se iniciam.

Ao amigo Fábio Fugarra pelo auxílio nas ilustrações apresentadas neste trabalho.

Às técnicas Ana Lourdes da Silva Machado e Clélia A. de Paiva Martins, pela colaboração técnica durante a fase experimental.

Ao Prof. Titular Mário Tsunezi Shimizu, por ter cedido as amostras de *Candida* que foram utilizadas nesta tese.

Ao Prof. Dr. Ivan Balducci, pela execução da análise estatística apresentada neste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Sílvia Scarpel e Terezinha Fátima Arantes de Mello, por serem solidárias e prestativas em todos os momentos.

À bibliotecária Angela de Brito Bellini pela orientação e
presteza na revisão das normas técnicas apresentadas neste trabalho.

À amiga Prof. Maria Tereza Callefe, pela orientação e
revisão de língua portuguesa, ortografia e gramática desta tese.

Aos funcionários do biotério Lorival e Antonio, sempre
cuidadosos no manejo dos animais utilizados nesta pesquisa.

A todos os amigos, professores, alunos e funcionários do
Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, meu
agradecimento pelo sorriso que tornou nossa convivência mais alegre,
pela disponibilidade em auxiliar, pelo incentivo nos momentos
difíceis que certamente me encorajaram a prosseguir. A todos vocês,
muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Anticorpos monoclonais	18
2.1.1 Técnica de anticorpos monoclonais na identificação de leveduras do gênero <i>Candida</i>	22
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODO	40
4.1.1 Preparo do antígeno citoplásmico de <i>C. albicans</i>	40
4.1.2 Preparo de uma fração de <i>C. albicans</i> rica em manana	41
4.2 Imunização dos camundongos	41
4.3 Produção de anticorpo monoclonal	42
4.3.1 Produção da Ascite	44
4.4 Análise Sorológica	45
4.4.1 ELISA	45
4.4.2 Isotipagem	45
4.5 SDS-PAGE	46
4.6 <i>Western-blotting</i>	47
4.7 Purificação do anticorpo monoclonal	49
4.8 Cepas de <i>Candida</i>	49
4.9 DOT-BLOT	50
4.10 Cromatografia de Afinidade em Concanavalina A-Sepharose	51
4.11 Oxidação pelo Metaperiodato	52
4.12 Análise Estatística	52
5 RESULTADOS	53
5.1 Preparo do antígeno e imunização dos camundongos	53
5.2 Isolamento do anticorpo monoclonal 76C anti- <i>C. albicans</i>	53
5.3 Caracterização do anticorpo	57
5.3.1 Isotipagem	57
5.3.2 Reatividade do anticorpo 76C	58
5.3.3 <i>Western-blotting</i>	62
5.3.4 DOT-BLOT	63
5.3.5 Oxidação pelo metaperiodato	66
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES	76
8 REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	91
ABSTRACT	95

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 -Representação do cálculo da quantidade de tampão de amostra aplicada a cada amostra de *Candida*.....50
- FIGURA 2 -ELISA. Isotipagem do Acmo 76C. Anticorpos de coelho anti-isótipos de imunoglobulinas de camundongo, anti-subclasses de IgG e anti- cadeias leves. Conjugado anti-IgG de coelho – peroxidase.....57
- FIGURA 3 -ELISA. Reatividade do Acmo 76C. Reatividade com o AgC/Ca. IgM monoclonal (M) 40µg/mL, IgM do soro normal (N) de camundongo 40µg/mL, IgM do soro de camundongo imunizado (I) com *C. albicans* 40µg/mL.....58
- FIGURA 4 -ELISA. Reatividade do Acmo 76C com mananoproteína presente no sobrenadante de cultura de *Candida albicans*. Conjugado anti-IgM de camundongo-peroxidase, Anticorpos a 40µg/mL.....59
- FIGURA 5 -ELISA. Reatividade do Acmo 76C com manano-proteína presente no sobrenadante de células de *Candida albicans* fervidas em tampão PBS. Conjugado anti-IgM de camundongo- peroxidase, Anticorpos a 40µg/mL.....60

- FIGURA 6 -ELISA. Reatividade do Acmo76C com eluato da coluna de concanavalina A – sepharose. Eluição: 0.1M de α metilmanopiranosídeo. Anticorpos a 40 μ g/mL.....61
- FIGURA 7 -*Western-blotting*. 1- Reatividade do anticorpo monoclonal 76C com fosforilase B (94 kDa) e com anidrase carbônica (30 kDa) 2 – anidrase carbônica humana.....62
- FIGURA 8 -DOT BLOT. Reatividade do anticorpo monoclonal 76C frente a diversas espécies de *Candida*.....63
- FIGURA 9 -ELISA. Reatividade do 76C após tratamento da manano-proteína com metaperiodato.....66

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Protocolo usado na preparação do anticorpo monoclonal 76C.....56
- Quadro 2 – Resultado Dot Blot. Reatividade de diversas espécies de *Candida* com o anticorpo monoclonal 76C.....65
-

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

μg = micrograma;

μL = microlitro

Acmos = anticorpos monoclonais

BME= Betamercaptoetanol

D.O . = densidade óptica

DMSO = Dimetilsulfóxido

ECM = matriz extracelular

ELISA = Ensaio de imunoabsorção com enzima ligada (do inglês enzyme-linked immunosorbent assay)

et al. = e outros (do latim: et alli)

HAT= meio para cultura de células suplementado com hipoxantina, aminopterina e timidina

HT = meio para cultura de células suplementado com hipoxantina e timidina

kDa = kilodalton

mM = milimolar

nm = nanômetros

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês polyacrylamide gel electrophoresis)

PBS = solução salina tamponada com fosfato

PBS-T = solução salina tamponada com fosfato + 0,1% de Tween 20

PBS-T-G = solução salina tamponada com fosfato+ 0,1% de Tween 20 +
0,5% de gelatina

Rpm – rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute (Marca registrada)

SDS – dodecilssulfato de sódio (do inglês: sodium dodecyl sulfate)

T.A. – temperatura ambiente

MOREIRA, D. Produção de anticorpo monoclonal reativo com leveduras do gênero *Candida*. 2001. 96f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a produção de um anticorpo monoclonal reativo com leveduras do gênero *Candida*. Esplenócitos de camundongos BALB/c previamente imunizados com *Candida* foram fusionados *in vitro* com células de mieloma Sp2-OAg14 e os híbridos resultantes mantidos em cultura a 37°C com 5% de CO₂. Os sobrenadantes das células em crescimento foram testados por ELISA para a produção de anticorpos. Os pontos positivos (0,29%) foram clonados para obter-se o anticorpo monoclonal e posteriormente expandidos *in vivo* em peritônio de camundongo. O anticorpo produzido pelo clone foi purificado e isotipado. O anticorpo monoclonal foi denominado 76C e é uma IgMκ. O 76C é dirigido para um epítipo de mananoproteína da parede celular de *Candida*, cuja natureza ainda não foi completamente elucidada. O anticorpo 76C foi analisado por DOT BLOT contra diferentes cepas de *Candida* reagindo positivamente com 87,5% das amostras testadas. O anticorpo monoclonal (76C) será uma ferramenta útil no estudo sorológico de pacientes com candidose invasiva.

PALAVRAS-CHAVE: Anticorpo monoclonal; *Candida albicans*, diagnóstico; manana.

1 INTRODUÇÃO

A importância médica e odontológica das infecções causadas por leveduras tem estimulado estudos com ênfase na epidemiologia, patogênese, genética e imunologia das espécies pertencentes ao gênero *Candida*.

As leveduras do gênero *Candida* estão amplamente distribuídas na natureza, podendo algumas espécies viver em vida saprofítica ou parasitária no homem e em animais (Budtz-Jørgensen¹⁰,1990). Espécies de *Candida* também estão presentes como comensais, no trato digestivo e vaginal fazendo parte da microbiota normal do hospedeiro. O estado de portador, sem exibir patologia, é vastamente pesquisado. Para Allen¹ (1992), o sistema imune e a competição com outros microrganismos manteriam estas leveduras sob controle. Entretanto, qualquer alteração da anfibiose resultaria em candidose.

De acordo com Sandven⁵⁷ (1990), espécies de *Candida* distinguem-se entre os demais *Deuteromycetes*, pela habilidade em formar pseudohifas, sendo a *C.glabrata* a única exceção. Algumas espécies de *Candida* são de grande importância médica e odontológica, como *C.albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. *Candida stellatoidea*, *C. guilhermondii* e *C.krusei* também são comumente isoladas de diferentes

espécimes clínicos (Samaranayake et al.⁵⁶, 1984). Citada na literatura em 1998 por Sullivan et al.⁶⁷, *C. dubliniensis* tem sido recentemente descrita entre as espécies de leveduras formadoras de clamidósporos e tubo germinativo. Esta espécie coloniza as estruturas bucais e orofaringe de indivíduos infectados por HIV e aids, podendo estar associada com *C.albicans* durante a manifestação clínica de candidose eritematosa (Rodero et al.⁵⁵,1998).

Os mecanismos pelos quais *C.albicans* causa doença em indivíduos sadios são pouco conhecidos. Várias características, como a capacidade de formar hifas, a aderência às células epiteliais da mucosa, a presença de substâncias semelhantes a endotoxinas e a secreção de enzimas proteolíticas, foram sugeridas como fatores de virulência que contribuiriam para a patogenicidade dessas leveduras (Shimizu⁶²,1988).

Existe uma forte correlação entre fatores predisponentes e prevalência de *Candida*, devendo-se considerar as características microbiológicas das espécies, a estrutura antigênica (sorotipos) e a produção de enzimas (proteínase e fosfolipase) como moduladores da virulência e da capacidade invasiva desses microrganismos (Lehner⁴¹, 1967; Bradford⁸, 1976; Tsuboi⁷³ et al., 1994). As proteínas de *Candida*, isoladas de casos de candidoses, já foram investigadas e consideradas, especialmente as proteínas ácidas, como fatores de virulência (MacDonald & Odds⁴²,1980; McCulough⁴⁶ et al.1996). Outra enzima, a hialuronidase, também pode estar envolvida na patogenicidade de

Candida (Bonifácio-Souza⁶,1990 e Khouiri³³,1998), facilitando sua penetração no tecido conjuntivo, principalmente quando associada com fosfolipase e proteinase (Silveira⁶⁴, 1990; Almeida²,1991; Shimizu et al.⁶³, 1995). Entre os fatores locais que cooperam para o aparecimento de candidoses, podemos destacar a maior predisposição de fumantes e usuários de próteses. Para Darling et al.¹⁵(1990), usuários de *cannabis* demonstraram um aumento na prevalência de *C.albicans* bucal, porém não foi constatado aumento proporcional de indivíduos com candidose bucal. Segundo Arendorf et al.³,1983, a combinação tabaco-prótese pode representar um dos mais importantes fatores etiológicos locais no desenvolvimento da candidose hiperplásica crônica. Para Allen¹ (1992), estas lesões fúngicas podem variar de aspecto eritematoso a esbranquiçado e apresentam bom prognóstico quando tratadas com diferentes medicamentos anti-fúngicos disponíveis para uso clínico.

Várias condições sistêmicas, como desordens endócrinas (Diabete melito), deficiências imunológicas ou imunossupressão (AIDS, uso contínuo de corticosteróides), também predispõem as candidoses e são exceções ao tratamento convencional, apresentando resistência e prognóstico muitas vezes desfavorável. Na tentativa de tratar quadros refratários de candidoses, estudos relacionados com o tratamento fitoterápico mostrou-se bastante efetivo quando comparado com tratamento alopático. Xavier⁷⁸ (1997) demonstrou que o óleo de *Fevillea trilobata* L. (Nhandiroba) era superior à nistatina, promovendo a cura em

período mais curto, com menor quantidade/dia de medicamento, sem contra-indicação e riscos de toxicidade.

De um modo geral, os fatores que predis põem à candidose bucal são locais e/ou sistêmicos e colaboram efetivamente para acentuar o quadro de infecção que pode ser agudo ou crônico, superficial ou profundo, localizado ou disseminado ou ainda ter caráter oportunista (Lacaz et al.³⁶, 1980; Odds⁴⁸, 1988; Budtz-Jørgensen¹¹, 1990).

Considerando prevalência de candidose e os mais diversos fatores que tornam susceptível à exacerbação desta patologia, propusemos-nos a investigar, sob a ótica imunológica, que recursos diagnósticos poderiam advir com o uso de anticorpos monoclonais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais são imunoglobulinas produzidas por um único clone de linfócitos B. Tais anticorpos são usualmente secretados por células híbridas produzidas pela fusão de células de mieloma com células esplênicas imunes.

A metodologia de hibridoma, assim denominada, permitiu a produção de grande quantidade de anticorpos homogêneos com especificidade determinada.

Köhler & Milstein³⁴ (1975) foram os primeiros pesquisadores a produzirem anticorpos monoclonais (Acmo) de especificidade pré-definida. Esses pesquisadores idealizaram um método para produzir um anticorpo específico para um determinante antigênico particular. A metodologia consistiu na fusão de células de mieloma (P3-X67Ag8) com células de baço provenientes de camundongo BALB/c pré-imunizado. Os camundongos foram imunizados com eritrócitos de carneiro, reestimulados depois de um mês, e sacrificados quatro dias mais tarde para remoção do baço. Após a fusão, as células (Sp-1) cresceram por oito dias em meio de cultura suplementado com

hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT), substituído em intervalos de um a três dias. Os híbridos cresceram em meio de Eagle-Dulbecco modificado, suplementado com hipoxantina e timidina (HT) por duas semanas. Após quatro dias de fusão, a presença de reatividade anti-eritrócitos de carneiro foi detectada pela técnica de placa modificada e o número total de células híbridas foi 1/30. Os híbridos foram posteriormente clonados em ágar semi-sólido e um clone chamado de Sp1/7, reclonado.

A viabilização desta metodologia de fusão de células, visando a produção de anticorpos monoclonais para antígenos definidos, tem tido um grande impacto na medicina e em diagnóstico. Inúmeros testes são realizados na tentativa de aumentar a aplicabilidade dos anticorpos monoclonais em terapêutica. A limitação de uso dos anticorpos monoclonais de camundongos deve-se ao fato de os seres humanos desenvolverem, rapidamente, anticorpos anti-imunoglobulina de camundongo. Porém, segundo Scroferneker & Pohlman⁶⁰ (1998) pesquisas tem sido realizadas no sentido de produzir anticorpos monoclonais humanos ou híbridos humano/camundongo, menos imunogênicos. A partir da década 1980, anticorpos monoclonais de camundongos tornaram-se ferramentas indispensáveis como marcadores específicos de diferentes populações celulares, especialmente de linfócitos. Nos últimos dez anos, a utilização dos anticorpos monoclonais na técnica de citometria de fluxo tem permitido uma análise acurada das

subpopulações de células B e T. Também é crescente a utilização de anticorpos monoclonais no campo da oncologia.

A terapia oncogênica associada a anticorpos monoclonais foi investigada por Gil et al.²¹ (1990), que demonstraram inibição *in vivo* do crescimento tumoral por um anticorpo monoclonal que reconhecia carboidrato. Os monoclonais (ASO e E1) ligaram-se a epítopos glicídicos na superfície de células do Tumor de Ehrlich (ET), induzindo a supressão tumoral *in vivo* por um mecanismo dependente de macrófagos. Em terapêutica oncogênica, os anticorpos monoclonais são usados como meios de purificação *in vitro* das células neoplásicas residuais antes do transplante de medula óssea (Trent⁷²,1995).

Anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos tumorais podem ser conjugados com radioisótopos, drogas, citocinas e toxinas. O anticorpo anti-CD20 foi o primeiro anticorpo aprovado pelo "Food and Drug Administration" (FDA) para o tratamento clínico do câncer, sendo comercializado no final da década de 1997. O anti-CD20 induz citotoxicidade dependente de anticorpo e complemento nas células positivas para este marcador, induz a apoptose de células de alguns linfomas e aumenta a sensibilidade ao efeito citotóxico induzido pela quimioterapia e toxinas (Scroferneker & Pohlman⁶⁰,1998).

Segundo Scroferneker & Pohlman⁶⁰ (1998), a utilização de anticorpos monoclonais como agentes supressores em transplantes de órgãos, tem se mostrado promissora. O único monoclonal com

aprovação clínica e comercial para esse fim é o anticorpo anti-CD3, OKT3, cujo alvo é a molécula CD3 presente nos linfócitos T. O anticorpo OKT3 atua ativando o sistema complemento para eliminação de células T e opsonizando estas células para a fagocitose.

Schneider et al.⁵⁹ (1998) produziram dois anticorpos monoclonais (C6 e PA10F) contra um componente de 48 kDa de *C. albicans* e demonstraram *in vitro* a reatividade cruzada destas imunoglobulinas com carcinoma ovariano humano. O Acmo PA10F reagiu com um antígeno de 74 kDa de células tumorais, apresentando um poder discriminatório entre variantes de malignidade de maior ou menor agressividade. O estudo da expressão do antígeno reconhecido por PA10F mostrou que o componente reativo de 74 kDa estava relacionado à malignidade desses tumores .

A aderência de *C. albicans* aos tecidos do hospedeiro é considerada um passo crucial para iniciar o processo patogênico. Aderir é um pré-requisito para colonização e subsequente infecção. De acordo com Odds⁴⁸(1988), as adesinas, glicoproteínas presentes na superfície da levedura, são responsáveis pela união de *C. albicans* às células do hospedeiro. Proteínas associadas à matriz extracelular (ECM) e células endoteliais têm sido relacionadas como possíveis alvos para a aderência de *Candida*. Cotter et al.¹⁴ (1998), utilizando anticorpos monoclonais contra proteínas da matriz extracelular (colágeno Tipo I, Tipo IV, laminina e fibronectina), reduziram a aderência de *C. albicans* às

células HEp-2, derivadas de carcinoma epidermóide de laringe. Os autores obtiveram o máximo de inibição quando acrescentaram o anticorpo monoclonal anti-colágeno Tipo IV.

2.1.1 Técnica de anticorpos monoclonais na identificação de leveduras do gênero *Candida*

A caracterização dos antígenos de determinada espécie de *Candida* permite estabelecer relações desta com outras espécies de leveduras pertencentes ao mesmo gênero ou a gêneros diferentes, bem como com espécies de bactérias. Hopkins & Benhan³⁰, em 1929, realizaram os primeiros estudos sobre a estrutura antigênica de *C. albicans* e demonstraram diferenças no comportamento antigênico de várias cepas por reações de aglutinação.

A estrutura antigênica de leveduras do gênero *Candida* tem sido amplamente estudada, visando caracterizar os principais antígenos citoplasmáticos e da parede celular, tanto de natureza protéica como polissacarídica. A parede celular de *C. albicans* é composta primariamente dos polissacarídeos: manana, glucana e quitina. A manana representa cerca de 23% do peso seco da parede celular, glucana de 40 a 60%, proteínas de 6 a 25%, lipídios de 1 a 7% e quitina 0,6 a 9%. A manana é distribuída por toda a parede celular sendo

considerada o principal antígeno de superfície. Quitina e glucana são encontradas no interior da parede celular (McCulluogh et al.⁴⁶, 1996).

Os polissacarídeos e complexos polissacarídeos-proteínas são antígenos de grande importância em leveduras, podendo ser extra ou intracelulares. Nas espécies de *Candida*, estes complexos são quimicamente definidos como gluco-manana-proteína, manana-proteína e glucana-proteína. A manana é um homopolissacarídeo constituído por unidades repetidas de manose unidas entre si e responsável pela maior atividade antigênica da célula de *Candida*. A manana é hidrossolúvel e reage bem nos testes de precipitação (Siqueira et al.⁶⁵, 1980).

Strockbine et al.⁶⁶ (1984) produziram três anticorpos monoclonais da classe IgG que reconheceram no *Western-blotting* proteínas com pesos moleculares aparentes de 120 a 135 kDa, 44 a 52 kDa, 35 a 38 kDa. A produção de fragmentos peptídicos, obtidos por digestão enzimática, evidenciaram que as proteínas identificadas pelos anticorpos monoclonais eram as mesmas reconhecidas pelos anticorpos séricos de pacientes com infecção invasiva por *Candida* e imunoglobulinas de coelho imunizado.

Brawner & Cutler⁹ (1984) investigaram a expressão de um antígeno de superfície em *C.albicans* usando um anticorpo monoclonal IgM. O antígeno foi demonstrado em 76% de noventa cepas de *C.albicans* e em cepas de *C. tropicalis* e *Torulopsis glabrata*. A expressão

do antígeno, determinada por reação de aglutinação, foi influenciada pela composição do meio de cultura, ou seja, células de *Candida* mantidas em caldo demonstraram maior reatividade do que as mantidas em meio sólido. Outro dado observado foi a menor reatividade das células no início da fase logarítmica (Log) quando comparadas com as células do período intermediário da mesma fase. Esses dados indicam que a expressão de antígenos de superfície em *Candida albicans* é um processo dinâmico e pode ser influenciado por vários fatores ambientais. Anticorpos monoclonais podem permitir a caracterização de antígenos de *Candida* presentes no hospedeiro durante a candidose.

Em 1985, Heidenreich & Dierich²⁸ observaram pela primeira vez que tubos germinativos de *Candida albicans* e *Candida stellatoidea* ligavam-se a eritrócitos humanos cobertos por iC3b e C3b, sugerindo a presença de receptores para complemento na parede da levedura, funcionando de forma similar a CR2 e CR3. Um ano mais tarde, este achado foi confirmado pelo encontro de um anticorpo monoclonal, Mo1, que reconhecia a cadeia α de CR3 e componentes antigênicos do tubo germinativo de *C. albicans*. Mo1 reconhecia uma sequência em CD11b, presente em CR3 de neutrófilos e outras proteínas neutrofílicas (Mayer et al.⁴⁵,1990).

Recentemente Lee & Chun³⁹ (1997) mostraram que receptores para iC3b do complemento estão envolvidos na aderência de *C. albicans* as células endoteliais vasculares e devem provavelmente

colaborar na patogênese da candidose disseminada. Experimentos realizados pelos autores num modelo de infecção em camundongo BALB/c mostraram que anticorpos anti-receptores iC3b podiam proteger os animais da candidose e/ou aumentar a sobrevida dos mesmos.

Hoopwood et al.²⁹ (1986) produziram um anticorpo monoclonal a partir de células de mieloma de camundongo e linfócitos de rato resultando na produção de um anticorpo monoclonal (IgM) designado 5B2. Os testes de imunofluorescência direta demonstraram que o antígeno-alvo estava presente na parede celular das espécies patogênicas de *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C. glabrata*, e *C. guilliermondii*. O antígeno era predominantemente de natureza polissacarídica, pois não sofria denaturação quando as células eram submetidas ao tratamento térmico (calor) e não eram afetadas pelo ditioneitol (DTT) e enzimas proteolíticas. Este antígeno não foi liberado da parede celular submetida ao tratamento com metilclorofórmio. Os resultados da reação de contra-imunoelektroforese mostraram que a atividade antigênica era compartilhada por duas moléculas com diferentes mobilidades eletroforéticas. A presença do epítipo em várias espécies de *Candida* analisadas estava relacionada ao estágio morfológico do ciclo celular, pois sofria grande variação entre espécies e dentro de uma mesma espécie. Na imunofluorescência indireta, o antígeno estava presente no citoplasma, no espaço periplasmático e em toda a superfície celular de *C. albicans*.

A ocorrência de antígenos comuns entre candidose e aspergilose, infecções fúngicas mais comuns em indivíduos imunocomprometidos, foi observada por Fratamico et al.¹⁹ (1991). Anticorpos monoclonais do isotipo IgG1 κ para o antígeno de 58 kDa de *Aspergillus fumigatus* reagiram cruzado com um polipeptídeo de 55 kDa, presente num extrato de *C. albicans*.

A utilização de testes sorológicos para diagnóstico rápido das candidoses tem impulsionado os estudos imunoquímicos do gênero *Candida*. Bernardis et al.⁵ (1993) usaram a técnica de *imunodot* para detecção do antígeno mananoproteína no soro de pacientes neutropênicos com candidose invasiva. A metodologia baseia-se no uso do Acmo AF1 que reconhece um epítipo de oligomanosídeo presente na mananoproteína de diferentes espécies de *Candida* patogênicas para o homem. Ensaio realizado com este Acmo, AF1 e manana acrescentada artificialmente, mostraram que a sensibilidade de detecção de manana circulante era da ordem de 2 a 5ng/mL.

Anticorpos monoclonais têm sido produzidos contra um vasto número de microrganismos, vírus, bactérias, fungos e parasitas multicelulares. Uma das aplicações desses anticorpos é o desenvolvimento de teste imunodiagnóstico para detecção de antígenos e/ou anticorpos no soro. Sendid et al.⁶¹ (1999) padronizaram dois testes para diagnóstico sorológico de candidose. Um deles, para detecção de anticorpos antimanana e o outro, para detecção de manana circulante

com sensibilidade de 0,1ng/mL. Os testes foram aplicados a 162 soros provenientes de 43 pacientes com candidose, comprovada clínica e micologicamente. Surpreendentemente, somente cinco soros foram positivos para ambos os testes, mananemia e detecção de anticorpos. Cerca de 84% dos pacientes, 36, apresentaram resultados positivos para, pelo menos, um dos testes. Esses dados demonstram claramente a disparidade existente entre os catabólitos de manana e a resposta imune humoral antimanana, sugerindo que a utilização dos dois testes imune enzimáticos pode ser útil no diagnóstico da candidose sistêmica.

Inúmeros procedimentos médicos como implantes, catéteres, materiais plásticos cirúrgicos e válvulas cardíacas têm melhorado a saúde de muitos indivíduos. Entretanto, estes materiais podem ser colonizados por diferentes microrganismos que formam um biofilme e estabelecem um reservatório crônico, a partir do qual ocorre disseminação de células microbianas. Entre estes microrganismos, *Candida albicans* destaca-se pela sua capacidade de aderência às superfícies plásticas (Lacaz et al.³⁷, 1991). San Millan et al.⁵⁸ (1996) avaliaram a adesão *in vitro* de *C. albicans* ao poliestireno e o efeito de três anticorpos monoclonais reativos com antígenos da parede celular. O Acmo B9E reduziu a filamentação e adesão ao poliestireno. Na ausência do anticorpo monoclonal B9E, a adesão de *C. albicans* ao poliestireno aumentava em paralelo com a formação do tubo germinativo.

O papel dos anticorpos monoclonais na candidose sistêmica tem sido investigado por muitos pesquisadores. Esses autores acreditam que indivíduos com candidose sistêmica apresentem anticorpos específicos que bloqueiam a fagocitose das leveduras (Laforce et al.³⁵ 1975; Walker & Urbaniak⁷⁶, 1980; Han & Cutler²⁵, 1997).

Num processo patológico por leveduras, uma resposta imunológica deficiente é sempre um pré-requisito para infecções severas por *Candida*. Considerando a importância das células T na resposta imune anti-*Candida* em humanos, Gomez et al.²³ (1996) estudaram a resposta imune celular para um constituinte de 65 kDa da mananoproteína (MP) de *C. albicans*. O antígeno em estudo foi purificado por cromatografia de afinidade com anticorpos monoclonais dirigidos contra epítomos de natureza polipeptídica, a julgar pela sua resistência à oxidação ao metaperiodato e sua sensibilidade às proteases. Os anticorpos monoclonais usados foram obtidos pela imunização de camundongos com a MP da levedura crescida em meio de cultura com doses subinibitórias de tunicamicina, uma droga que interfere com o processo de glicosilação. O antígeno purificado induziu, em nanogramas, forte proliferação de células T, inibida de forma dose-dependente pelo fragmento Fab do anticorpo.

As dificuldades em estabelecer o diagnóstico da candidose disseminada são amplamente discutidas com o objetivo de planejar estratégias preventivas e formas de tratamento alternativo.

Consideráveis tentativas têm sido realizadas no sentido de desenvolver testes sorológicos para detecção de anticorpo e/ou antígeno que comprovem a invasão tecidual por *C. albicans*. Muitos desses experimentos têm focado a manana como principal antígeno. Jacquinot et al.³¹ (1998) relatam que a estrutura molecular da manana tem sido exaustivamente estudada, podendo apresentar oligomanosídeos O- e N ligados. A parte N ligada compreende um domínio ácido estável que consiste de resíduos de manopiranosose α 1-2 e α 1-3 ligados com alguns terminais β 1-2 na *Candida albicans* sorotipo A. O domínio ácido lábil está ligado à molécula por pontes fosfodiéster e é constituído por homopolímeros de oligomanosídeos β 1-2. Dependendo do comprimento e tipo da ligação da cadeia manosil, as oligomanoses interagem de forma altamente específica com o sistema imune do hospedeiro, com linfócitos, macrófagos, citocinas, proteínas de ligação a manose e anticorpos. O grau de polimerização da cadeia é importante e parece envolver um epítipo conformacional, induzido apenas num certo comprimento da cadeia monossacarídica.

Jacquinot et al.³¹ (1998) prepararam um Acmo EB-CA1 reativo com oligomanosídeos liberados de um domínio ácido estável da manana de *C. albicans*. A reatividade do anticorpo foi observada com uma manopentose e/ou oligômeros maiores, enquanto manotetraose e trioses não eram reativas. O epítipo do MaEB-CA1 encaixa na estrutura geral de α 1-(2man α 1)_n-2man que corresponde ao fator antigénico 1. O fator 1 é

ubíquo em espécies de leveduras (oligomanose O ligada) e também está presente em *C. albicans*.

A baixa resposta imune humoral anti-mananoproteína em camundongo tem sido observada repetidamente. Domer et al.¹⁶ (1986) têm demonstrado que algumas mananoproteínas da parede celular de *C. albicans* podem suprimir a resposta de linfócitos B. Cassone et al.¹³ (1988) produziram um anticorpo monoclonal IgM, denominado AF-1, dirigido contra constiuintes de gluco-manano-proteína da parede celular de *C. albicans* e de outras espécies patogênicas de *Candida*. Testes de aglutinação e imunofluorescência indireta demonstraram que o Acmo era dirigido contra um epítipo da parede celular de *C. albicans*, sorotipo A e B, *C. guilliermondii*, *C. viswanathi*, porém não apresentava reação positiva com as espécies de *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. glabrata*. Nenhuma diferença foi observada nas reações de aglutinação realizadas com células viáveis e quimicamente inativadas.

Várias frações da manana da parede celular foram extraídas por diferentes técnicas e tratadas pelo calor, periodato e proteases. Os testes comprovaram que o epítipo reconhecido pelo monoclonal AF-1 era um polissacarídeo da molécula de glucomananoproteína (GMP) da superfície celular. Os tratamentos térmico e enzimático não interferiram na habilidade de ligação da GMP com o Acmo AF-1, porém a ligação foi sensível à oxidação pelo periodato, como ocorre com epítipos de carboidrato.

Durante os últimos dez anos, os pesquisadores têm se interessado por anticorpos que protejam contra candidose disseminada (Han & Cutler²⁴,1995) e infecções vaginais (Han et al.²⁷,1998). Anticorpos monoclonais específicos para epítomos de manana de *C.albicans* e vacinas constituídas por um complexo lipossoma-manana de *C.albicans* (L-mann) aumentam a resistência à infecção vaginal quando administrados por via intravaginal ou intra peritoneal. O anticorpo monoclonal B6.1 também mostrou-se efetivo contra infecções vaginais por *C. tropicalis*.

O mecanismo de proteção depende da ação direta de anticorpos sobre *C. albicans*. Fragmentos Fab do Acmo específico para parede celular da hifa inibem a formação do tubo germinativo (Casanova et al.¹² 1990, citado por Han et al.²⁶,1997). Outro exemplo é a produção de anticorpos monoclonais capazes de reduzir a filamentação de *C. albicans*, inibindo dessa forma sua ação patogênica, San Millan et al.⁵⁸, (1996).

Han et al.²⁶ (1997) isolaram dois Acmos designados B6.1 e B6. Estes anticorpos pertenciam ao isotipo IgM e possuíam a característica de aglutinar células leveduriformes de *C.albicans*. Ambos eram específicos para manana da parede celular. Experimentalmente, o acmo B6.1 aumentava a resistência contra candidose disseminada, enquanto Acmo B6 não apresentava esta característica. Estes anticorpos também protegiam os camundongos contra infecção vaginal e podiam ser

usados com finalidade terapêutica. Os dois Acmos reconheciam uma adesina localizada na superfície celular de *C. albicans*, mas os epítomos reativos diferiam na especificidade.

A diferença na resposta imunológica é justificada por Han et al.²⁶ (1997) pela especificidade dos epítomos reconhecidos. Embora ambos os epítomos fizessem parte do complexo fosfomanana da parede celular, o epítomo do Acmo B6.1 perdia-se após hidrólise ácida, enquanto o determinante antigênico do B.6 estava associado a uma fração ácido estável, localizada de forma esparsa na superfície celular dos blastósporos.

Estudos sobre o dimorfismo de *C.albicans* mostraram que os epítomos de superfície residiam em componentes de 155 kDa ou maiores, liberados por digestão enzimática da parede celular do microrganismo. O mesmo processo de digestão realizado com tubo germinativo liberou antígenos diferentes e específicos de forma, sugerindo intensa variabilidade antigênica Han et al.²⁶, 1997).

Sundstrom et al.⁶⁹ (1988) avaliaram três anticorpos monoclonais específicos para as superfícies antigênicas das duas formas de crescimento de *C.albicans*, constatando por imunofluorescência que antígenos de superfície expressavam-se variavelmente. Os anticorpos monoclonais testados reagiram com as frações glucana de células digeridas, indicando reatividade com a porção carboidrato da mananoproteína. Os autores utilizaram, para imunização, blastoconídeos,

11443
 formando tubo germinativo e produziram quatro Acmos IgM. Posteriormente, testaram três antígenos diferentes, blastoconídeo de *C. albicans*, tubo germinativo e blastoconídeo autoclavado. Todos os Acmos reagiram com os diversos antígenos. Diferentes graus de reatividade foram observados com cinco cepas de *C. albicans*, *C. stellatoidea* e *C. tropicalis*. Nenhuma reação pôde ser demonstrada com *C. glabrata*. O padrão de reação variou de espécie para espécie e com o Acmo usado. Os determinantes antigênicos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais eram resistentes ao tratamento com calor, tripsina e sensíveis ao periodato. Os Acmos reagiram com extratos contendo mananoproteína de *Candida* ou parede celular e foram específicos para parede celular de leveduras por reação de aglutinação e imunofluorescência. Estas características sugeriam os carboidratos como os principais determinantes antigênicos na superfície celular de *Candida*.

As aplicações diagnósticas dos anticorpos monoclonais incluem radioimunoensaio, ensaio imunoenzimático, citometria de fluxo e hibridização *in situ* na imunotipagem em secções de tecidos (Trent⁷², 1995).

Borg-Von Zepelin & Grüness⁷ (1993) considerando *C. albicans* e *C. tropicalis* como as espécies de *Candida* mais virulentas e que se distinguem das demais pela capacidade de secretar proteinases, produziram e caracterizaram dois anticorpos monoclonais contra uma proteinase secretada por *Candida tropicalis* DSM 4238. A proteinase de



C. tropicalis diferia da proteinase de *C. albicans* sob vários aspectos, tais como, intensidade de glicosilação e baixa estabilidade em alcali. Os monoclonais produzidos foram denominados MT1 e MT2 e eram reativos contra proteinase de *C. tropicalis*. Ambos os Acmos reagiram com proteinases homólogas, nativas e denaturadas, mas apresentaram diferentes padrões de reatividade com enzimas heterólogas. O MT1 reagiu com mananoproteína de *C. tropicalis* e *C. albicans* sorotipo A e na imunofluorescência reagiu com a superfície dos blastoconídeos e pseudomicélio de duas espécies diferentes de *Candida*. No sorotipo B, a reação foi observada somente com o blastoconídeo. O tratamento pelo calor e o tratamento enzimático com pronase e tripsina não reduziram a imunofluorescência no caso do MT1, mas o mesmo não ocorreu com o MT2. Os resultados sugeriram que o Acmo MT1 ligava-se a um epítipo de carboidrato, enquanto o MT2 ligava-se a epítipo pertencente à parte protéica da enzima. Os Acmos mostraram-se efetivos na detecção de antigenemia por ELISA nos soros de pacientes com candidose, podendo mensurar 4ng/mL de antígeno circulante.

A composição antigênica da parede celular de *Candida albicans* tem sido bastante estudada na tentativa de identificar antígenos de relevância para o diagnóstico clínico.

Ponton et al.⁵² (1993) estudaram a relação antigênica entre blastoconídeo e tubo germinativo de *Candida albicans* frente a dez anticorpos monoclonais diferentes, sendo oito Acmo IgM (15C9, 3D9,

G3B, B9M, PA10F, 11C11, 21E6 e D9F), um Acmo IgG (14.8) e um Acmo IgA (N3B). Os autores analisaram a reatividade contra antígenos da parede celular tanto em células integras como em células tratadas com ditioneitol (DTT). Diferentes padrões de reatividade foram revelados por *immunoblot* e imunofluorescência com extratos de tubo germinativo e blastoconídeo. A reatividade dos blastoconídeos tratados com DTT era superior à dos não tratados, sugerindo um aumento na exposição dos epítomos. O 15C9 apresentou um aumento na reatividade com antígenos extraídos do blastoconídeo por 60 minutos e diminuição marcante com o antígeno extraído após 120 minutos (Ponton et al.⁵² 1993).

Evidências da presença de antígenos comuns no tubo germinativo e nos blastoconídeos sugerem variabilidade antigênica ou reatividade cruzada. Baseados nestes resultados, foram descritos quatro tipos diferentes de antígenos: a). tipo I - são os antígenos específicos para tubo germinativo verdadeiro e são expressos somente na parede celular do tubo germinativo; b). tipo II - antígenos que podem ser expressos na superfície celular do tubo germinativo e no interior da parede celular dos blastoconídeos. Na imunofluorescência, esses antígenos aparecem como tubo germinativo específico. A presença dos antígenos tipo II no interior da parede celular dos blastoconídeos explicaria a indução de anticorpos anti-tubo germinativo em coelho imunizado com blastoconídeo tratado com DTT; c). tipo III são antígenos expressos nas superfícies de ambas as formas. As mananas pertencem a este tipo de

antígeno. Finalmente, d). os antígenos do Tipo IV que são expressos no interior da parede celular do blastoconídeo e tubo germinativo (Ponton et al.⁵² 1993).

Os testes sorológicos para detecção de candidose tem visado a detecção dos componentes de *Candida* presentes no soro circulante e a resposta imune humoral para estes componentes. Para aplicação em sorodiagnóstico, o teste deve apresentar grande especificidade, sensibilidade e fácil execução. Para detecção de manana circulante, os testes de aglutinação por látex e ELISA têm sido amplamente avaliados. Entre os testes recentemente desenvolvidos e que estão sendo investigados estão: partículas de látex associadas a Acmo reagindo com manana de *C. albicans* e um imunoteste para detecção de enolase, um antígeno citoplásmico de 48 kDa.

Poulain et al.⁵³ (1991) produziram um Acmo designado 5B2 que reage com mananoproteína da parede celular de *C. albicans*. O Acmo foi purificado e conjugado ao ouro coloidal. A habilidade deste Acmo, conjugado ao ouro para detectar antígenos de *C. albicans*, foi testada pela técnica do DOT BLOT, após procedimento de coloração envolvendo ouro e prata (GSS). O DOT BLOT usando Acmo-GSS e a técnica de contraímunoeletroforese foram associados e testados em soros sucessivos de pacientes com episódios de candidose sistêmica, comprovada clínica e micologicamente. Os resultados demonstraram que

pacientes com candidose sintetizavam anticorpos contra glicoproteínas do epítipo 5B2, presentes transitoriamente no soro dos mesmos.

Ollert & Calderone⁴⁹ (1990) produziram um anticorpo monoclonal a partir da fusão de esplenócitos de camundongo imunizado com extrato de hifas inteiras. Um dos clones secretou um Acmo IgG1 que reagia com hifas de *C. albicans* por imunofluorescência indireta, porém não reagia com células leveduriformes e segmentos de pseudohifas originados de blastoconídeos. Oito de nove isolados clínicos recentes de *C. albicans* apresentaram reatividade com o Acmo 1.183 por imunofluorescência indireta. O antígeno reconhecido nas hifas era sensível ao calor, redução pelo β -mercaptoetanol e proteólise com pronase, tripsina e subtilisina. A análise por *immunoblot* de hifas inteiras e de extratos tratados com DTT revelou proteínas de peso molecular aproximado entre 55 e 60 kDa sob condições de redução. Células leveduriformes que se encontravam em crescimento exponencial foram tratadas com EDTA, BME e zimolase para formar protoplastos. O extrato derivado dos protoplastos apresentou reatividade com o Acmo 1.183. No *immunoblot*, uma proteína de 20 kDa foi reconhecida pelo Acmo1.183. Nenhuma reatividade foi encontrada no material da parede celular. Esses dados indicam que componentes específicos da parede celular das hifas de *C. albicans* estão relacionados com antígenos presentes nos protoplastos das células leveduriformes. Assim, o do Acmo 1.183 é

reativo com antígenos presentes nas hifas e leveduras, porém estes componentes não podem ser detectados na superfície dos blastósporos.

Considerando a importância clínica das leveduras do gênero *Candida*, a pesquisa de anticorpos monoclonais anti-*Candida* é de relevância, contribuindo efetivamente no âmbito diagnóstico e terapêutico.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi preparar um anticorpo monoclonal reativo com leveduras do gênero *Candida* e posteriormente caracterizar seu isótipo e reatividade, visando utilizá-lo na identificação presuntiva destes microrganismos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Preparo dos antígenos

4.1.1 Preparo do antígeno citoplasmático de *C. albicans*

Candida albicans, cepa ICB7, proveniente do laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo, foi cultivada em um frasco contendo 200mL de caldo Sabouraud por 24 horas, a 37°C, num agitador ÉTICA (50rpm). No dia seguinte, o inóculo obtido foi adicionado a dois litros de caldo Sabouraud e incubados por mais 48 horas, a 37°C, sob agitação. A seguir, o crescimento foi interrompido com formaldeído 0,080% e a cultura, deixada por 18 horas, a 4°C. As células foram colhidas por centrifugação a 7000 rpm, lavadas e suspensas em tampão Tris-HCL 0,15M, pH 7,4, acrescido de fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF-SIGMA) numa concentração final de 4mM. Adicionaram-se então, pérolas de vidro a esta suspensão que foi vigorosamente agitada, por uma noite, a 4°C. O lisado foi centrifugado e o precipitado e o sobrenadante conservados. O sobrenadante foi dialisado contra 2 L de solução salina tamponada com fosfato (PBS), liofilizado e conservado a -20°C, passando a constituir o antígeno citoplasmático

(AgC). O conteúdo protéico foi determinado pelo método de Bradford⁸ (1976).

4.1.2 Preparo de uma fração de *C. albicans* rica em manana

C.albicans, cepa ICB7, foi cultivada em 100mL de caldo Sabouraud dextrose por 24 horas a 37°C e em seguida transferida para 2 litros do mesmo caldo. A cultura foi então incubada a 37°C por cinco dias, sob agitação constante (agitador horizontal ÉTICA) a 50 rpm. Após este período, o crescimento foi interrompido pela adição de formaldeído a 0,080% e deixado em repouso por 24 horas. No dia seguinte, a cultura foi filtrada em gaze e as células separadas e lavadas três vezes por centrifugação a 7000rpm, em PBS. A seguir, as células foram suspensas em 100mL de PBS e fervidas por 15 minutos. Novamente o material foi centrifugado a 5000rpm, 20 minutos, a temperatura ambiente e o sobrenadante recuperado e dialisado contra tampão fosfato 10mM, pH7,4 e concentrado por ultrafiltração para um volume de 2mL.

4.2 Imunização dos camundongos

Estes procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal da Faculdade de

Odontologia de São José dos Campos –UNESP, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob protocolo nº 06/99-PA/CEP.

Para a realização do experimento, camundongos isogênicos, da linhagem BALB/C, de ambos os sexos e com oito semanas de idade foram mantidos com água e ração esterilizadas e acondicionados em ambiente com temperatura controlada. Os camundongos (n=5) foram imunizados por via intra-dérmica com 200µg de AgC em 200µL de PBS, emulsificados em igual volume de adjuvante de Freund completo. Após trinta dias da injeção inicial, os animais foram reestimulados com 400µg do mesmo antígeno em PBS, por via intra-peritoneal, e o baço retirado três dias mais tarde para proceder à fusão com as células de mieloma.

4.3 Produção de anticorpo monoclonal

Para a produção do anticorpo monoclonal foi utilizado o protocolo proposto por Goding²² (1980), com algumas modificações.

Células de mieloma da linhagem Sp-2 O/Ag14(*), mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas, lavadas por centrifugação em meio RPMI 1640 sem soro, a 1000rpm, por 10 minutos, a T.A. (anexo). Após este procedimento, as células foram suspensas em 5mL de meio RPMI completo e mantidas em estufa com 100% de

* Doadas pelo Dr. Jean-Luc Gesztezi, Disciplina de Imunologia da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP)

umidade, a 37°C, com 5% de CO₂. Após o crescimento, as células foram repicadas para cinco garrafas de 25cm³ para se obter cerca de 10⁷ células em fase logarítmica de crescimento.

As células B esplênicas foram lavadas com RPMI sem soro e contadas em câmara de Neubauer com e sem azul de Tripan. A seguir, cerca de 5x10⁷ células Sp-2 O/Ag14 foram misturadas com 1x10⁸ células esplênicas e novamente lavadas por centrifugação, com RPMI sem soro, a 1000rpm, 10 minutos, a T.A..

Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, tomando-se o cuidado para remover completamente o meio de cultura e adicionou-se 1mL de polietilenoglicol (PEG) a 45%, agitando-se delicadamente para homogeneizar a suspensão por 1 minuto. Acrescentaram-se depois 10mL de RPMI sem soro, agitando-se a suspensão por mais 10 minutos. A seguir, as células foram lavadas por centrifugação em 100mL do mesmo meio com a finalidade de remover o PEG, e ressuspensas em 50mL de RPMI completo adicionado de hipoxantina, aminopterina e timidina – HAT (anexo). As células foram distribuídas, na razão de 1x10⁶ por orifício, em placas de 96 orifícios (COSTAR) sobre *feeder layer*, preparado no dia anterior, com baço de camundongo não imune (1,6 x 10⁵ células por orifício) e incubadas a 37°C com 100% de umidade e 5% de CO₂. Após cinco dias, 50% do sobrenadante de cada orifício foi removido e acrescentou-se igual volume do mesmo meio.

No décimo dia, as culturas foram examinadas com microscópio invertido (NIKON, type 104) e os orifícios contendo híbridos, crescendo de forma confluyente, foram marcados. Neste mesmo dia, foi retirado 50% do meio HAT e substituído por RPMI completo, contendo hipoxantina e timidina (HT). Todos os orifícios positivos foram analisados por ELISA.

Todos os procedimentos foram realizados na câmara de Fluxo Laminar Vertical (VECO), utilizando-se material esterilizado e descartável.

4.3.1 Produção da ascite

Para a produção da ascite foi injetado 0,5mL de pristane por via intra peritoneal, em cinco camundongos BALB/C de oito semanas de idade. No décimo dia consecutivo, foram injetadas 10^7 células do clone produtor de anticorpo previamente selecionado.

Aguardou-se o período de duas a três semanas a seguir e a ascite foi colhida (5 a 10 mL de ascite por camundongo).

4.4 Análise sorológica

4.4.1 ELISA

Placas de poliestireno (Costar) foram sensibilizadas com AgC de *C. albicans* (100µg/mL), em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH9,6 e incubadas por duas horas a 37°C e por 18 horas a 4°C. No momento do uso, as placas foram bloqueadas com 0,5% de gelatina em PBS, por 30 minutos a 37°C e lavadas cinco vezes com PBS contendo 0,1% de Tween-20 (PBS-T). A seguir, acrescentaram-se os sobrenadantes de cultura e/ou soro diluído em PBS-T-G e incubou-se por 2 horas a 37°C. Na triagem dos híbridos, utilizou-se o meio RPMI completo como controle negativo. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS-T e posteriormente adicionados 50µl de conjugado anti-camundongo marcado com peroxidase (anti-IgG, anti-IgA e anti-IgM, SIGMA), numa concentração de 1µg/mL. A atividade de peroxidase foi revelada utilizando-se 100µL do substrato que consistia de 6mg ortofenildiamino (SIGMA) em 12mL de tampão citrato-ácido cítrico 0,1M, pH 5,5 e H₂O₂ a 0,03%. Após o desenvolvimento da cor, a reação foi bloqueada com 50µL de ácido sulfúrico 2,5 normal (N) e as densidades óticas (DO) lidas num leitor de ELISA (Modelo 3550-BIORAD) a 490 nm.

4.4.2 Isotipagem

Placas de ELISA foram sensibilizadas com o Acmo 76C anti-*Candida* (10 μ g/mL) em PBS, por duas horas, a 37°C. Após este período as placas foram lavadas com PBS-T e os sítios livres bloqueados com PBS-T-leite (5%) por uma hora a 37°C. A seguir, adicionaram-se aos orifícios os anticorpos de coelho específicos para as subclasses de IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, IgA e as cadeias leves κ e λ (Bio -Rad) e as placas foram incubadas por duas horas a 37°C. Depois da incubação e lavagem das placas, foi acrescentado anti-soro de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (1 μ g/mL). O substrato e a revelação foram realizados de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

4.5 SDS-PAGE

Para realização da eletroforese, utilizou-se o protocolo proposto por Laemmli³⁸ (1970), que consistia na utilização de um gel de separação linear a 10% de acrilamida e um gel de concentração polymerizados entre duas placas de vidro, separadas por espaçadores de 0,8mm de espessura. Os géis foram preparados a partir de soluções estoque contendo 30% de peso de acrilamida e N,N-bismetilenoacrilamida (SIGMA).

No gel de separação, a polimerização foi feita em solução contendo 0,375M de Tris-HCL, pH 8,8 e 0,1% de SDS, em presença de

TEMED e persulfato de amônio (SIGMA). O gel de concentração foi polimerizado em presença de 0,125M de Tris-HCL pH 6,8 e 0,1 % de SDS, 0,1% de persulfato de amônio e 0,05% de TEMED.

As amostras dos antígenos foram preparadas em tampão de amostra (0,0625M de Tris-HCL pH 6,8, 20% SDS, 10% Glicerol e 0,005% de azul de bromofenol) adicionado de 5% de 2-mercaptoetanol (SIGMA), como agente redutor e aquecidas a 100°C, por um minuto. Paralelamente às amostras analisadas, em cada corrida foi utilizada uma mistura de proteínas de tamanho molecular conhecido que serviu como referência (marcadores de PM – PHARMACIA, fosforilase b 94kDa, soro albumina bovina 67 kDa, anidrase carbônica 30 kDa, inibidor da tripsina 20,1 kDa, lactoalbumina 14,4kDa). A corrida foi processada no sistema Mini-Protean II (BIO-RAD) a 25mA em tampão Tris 0,025 M, Glicina 0,192 e SDS 0,1%, pH 8,3, até que o corante azul de bromofenol atingisse o fim do gel.

4.6 Western-blotting

A técnica de *Western-blotting* foi desenvolvida de acordo com Towbin et al.⁷¹ (1979). Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, foi obtida a réplica do gel em nitrocelulose entre seis folhas de papel Whatman nº3 e duas esponjas embebidas em tampão de transferência (Tris 0,025M, Glicina 0,192M e metanol 20%)

A transferência eletroforética foi realizada por 18 horas, a 50 V, numa cuba Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD) equipada com uma fonte Power Pac 300 (BIO-RAD). Para monitorar a transferência, a nitrocelulose foi corada pelo Ponceau S 0,05% em ácido tricloracético (TCA) 3%, 5 minutos e descorada com água destilada. Os padrões foram marcados e as colunas individualizadas. A seguir, os sítios livres da nitrocelulose foram saturados com PBS contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T) e 5% de leite em pó desnatado (Molico-Nestlé), por duas horas, sob agitação. Em seguida, a nitrocelulose foi incubada por toda a noite, com o anticorpo monoclonal diluído no mesmo tampão, por duas horas, a 25°C, sob agitação.

A seguir, a nitrocelulose foi lavada cinco vezes com PBS-T e incubada com um conjugado anti-IgG ou anti-IgM de camundongo marcado com a peroxidase. Após este período, as fitas foram novamente lavadas com PBS-T e posteriormente incubadas com 6mg do substrato diaminobenzidina (DAB - SIGMA) em 10mL de Tris-HCL, 0,1M, pH 7,5 e 0,03% de H₂O₂. Após a revelação, a reação foi bloqueada por múltiplas passagens em água destilada.

4.7 Purificação do anticorpo monoclonal

Cerca de 0,5mL de fluido ascítico foram adicionados a um volume de 1,5mL do reagente 1 (E-Z.SEP-IgM Pharmacia) e incubado por trinta minutos a T.A. Após, a amostra foi centrifugada a 3500rpm, por trinta minutos, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspense em 0,5mL de água deionizada e incubado a 10 minutos T.A. A seguir foram adicionados 0,5mL do reagente 2, e a mistura novamente incubada por mais trinta minutos e posteriormente centrifugada a 3500rpm, por meia hora, a 4°C. O sobrenadante foi então desprezado e o precipitado, contendo a IgM monoclonal, ressuspense num volume equivalente ao volume inicial da ascite em tampão fosfato pH 9,0.

4.8 Cepas de *Candida*

Foram utilizadas 32 cepas de *Candida* provenientes de quatro instituições: *C.albicans* (FCF 14, FCF14,1, ICB7, E37, P54, ICB11, P79, ICB17B, 28A); *C. tropicalis* (FCF 427, FCF164, 16A, 73, 74, 75, 23C); *C.krusei* (FO31b); *C.parapsilosis* (ICB06, ICB02, ICB122); *C. guilliermondii* (FCF152, FCF158, FCF205, ICB06, ICB76); *C. stellatoidea* (10C); *C.dubliniensis* (CD3, CD5, CD36, CD4, CD2, CD1). As cepas com as iniciais FCF e ICB foram obtidas na micoteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas(USP) e do Instituto de Ciência Biomédicas(USP)

respectivamente. As cepas de *C. dubliniensis* foram doadas pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. As demais foram isoladas no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos por Shimizu et al.^{62,63} (1988 e 1995). As cepas foram mantidas em tubo de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose inclinado (DIFCO), a 8°C aproximadamente, com repiques mensais. Após 48 horas, a 37°C, o crescimento foi coletado com alça de platina e colocado em tubos de 1,7 mL devidamente pesados. Em seguida acrescentou-se o tampão de amostra na razão direta do peso úmido de cada amostra.

$$\begin{aligned} 15\text{mg (peso úmido)} & \quad \text{_____} \quad 50\mu\text{L (Tampão)} \\ 8\text{mg} & \quad \text{_____} \quad x \\ x & = 26,06\mu\text{L} \end{aligned}$$

FIGURA 1- Representação do cálculo da quantidade de tampão aplicado a cada amostra de *Candida*.

4.9 DOT-BLOT

As amostras foram preparadas de acordo com o item 4.8, fervidas e aplicadas na nitrocelulose (2μL por ponto) e incubadas na estufa a 37°C, por uma hora. Após, a nitrocelulose foi lavada com PBS-T por uma hora e bloqueada com PBS-T-Leite, duas horas, a T.A., sob agitação. Seguiu-se a incubação com o Acmo 76C 1/100, duas horas, a T.A., sob agitação e mais uma etapa de lavagem.

O imunocomplexo foi revelado com anti-IgM de camundongo marcado com peroxidase ($1\mu\text{g/mL}$) 1 hora, a T.A., sob agitação. Depois foi acrescentado o substrato da peroxidase que consistia de 6mg de diaminobenzidina (DAB) em 10mL de tampão Tris-HCl, 01M, pH 7,5 e 0,03% de H_2O_2 . Após o desenvolvimento da cor, a reação foi bloqueada lavando-se a nitrocelulose em água destilada.

4.10 Cromatografia de afinidade em concanavalina A-Sepharose

Foi preparada uma coluna de 5mL de concanavalina A-Sepharose4B (PHARMACIA) em coluna plástica (Bio-Rad) de dois cm de altura x 2,3cm de diâmetro. A coluna foi saturada com Tris-HCL10mM, pH7,2, NaCl 0,5M, MgCl_2 1mM, CaCl_2 1mM e azida sódica 0,02%. A fração rica em manana (30mg) foi dissolvida em 5mL do tampão da coluna, adicionado de PMSF 2mM e aplicada. O antígeno foi aplicado em fluxo lento e o efluente recolhido e a coluna lavada com 20 volumes de tampão até que a D.O. a 280nm chegasse a 0,02.

A eluição foi feita com α metilmanopiranosídeo 0,2M em Tris-HCl 10mM pH7,2. O eluato e o efluente foram dialisados contra 2 L de água destilada e liofilizados.

4.11 Oxidação pelo metaperiodato

A placa de ELISA sensibilizada com a manano-proteína em PBS foi inicialmente lavada três vezes com tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,5. Logo após, a mesma foi incubada com metaperiodato de sódio preparado em água destilada e depois diluído em tampão acetato de sódio 0,1 M, de tal forma que a concentração final situasse em torno de 5mM, por 30 minutos, a 4°C, no escuro. A seguir, a placa foi novamente lavada com PBS e o agente de terminação adicionado às placas. O agente utilizado neste tratamento foi sacarose 0,5M em PBS. Após mais 30 minutos de incubação, a placa foi novamente lavada em PBS e a reação de ELISA foi desenvolvida conforme o item 4.4.1.

4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística através dos testes ANOVA, teste de TUKEY ao nível de 5% e análise de regressão linear (Anexo B). A análise estatística foi realizada através do programa Sigma Stat (versão 2.03,1997).

5 RESULTADOS

5.1 Preparo do antígeno e imunização dos camundongos

Candida albicans, cepa ICB7, foi cultivada em meio Sabouraud e o antígeno citoplasmático preparado após lise dos blastósporos com pérolas de vidro, por 18 horas, a 4°C. A concentração de proteína nesta preparação foi mensurada pelo método de Bradford⁸ (1976) e era cerca de 120µg de proteína por miligrama de peso seco do antígeno (AgC/Ca). Desta forma, na imunização dos camundongos foram utilizados 24 µg de proteína por animal e no *booster* foram administrados 48µg de proteína em PBS por via intraperitoneal, por camundongo.

5.2 Isolamento do anticorpo monoclonal 76C anti-*Candida albicans*

Para viabilizar a metodologia de produção do anticorpo monoclonal, foi necessário realizar duas fusões celulares até a obtenção do clone produtor de anticorpo anti-*Candida*.

Na primeira fusão foram selecionados, por microscopia, 34 pontos positivos em sete placas de cultura (5%). Os pontos positivos

foram identificados por microscopia e testados por ELISA, utilizando um conjugado anti-IgG, IgA, IgM de camundongo marcado com peroxidase, o que resultou em 18 pontos de interesse (2,67%), ou seja, reativos com AgC/Ca. Destes 18 pontos foram clonados os de maior reatividade.

Os clones resultantes desta fusão perderam-se por contaminação das culturas com fungos. Em caso de contaminação recente, utilizávamos anfotericina B, obtendo desta forma, boa recuperação dos clones. Porém quando a contaminação fúngica já era bem evidente, o tratamento não surtia efeito e os clones eram desprezados. Por duas vezes foi necessário recomeçar os procedimentos de imunização e realizar novas fusões celulares. Num segundo experimento, também trocou-se o meio de cultura a cada cinco dias. O monitoramento dos clones foi realizado por microscopia e ELISA. Um mês após, iniciamos a clonagem de 27 pontos produtores de anticorpos (Quadro 1). Destes 27 pontos, dois foram selecionados por serem os mais reativos com o AgC/Ca. Estes híbridos foram clonados por diluição limite e expandidos *in vitro* e *in vivo* como o objetivo de produzir anticorpo em maior quantidade. Dois clones denominados (76C) e (316) mantiveram-se estáveis e foram reclonados mais duas vezes. No procedimento de isotipagem, os clones foram caracterizados como IgM κ monoclonal (76C) e IgG2b κ monoclonal (316). A estabilidade do clone 316 reduziu-se após dois meses de manutenção em laboratório, com perda significativa da produção de anticorpo. Paralelamente, o clone

76C, cultivado em garrafa, mostrou-se estável o que nos permitiu expandi-lo e produzir um grande número de células. O clone 76C foi então inoculado no peritônio de quatro camundongos BALB/c, previamente tratados com pristane. Após nove dias, a ascite foi removida e as células híbridas foram guardadas em líquido de congelação (Anexo A) e mantidas em nitrogênio líquido. Todas as ascites foram centrifugadas e conservadas a -20°C, após adição de azida sódica 0,1%.

Quadro 1 – Protocolo usado na preparação do anticorpo monoclonal 76C

28/11/99	30/11/99	6/12/99	13/12/99	18/01/00	03/02/00	24/02/00	14/03/00	21/3/00
Feeder layer	Fusão	Troca do meio RPMI + HAT	Microscopia 27 pontos positivos (4,01%)	Reclonagem dos híbridos 76C e 316 (0,29%)	ELISA Anti-IgG, IgA, IgM	Injeção de pristane	Congelamento de células em nitrogênio	Injeção dos camundongos
			ELISA Anti- IgG, IgA, IgM Clonagem dos pontos positivos		Expansão in vitro do clone 76C e 316			

5.3 Caracterização do anticorpo 76C

5.3.1 Isotipagem

Os resultados da isotipagem do anticorpo monoclonal 76C são apresentados na Figura 2. Como pode ser observado, o anticorpo 76C é uma imunoglobulina M monoclonal com cadeias leves do tipo Kappa.

Para proceder a este teste foi necessário purificar o anticorpo 76C. O sistema E-Z-Sep IgM (Pharmacia) permitiu-nos a purificação deste isótipo de imunoglobulina nas ascites e nos soros de camundongo.

Isotipagem do 76C

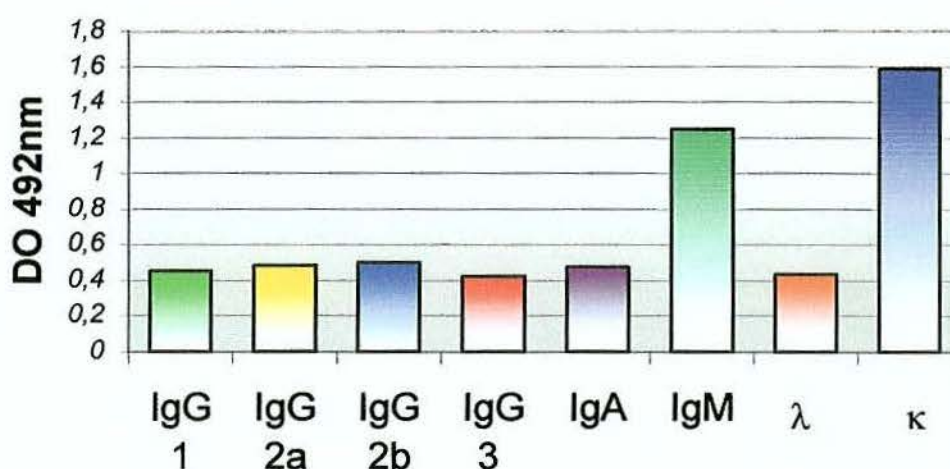


FIGURA 2 – ELISA. Isotipagem do Acmo 76C. Anticorpos de coelho anti-isótipos de imunoglobulinas de camundongo, anti-subclasses de IgG e anti-cadeias leves. Conjugado anti-IgG de coelho - peroxidase.

5.3.2 Reatividade do anticorpo monoclonal 76C

O anticorpo 76C foi testado em ELISA frente o AgC/ca (Figura 3). No gráfico abaixo, pode-se observar que a reatividade do Acmo é acentuada e estatisticamente significativa, $p < 0.001$, em todas as diluições testadas, quando comparado com a reatividade de IgM purificada dos soros de camundongos, normal e imunizado.

Reatividade do Acmo 76C

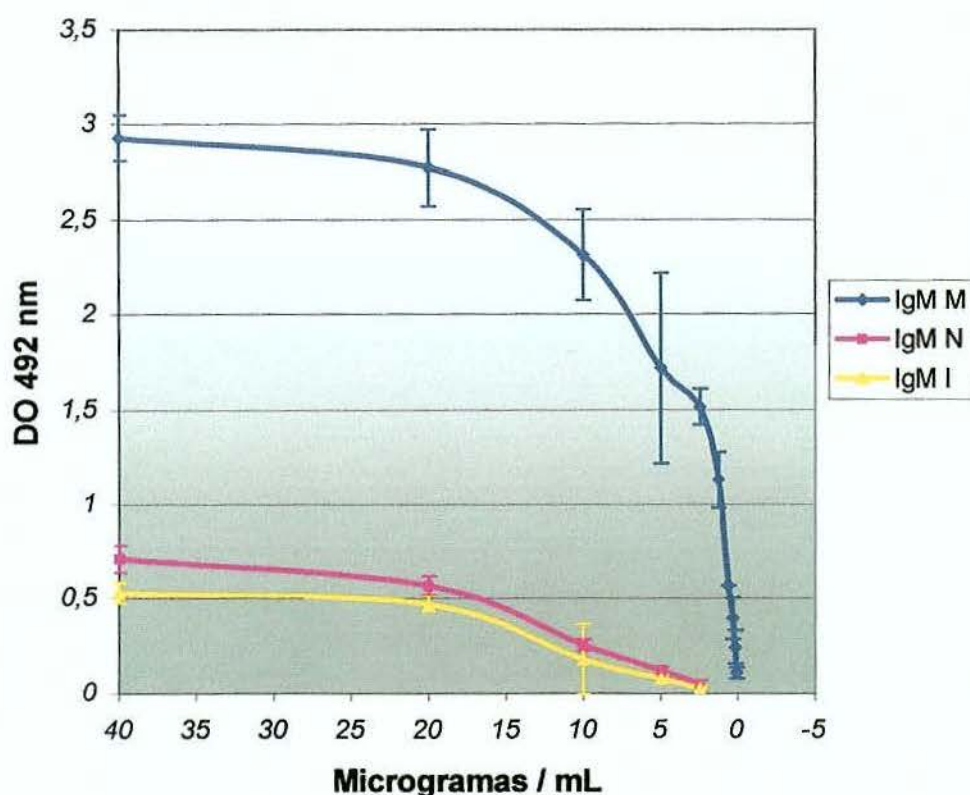


FIGURA 3 – ELISA. Reatividade do Acmo 76C. Reatividade com o AgC/Ca. IgM monoclonal (M) 40 µg/mL, IgM do soro normal (N) de camundongo 40 µg/mL, IgM do soro de camundongo imunizado (I) com *C. albicans* 40 µg/mL.

Na Figura 4 pode-se observar a reatividade do Acmo 76C com manana-proteína liberada das células de *Candida* após fervura da cultura por 15 minutos. A diferença em reatividade é estatisticamente significativa para $p < 0,05$.

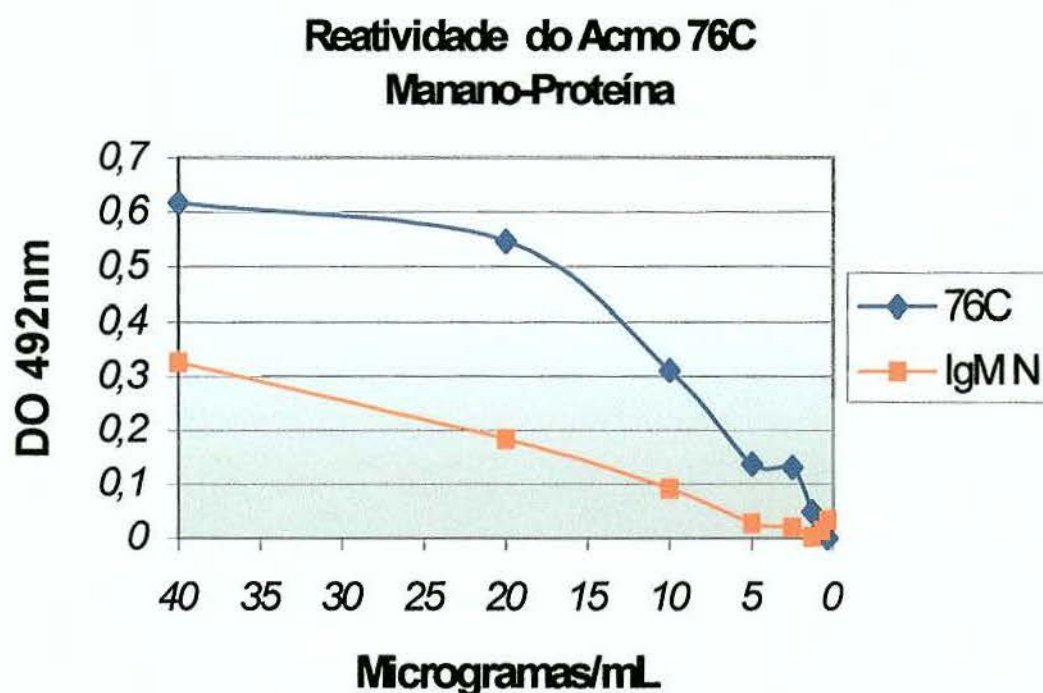


FIGURA 4 – ELISA. Reatividade do Acmo 76C com manano-proteína presente no sobrenadante de cultura de *Candida albicans*. Conjugado anti-IgM de camundongo-peroxidase. Anticorpos a 40 μ g/mL.

Na Figura 5, a fração manano-proteína, preparada de acordo com o protocolo do item 4.1.2, foi analisada em ELISA e a reatividade do Acmo 76C comparada com uma IgM normal de camundongo. A reatividade do anticorpo 76C é estatisticamente significativa em todas as diluições testadas.

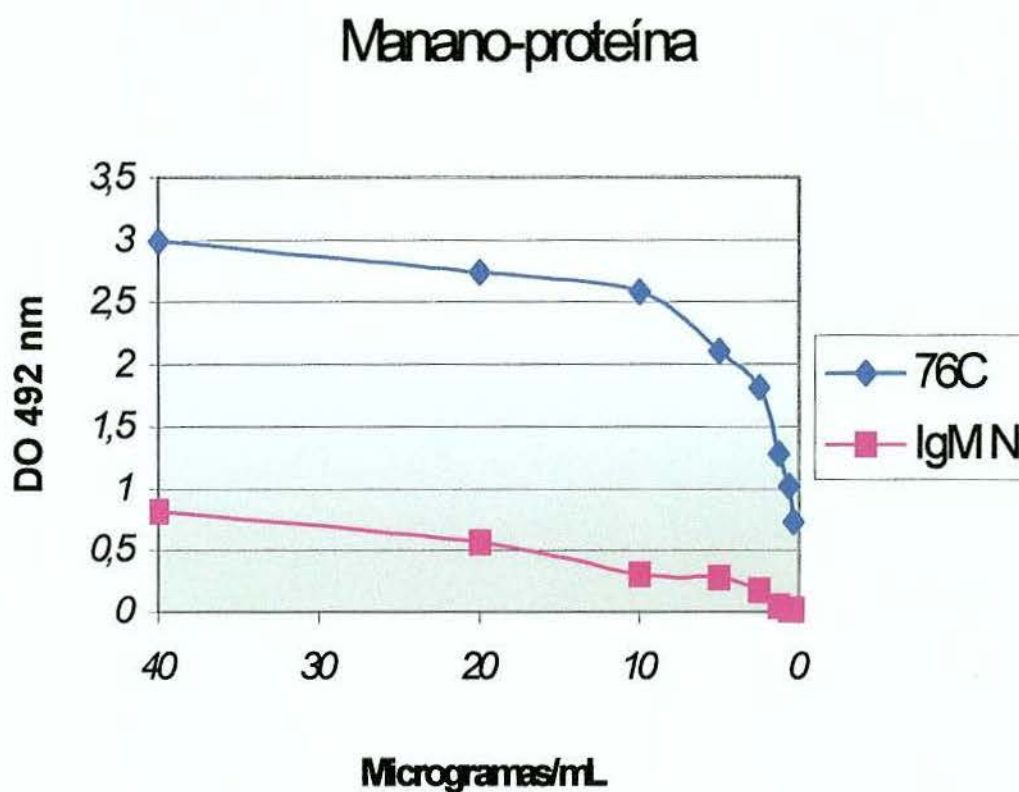


FIGURA 5 – ELISA. Reatividade do Acmo 76C com manano-proteína presente no sobrenadante de células de *Candida albicans* fervidas em tampão PBS. Anticorpos a 40 μ g/mL.

Na Figura 6 pode-se observar que a reatividade de 76C frente a fração eluída da coluna de concanavalina A com α metil manopiranosídeo não é muito elevada, quando comparada com IgM normal de camundongo. Os testes estatísticos (ANOVA e Regressão Linear) mostraram que não existe diferença entre os valores obtidos.

Manano-proteína

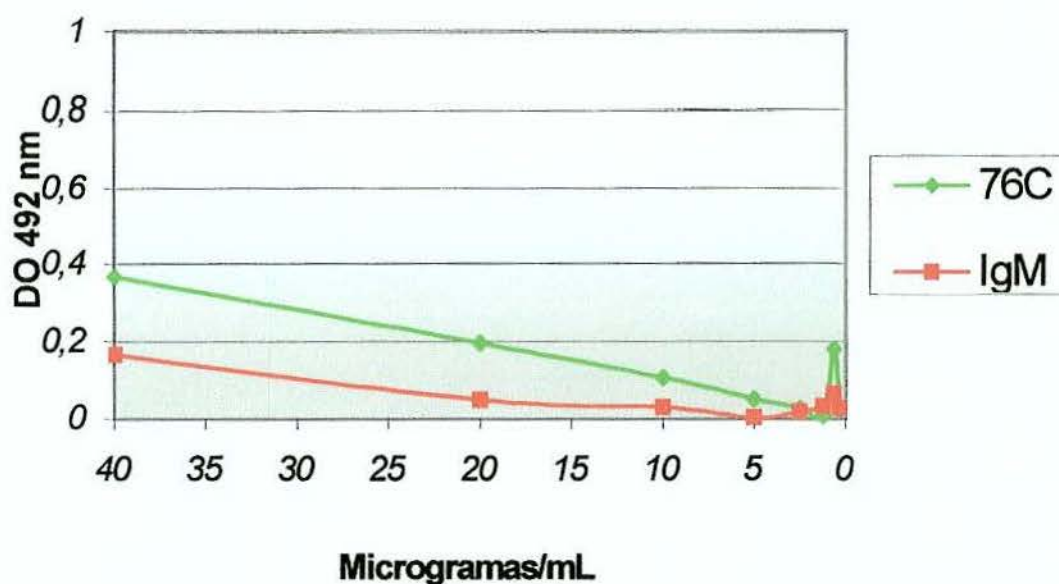


FIGURA 6 – ELISA. Reatividade do Acmo 76C com eluato da coluna de concanavalina A- sepharose. Eluição: 0.1M de α metil-manopiranosídeo. Anticorpos a 40 μ g/mL

5.3.3 Western-blotting

A Figura 7 pode-se observar a reatividade do anticorpo monoclonal 76C com duas proteínas: a fosforilase B (94kDa) e anidrase carbônica (30kDa), ambas de origem bovina e também com anidrase carbônica de origem humana. Nenhuma reatividade foi observada com blastósporos inteiros de *C. albicans* ou com o AgC/Ca pela técnica de *Western-blotting*.

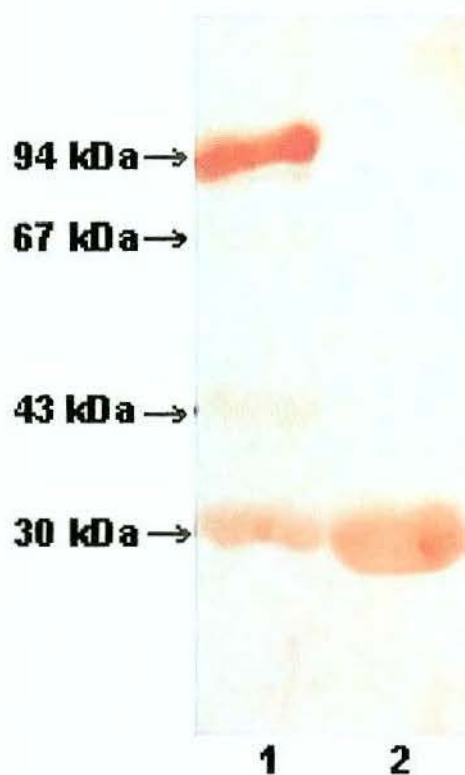
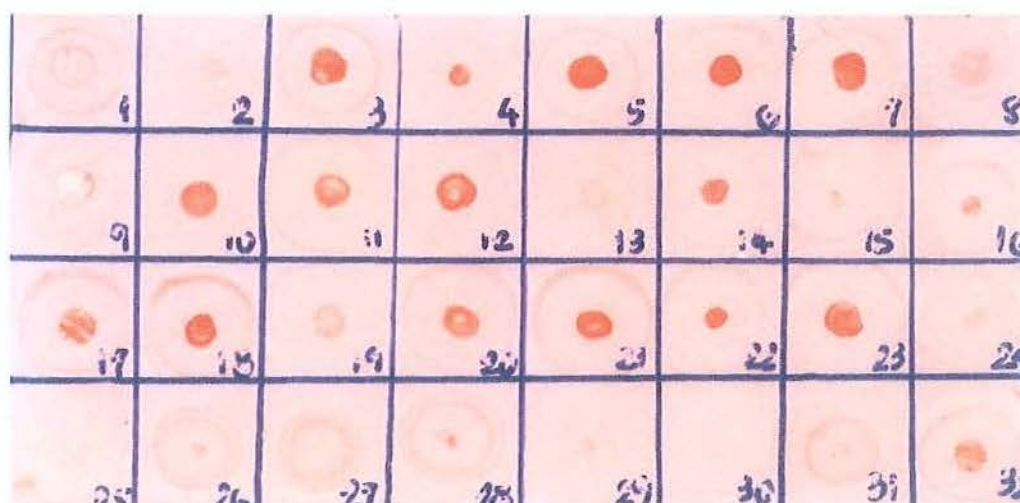


FIGURA 7 – *Western-blotting*. 1 - Reatividade do anticorpo monoclonal 76C com fosforilase B (94 kDa) e com anidrase carbônica (30 kDa) 2 - anidrase carbônica humana.

5.3.4 DOT BLOT

Na Figura 8, apresentamos os resultados da reatividade do anticorpo monoclonal 76C com diferentes cepas de *Candida albicans* e outras espécies do mesmo gênero.

Como pode ser observado no Quadro 2, alguns isolados de *Candida albicans* não reagiram com este monoclonal . O mesmo ocorreu com outras espécies analisadas.



Número	Cepa/Espécie	Número	Cepa/Espécie
1	E37 <i>C. albicans</i>	17	ICB17B <i>C. albicans</i>
2	ICB11 <i>C. albicans</i>	18	FCF158 <i>C. guilliermondii</i>
3	75 <i>C. tropicalis</i>	19	FCF14 <i>C. albicans</i>
4	ICB 06 <i>C. parapsilosis</i>	20	ICB06 <i>C. guilliermondii</i>
5	16A <i>C. tropicalis</i>	21	ICB76 <i>C. guilliermondii</i>
6	ICB 7 <i>C. albicans</i>	22	28A <i>C. albicans</i>
7	FCF205 <i>C. guilliermondii</i>	23	ICB122 <i>C. parapsilosis</i>
8	FCF14-1 <i>C. albicans</i>	24	CD3 <i>C. dubliniensis</i>
9	74 <i>C. tropicalis</i>	25	CD5 <i>C. dubliniensis</i>
10	ICB2 <i>C. parapsilosis</i>	26	CD36 <i>C. dubliniensis</i>
11	73 <i>C. tropicalis</i>	27	CD4 <i>C. dubliniensis</i>
12	P79 <i>C. albicans</i>	28	CD2 <i>C. dubliniensis</i>
13	10C <i>C. stellatoidea</i>	29	CD1 <i>C. dubliniensis</i>
14	P54 <i>C. albicans</i>	30	164 <i>C. tropicalis</i>
15	FCF427 <i>C. tropicalis</i>	31	FCF152 <i>C. guilliermondii</i>
16	23C <i>C. tropicalis</i>	32	31B <i>C. krusei</i>

FIGURA 8 - DOT BLOT . Reatividade do anticorpo monoclonal 76C frente a diversas espécies de *Candida*.

Quadro 2 – Resultado Dot Blot. Reatividade de diversas espécies de *Candida* com o anticorpo monoclonal 76C.

ESPÉCIE	CEPA	REATIVIDADE COM 76C
<i>C.albicans</i>	FCF 14	+
	E 37	+
	ICB 11	-
	ICB7	+
	FCF14-1	+/-
	P79	+
	P54	+
	17B	+
	28A	+
<i>C. tropicalis</i>	FCF 427	-
	75	+
	FCF164	+
	74	+/-
	73	+
	23C	+
	16A	-
<i>C. parapsilosis</i>	ICB 06	+
	ICB2	+/-
	ICB122	+
<i>C. guilliermondii</i>	FCF205	+
	FCF158	+
	ICB06	+
	ICB76	+
	FCF152	+/-
<i>C. stellatoidea</i>	10C	-
<i>C. dubliniensis</i>	CD1	-
	CD2	-
	CD3	-
	CD4	+/-
	CD5	-
	CD36	+/-
<i>C. krusei</i>	31B	+

*Consideradas as cepas de forte reatividade.

5.3.5 Oxidação pelo metaperiodato

Na Figura 9 é apresentado o resultado da oxidação branda da mananoproteína pelo metaperiodato. A reatividade do anticorpo monoclonal 76C não foi modificada frente ao tratamento do antígeno.

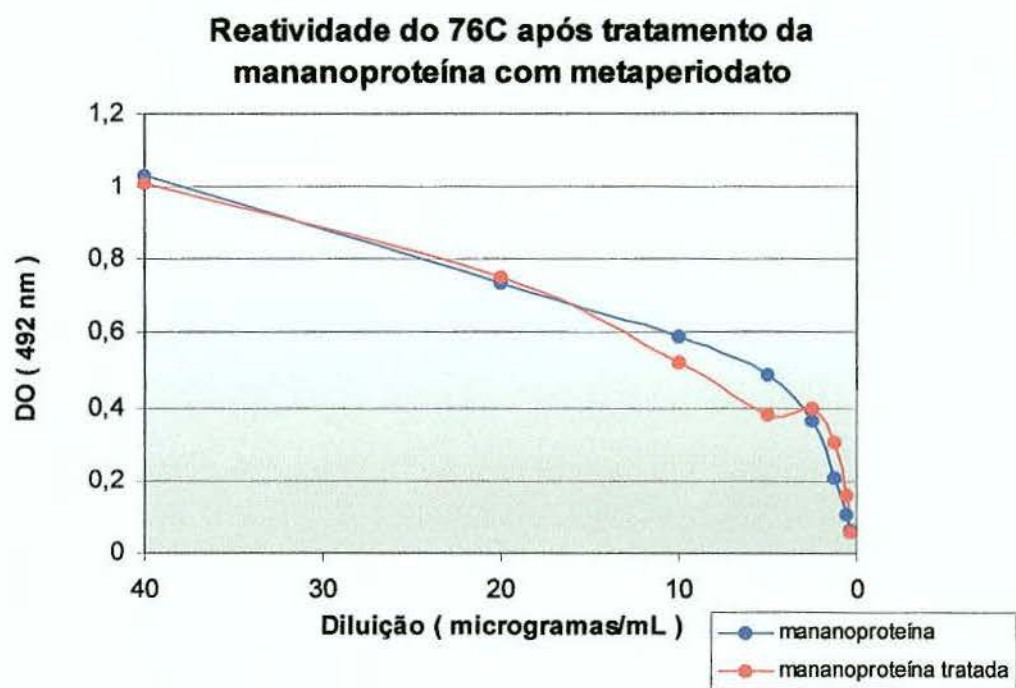


FIGURA 9 - ELISA. Reatividade do 76C após tratamento da mananoproteína com metaperiodato de sódio.

6 DISCUSSÃO

A utilização de anticorpos monoclonais no diagnóstico das candidoses sistêmicas tem sido investigada por muitos pesquisadores (Cassone¹³,1988; Poulain et al.⁵³1991; Bernardis et al.⁵1993; Marcilla et al.⁴³1998). Consideráveis tentativas foram feitas no sentido de desenvolver testes sorológicos para detecção de anticorpos e/ou antígenos que possam comprovar a invasão tecidual por *Candida albicans*. Para isso, inúmeras técnicas bioquímicas e imunológicas foram aplicadas, tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), imunodifusão, contraímunoeletroforese, *western-blotting*, imunofluorescência direta, ELISA com avidina-biotina e aglutinação pelo látex (Lehmann & Reiss⁴⁰, 1980; Gatermann et al.²⁰, 1986; Hoopwood et al.²⁹,1986; Ferreira et al.¹⁸,1990; Nakamura et al.⁴⁷,1991). O advento dos anticorpos monoclonais melhorou a especificidade de muitas dessas técnicas, porém nenhum método sorológico para detecção de antígeno de *Candida* pode ser considerado definitivo ao ponto de ser empregado rotineiramente.

A composição antigênica da parede celular de *Candida albicans* tem sido bastante estudada visando a identificação de antígenos

de relevância para o diagnóstico clínico. Muitos desses experimentos deram destaque à manana, como um dos principais antígenos de *Candida* (Lehmann & Reiss⁴⁰, 1980; Dömer et al.¹⁶, 1986; Sundstrom et al.⁶⁹, 1988; Nakamura et al.⁴⁷, 1991; Bernardis et al.⁵, 1993; Han & Cutler²⁴, 1995; Han & Cutler²⁵, 1997; Sendid et al.⁶¹, 1999). Uma dificuldade encontrada por muitos pesquisadores foi o caráter transitório da manana presente no soro de pacientes com candidose sistêmica. Segundo Suzuki et al.⁷⁰ (1988), pacientes com candidose gastrointestinal são soronegativos para manana, porém, tornam-se positivos com a evolução para candidose sistêmica. Van Deventer et al.⁷⁵ (1996) observaram que os anticorpos anti-manana aumentam somente após as culturas de tecidos profundos tornarem-se positivas para *Candida albicans*. O título de anticorpos anti-manana eleva-se em indivíduos imunocomprometidos duas semanas após o início da candidose invasiva. Porém, se os indivíduos estiverem apenas colonizados os anticorpos anti-manana mantêm-se estáveis ou diminuem em título. Empregando a técnica de inibição de hemaglutinação, Weiner & Yount⁷⁷ (1976), concluíram que os pequenos fragmentos de manana em imunocomplexos solúveis podem não reagir com o anticorpo, não sendo portanto detectáveis nos testes de precipitação e ELISA sanduíche.

O presente trabalho tinha por objetivo desenvolver reagentes que pudessem ser úteis no diagnóstico das candidoses sistêmicas. Assim, iniciamos o trabalho preparando anticorpos policlonais

capazes de detectar antígenos de *Candida*. Para isso, elegemos, como antígeno, uma preparação de polipeptídeos obtidos após ruptura dos blastósporos de *C. albicans* com pérolas de vidro. Portanto, na preparação antigênica utilizada, contávamos com polipeptídeos citoplasmáticos de *Candida*, mas também com glicoconjugados derivados da parede, constituídos de manano-proteína e glucano-proteína. Nossas primeiras tentativas de produção de anticorpos policlonais anti-*C.albicans* em camundongos e coelhos foram frustrantes. Os animais respondiam fracamente à imunização, ou não respondiam. Estudando a literatura sobre o assunto, suspeitamos que este fenômeno poderia ser atribuído a imunossupressão induzida pelo alto conteúdo de polissacarídeos na preparação antigênica utilizada.

Após esta experiência, decidimos optar pela preparação de um anticorpo monoclonal que reconhecesse leveduras do gênero *Candida*. Usando a mesma preparação antigênica e com intenção de produzir um anticorpo monoclonal para um componente protéico, concentramos nossa atenção na pesquisa de IgG. Entretanto, após exaustiva procura, verificamos que contávamos tão somente com um anticorpo monoclonal do isotipo IgM (IgM_K) e com especificidade, ao que tudo indicava, para um componente rico em carboidrato.

Em nossa experiência, ficou evidente, o baixo percentual de positividade alcançada nas fusões realizadas. Na verdade, a porcentagem de híbridos obtidos situava-se dentro dos limites esperados,

quando as placas eram inspecionadas ao microscópio invertido, porém, ao analisar o parâmetro especificidade, ressaltava a baixa produção de híbridos. Nossos resultados ficaram aquém dos apresentados por outros pesquisadores; Kölher & Milstein³⁴(1975), obtiveram 3% de clones positivos para a produção de anticorpos quando testados pela técnica de placa indireta. Os mesmos autores, em outro experimento, relatam que a população de células híbridas foi estudada e analisada por diluição limite e, de 157 células híbridas independentes, somente 15 eram capazes de produzir anticorpos. Em nosso estudo, na primeira fusão, obtivemos 2,67% de clones positivos para *Candida* (Quadro I). A maioria, porém, perdeu-se nas clonagens subseqüentes. Na segunda fusão conseguimos apenas 0,29% de clones positivos, percentual muito baixo quando comparado a outras fusões realizadas em nosso laboratório, cujas cifras atingiam um percentual de 0,74 a 1,48% (Unterkircher et al.⁷⁴, 1999). Cassone et al.¹³ (1988) relatam que na produção do anticorpo monoclonal AF-1, 14 dias após o início da fusão, somente 2 de 384 orifícios foram positivos para o antígeno pesquisado, ou seja, um percentual de 0,52% de chance de se obter um anticorpo específico. Este percentual é similar aos resultados obtidos neste trabalho.

O clone 76C, sintetizando um anticorpo IgM κ , reativo com AgC/Ca foi o único que se manteve estável após várias clonagens, e, por esta razão, foi expandido *in vitro* e *in vivo*. A ascite derivada do clone foi testada com diferentes amostras de *Candida albicans* e com outras

espécies do mesmo gênero. Nem todas as amostras de *C.albicans* foram reconhecidas por 76C, ou porque o antígeno-alvo não ocorre em todas as amostras ou não é acessível em determinados casos. Como o antígeno reconhecido por 76C é termoestável e não pode ser evidenciado na eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, sugerimos que seja de natureza glícídica e faça parte da manano-proteína da parede celular de *Candida*. Se assim for, a diferença de reatividade pode ser devida ao comprimento dos oligomanosídeos liberados da parede celular e/ou ao tipo de ligação terminal envolvida nos oligomanosídeos da manana. De acordo com Peat et al.⁵¹ (1961), Zhang & Ballou⁷⁹ (1981) e Jaquinot et al.³¹ (1998), os oligomanosídeos de manana podem ser O- ou N- ligados. A parte N-ligada é ácido estável e consiste de resíduos de manopirranose α 1-2 e α 1-3 com terminais β 1-2 na *Candida albicans*, sorotipo A. O domínio ácido lábil é constituído por homopolímeros de oligomanosídeos β 1-2 e dependendo do comprimento e do tipo de ligação da cadeia manosil, as oligomanoses interagem de forma altamente específica com anticorpos. Neste trabalho, as amostras de *Candida albicans* utilizadas não foram tipadas, assim não temos informação dos sorotipos usados.

A reatividade do anticorpo monoclonal 76C em ELISA e no dot blot e a ausência de marcação de um polipeptídeo no AgC/Ca, na técnica de *Western-blotting*, reforça a hipótese de um epítopo de natureza glícídica associado à manana. Devemos considerar que os fragmentos de manana são muito grandes e não penetram no gel de

poliacrilamida, impossibilitando sua análise na técnica de *Western-blotting*. A análise dos fragmentos de manana exigiria hidrólise ácida parcial e outras técnicas, ainda não desenvolvidas em nosso laboratório, que pudessem nos conduzir a um resultado conclusivo. O dot blot mostrou-se relevante na detecção do epítipo reativo em 87,5% das amostras de *Candida* testadas, sugerindo que tal epítipo faça parte de um glicoconjugado, pois polissacarídeos puros não ligam facilmente à nitrocelulose nas condições usadas. Estudos empregando a técnica de dot blot para detecção de manana circulante já foram empregados por muitos pesquisadores. Sendid et al.⁶¹ (1999) padronizaram um teste diagnóstico para *Candida* baseado no dot blot com sensibilidade para detectar 0,1ng/mL de antígeno. Similarmente, Bernardis et al.⁵ (1993) foram capazes de reconhecer 2 a 5ng/mL de manana em ensaios aplicando dot blot associado a um anticorpo monoclonal denominado AF-1 e Rebolí⁵⁴ (1993) observou que empregando anticorpo policlonal de coelho anti-*Candida*, quantidades tão pequenas de manana, como 1 ng/mL, podiam ser detectadas no soro de pacientes.

As cepas de *Candida albicans* testadas não foram submetidas a sorotipagem. Estudos relacionados à sorotipagem mostraram que *C. albicans* sorotipo A contém determinantes antigênicos não detectáveis em *Candida* sorotipo B (Summers et al.⁶⁸, 1964). Lehmann & Reiss⁴⁰ (1980) afirmam que as propriedades dos sorotipos de mananas são diferentes e a reatividade com o anticorpo também. Anti-

peptideogluanos e anti-parede celular, estudados na literatura, reagem fortemente com o sorotipo B.

O antígeno reconhecido pelo anticorpo 76C foi purificado em concanavalina A e sua reatividade detectada em ELISA. A lectina, concanavalina A, liga-se especificamente a resíduos de α -D-glucopiranosose terminais não redutores ou O-2 substituídos, presentes em polissacarídeos e glicoproteínas. Esta lectina tem sido muito usada para detectar estes resíduos em fungos e leveduras. A demonstração que a molécula reconhecida pelo 76C tem afinidade por concanavalina A também reforça nossa suspeita de tratar-se de manano-proteína. A baixa reatividade observada em ELISA pode ser atribuída a pequena quantidade de antígeno usada na sensibilização das placas ou mesmo a dificuldade em sensibilizar uma placa com um glicoconjugado contendo uma parte glicídica preponderante.

Também avaliamos se a oxidação pelo metaperiodato de sódio poderia reduzir ou eliminar a reatividade do Acmo 76C pela manano-proteína ligada à placa de ELISA. Surpreendentemente, este fenômeno não ocorreu. Nenhuma diferença significativa foi observada entre o controle e o antígeno tratado. Entretanto é importante analisar o modo de ação do metaperiodato. O metaperiodato é um dos reagentes mais utilizados para gerar grupos aldeídos sobre glicoconjugados. Ele oxida especialmente os dióis vicinais nas unidades de açúcar e é comumente usado na análise química de oligossacarídeos pela

degradação de Smith. A susceptibilidade de um glicoconjugado a oxidação pelo metaperiodato varia muito e precisa ser determinada empiricamente. Assim, este resultado não exclui de forma alguma nossa hipótese inicial, mas sugere que uma série de experimentos sejam necessários para se determinar a sensibilidade deste antígeno à oxidação pelo metaperiodato (O'Shannessy & Wilchek⁵⁰,1990).

A natureza química do epítipo reconhecido não foi completamente definida e exigirá novos ensaios com enzimas proteolíticas e testes de inibição de reatividade com carboidratos. A resistência da manano-proteína à oxidação branda pelo metaperiodato observada no presente estudo diverge de outros trabalhos, como os relatados por Bernardis et al.⁵ (1993) e também por Gomez et al.²³ (1996).

Na técnica de *Western-blotting*, o acmo 76C reagiu cruzado com duas enzimas de mamíferos, a anidrase carbônica tipo II de origem bovina (30kDa) e fosforilase B (94 kDa) e também com anidrase carbônica tipo II de origem humana. Este comportamento comprova a existência de um epítipo comum entre estas moléculas e o antígeno presente na parede das leveduras. Como estas enzimas são glicoproteínas, o epítipo homólogo deve ser o terminal de carboidrato. Reatividade cruzada de anticorpos monoclonais anti-*Candida* com proteínas de mamíferos, com receptores do sistema complemento (CR2) (Heidenreich & Dierich²⁸,1985; Edwards Junior et al.¹⁷, 1986; Mayer et al.⁴⁵, 1990; Lee & Chun³⁹, 1997) e enolase, (Mathews & Burnie⁴⁴,1988

apud in Nakamura et al.⁴⁷,1991; Reboli⁵⁴,1993), já foi citada na literatura. A enolase é uma enzima de 48kDa que participa da via glicolítica, e que foi identificada como antígeno imunodominante nas infecções por *Candida* e considerada um importante alérgeno fúngico (Ballantyne & Warmington⁴, 2000). Kanbe et al.³²(1996) correlacionaram a presença de anticorpo IgE para fosfomananoproteína de *C. albicans* com quadros alérgicos em humanos.

Novos estudos deverão ser realizados com o Acmo 76C visando seu uso na pesquisa de manano-proteína no soro de pacientes com candidose invasiva e em estudos imunoquímicos de glicoconjugados em leveduras do gênero *Candida*.

7 CONCLUSÕES

Considerando a metodologia empregada neste trabalho e os resultados apresentados nesta pesquisa, podemos concluir :

- a) o acmo 76C é reativo com a manano-proteína presente na parede de *C. albicans* e de outras espécies de *Candida*;
- b) o epítipo reconhecido pelo acmo 76C na manano-proteína é termoestável, mas resistente a oxidação branda pelo metaperiodato;
- c) o acmo 76C é uma IgM κ ;
- d) no *Western-blotting*, o acmo 76C não reagiu com antígeno citoplasmático de *C.albicans* (AgC/Ca) utilizado na imunização dos camundongos.
- e) no *Western-blotting*, o acmo 76C apresentou reatividade cruzada com duas glicoproteínas de mamíferos, a fosforilase B e a anidrase carbônica tipo II.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 ALLEN, C. Diagnosing and managing oral candidiasis. **J Am Dent Assoc**, v.123, p.77-8, Jan.1992.
- 2 ALMEIDA, N. Q. **Influência da produção de hialuronidase, proteinase, condroitin-sulfatase e fosfolipase por algumas espécies de *Candida* sobre a patogenicidade para camundongos.** 1991.111f. Tese (Livre Docência em Microbiologia) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.
- 3 ARENDORF, T. M. et al. Tobacco smoking and denture wearing in oral candidal leucoplakia. **Br Dent J**, v.155, n10, p.340-3, Nov.1983.
- 4 BALLANTYNE, D.S.; WARMINGTON, J.R. Purification of native enolase from medically important *Candida* species. **Biotechnol Appl Biochem**, v.31, p.213-8, jun.2000. Medline. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed/>. Acesso em:10 Fev.2001. (Abstract)
- 5 BERNARDIS, F. et al. Use of a monoclonal antibody in a dot immunobinding for detection of a circulating mannoprotein of *Candida* spp. in neutropenic patients with invasive candidiasis. **J Clin Microbiol**, v.31,n.12, p.3142-6, Dec. 1993.

Baseado em:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Rio de Janeiro. **Referência Bibliográfica NBR 6.023.** Rio de Janeiro, 2000. 22p.

- 6 BONIFÁCIO-SOUZA, E.M. et al. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade à anti-fúngicos de amostras de *C. albicans* sorotipo A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. **Rev Microbiol**, v.21, p.247-53,1990.
- 7 BORG-VON ZEPELIN; M., GRÜNESS, V. Characterization of two monoclonal antibodies against secretory proteinase of *Candida tropicalis* DSM 4238. **J Med Vet Mycol**, v.31,n.1, p.1-15, 1993.
- 8 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n.7, p. 248, May 1976.
- 9 BRAWNER, D.L.; CUTLER, J.E. Variability in expression of a cell surface determinant on *Candida albicans* as evidenced by an agglutinating monoclonal antibody. **Infect Immunol**, v.43, n.3, p.966-72, Mar. 1984.
- 10 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infection. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.61-9,1990.
- 11 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Histopathology, immunology and serology of oral yeast infection. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1,p.37-43, 1990.

- 12 CASANOVA, M.; MARTINEZ, J.P.; CHAFFIN, W.L. Fab fragments from a monoclonal antibodies against a germe tube mannoprotein block the yeast-micelium transition in *Candida albicans*. **Infect Immun**, v.58, p.3810-2, 1990 apud HAN, Y. et al. Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. **Infect Immun**, v.65, n.10, p.4100-7, Oct. 1997.

- 13 CASSONE, A . et al. Production and characterisation of a monoclonal antibody to a cell-surface, glucomannoprotein constituent of *Candida albicans* and other pathogenic *Candida* species. **J Med Microbiol**, v.27, n.4, p.233-8, Dec. 1988.

- 14 COTTER, G.; WEEDLE, R.; KAVANAGH, K. Monoclonal antibodies directed against extracellular matrix proteins reduce the adherence of *Candida albicans* to HEp-2 cells. **Mycopathol**, v.141, n.3, p.137-42, 1998.

- 15 DARLING, M.R.; ARENDORF, T.M.; COLDREY, N.A. Effect of cannabis use on oral candidal carriage. **J Oral Pathol Med**, v.19, n.7, p.319-21, 1990.

- 16 DOMER, J.E. et al. Separation of immunomodulatory effects of mannan from *Candida albicans* into stimulatory and supressive components. **Cell Immunol**, v.101, n.2, p.403-14, Sept. 1986.

- 17 EDWARDS JUNIOR, J.E. et al. Expression of specific binding sites on *Candida* with functional and antigenic characteristics of human complement receptors. **J Immunol**, v.137, n.1, p.3577-83, Dec. 1986.

- 18 FERREIRA, R.P. et al. Detection of *Candida* antigenuria in disseminated candidiasis by immunoblotting. **J Clin Microbiol**, v.28, n.5, p.1075-8, May 1990.
- 19 FRATAMICO, P.M.; LONG, W. K.; BUCKLEY, H. R. Production and characterization of monoclonal antibodies to 58 kilodalton antigen of *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun**, v.59, n.1, p.316-22, Jan. 1991.
- 20 GATERMANN, S.; HEESEMANN, J.; LAUFS, R. Identification of *Candida albicans* antigens recognized by sera of patients with candidiasis. **Mykosen**, v.29, n.8, p.343-54, 1986.
- 21 GIL, J. et al. Inhibition of *in vivo* tumor growth by a monoclonal IgM antibody recognizing tumor cell surface carbohydrates. **Cancer Res.**, v.50, p.7301-6, n.22, Nov. 1990.
- 22 GODING, V.W. Antibody production by hibridomas. **J Immunol Methods**, v.39, p.285-308, 1980.
- 23 GOMEZ, M.J. et al. Purification and biochemical characterization of a 65-kilodalton mannoprotein (MP65), a main target of anti-*Candida* cell-mediated immune responses in humans. **Infect Immun**, v.64, n.7, p.2577-84, July 1996.
- 24 HAN, Y.; CUTLER, J.E. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. **Infect Immun**, v.63, n.7, p.2714-9, July 1995.

- 25 HAN, Y.; CUTLER, J.E. Assessment of a model of neutropenia and the effect of na anti-candidiasis monoclonal antibodies in these animals. **J Infect Dis**, v.175, n.5, p.1169-75, 1997.
- 26 HAN, Y. et al. Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. **Infect Immun**, v.65, n.10, p.4100-7, Oct. 1997.
- 27 HAN, Y. et al. A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. **Infect Immun**, v.66, n.12, p.5771-6, Dec. 1998.
- 28 HEIDENREICH, F.; DIERICH, M. P. *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. **Infect Immun**, v.50, n.2, p.598-600, Nov. 1985.
- 29 HOOPWOOD, V. et al. A monoclonal antibody to a cell wall component of *Candida albicans*. **Infect Immun**, v.54, n.1, p.222-7, Oct.1986.
- 30 HOPKINS, J.G.; BENHAM, R.W. Monilia infections of the hands and feet. **New Y J Med**, v.29, p.793-800, 1929.

- 31 JAQUINOT, P.M. et al. Nature of *Candida albicans*-derived carbohydrate antigen recognized by a monoclonal antibody in patient sera and distribution over *Candida* species. **FEMS Microbiol Lett**, v.169, n.1, p.131-8, Dec.1998.
- 32 KANBE, T. et al. Evidence for the presence of immunoglobulin E antibodies specific to cell wall phosphomannoproteins of *Candida albicans* in patients with allergies. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.6, n.3, p.645-50, Nov. 1996. Medline. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed/>. Acesso em:10 fev.2001. (Abstract).
- 33 KHOURI, S. **Deteção e caracterização de hialuronidase em espécies de Candida por eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrofotometria**. 1998, 115f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- 34 KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v.256, p.495-7, Aug. 1975.
- 35 LAFORCE, F.M. et al. Inhibition of leukocyte candidacidal activity by serum from patients with disseminated candidiasis. **J Lab Clin Med**, v.86, n.4, p.657-66, Oct. 1975.
- 37 LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica**. 8.ed., São Paulo: Sarvier, 1991.695p.
-

- 38 LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, Aug. 1970.
- 39 LEE, K.L.; CHUN, W.H. The effects of monoclonal antibodies against iC3b receptors in mice with experimentally induced disseminated candidiasis. **J Immunol**, v.92, n.1, p.104-10, 1997.
- 40 LEHMANN, P.F.; REISS, E. Detection of *Candida albicans* mannan by immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis, and enzyme-linked immunoassay. **Mycopathologia**, v.70, n.2, p.83-8, 1980.
- 41 LEHNER, T. Oral candidosis. **Dent Pract Dent Rec**, v.17, n.6, p.209-16, Feb. 1967.
- 42 MacDONALD, F.; ODDS, F. C. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. **J Med Microbiol**, v.13, n.3, p.423-35, Aug. 1980.
- 43 MARCILLA, A.; VALENTIN, E.; SENTANDREU, R. The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis. **Int Microbiol**, v.2, n.1, p.107-16, Jun. 1998. Medline. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed/>. Acesso em: 10 jan. 2001. (Abstract).

- 44 MATTHEWS, R.; BURNIE, J. Diagnosis of sistemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. **J Clin Microbiol**, v.26, p.459-63, 1988 apud NAKAMURA, A.; ISHIKAWA, N.; SUZUKI, H. Diagnosis of invasive candidiasis by detection of mannan antigen by using the avidin-biotin enzyme immunoassay. **J Clin Microbiol**, v. 29, n.11, p.2363-7, Nov. 1991.
- 45 MAYER, C.L.; DIAMOND, R.D.; EDWARDS JUNIOR, J.E. Recognition fo binding sites on *Candida albicans* by monoclonal antibodies to human leukocyte antigens. **Infect Immun**, v.58, n.11, p.3765-9, Nov. 1990.
- 46 McCULLOUGH, M.J.; ROSS, B. C.; READE, P.C. *Candida albicans*: a review of this history, taxonomy, epidemiology, virulence atributes and methods of strain diferenciation. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.25, n.2, p.136-44, 1996.
- 47 NAKAMURA, A.; ISHIKAWA, N.; SUZUKI, H. Diagnosis of invasive candidiasis by detection of mannan antigen by using the avidin-biotin enzyme immunoassay. **J Clin Microbiol**, v. 29, n.11, p.2363-7, Nov. 1991.
- 48 ODDS, F.C. ***Candida and candidosis***. 2 ed. London:Baillière Tindall, 1988. 468p.
-

- 49 OLLERT, M. W.; CALDERONE, R. A. . A monoclonal antibody that defines a surface antigen on *Candida albicans* hyphae cross-reacts with yeast cell protoplasts. **Infect Immun**, v.58, n.3, p.625-31, Mar. 1990.
- 50 O'SHANNNESSY, D.V.; WILCHEK, M. Immobilization of glycoconjugates by their oligosaccharides: use of hydrazido-derivatized matrices. **Anal Biochem**, v.191, p.1-8, 1990.
- 51 PEAT, S.; WHELAN, W. J.; EDWARDS, T.E. Polysaccharides of baker's yeast. Part IV. Mannan. **J Chemical Society**, v.1, p.29-34, 1961.
- 52 PONTON, J. et al. Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies. **Infect Immun**, v.61, n.11, p.4842-7, Nov. 1993.
- 53 POULAIN, D.; MACKENZIE, D.W.R.; VAN CUTSEM, J. Monoclonal antibody-gold silver staining dot assay for the detection of antigenemia in candidosis. **Mycoses**, v.34, n.516, p. 221-6, 1991.
- 54 REBOLI, A. C. Diagnosis of invasive candidiasis by a dot immunobinding assay for *Candida* antigen detection. **J Clin Microbiol**, v.31, n.3, p.518-23, Mar. 1993.
- 55 RODERO, L. et al. *Candida dubliniensis*: primer aislamiento en Argentina. **Rev Arg Microbiol**, v.30, n.1, p.39-41, 1998.
-

- 56 SAMARANAYAKE, L. P.; RAESIDE. J. M.; MacFARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro* **Saboraudia: J Med Vet Mycol**,v.22, n.3, p.201-7, 1984.
- 57 SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing yeast isolates. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.27-36, 1990.
- 58 SAN MILLAN, R. et al. Effect of monoclonal antibodies directed against *Candida albicans* cell wall antigens on the adhesion of the fungus to polystyrene. **Microbiol**, v.142, p 2271-7, Aug.1996.
- 59 SCHNEIDER, J. et al. Cross-reactivity between *Candida albicans* and human ovarian carcinoma as revealed by monoclonal antibodies PA10F and C6. **Br J Cancer**, v.77, n.6, p.1015-20, 1998.
- 60 SCROFERNEKER, M.L.; POHLMANN, P.R. **Imunologia básica e aplicada**. Porto Alegre: Sagra Luzzato, 1998. 578p.
- 61 SENDID, B. et al. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of sistemic candidiasis. **J Clin Microbiol**, v.37, n.5, p.1510-7,1999. Medline. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed/> . Acesso em:21 set. 2000. (Abstract).

- 62 SHIMIZU, M.T. Enzimas histolíticas produzidas por leveduras do gênero *Candida*. **Rev. Microbiol.**, v.19, n.4, p.442-45, out./dez.1988.
- 63 SHIMIZU, M.T. et al. Hyaluronidase and chondroitin-sulfatase production by different species of *Candida*. **J Med Vet Mycol**, v.33, n.1, p.27-31, Jan./Feb. 1995.
- 64 SILVEIRA, F.R.X. **Frequência e biosorotipagem de amostras de *Candida albicans* da mucosa jugal de portadores saudáveis, dentados, fumantes e não fumantes.** 1990. 59f. Tese (Doutorado em Semiologia) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- 65 SIQUEIRA, A . M.; RODRIGUES, M.C.; BRACCIALI, M.L. Estrutura antigênica das espécies do gênero *Candida*. IN: LACAZ, C.S. **Candidíasis**. São Paulo: EDUSP, 1980.cap.2, p. 27-46.
- 66 STROCKBINE, N. A.; LARGEN, M.T.; BUCKLEY, H.R. Production and characterization of three monoclonal antibodies to *Candida albicans* proteins. **Infect Immun**, v.43, n.3, p.1012-18, Mar. 1984.
- 67 SULLIVAN, D.; COLEMAM, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and Identification. **J Clin Microbiol**, v.36, n.2, p.329-34, Feb.1998.

- 68 SUMMERS, D.F.; GROLLMAN, A . P.; HASENCLEVER, H.F. Polysaccharide antigens of *Candida* cell wall. **J. Immunol.**, v.92, p.491-9, 1964 apud LEHMANN, P.F.; REISS, E. Detection of *Candida albicans* mannan by immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis, and enzyme-linked immunoassay. **Mycopathologia**, v.70, n.2, p.83-8, 1980.

- 69 SUNDSTROM, P. M. et al. Antigenic differences in the surface mannoproteins of *Candida albicans* as revealed by monoclonal antibodies. **Infect Immun**, v.56, n.3, p.601-6, Marc. 1988.

- 70 SUZUKI, H. et al. Studies on detection of *Candida* antigen in the sera of mice inoculated orally with *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v.104, p.7-17, 1988 apud NAKAMURA, A.; ISHIKAWA, N.; SUZUKI, H. Diagnosis of invasive candidiasis by detection of mannan antigen by using the avidin-biotin enzyme immunoassay. **J Clin Microbiol**, v. 29, n.11, p.2363-7, Nov. 1991.

- 71 TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Nalt Acad Sci**, v.76, n.9, p.4350-4, Sept. 1979.

- 72 TRENT, R. J. **Introdução à medicina molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.177p.

- 73 TSUBOI, R. et al. Pathogenesis of superficial mycoses. **J Med Vet Mycol**, Suppl.1, v.32, p.91-104, 1994.
- 74 UNTERKIRCHER, C.S. et al. Produção de anticorpos monoclonais anti-*Streptococcus mutans*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, Salvador. **Anais...**S.L.: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p.211
- 75 Van DEVENTER, A. J. et al. Kinetics of anti-mannan antibodies useful in confirming invasive candidiasis in immunocompromised patients. **Microbiol Immunol**, v.2, n.40, p.125-31, 1996. Medline. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed/> . Acesso em: 10 fev. 2001. (Abstract).
- 76 WALKER, S.M.; URBANIAK, S.J. A serum-dependent defect of neutrophil function in chronic mucocutaneous candidiasis. **J Clin Pathol**, v.33, n.4, p.370-2, Apr. 1980.
- 77 WEINER, M.H.; YOUNT, W. J. Mannan antigenemia in the diagnosis of invasive *Candida* infection. **J Clin Invest**, v. 58, p.1045-53, 1976 apud NAKAMURA, A., ISHIKAWA, N., SUZUKI, H. Diagnosis of invasive candidiasis by detection of mannan antigen by using the avidin-biotin enzyme immunoassay. **J Clin Microbiol**, v. 29, n.11, p.2363-7, Nov. 1991.
-

- 78 XAVIER, M.N. **Terapêutica alopática versus fitoterápica em pacientes idosos portadores de candidose bucal. Manifestações bucais na senescência.** 1997. 110p. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração - Estomatologia) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.
- 79 ZHANG, W.; BALLOU, C.E. *Saccharomyces kluyveri* cell wall mannoprotein. **Biol Chem**, v.256, n.19, p.10073-9, Oct. 1981.

ANEXO – A Procedimentos realizados na produção de anticorpo monoclonal

1. Meio RPMI 1640 (SIGMA)

Estoque

RPMI.....	5,2g
NaHCO ₃	1,0g
HEPES.....	2,87g
Gentamicina.....	20mg
H ₂ O.....	500mL

Acertar o pH para 7,2 com NaOH 0,1M. Meio esterilizado por filtração (membrana Millipore 0,22µm).

2. Meio RPMI 1640 Completo (SIGMA)

RPMI.....	90mL
L-Glutamina.....(200mM).....	2mL
BME.....(14mM).....	0,35mL
Soro Fetal.....	10mL

3. Células alimentadoras “*Feeder Layer*”

Vinte de quatro horas antes da fusão, um camundongo Balb/c de dois meses de idade, foi sacrificado e o baço removido em condições assépticas.

O baço foi macerado e as células esplênicas lavadas duas vezes em RPMI e então suspensas em 50mL de RPMI completo. Posteriormente, estas células foram distribuídas na razão de $1,7 \times 10^5$ por orifício da placa de cultura (COSTAR – 96 furos). No momento da fusão, o meio de cultura foi retirado e substituído pelo RPMI completo + HAT, contendo as células fusionadas.

4. Ágar Sabouraud

Dextrose.....	40g
Peptona.....	10g
Ágar.....	15g
Água destilada.....	1000mL

Ferver em banho-maria a água e o ágar até dissolução completa. Adicionar a dextrose e a peptona. Agitar. Distribuir e autoclavar a 120°C durante 15 minutos.

5. Produção da ascite

Injetar 0,5mL de pristane por via intra peritoneal em camundongo Balb/c com oito semanas de idade. Após 10 dias, injetar cerca de 10^6 a 5×10^6 células do clone selecionado. Recolher a ascite (2 a 10mL) duas a três semanas mais tarde.

6. Meio para congelamento de células

RPMI Completo

20% Soro fetal bovino

20% de Glicerol ou DMSO

ANEXO B - ESTATÍSTICA *

FIGURA 3 – Foi realizado o teste de ANOVA seguido do teste de Tukey a nível de 5%, comparando o anticorpo monoclonal 76C com IgM imune e IgM normal, sendo estatisticamente significativo ou seja $p < 0.001$. A comparação das médias entre os anticorpos IgM normal e IgM imune não foram estatisticamente significantes.

FIGURA 4 – Foi efetuado a ANOVA para a análise de regressão linear e verificou-se que $p < 0,05$, ou seja os valores médios apresentados pelos anticorpos 76C e IgMN são estatisticamente significantes para os dados em análise : microgramas x mL versus Densidade óptica (D.O).

FIGURA 5 – Foi efetuado a ANOVA para a análise de regressão linear e verificou-se que $p < 0,05$, ou seja os valores médios apresentados pelos anticorpos 76C e IgMn são estatisticamente significantes para os dados em análise : microgramas x mL versus Densidade óptica (D.O).

FIGURA 6 – Foi efetuado a ANOVA para a análise de regressão linear e verificou-se que $p > 0,05$, ou seja os valores médios apresentados pelos anticorpos 76C e IgMn não são estatisticamente significantes para os dados em análise : microgramas x mL versus Densidade óptica (D.O).

FIGURA 9 – Foi efetuado a ANOVA para a análise de regressão linear e verificou-se que $p > 0,05$, ou seja os valores médios apresentados pela mananoproteína e mananoproteína tratada com metaperiodato em ELISA, não são estatisticamente significantes para os dados em análise: microgramas x mL versus Densidade óptica (D.O).

*A análise estatística foi realizada através do Programa Sigma Stat, versão (2.03,1997).

MOREIRA, D. **Production of monoclonal antibody reactive with yeast of the genus *Candida***. 2001. 96f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

ABSTRACT

The aim of this study was to obtain a reactive monoclonal antibody against Candida albicans. Spleen cells of BALB/c mice previously immunized with Candida were fused in vitro with mieloma cells Sp2-OAg14. The resultant hybrid cells were kept in culture medium at 5% CO2. The suspension growing cells were tested by ELISA to check the antibodies titer. The positive colonies were cloned to achieve the monoclonal antibody and further expanded in mice peritoneum. The antibody produced was purified and isotyped. The monoclonal antibody was denominated 76C. The 76C was directed against mannoprotein molecules from Candida cell surface, which has not yet been completely investigated to find out the specific nature of epitope. The antibody 76C was analysed by DOT BLOT against different Candida species and there were positives results in 87,5% of the tested samples. The monoclonal antibody 76C will be a useful tool to investigate oligomannoside epitope from mannan and could be applied in sera diagnosis in invasive candidiasis and in studies of glicidic epitope.

KEY WORDS: Monoclonal antibody; *Candida albicans*, diagnosis; mannan.

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 06/99-PA/CEP, sobre “Produção de Anticorpos Monoclonais Anti-Candida Albicans”, sob a responsabilidade de Daniella Moreira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 20 de fevereiro de 2001.



Prof. Dr. Paulo Villela Santos Junior
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho.

São José dos Campos, 05 de junho de 2001.


Daniella Moreira