



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Ana Claudia Simões

**Obtenção de anticorpos monoclonais murinos contra
antígenos do *Staphylococcus aureus* resistente à
metecilina por imunização subtrativa**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elenice Deffune
Coorientador: Prof^o Dr^o Andrei Moroz

**Botucatu
2015**

Ficha catalográfica

Ana Claudia Simões

Obtenção de anticorpos monoclonais murinos contra
antígenos de *Staphylococcus aureus* resistente à
metecilina por imunização subtrativa

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Pesquisa e
Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune
Coorientador: Prof. Dr. Andrei Moroz

Botucatu
2015

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha família que sempre incentivou os meus estudos e minha vontade de crescer...

Ao meu grande amor Igor...

Aos meus amigos queridos...

Agradecimientos

À Deus e Nossa Senhora Aparecida por iluminarem o meu caminho e estarem sempre ao meu lado ouvindo e abençoando meus pedidos e sonhos...

Àos meu pais Fernando e Ezilda, por estarem ao meu lado em todos os momentos e sempre investirem nos meus estudos e acreditarem em mim, por todo amor, carinho, paciência e força que me deram ao longo de todos esses anos... não tenho palavras para descrever o quanto vocês são essenciais na minha vida! Amo demais vocês!

À minha querida irmã Mariana, pelo grande apoio aos meus estudos e sonhos, por estar sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida, por ser minha melhor amiga e confidente, por me dar forças sempre que as coisas pareciam difíceis de se resolver.... você é a melhor irmã do mundo! Amo você!

Ao meu querido Vô Mané, por ser meu anjo da guarda e olhar por mim lá do céu... obrigada por escutar todos os meus pedidos e estar do meu lado o tempo todo!

Ao meu namorado Igor, por ser meu porto seguro e me apoiar em todas as minhas escolhas, por todo amor, carinho e paciência nos momentos mais difíceis... por ser a minha alegria todos os dias, ao seu lado tudo é mais fácil e cheio de encanto... Te amo pra sempre!

Aos meus sogros, Cris e Nil, e a vó Ivone, por serem minha segunda família, pelo amor e carinho que cuidam de mim, pelas orações para meus infinitos testes darem certo e pelo imenso apoio em todas as minhas escolhas, vocês são nota 1000! Obrigada por tudo, amo vocês!

Agradeço em especial a Dra Elenice Deffune, por todos os ensinamentos, pela oportunidade em participar de sua equipe de pesquisa, acreditar no meu potencial e sempre estar disposta a me ajudar. A senhora é um exemplo de mulher e uma profissional incrível, sua mente é brilhante, me sinto muito feliz e honrada por ter iniciado minha carreira na pesquisa ao seu lado. À você Doutora, minha eterna gratidão.

À Dra Rosana, nosso anjo da guarda, muito obrigada pelos ensinamentos e conselhos ao longo desse caminho, seu apoio foi fundamental em todas as etapas do meu trabalho!

À Josy, pela paciência e dedicação com a qual me ensinou toda a parte de cultura de células e de anticorpo monoclonal, foi um privilégio aprender e conviver com uma profissional extremamente competente e que se tornou uma grande amiga e companheira em todos os momentos, não tenho palavras para agradecer e expressar a minha satisfação em ter trabalhado com você, muito obrigada por tudo Jo!

Ao meu co-orientador Dr Andrei, por toda ajuda na revisão do meu trabalho e na técnica de imunização subcutânea, mesmo estando distante, sempre manteve contato e se preocupou em me ajudar com os inúmeros testes e revisão dos protocolos, muito obrigada Andrei!

À querida Ondina, sempre disposta a me ajudar e socorrer com os inúmeros desafios enfrentados no dia-a-dia, sempre com um conselho quando a saudade de casa tomava conta de mim, e muitas histórias divertidas para nos distrair... sem esquecer de mencionar o delicioso café todas as manhãs e por cuidar do material o qual nos é primordial para o trabalho na cultura celular. Muito obrigada Ondina!

Aos queridos amigos do laboratório de Engenharia Celular, Thaiane, Helô, Helga, Vitória, Woner, Henrique, Isabele, Caroline, Ju Raveli, Flávia, Camila, Natália, Ana Livia, por tornar o trabalho mais prazeroso e divertido, por todas as risadas com as histórias hilárias da Tha, pelo companheirismo com o qual sempre trabalhamos juntos, ao lado de vocês aprendi o significado do verdadeiro trabalho em equipe. Vocês foram a minha família em Botucatu durante esses três anos. Obrigada por todas as lembranças lindas que guardarei de vocês! Vocês moram no meu coração! Mil vezes obrigada.

À querida Jaque, do IBB, pela enorme dedicação e contribuição com o meu trabalho, sempre super atenciosa e comprometida com os meus testes, foi um imenso prazer conhecer uma profissional como você! Sem palavras para te agradecer, muito obrigada Jaque querida!

À Profª Dra Lurdinha pela imensa ajuda com toda a parte de microbiologia, muito obrigada pela grande atenção e disponibilidade em nos receber sempre tão bem em seu laboratório!

À Valéria, em dispor o seu tempo para me ajudar com todas as culturas de bactérias e nos experimentos feitos no laboratório de Microbiologia, só tenho que agradecer pela grande atenção e pelos seus ensinamentos, que foram de grande valia. Muito obrigada por tudo.

À Profª Dra Lucilene Delazari, pela grande disponibilidade em nos ajudar com a análise proteômica em fase crítica de nossos experimentos, mesmo estando muito ocupada e cheia de trabalho, foi imensamente atenciosa e comprometida com a nossa pesquisa.

Ao Carlinhos (biotério) por toda ajuda e cuidado com os camundongos, pela dedicação e comprometimento que teve com os meus experimentos, você foi fundamental para a realização desse trabalho. Muito obrigada por tudo, Carlinhos!

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo, pela grande ajuda e apoio nas fases finais dos experimentos, pela prontidão e disponibilidade com que me atenderam, meu muito obrigada!

Aos meus queridos amigos da faculdade, Pit, Pague, Paper, Xanico e Penumbra, por me apoiarem e me ajudarem nessa jornada, por estarem presente mesmo estando distantes, vocês estão para sempre no meu coração! Obrigada por todos os momentos de diversão, de estudos,

intermináveis trabalhos, festas e pelo ombro amigo nos momentos difíceis, vocês são incríveis.

As minhas queridas amigas de cordeiro city, Aline K., Marina K., Camila, Marina P., Aline B. e Larissa, por me ajudarem a enfrentar todas as dificuldades, pelos momentos de alegrias e descontração ao lado de vocês, pelas risadas e pela enorme parceria que existe entre nós, vocês fazem parte dessa conquista! Obrigada por tudo meninas, amo vocês!

À funcionária da limpeza Natália, responsável por manter o nosso ambiente de trabalho sempre tão limpo e confortável, nos ajudando a evitar contaminações nos laboratórios.

Epígrafe

“ Quando a alma está feliz a prosperidade cresce, a saúde melhora, as amizades aumentam, enfim, o mundo fica de bem com você...! O mundo exterior reflete o universo interior.” (Mahatma Gandhi)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcuta)

Resumo

RESUMO

As infecções por MRSA podem ser consideradas um problema de saúde pública, com alta taxa de mortalidade. Desta maneira, com a ampla disseminação do MRSA é necessário adotar programas de vigilância que avaliem o perfil de sensibilidade dos isolados, além estimular o desenvolvimento tecnológico objetivando métodos mais rápidos e confiáveis que antecipem a escolha da terapêutica mais adequada propondo métodos de prevenção e vacinas para o avanço no controle da infecção hospitalar. Diante deste desafio este projeto tem como objetivo a caracterização de anticorpos monoclonais anti-MRSA obtidos por protocolos de imunização clássica e a obtenção de outros anticorpos com método de imunização subtrativa. Foram utilizados 10 camundongos Balb/C que receberam como tolerógeno proteínas de cepas de E.coli e MSSA associados a 100mg/kg/d de ciclofosfamida (CFM) em D1, D2 ,D3,D15, D16 e D17. Em D+31, 38, 45 e 54 foram feitas injeções de 50µg de proteínas da cepa de MRSA, anteriormente genotipada e confirmada a presença do gene *mec A*. Foram preparados extratos antigênicos por 3 métodos diferentes: fervura, morte à temperatura ambiente seguida de filtração 0,22µm e morte à temperatura ambiente e exposição ao banho ultrassônico. Pelo método de fervura obteve-se em média 5,31mg/mL enquanto que as técnicas de morte a TA ambiente, filtrado ou submetido ao banho ultrassônico obtiveram em média uma concentração protéica duas vezes maior indicando a existência de proteínas termolábeis. Foi identificado uma taxa de mortalidade de 30% nos animais provavelmente associado ao uso da CFM. Foram realizadas 7 fusões celulares com a construção de 4.402 híbridos com uma taxa de eficiência de fusão de 2,42 vezes menor do que aquela obtida nos protocolos de imunização clássica. Dois hibridomas foram escolhidos para a clonagem pelo método de diluição limitante, cuja caracterização imunoquímica identifica reconhecimento de bandas de 30 e 50kDa. A análise proteômica das bandas de proteínas que os dois clones reconheceram confirmam que a banda de 50 kDa corresponde a ATP sintase e a de 30kDa de IsaA, ou antígeno imunodominante do *S. aureus*. O anticorpo de especificidade anti-IsaA tem sido relatado na literatura como importante para a terapêutica (vacinas). A ATP sintase é uma enzima ubiquitária, mitocondrial, expressa também na membrana das células relacionada com processo de bioenergia e com os denominados nanomotores nanoestruturados biológicos.

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal, *Staphylococcus aureus*, resistência à meticilina, imunização subtrativa.

ABSTRACT

The MRSA infections are considered a public health problem, with a high mortality rate. Thus, with the wide spread of MRSA it's necessary to embrace monitoring programs to evaluate the sensitivity profile of the isolates, as well as to stimulate technological development aiming faster and more reliable methods to anticipate the choice of the most appropriate therapy by proposing methods of prevention and vaccines to advance the control of hospital infections. Therefore, this study aims the characterization of anti-MRSA monoclonal antibodies obtained by classical immunization protocols and the obtaining of other antibodies with the subtractive immunization method. We used 10 Balb/C mice that received as tolerogen proteins of strains of *E. coli* and MSSA associated with 100mg/kg/d of cyclophosphamide (Cy) in D1, D2, D3, D15, D16 and D17. On D+31, 38, 45 and 54 we made injections of 50 µg of the MRSA strain protein, previously genotyped and with confirmed presence of *mec A*. We prepared antigenic extracts by 3 different methods: boiling, death at ambient temperature followed by 0.22 µm filtration and death at ambient temperature and exposure to ultrasonic wash. The boiling method resulted on average 5.31mg/mL, whereas the technique of death at ambient temperature, filtered or exposed to ultrasonic wash culminated on average in a protein concentration two times higher, indicating the existence of heat labile proteins. We identified a mortality rate of 30% in the animals, which was probably associated with the use of Cy. We performed seven cellular fusions with the construction of 4.402 hybrids with a fusion efficiency rate of 2.42 times smaller than that obtained in protocols of classical immunization. We selected two hybridomas for cloning by the limiting dilution method, whose immunochemical characterization identifies bands of 30 and 50 kDa. The proteomic analysis of protein bands that was recognized by the two clones confirm that the 50 kDa band corresponds to ATP synthase and the 30kDa to IsaA, or immunodominant viral antigen of *S. aureus*. The anti-IsaA specificity antibody according to the literature is important for the therapeutic (vaccines). The ATP synthase is a ubiquitous mitochondrial enzyme, also expressed in the membrane of cells related to bioenergy process and to the nanostructured biological nanomotors.

Keywords: Monoclonal antibody, *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, subtractive immunization.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1 – Esquema dos Fatores de Virulência do <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2. Figura 2 – Esquema do mecanismo de resistência à meticilina do <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3. Figura 3 – Esquema adaptado de Vandijck DM, 2008. Comparação entre o estadiamento clínico da infecção nosocomial e custos	20
4. Figura 4 – Esquema simplificado das etapas que foram desenvolvidas nos dois protocolos de obtenção e caracterização de anticorpo monoclonal murino anti-MRSA.....	22
5. Figura 5 – Esplenectomia dos camundongos Balb/c imunizados para fusão celular.....	27
6. Figura 6 – Fotomicrografia do híbrido MRSA 2-196, microscopia invertida, aumento de 10x	28
7. Figura 7 – Clones em cultura juntamente com os timócitos que atuam como <i>feeder cells</i>	30
8. Figura 8 – Método de Ascite.....	31
9. Figura 9 – Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida, corado com Azul de Comassie	39
10. Figura 10 – Aspecto operacional da esplenectomia	40
11. Figura 11 – Fotomicrografia da clonagem realizada pela técnica de Diluição Limitante, observado por microscopia invertida de luz transmitida.....	44
12. Figura 12 – Resultado da Determinação de Classe e Subclasse dos anticorpos produzidos pelo kit CBA flex - IgA, IgG e IgM (BD Biosciences®)	45
13. Figura 13 – Resultado da Determinação de Classe e Subclasse dos anticorpos produzidos pelo kit CBA flex - IgA, IgG e IgM (BD Biosciences®)	46
14. Figura 14 – Resultado da Citometria de Fluxo realizada para avaliar a especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos	47
15. Figura 15 – Resultado da Citometria de Fluxo realizada para avaliar a especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos	48
16. Figura 16 – Resultado da Citometria de Fluxo realizada para avaliar a especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos	49

17. Figura 17 – <i>Western Blotting</i> dos anticorpos MRSA 2-194A42, MRSAS 5-23 e do anti-PBP2a comercial	50
18. Figura 18 – Gráfico de distribuição da pontuação peptídica.....	51
19. Figura 19 – Proteínas correspondentes ao mesmo conjunto de peptídeos. Análise proteômica realizada com uso da ferramenta MASCOT	52
20. Figura 20 – Gráfico de distribuição da pontuação peptídica.....	54
21. Figura 21 – Proteínas correspondentes ao mesmo conjunto de peptídios.....	55

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

1. Quadro 1 – Lista dos <i>primers</i> utilizados para a detecção dos genes de enterotoxinas, TSST-1 e PBP2a	23
2. Quadro 2- Protocolos realizados para obtenção de antígenos do MRSA	24
3. Quadro 3 – Protocolos realizados para obtenção de antígenos de MRSA, MSSA e E.coli através da Imunização Subtrativa.....	24
4. Quadro 4 – Protocolo de imunização subtrativa para obtenção de anti-MRSA	26
5. Quadro 5 – Genotipagem da cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.....	36
6. Quadro 6 – Amostras dos extratos antigênicos de diferentes cepas utilizadas para a caracterização antigênica da amostra utilizada	39

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

1.	Tabela 1 – Modo de preparo dos respectivos extratos antigênicos e concentração proteica obtida nas diferentes técnicas de preparo	37
2.	Tabela 2 – Resultado das sete fusões celulares do protocolo de Imunização Subtrativa.....	41
3.	Tabela 3 – Comparação dos métodos de Imunização Clássica e Imunização Subtrativa	42
4.	Tabela 4 – Resultado do <i>screening</i> dos híbridos por Elisa indireto	43
5.	Tabela 5 – Resultado das clonagens do híbrido MRSA 2-196 e MRSAS 5-23.....	44
6.	Tabela 6 – Média de Intensidade de Fluorescência, por Citometria de Fluxo	49

Lista de Gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

1. Gráfico 1 – Comparação das concentrações protéicas (mg/mL) dos diferentes extratos antigênicos obtidos..... 38

Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.2. Origem e mecanismo da multirresistência.....	16
1.3. Anticorpos monoclonais.....	18
1.4. Obtenção de Anticorpos monoclonais anti-MRSA pelo método de imunização subtrativa.....	19
1.5. Justificativa: O impacto do MRSA no controle da infecção.....	19
2. Objetivos.....	21
3. Material e métodos.....	22
3.1. Genotipagem molecular da cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.....	22
3.2. Obtenção das frações antigênicas dos extratos das bactérias.....	23
3.2.1 Amostra submetida à fervura.....	24
3.2.2 Amostra submetida à morte temperatura ambiente e filtração.....	24
3.2.3 Amostra submetida à temperatura ambiente e banho ultrassônico.....	25
3.2.4 Amostras de MRSA, MSSA e E.coli submetidas à fervura.....	25
3.3. Caracterização do extrato antigênico.....	25
3.4. Imunização subtrativa – Protocolo MRSA 2.....	25
3.5. Fusão Celular – Protocolo MRSA 2.....	26
3.6. Seleção dos Hibridomas para <i>Screening</i> – Protocolo MRSA 2.....	27
3.7. <i>Screening</i> dos Hibridomas obtidos – Protocolo MRSA 2.....	28
3.8. Clonagem Celular pela técnica de diluição limitante – MRSA 1 e MRSA 2.....	29
3.9. <i>Screening</i> dos clones – Protocolo MRSA 1 e MRSA 2.....	30
3.10. Citometria de Fluxo.....	30
3.11. Obtenção de Anticorpos monoclonais em alta concentração – Protocolo MRSA 1 e MRSA 2.....	31
3.12. Purificação dos Anticorpos monoclonais – Protocolo MRSA 1 e MRSA 2.....	32
3.13. Determinação de classe e subclasse – Protocolo MRSA 1 e MRSA 2.....	32
3.14. Caracterização das frações antigênicas dos extratos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	32
3.15. Caracterização da reatividade imunológica dos anticorpos monoclonais por <i>Western Blotting</i>	

3.16.	Descrição da Análise Proteômica.....	33
3.17.	Protótipo de Biosensor utilizando anticorpos monoclonal anti-MRSA.....	35
4.	Resultados e Discussão.....	36
5.	Conclusões.....	58
6.	Perspectivas.....	59
7.	Referências Bibliográficas.....	60

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

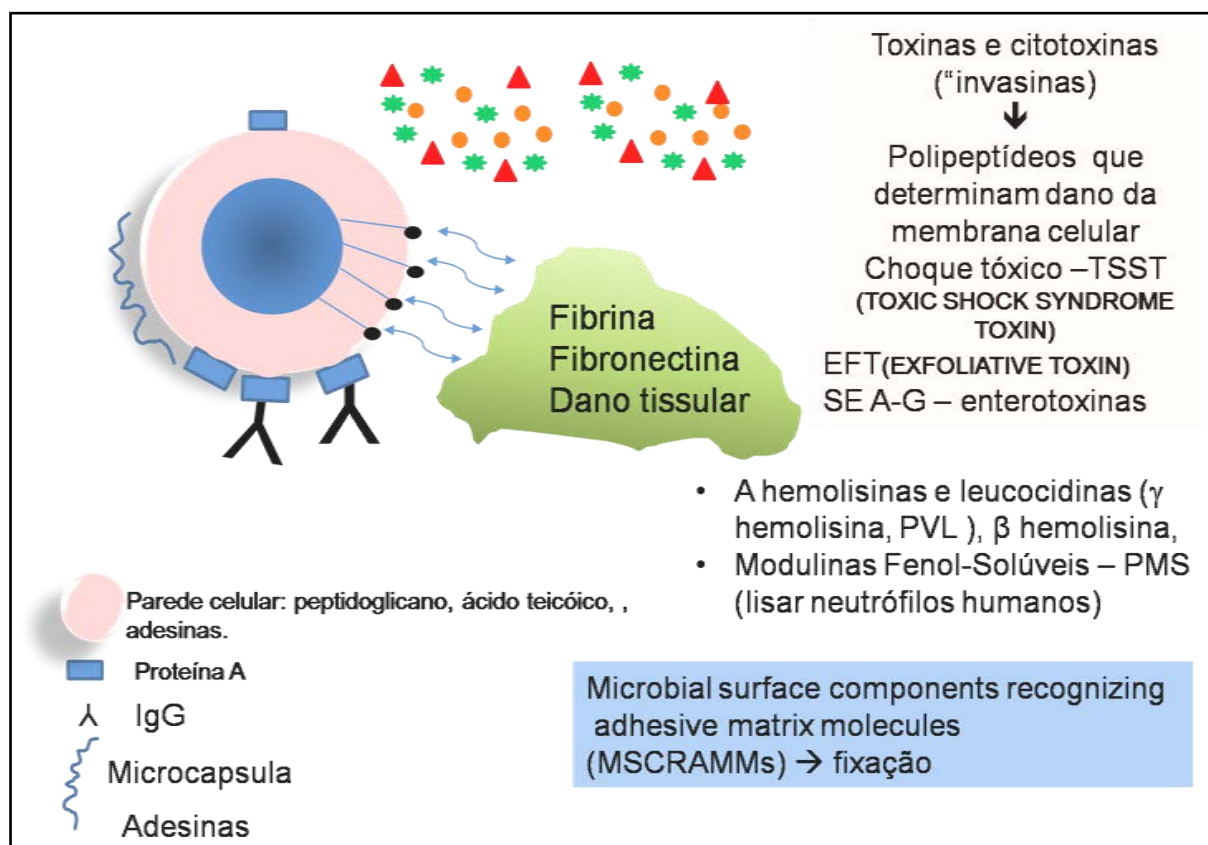
Os estafilococos são bactérias classificadas como cocos gram-positivos, imóveis, não formadores de esporos, e classificados como catalase positivos. São organismos colonizadores da pele e das mucosas de seres humanos e outros animais e se organizam, morfológicamente, agrupados semelhantemente a cachos de uva. As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem a Família *Staphylococcaceae* e possuem 47 espécies e 24 subespécies (GARRIT, *et al.*, 2001; ELZÉBY, 2013). Alguns dos estafilococos patogênicos produzem uma enzima denominada coagulase, considerada como marcador para detecção laboratorial desses microorganismos (KONEMMAN, 2001) podendo ser classificados em dois grupos: coagulase positiva e coagulase negativa (KLOOS, *et al.*, 1999)

O *S. aureus* possui capacidade de colonizar indivíduos saudáveis, de forma assintomática. São encontrados no ambiente externo e em narinas anteriores de 20% a 40% dos adultos. Outros sítios de colonização incluem pregas cutâneas, períneo, axilas e vagina; de tal modo que nestes indivíduos faz parte da flora normal (KONEMAN, 2001). As infecções causadas pelo *S. aureus* podem ser superficiais ou invasivas e muito tóxicas (TRABULSI *et al.*, 2008). O principal modo de transmissão de *S. aureus* é por contato direto, geralmente pelo contato pele-a-pele com indivíduos colonizados ou infectados. Infecções oportunistas graves podem acometer indivíduos imunodeficientes que apresentem as seguintes características: perda da barreira de pele normal, a presença de doenças de base (diabetes ou AIDS), defeitos na função dos neutrófilos, entre outros (CHAMBERS&DELEO, 2009).

Trata-se de um patógeno com grande capacidade de sobrevivência e eficiência em interagir em diferentes ambientes e colonizar hospedeiros humanos devido à presença de genes responsáveis pela expressão de toxinas, proteínas de superfície celular e proteínas que conferem resistência aos antimicrobianos, o que pode reforçar a sua virulência e conferir resistência aos antibióticos (BRONNER *et al.*, 2004, ZETOLA *et al.*, 2005). Possuem proteínas de membrana e toxinas como principais fatores de virulência. Na membrana do *S. aureus* encontram-se cinco famílias de antígenos: as proteínas de adesão, superantígenos, toxinas formadoras de poros, toxinas de ribosilação de ADP e proteases. Embora com funções semelhantes, estas proteínas não são antigenicamente idênticas (ex. leucotoxinas e alfatoxinas ou superantígenos) e estes fatores de virulência podem ser regulados e distribuídos de forma diferentes entre as cepas (BRONNER *et al.*, 2004). As citotoxinas constituem um grupo de proteínas capazes de causar dano nas membranas celulares das células do organismo invadido

determinando a formação de poros: α - hemolisinas, leucocidinas, β -hemolisinas e as modulinas fenol solúveis (PEREIRA, 2013). Abaixo, na figura 1, pode-se observar alguns dos fatores de virulência citados.

Figura 1 – Esquema dos Fatores de Virulência do *Staphylococcus aureus*



Fonte: Adaptado de: <http://slideplayer.es/slide/1497747/> acesso em 08 de janeiro de 2014

1.2 Origem e mecanismos da multirresistência

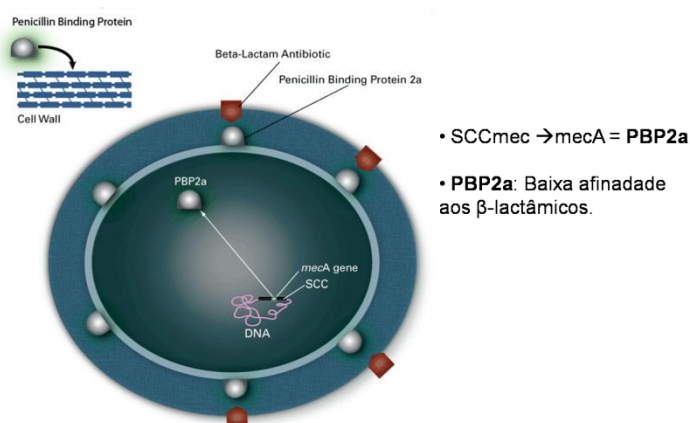
Em 1961, foi descrito o primeiro isolado de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), na Inglaterra (BARBER, 1961). Os elementos de resistência aos antibióticos são muitas vezes adquiridos através da transferência horizontal de genes, a partir de fontes externas, embora mutações cromossômicas e a seleção com antibióticos sejam muito prevalentes. (CHAMBERS & DELEO, 2009). O MRSA é caracterizado quando o *S. aureus* sensível a meticilina (em inglês *methicillin-sensitive staphylococcus aureus* - MSSA) adquire um cassete cromossômico de resistência, o *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec). Os SCCmec tem sido identificados em *S. aureus* e transmitido entre as espécies de estafilococos como um estruturas genéticas móveis carreadoras do gene *mecA*. Há vários tipos de SCCmec, mas todos possuem o complexo gene *mec* contendo o gene *mecA* que codifica a proteína ligadora de penicilina PBP2', também chamada de PBP2a, e o complexo

gene *ccr*, que codifica enzimas recombinases sítio-específicas. A *PBP2'* possui peso molecular igual a 78kDa e reduzida afinidade aos beta lactâmicos. O mecanismo de resistência a meticilina se dá através da alteração das proteínas ligadoras de penicilinas, as *PBPs*. O *S. aureus* produz quatro tipos de *PBPs*: *PBP1*, *PBP2*, *PBP3* e *PBP4*. As cepas de MRSA produzem uma nova *PBP*, a *PBP2'*, a qual determina baixa afinidade à meticilina e a praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos (LOPES, 2005), vide figura 2 exemplificando esse mecanismo de resistência.

Os β -lactâmicos ligam-se às *PBPs* da parede celular, interrompem a síntese do peptideoglicano e, conseqüentemente, levam a morte da bactéria. No entanto, os β -lactâmicos não conseguem se ligar à *PBP2a* devido a sua atividade de transpeptidase. Desta forma, a síntese do peptideoglicano da parede celular é continuada (DEURENBERG *et al.*, 2006).

Enquanto os HA-MRSA (hospital-acquired MRSA) carregam SCCmec dos tipos I a III, os CA-MRSA (community-acquired MRSA) estão mais associados aos tipos IV e V. Os tipos IV e V são elementos genéticos menores e com mais mobilidade que os outros. Esses tipos carregam menos genes determinantes de resistência do que os tipos II e III. Por isso, os CA-MRSA caracteristicamente tendem a ser menos multirresistentes que os HA-MRSA, mantendo em geral sensibilidade à clindamicina, por exemplo (MÍMICA & MENDES, 2007).

Figura 2 - Esquema do mecanismo de resistência à meticilina do *Staphylococcus aureus*



Fonte: <http://depts.washington.edu/hivavids/derm/case6/discussion.html>

Além dos fatores de virulência muito bem definidos e detalhados, assim como o mecanismo de resistência mais estudado e conhecido, como a resistência a meticilina, com a era da proteômica, inúmeros antígenos foram descritos, muitos dos quais ainda não se tem determinada a função específica. Enany e colaboradores, em 2012, fizeram uma pesquisa com um clone de MRSA adquirido da comunidade européia, encontrado na Europa e países

mediterrâneos. Nesse estudo, foi identificado exoproteínas e fatores de virulência, através de duas técnicas de proteômica e, posterior, análise por espectrofotometria de massa. Os autores constataram 174 proteínas distintas com um alto grau de confiança, ou seja, ainda há muito que pesquisar sobre esse patógeno tão importante no “mundo” médico.

1.3 Anticorpos monoclonais

A tecnologia dos hibridomas revolucionou tanto a medicina diagnóstica, como mais recentemente a terapêutica. Em 2009 esta tecnologia mobilizou cerca de 36,4 bilhões de dólares em vendas em todo o mundo, sendo considerado como “ouro líquido” (LEDFORD, 2010). Está entre as tecnologias diagnósticas e farmacológicas mais rentáveis do mundo. Atingiu a sua maturidade tecnológica tendo em vista que o método foi descrito pela primeira vez por Georges Köhler e Cesar Milstein, em 1975, e atualmente possui melhorias de processo que vão desde métodos inovadores de imunização/tolerização até plataformas recombinantes. No entanto, a produção clássica descrita por Georges Köhler e Cesar Milstein continua sendo a sólida base para as ferramentas diagnósticas. Estes autores obtiveram os primeiros anticorpos monoclonais (AcMm) com a descoberta da técnica de hibridização celular somática, a qual permitiu a produção de anticorpos com alta afinidade e única especificidade para um alvo antigênico (ABBAS & LICHTMAN, 2009). Esta técnica consiste na injeção de células ou antígenos no camundongo para estimular a produção de linfócitos B, que produzem diferentes tipos de anticorpos. As células do baço do animal são extraídas (fonte de linfócitos B ativados) e fundidas a células mielomatosas murinas não-secretoras, para a obtenção de células híbridas imortalizadas e produtoras de anticorpos. A linhagem do mieloma apresenta um gene hipermetilado, e mutações que lhe conferem a característica de não possuir a enzima hipoxantina-fosforribosil transferase (HPRT). Esta enzima é reguladora do crescimento celular e responsável pela regulação da síntese de purinas e pirimidinas e pela via de síntese. As células mielomatosas, HGPRT negativas tem a via *de novo* bloqueada e são incapazes de utilizar a via alternativa na presença de hipoxantina-timidina-aminopterina (HAT), contido nos meios de cultura da etapa de fusão celular. Já os linfócitos B, que são HGPRT positivos podem usar a via alternativa, mas são incapazes de se multiplicar indefinidamente. Portanto, somente os híbridos que herdaram o gene HPRT positivo dos linfócitos e a capacidade de crescimento irrestrito dos mielomas irão se multiplicar e crescer indefinidamente com rápida formação de colônias. Os híbridos que secretam o anticorpo desejado são selecionados e clonados para produzir quantidades ilimitadas de anticorpo monoclonal (Köhler & Milstein, 1975) e, subsequentemente, utilizados na técnica de escolha.

Nos últimos dois anos, uma linha de produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra cepas de MRSA foi iniciada no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu. Neste protocolo foram obtidos 6 híbridos de interesse, ou seja, reconhecedores de antígenos sobre a superfície do *S. aureus*, no entanto, problemas de logística impediram a finalização do projeto com a subsequente caracterização. Os Hibridomas foram congelados em nitrogênio líquido a -196°C . Clonar, caracterizar e avaliar o potencial diagnóstico dos híbridos já obtidos e estabelecer técnica inovadora de imunização para obtenção de novos anticorpos anti-MRSA constituíram o desafio desta pesquisa.

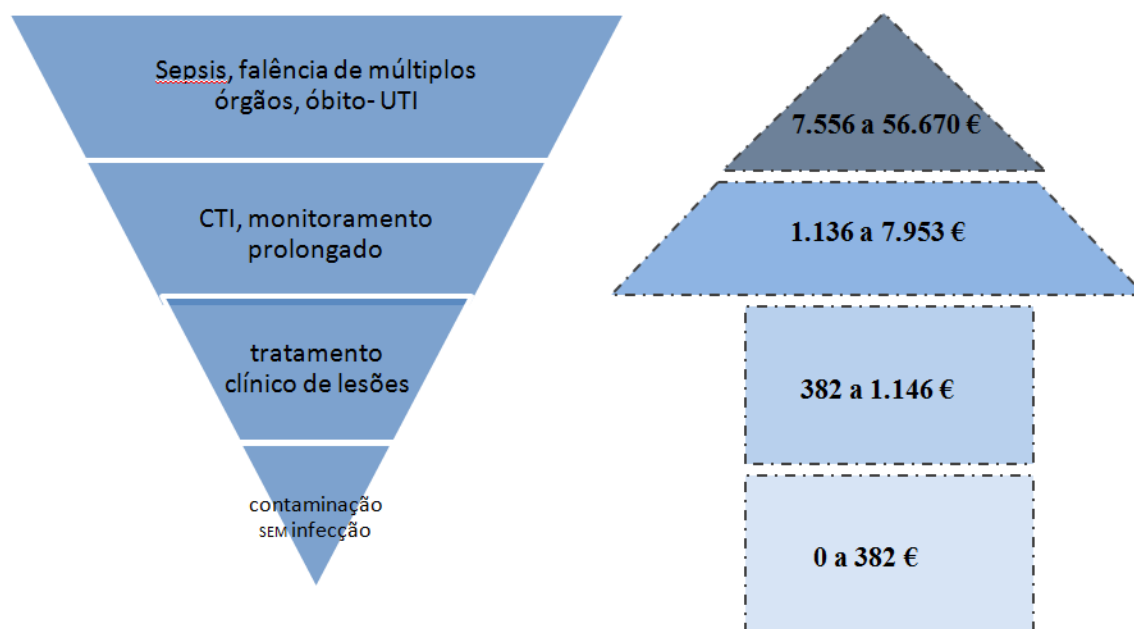
1.4 Obtenção de anticorpos monoclonais anti-MRSA pelo método de imunização subtrativa

A imunização subtrativa (*subtractive immunization*) é uma técnica inovadora e foi utilizada com sucesso para a obtenção de anticorpos relevantes e dirigidos contra antígenos associados à apoptose, invasividade, agressividade e potencial metastático em diferentes relatos (WILLIAMS *et al.*, 1992; BROOKS *et al.*, 1993; TESTA *et al.*, 1999; BOUKERCHE *et al.*, 2000; YANG & WANG, 2002; RASMUSSEN & DITZEL, 2009). Além disso, recentemente foi relatada a obtenção de anticorpos monoclonais específicos a *E. coli* O157:H7 utilizando-se esta técnica (JIN *et al.*, 2012) para controle de alimentos contaminados. A principal modificação introduzida por esta técnica consiste em se reduzir a resposta imune do camundongo contra proteínas imunodominantes comuns, que não sejam de interesse, ou seja, tolerizar o camundongo contra proteínas indesejáveis. Desta forma, aumentam-se as probabilidades de obtenção de anticorpos monoclonais mais específicos e relevantes aos processos funcionais de interesse, como a resistência aos antibióticos (BROOKS *et al.*, 1993).

1.5 Justificativa: O impacto do MRSA no controle da infecção

A infecção hospitalar é a principal causa de morte em pacientes hospitalizados, afeta mais de 2 milhões de pacientes por ano, causando aproximadamente 90.000 mortes por ano, nos Estados Unidos (BURKE, 2003). O custo médio do tratamento varia entre US\$ 14.000 a US\$38.000 por paciente sendo que o custo total pode comprometer até US\$ 4,5 bilhões/ ano (ROBERTS *et al.*, 2003). Desta forma, as infecções por MRSA podem ser consideradas um problema de saúde pública (DUERDEN, 2012), sendo que os custos em euros estão na figura 3.

Figura 3 – Esquema adaptado de Vandijck DM, 2008. Comparação entre o estadiamento clínico da infecção nosocomial e custos.



Fonte: Adaptado de Vandijck DM, 2008

Levando em consideração os 2 milhões de pacientes afetados por ano no mundo, o custo mínimo é de 15 bilhões de euros por ano o que corresponderia a R\$ 48 bilhões em moeda corrente nacional.

O MRSA emergiu como patógeno nosocomial durante as duas últimas décadas e representa um grande desafio em termos de quimioterapia, porque as opções de antimicrobianos eficazes para infecções causadas por estes agentes patogênicos estão perto de se esgotar (GRUNDMANN *et al.*, 2006; LOWY, 2003). Outro aspecto importante a considerar é a redução do tempo de diagnóstico que se relaciona diretamente com a redução da morbidade e mortalidade (LINDSEY *et al.*, 2008).

As infecções hospitalares geram uma problemática de grande impacto para a saúde pública à medida que interferem na assistência médica, repercutindo em custos elevados, aumento do número de internações e acentuada taxa de mortalidade (SILVA, 2003). Desta maneira, com a disseminação do MRSA é necessário adotar programas de vigilância que avaliem o perfil de sensibilidade dos isolados. Além disso, é importante estimular o desenvolvimento tecnológico objetivando métodos mais rápidos e confiáveis que antecipem a escolha da terapêutica mais adequada (DIAB, *et al.*, 2008) e propor métodos de prevenção e vacinas para um avanço no controle da infecção hospitalar.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Produzir e caracterizar anticorpos monoclonais anti-MRSA utilizando o método de imunização subtrativa.

2.2 Objetivos Específicos

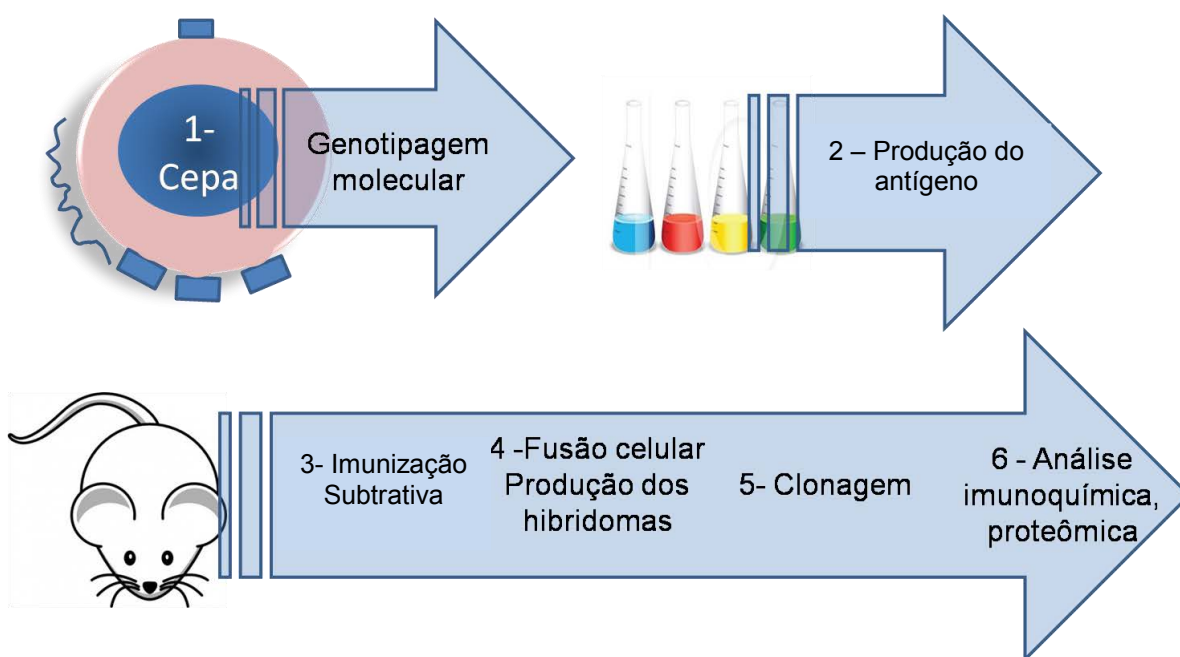
- Estabelecer a produção de hibridomas a partir de imunização subtrativa (protocolo MRSAS 2).
- Clonar e caracterizar os hibridomas obtidos nos protocolos MRSA1 (previamente realizado) e MRSAS 2.
- Determinar classe e subclasse das imunoglobulinas dos clones de interesse, por citometria fluxo.
- Proceder à caracterização imunoquímica e proteômica dos anticorpos obtidos.
- Propor o protótipo de imunosensor com dois diferentes anticorpos monoclonais fixados em fibroína da seda.

Material e Métodos

2.1.1 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto possui 2 fases bem caracterizadas que ocorreram em paralelo. Uma das etapas envolve a produção de anticorpos monoclonais murinos a partir da técnica inovadora utilizando a tolerização contra antígenos “maiores” com posterior infusão do imunógeno, denominada MRSA2. Esta técnica descrita por Brooks *et al.*, em 1993, denomina-se imunização subtrativa. Durante o período de tolerização e imunização ocorreu paralelamente o descongelamento de híbridos obtidos anteriormente por Querino, 2013, em protocolo denominado MRSA1. Estes por sua vez foram obtidos por métodos clássicos de imunização e fazem parte do banco de células do laboratório estando criopreservados em nitrogênio líquido. A partir da obtenção e amplificação dos clones, os procedimentos operacionais são os mesmos em ambos os protocolos. A figura 4 indica os procedimentos que foram realizados nos dois protocolos (MRSA 1 e MRSAS 2)

Figura 4 – Esquema simplificado das etapas que foram desenvolvidas nos dois protocolos de obtenção e caracterização de anticorpo monoclonal murino anti-MRSA



3.1 Genotipagem molecular da cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

A genotipagem da cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) com a colaboração da Professora Dra. Maria de Lourdes R. da Cunha.

Inicialmente, foi realizada a extração de DNA através do Kit Illustra (GE Healthcare®), possibilitando a digestão inicial das células de estafilococos com lisozima e proteinase K. Prosseguiu-se com a detecção de genes de enterotoxinas, TSST-1 e da PBP2a, utilizando *primers* específicos para cada produto pesquisado, listados no quadro 1.

Quadro 1 – Lista dos *primers* utilizados para a detecção dos genes de enterotoxinas, TSST-1 e PBP2a.

<i>Primer</i>	Produto
<i>sea1 e sea2</i>	Enterotoxina A
<i>seb1 e seb2</i>	Enterotoxina B
<i>sec11 e sec12</i>	Enterotoxina C
<i>sed1 e sed2</i>	Enterotoxina D
<i>see1 e see2</i>	Enterotoxina E
<i>seg1 e seg2</i>	Enterotoxina G
<i>seh1 e seh2</i>	Enterotoxina H
<i>sei1 e sei2</i>	Enterotoxina I
<i>tsst1 e tsst2</i>	TSST - 1
<i>mecA1 e mecA2</i>	PBP2a

3.2 Obtenção das frações antigênicas dos extratos das bactérias

As bactérias utilizadas para a produção do extrato antigênico foram: cepas de MRSA (cedida pelo Hospital Municipal de Bauru; MSSA (*S. aureus* ATCC 25923) e E.coli (ATCC 35218) ambas cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Profª Dra Maria de Lourdes R. da Cunha. Essas bactérias foram semeadas em meio de cultura Agar Sangue (Blood Agar Base, Himedia, Mumbai, India) e o inóculo foi padronizado na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL) em 10mL de água de injeção, para proceder a produção do extrato descrita abaixo e esquematizada nos quadros 2 e 3.

Quadro 2- Protocolos realizados para obtenção de antígenos do MRSA.

Protocolo MRSA	Processamento	Material Recuperado
•Fervura •Morte T.A. (48h) e filtração •Banho ultrassônico	•Centrifugação	•<i>Pellet</i>/Sobrenadante •Sobrenadante •Sobrenadante

Quadro 3 – Protocolos realizados para obtenção de antígenos de MRSA, MSSA e E.coli através da Imunização Subtrativa.

Protocolo Imunização Subtrativa (MRSA,MSSA e E.coli)	Processamento	Material Recuperado
• Fervura	• Centrifugação	• <i>Pellet</i>/Sobrenadante

3.2.1 Amostra submetida à fervura

A técnica utilizada segue a metodologia já executada no primeiro protocolo de obtenção de anti-MRSA, denominado protocolo MRSA1 (QUERINO, 2013). O inóculo foi padronizado como descrito acima, segundo a escala de McFarland. Em média, 10^8 UFC de *S. aureus* resistente a metilicina foram semeadas em uma placa de ágar sangue e transferidas para tubo cônico contendo 10mL de água estéril. Este material foi submetido a fervura por 10 minutos. Após fervura, realizou-se o plaqueamento (placa de Ágar, técnica quantitativa) do material para controlar a efetividade da inativação das bactérias. Houve inibição do crescimento e o material foi liberado para o processamento das frações antigênicas. (BLANCO *et al.*, 1997). Sendo assim, o tubo foi centrifugado a 9676,8g por 30 minutos. O sobrenadante foi recuperado e nomeado “sobrenadante fervura” e congelado a -30°C.

A determinação da concentração protéica do antígeno foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop 1000®) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.2 Amostra submetida à morte temperatura ambiente e filtração

Alíquota bacteriana foi imersa em água de injeção e incubada a temperatura ambiente, por 48 horas. Após incubação, a amostra foi centrifugada como descrito acima, foi coletado o

sobrenadante e filtrado em filtro de seringa de 0,22µm (MILLEX®GV). Realizou-se o plaqueamento do sobrenadante filtrado e constatou-se um pequeno crescimento de colônias.

3.2.3 Amostra submetida à morte temperatura ambiente e banho ultrassônico

Alíquota bacteriana foi imersa em água de injeção e incubada a temperatura ambiente, por 48 horas. Após incubação, a amostra foi centrifugada como descrito acima, foi coletado o sobrenadante e colocado em banho ultrassônico Unique® (Modelo USC 1400), numa frequência de 40 kHz por 10 minutos.

3.2.4 Amostras de MRSA, MSSA e E.coli submetidas à fervura

Procedeu-se como descrito no item 3.2.1, com recuperação do *pellet* dessas amostras, para posterior aplicação das injeções referentes à imunização subtrativa.

3.3 Caracterização do extrato antigênico

Para a identificação das frações antigênicas presentes nos quatro extratos de MRSA produzidos, realizou-se a separação em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de 9 cm x 8 cm e 1,0 mm de espessura, com gel de separação de gradiente 10% e empilhamento de 5% (LAEMMLI, 1970), em tampão Tris/Glicina. O extrato antigênico foi diluído em tampão de amostra contendo 2-Mercaptoetanol (1M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol e 50% glicerol) e aquecido por 5 minutos a 95°C. Foram aplicados 70µg de extrato por canaleta e a corrida efetuada em voltagem constante, com 70 volts no gel de empilhamento e 110V no gel de separação. Um padrão de peso molecular (Sigma®- S8445).

Finalizada a corrida, o gel foi deixado sob agitação em solução corante de Azul de Comassie por 2 horas e, em seguida, descorado e fotografado.

3.4 Imunização subtrativa – Protocolo MRSA2

No protocolo prévio realizado com imunização clássica foram obtidos anticorpos que nos testes iniciais mostraram reação cruzada com cepas de MSSA e *E. coli*. Diante destes resultados optou-se por novo método de imunização incluindo a etapa de tolerização contra antígenos que não sejam de interesse. Foram preparados extratos das cepas, e obtidos o *pellet* de ambas as bactérias para a qual se desejava a tolerização. Após a injeção do tolerógeno aplicou-se o quimiotrápico, como modulador da resposta imune. A droga utilizada foi a

ciclofosfamida (CFM) na concentração de 100mg/kg, por via intraperitoneal, conforme descrito (BROOKSet al., 1993; JINet al., 2012). Antes de iniciar o protocolo propriamente dito, foi realizado um piloto com a injeção de CFM, para se analisar o índice de mortalidade dos animais.

Após a validação do uso da ciclofosfamida, iniciou-se o protocolo de imunização propriamente dito. A agenda de imunização foi programada como descrito previamente por Jin *et al.*, 2012, com pequenas modificações por Deffune, 2014. No quadro 4, tem-se o esquema da agenda de imunização.

Quadro 4 – Protocolo de imunização subtrativa para obtenção de anti-MRSA

Dia do Ciclo		Dia do Mês	Injeção
1º Ciclo	1	19/03 (quarta)	50µgPool de <i>E. coli</i> e MSSA + 100mg/kg CFM
	2	20/03 (quinta)	100mg/kg CFM
	3	21/03 (sexta)	100mg/kg CFM
2º Ciclo	15	02/04 (quarta)	50µgPool de <i>E. coli</i> e MSSA + 100mg/kg CFM
	16	03/04 (quinta)	100mg/kg CFM
	17	04/04 (sexta)	100mg/kg CFM
3º Ciclo	31	17/04 (quinta)	50µgde MRSA
	38	24/04 (quinta)	50µgde MRSA
	45	30/04 (quarta)	50µgde MRSA
	54	09/05 (sexta)	50µgde MRSA
Fusão Celular		13/05 (terça)	FUSÃO em 4 animais
4º Ciclo		16/05 (sexta)	50µgde MRSA nos 4 animais restantes
		23/05 (sexta)	50µgde MRSA nos 4 animais restantes
Fusão Celular		27/05 (terça)	FUSÃO em 4 animais

Legenda: 1= MSSA- cepa de *S. aureus* sensível à metilicina; 2=CFM- ciclofosfamida;3=MRSA – cepa de *S. aureus* multi-resistente. Fonte: Arquivo Pessoal, 2014.

3.5 Fusão Celular – Protocolo MRSA 2

Após o término dos ciclos de imunização, os animais foram anestesiados e procedeu-se à esplenectomia. O baço retirado foi transferido ao LEC para processamento e remoção dos linfócitos, como descrito no POP do laboratório e observado na figura 5. O procedimento de fusão foi efetuado por co-centrifugação dos linfócitos recém-coletados de cada animal imunizado juntamente com células NS/1 na proporção de 1/10 e polietilenoglicol PM 4000 (PEG). Os parceiros de fusão foram o NS/1 (linhagem estável de mieloma murino não secretora) e linfócitos B do baço dos camundongos Balb/c previamente imunizados, segundo descrito (KÖHLER & MILSTEIN, 1975 modificado por DEFFUNE, 1992). Os híbridos recém criados foram plaqueados.

Figura 5 – Esplectomia dos camundongos Balb/c imunizados para fusão celular



Legenda: A=anestesia inalatória; B= abertura da parede abdominal e exposição do peritônio; C= decúbito lateral esquerdo – baço na ponta da seta; D= punçamento do baço; E= isolamento do baço em placa de Petri.
Foto: Arquivo pessoal, 2014.

3.6 Seleção dos Hibridomas para Screening – Protocolo MRSA 2

Nesta etapa as placas de 96 poços contendo os hibridomas foram avaliadas em microscópio invertido com luz transmitida (Zeiss Axiovert 200®, Zeiss™). Durante esta investigação foram identificados os poços que possuíam hibridomas translúcidos, com membrana plasmática regular (exemplificado na figura 6) para prosseguir ao *screening* (aspecto de pérolas). Os poços que tinham colônias de fibroblastos aderentes foram descartados (DEFFUNE, 1992).

Figura 6 – Fotomicrografia do híbrido MRSA 2-196, microscopia invertida, aumento de 10x

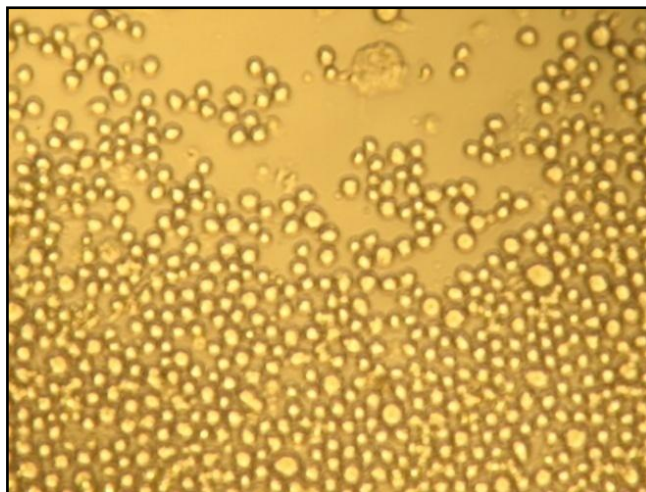


Foto: Arquivo pessoal, 2014.

3.7 Screening dos hibridomas obtidos – Protocolo MRSA 2

Após a cuidadosa inspeção microscópica, foram identificadas os poços de cultura com células saudáveis e mais de 80% de confluência. A marcação é realizada na tampa da placa com círculo correspondendo à localização do híbrido a ser testado. Após esta etapa, em cabine de segurança, os sobrenadantes de cultura (SNC) foram coletados. A condição para a coleta do SNC é de que o poço não tenha tido troca de meio de cultura por pelo menos 48 horas, favorecendo o aumento da concentração de imunoglobulinas.

Os SNC coletados foram testados por ELISA indireto para determinar a presença de anticorpos específicos contra os antígenos utilizados na imunização dos camundongos, conforme descrito por Vicentini-Oliveira, 2010. Os antígenos de *S. aureus* resistente a meticilina foram fixados nas microplacas de fundo chato na concentração de 25µg/mL(*coating*), e posteriormente, 50µg/mL, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (Na₂CO₃/ NaHCO₃ 0,2M, pH 9,6) por 1 hora a 37°C e, em seguida, a 4°C por 12 horas. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com leite desnatado diluído em PBS (PBS (0,14 M NaCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl - pH 7.4 + 5% de leite em pó desnatado).

Os SNC das células obtidas (100µL) foram aplicados na placa de ELISA, assim como os anti-soros dos camundongos pré-imunização (controle negativo) e pós-imunização (controle positivo) obtidos nos protocolos de fusão MRSAS. O meio de cultura estéril também foi utilizado como controle negativo da reação.

O anticorpo secundário escolhido para detectar os anticorpos murinos foi uma IgG de cabra polivalente anti-IgG/ IgM/ IgA de camundongo conjugado a peroxidase (1/10.000), diluído em blotto. A solução cromógena empregada foi o TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Abbot®). Após parar a reação com HCl 1N foi medido a intensidade da reação por análise espectrofotométrica em aparelho leitor de microplacas, com filtro de 450nm. Entre as etapas foram realizadas lavagens com PBS pH 7.4 (0,14 M NaCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl) adicionado de 0,1% Tween 20.

As células cujos sobrenadantes apresentaram-se reagentes frente ao antígeno, foram expandidas para volumes crescentes de meio de cultura e os respectivos sobrenadantes testados por mais duas vezes por ELISA indireto. Aquelas que se mantiveram reagentes até a terceira triagem foram selecionadas para caracterização.

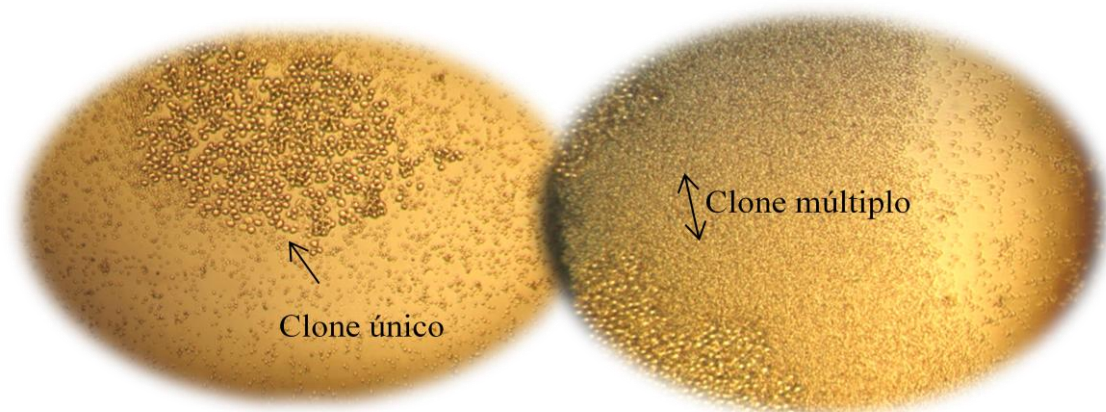
3.8 Clonagem Celular pela técnica de diluição limitante – MRSA-1 e MRSAS- 2

A clonagem foi realizada para o híbrido MRSAS 5-23 (protocolo MRSAS -2) e para o MRSA 2-196 criopreservado, obtido por Querino, 2013, (protocolo MRSA-1).

Para o protocolo MRSA1, após o descongelamento do hibridoma e manutenção do mesmo em cultura foi realizada a confirmação da positividade do anticorpo produzido pelo teste ELISA indireto (VICENTINI-OLIVEIRA, *et al.*, 2010). O hibridoma do protocolo MRSA2 foi clonado antes da etapa de criopreservação, portanto, os poços que se mantiveram com boa reatividade e crescimento celular adequado foram levados à clonagem.

A clonagem foi realizada pelo método de diluição limitante em microplaca (HARLOW & LANE, 1988) com timócitos obtidos de camundongos BALB/c de 15 a 20 dias de idade como células de companhia (*feeder cells*). Na figura 7 podem ser visualizados os clones e ao redor células bem menores, que são as *feeder cells* (timócitos). Na técnica de diluição limitante, é feita uma suspensão de híbridos (após crescimento máximo), a qual foi diluída e distribuída em uma série de orifícios estéreis em uma placa de 96 poços. A finalidade da clonagem é garantir que haja uma única célula (hibridoma) em cada poço da placa de cultura. Através da observação por microscopia invertida, cada poço foi identificado sob a condição de clone único ou múltiplo, sendo que somente os clones oriundos de poços denominados únicos foram considerados potenciais monoclonais.

Figura 7 – Clones em cultura juntamente com os timócitos que atuam como *feeder cells*



Legenda: Observação por microscopia invertida da clonagem. Figura à esquerda: clone único, representado por células maiores e timócitos ao redor representado pelas células menores, aumento de 5x. Figura à direita: clone múltiplo representado pelos grupos de células maiores (indicação na ponta da seta) e ao redor os timócitos, aumento de 10x.
Fonte: Arquivo Pessoal, 2014.

3.9 Screening dos clones – Protocolo MRSA 1 e MRSA 2

Nesta etapa foi realizado o mesmo procedimento descrito no *screening* dos hibridomas, pelo método ELISA Indireto, utilizando-se o SNC dos poços que possuíam colônias de clones translúcidos e com membrana plasmática regular e crescimento adequado (não lento). O mesmo padrão de técnicas e métodos escolhidos foi mantido.

3.10 Citometria de Fluxo

Este ensaio foi proposto para avaliar a especificidade dos anticorpos produzidos em relação a antígenos de superfície do MRSA utilizando o equipamento FACs Calibur BD® com leitura do *Software CellQuest®* na faixa das plaquetas (levando em consideração o tamanho similar do *Staphylococcus aureus*). Para isso, foi preparado tubos com 1×10^7 bactérias MRSA em isoton e paraformaldeído, para a conservação da membrana bacteriana. Destes tubos-mãe, foram distribuídos alíquotas de 100µl para tubos de poliestirenos (contendo 1×10^6 bactérias/mL), onde foram incubados com 200µl de sobrenadante de cultura contendo os anticorpos produzidos (anticorpo primário), sem esquecer dos controles: positivos (do soro do camundongo imunizado e anti-PBP2a comercial), controle auto da população bacteriana e controle do anticorpo secundário para evitar reações inespecíficas. Após incubação sob agitação e temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados e procedeu-se a lavagem com isoton®. O sobrenadante foi aspirado com muito cuidado para não perder o *pellet*, e adicionado o anticorpo secundário anti-imunoglobulina murina IgG e IgM conjugado com isoticianato de Fluoresceína (FITC) conforme descrito por Golim, 2008.

As análises foram realizadas avaliando-se o deslocamento dos *dot plots* (tamanho, granulosidade e expressão de fluorescência) em relação ao eixo estabelecido pelo equipamento.

3.11 Obtenção de anticorpos monoclonais em alta concentração – Protocolo MRSA 1 e MRSA 2

Os anticorpos foram amplificados de duas maneiras distintas: SNC por “bath” de cultura e pelo método de ascite. Para a expansão denominada “bath” de cultura, as células em cultivo (clones) foram mantidas por um período de 8 a 14 dias sem troca de meio de cultura para promover a morte celular, conseguindo-se assim, maior liberação de anticorpos. As células em apoptose foram separadas por centrifugação, desprezadas e o SNC foi congelado em tubos devidamente identificados para posterior análise. Os anticorpos produzidos em líquido ascítico foram obtidos através da injeção de suspensões de clones produtores na cavidade abdominal de camundongos, como pode ser visualizado na figura 8. Inicialmente injetou-se 1mL Pristane® na cavidade abdominal dos camundongos e após 15 dias os clones foram injetados para produção de ascite. O líquido ascítico foi retirado por punção, centrifugado a 12.000g por 30 minutos e o sobrenadante obtido aliquoteado. Ambos foram armazenados em freezer a -80°C.

Figura 8 – Método de Ascite



Legenda: **Figura A**- injeção do clone 2-196A42 via intraperitoneal; **Figura B** – camundongo com volume abdominal aumentado, protusão, grande quantidade de líquido ascítico = momento da coleta.
Fonte: Arquivo pessoal, 2014.

3.12 Purificação dos Anticorpos monoclonais – Protocolo MRSA 1 e MRSA 2

Após determinação de classe/subclasse, os anticorpos monoclonais foram purificados a partir de líquido ascítico por cromatografia de afinidade. O aparelho AKTA Prime (GE Healthcare®) realiza a purificação através da passagem da amostra por colunas que possuem afinidade pela imunoglobulina de interesse, permitindo a eluição da mesma no final do processo.

Para purificar as imunoglobulinas de classe IgM será utilizado a coluna Hi Trap IgM (GE Healthcare®) e para classe IgG a coluna Hi Trap rprotein A (GE Healthcare®).

3.13 Determinação de Classe e Subclasse – Protocolo MRSA 1 e MRSA 2

A técnica de citometria de fluxo foi realizada para determinação da classe e sub-classe das imunoglobulinas murinas produzidas através do kit CBA Flex - IgA, IgG e IgM (BD Biosciences®), utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Cytometric Bead Array (CBA) é um kit utilizado para identificação rápida dos isotipos de cadeia pesada e leve de um anticorpo monoclonal murino em uma única amostra. Cada esfera (*bead*) prevê uma superfície de captura para uma proteína específica. Para a determinação do isotipo, anticorpos reveladores com intensidade de fluorescência diferentes para cada isotipo são colocados após incubação das *beads* com a amostra (sobrenadante de cultura). O kit aliado à citometria de fluxo permite volume de amostra pequena, poucas diluições e rápida execução da técnica. Este produto possibilita a detecção de mais de uma classe e/ou subclasse na mesma amostra (MORGAN et al., 2004).

A leitura foi realizada em citometro de fluxo provido de laser de argônio a 480nm, de 15mW, e as informações obtidas foram analisadas pelo software Cell Quest - BD® por gráficos em “dot plot” para análise.

3.14 Caracterização das frações antigênicas dos extratos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a identificação das frações antigênicas presentes nos 6 extratos produzidos (4 extratos de MRSA, 1 extrato de pellet de MSSA e 1 extrato de pellet de E.coli,) realizou-se a separação em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de 9 cm x 8 cm e 1,0 mm de espessura, com gel de separação de gradiente 10% e empilhamento de 5% (LAEMMLI, 1970), em tampão Tris/Glicina. O extrato antigênico foi diluído em tampão de

amostra contendo 2-Mercaptoetanol (1M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol e 50% glicerol) e aquecido por 5 minutos a 95°C. Foram aplicados 70µg de extrato por canaleta e a corrida efetuada em voltagem constante, com 70 volts no gel de empilhamento e 110V no gel de separação. Um padrão de peso molecular (Sigma®- S8445).

Finalizada a corrida, o gel foi deixado sob agitação em solução corante de Azul de Comassie por 2 horas e, em seguida, descorado e fotografado.

3.15 Caracterização da reatividade imunológica dos anticorpos monoclonais por *Western Blotting*

A separação das frações proteicas dos extratos antigênicos produzidos foi realizada em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de 9 cm x 8 cm e 1,5 mm de espessura, com gel de separação de gradiente 10% e empilhamento de 5% (LAEMMLI, 1970). As condições de corrida e concentração das amostras são semelhantes às já descritas anteriormente.

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad® - 0,45_m) por 1 hora, empregando-se um potencial de 35 mA, em tampão 25mM Tris/Glicina/Metanol, a 4°C (TOWBIN *et al.*, 1979).

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com tampão PBS (0,01M PO₄⁻/0,15M NaCl, pH 7,2) acrescido de 5% de leite em pó desnatado e incubadas, por 14 horas, com os anticorpos. Em seguida, realizou-se a reação com anticorpo anti-IgG/A/M de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:1.000 em BSA 1% por 120 minutos, à temperatura ambiente. As reações foram reveladas com o sistema de detecção *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity substrate* (Pierce, Rockford, IL, USA). Os sobrenadantes de cultura testados não foram diluídos, apenas o anticorpo comercial anti-PBP2a (BBI Solutions®) foi diluído a 1:5000 em tampão PBS (pH 7,4).

3.16 Descrição da Análise Proteômica

Após a caracterização do extrato antigênico por eletroforese e avaliação imunológica dos anticorpos monoclonais produzidos por *Western Blotting*, foi realizada outra corrida eletroforética e recortou-se os *spots* (bandas) de proteínas de interesse dos géis de eletroforese para enviá-los ao Laboratório de Proteômica da Professora Lucilene Delazari dos Santos. Procedeu-se então a digestão protéica *in gel* realizada segundo Shevchenko e colaboradores

(2006). Os *spots* de proteínas foram descoloridos em solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e acetonitrila 50% (v/v). Em seguida, as proteínas contidas nos spots foram submetidas às etapas de redução e alquilação das pontes de dissulfeto na presença de DDT 10 mM e Iodoacetaminda (IAA) 55 mM, respectivamente. Após esta etapa, os géis foram desidratados com acetonitrila 100% (v/v), sendo então, submetidos a centrifugação a vácuo. Os géis desidratados foram incubados com uma solução 12,5 nmol/uL de tripsina (PROMEGA) em tampão bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0 durante 18 horas a 37°C. A hidrólise foi interrompida com a adição de ácido fórmico 1% (v/v) em relação ao volume da amostra e os sobrenadantes foram coletados e secos por centrifugação a vácuo, e posteriormente, analisados por espectrometria de massas.

Para o sequenciamento peptídico por espectrometria de massas do tipo ESI-Q-ToF foi utilizado um equipamento do tipo electrospray (ESI) quadropolo, modelo MicrQ-TOF III (marca BrukerDaltonics), acoplado à um cromatógrafo líquido LC-20AT (marca Shimadzu®). O cromatógrafo líquido é acoplado ao equipamento de espectrometria de massas e composto por um sistema binário de bombas e um aplicador de amostras automático. A fase móvel consiste de água (A) e acetonitrila (B), contendo ácido fórmico 0,1% (v/v) ou TFA 0,1% (v/v). Em adição, a separação cromatográfica foi realizada por meio de um coluna de fase reversa C18 (4,5 mm x 100 mm, 1,8 µm). As condições de eluição é otimizada num gradiente linear de 0 a 85% do solvente B por 60 minutos, num fluxo de 0,2 mL/min. A coluna e o aplicador automático de amostras foram mantidos a 25°C e 10°C, respectivamente. O volume de injeção dos compostos de referência e das amostras foi de 2 µL.

O espectrômetro de massas atuou com 4.5 kV e temperatura de solvatação de 180°C, modo positivo em um intervalo de ionização entre 100 m/z a 1000 m/z, fluxo de nitrogênio de 6 L/min e pressão de 0.8 bar. As amostras foram solubilizadas em acetonitrila 50% (v/v) e TFA 0,1% (v/v) e injetadas usando um fluxo constante de 0,3mL/min. Para as análises de MS/MS foi utilizado o gás nitrogênio como gás de colisão. A energia de colisão utilizada foi de 1 a 200 eV. Os dados foram processados pelo software Bruker Data Analysis (versão 3.3) e analisados pelo *software* Scaffold versão 4.1.

Para finalizar as análises, faz-se uso da Bioinformática proteômica. Após as aquisições dos resultados de espectrometria de massas de cada amostra, os dados são exportados e submetidos à análise automática com a ferramenta de bioinformática MASCOT v.2.1 (www.matrixscience.com) utilizado para auxiliar na identificação das proteínas do presente

trabalho. Os espectros dos peptídeos e das fragmentações obtidos experimentalmente são confrontados com o conjunto de sequências de peptídeos alocada no banco de dados SwissProt. Para aumentar a precisão na determinação das proteínas, serão utilizados os seguintes parâmetros: Enzima: Tripsina como agente de clivagem; Taxonomia: *Bacteria*; Carbamidometilação (cisteína) como modificação fixa; Oxidação (metionina e triptofano) como modificação variável; Nº de clivagens perdidas pela enzima: 1; Massa molecular do tipo: Monoisotópica; Massa molecular: sem restrições; Erro de tolerância de peptídeos $\pm 0,1$ Da e erro de tolerância de MS/MS $\pm 0,1$ Da para análise de MS/MS; Protonação: +1 ou +1,+2, +3 para o estado da carga dos peptídeos; Tipo de instrumento: ESI-Q-ToF.

3.17 Protótipo de Biosensor utilizando anticorpos monoclonal anti-MRSA

Após a purificação dos anticorpos, esta etapa será procedida na Faculdade de Química de Araraquara com a participação do Serviço do Professor Sidney Ribeiro. Esta parceria já existe entre os laboratórios. Uma vez constituído os sensores, estes serão transportados ao LEC, para análise de especificidade. Esta etapa precisa ser realizada na Faculdade de Araraquara em função da necessidade de controle de qualidade dos sensores por espectrofotometria atômica, equipamento não disponível no campus de Botucatu.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa dos resultados envolveu a genotipagem da cepa de MRSA hospitalar oriunda de amostra de paciente internado no Hospital Estadual de Bauru. Foi esta a cepa utilizada por Querino, 2013. No entanto, a autora não havia procedido a confirmação da multiresistência através da genotipagem, o que foi realizado no presente projeto, no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências, Unesp de Botucatu. O resultado confirmou a presença do gene *mecA*, comprovando a multirresistência da cepa utilizada nessa pesquisa. Também foram confirmados os genes para as enterotoxinas G (*seg*), H (*seh*), I (*sei*) e hemolisinas α (*hla*) e δ (*hld*), como pode ser observado no quadro 5.

Quadro 5 – Genotipagem da cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina.

Fatores de virulência	Gene	Expressão
PBP2a	<i>mec A</i>	+
Superantígenos	<i>sea</i>	-
	<i>seb</i>	-
	<i>sec</i>	-
	<i>sed</i>	-
	<i>see</i>	-
	<i>seg</i>	+
	<i>seh</i>	+
	<i>sei</i>	+
Hemolisinas	<i>TST</i>	-
	<i>Hla</i>	+
	<i>hlb</i>	-
	<i>hld</i>	+
Esfoliatinas	<i>ETA</i>	-
	<i>etb</i>	-
	<i>etd</i>	-

Fonte: Laudo do Laboratório de Microbiologia do IBB-UNESP, 2014

Quanto à obtenção e preparo dos extratos antigênicos, seguindo o descrito na metodologia, foram executadas 3 técnicas diferentes, envolvendo MRSA, MSSA e *E. coli*. Pode-se observar na tabela 1, que as amostras 1 (Sobrenadante de MRSA), 4 (*pellet* de MSSA), 5 (*pellet* de *E. coli*) e 6 (*pellet* de MRSA), foram submetidas a técnica de fervura. A amostra 2 (sobrenadante de cultura MRSA) foi obtida através da morte à temperatura ambiente com posterior filtração em filtro de *nylon* 0,22 μ (Millex GN®) e a amostra 3

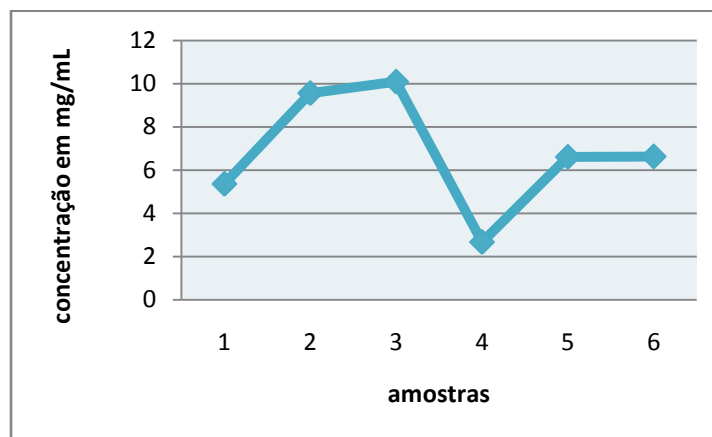
(sobrenadante de cultura de MRSA) foi obtida através da morte à temperatura ambiente com posterior imersão no banho ultrassônico por 10 minutos. O objetivo da mudança metodológica foi o de observar se havia diferença entre os métodos na obtenção quantitativa das proteínas. Observou-se que as amostras submetidas à fervura (1,4,5 e 6) tiveram menores concentrações proteicas quando comparada às outras duas técnicas. A hipótese é de que o método de fervura, apesar de ser considerada universal, promove a destruição e/ou desnaturação de parte das proteínas presentes nas amostras, no entanto, não encontramos descrição na literatura da estabilidade ou instabilidade térmica destas proteínas, nem quais proteínas poderiam estar comprometidas pela fervura. Os dados deste projeto corroboram com Querino, 2013, que obteve 2,25 mg/mL na técnica de fervura. As maiores concentrações proteicas foram identificadas nas técnicas de morte a temperatura ambiente seguido de filtração (amostra 2) e morte a temperatura ambiente seguido de banho ultrassônico (amostra 3), como pode ser observado no gráfico 1, em destaque no quadro vermelho.

Tabela 1–Modo de preparo dos respectivos extratos antigênicos e concentração proteica obtida nas diferentes técnicas de preparo.

Antígeno	Tipo	Concentração mg/mL
Amostra 1- MRSA	SNC - fervura	5,36
Amostra 2 - MRSA	SNC – TA + filtração 0,22μ	9,56
Amostra 3 -MRSA	SNC – TA + banho ultrassônico	10,09
Amostra 4 - MSSA	<i>pellet</i>	2,67
Amostra 5 – E. coli	<i>pellet</i>	6,61
Amostra 6- MRSA	<i>pellet</i>	6,63

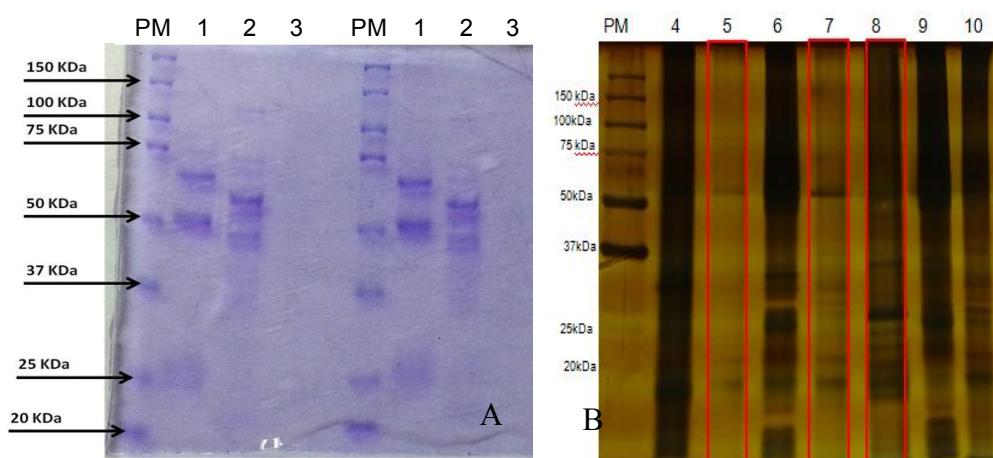
Legenda: Amostra 1- Sobrenadante de MRSA; amostra 2- Sobrenadante de MRSA; amostra 3- Sobrenadante de MRSA; amostra 4- *pellet* de MSSA; amostra 5- *pellet* de E.coli e amostra 6- *pellet* de MRSA.

Gráfico 1 – Comparação das concentrações protéicas (mg/mL) dos diferentes extratos antigênicos obtidos.



Legenda: Amostra 1- Sobrenadante de MRSA; amostra 2- Sobrenadante de MRSA; amostra 3- Sobrenadante de MRSA; amostra 4- *pellet* de MSSA; amostra 5- *pellet* de E.coli e amostra 6- *pellet* de MRSA.

Os extratos antigênicos e SNC obtidos foram caracterizados por Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida e corados com Azul de Comassie (Gibco®), demonstrado na figura 9A. Na primeira pista tem-se o padrão de peso molecular, na pista ao lado observa-se bandas de 65, 50, 30 e 25 kDa referentes a amostra 1 (MRSA: SNC-fervura). Na amostra 2 (MRSA: SNC TA + filtração) visualizou-se bandas de 50 kDa e 45 kDa e na última pista com a amostra 3 (*pellet* de MSSA), não foi visualizado bandas. Diante destes resultados foi realizada outra corrida eletroforética do extrato antigênico (amostra 3: *pellet* de MSSA) e de outros extratos antigênicos não caracterizados anteriormente. O gel foi corado com azul de Comassie (Gibco®) e contra-corado com nitrato de prata (Sigma Aldrich®), figura 9B. As pistas selecionadas no retângulo vermelho, correspondem ao *pellet* de MRSA (amostra 5), ao *pellet* de MSSA (amostra 7) e ao *pellet* de E.coli (amostra 8). Na amostra 5 foram identificadas três bandas fortes: 50, 23 e 18 kDa, respectivamente. Na amostra 7, destacam-se 4 bandas ou “spots” proteicos: uma banda forte de 50 kDa e bandas marcadas fracamente nas regiões de 30 kDa e entre 23 e 18 kDa. Na amostra 8, observam-se uma bandas de 37, 30, 25 e 15 kDa. Assim, pode-se observar que há similaridade entre amostras do *pellet* de MRSA e MSSA. Esses dados estão registrados no quadro 6 abaixo, onde pode se observar que as proteínas contra as quais foram obtidos anticorpos monoclonais se expressam tanto nas cepas de MRSA quanto nas cepas de MSSA.

Figura 9 - Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida, corado com Azul de Comassie.

Legenda: em A : P.M.: padrão de peso molecular; amostra 1: MRSA: SNC-fervura; amostra 2: MRSA: SNC TA + filtração e amostra 3 *pellet* de MSSA. Em duplicata. Em B Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida, corado com Azul de Comassie e contra corado com nitrato de prata. 4: MRSA SNC fervura 4,03mg/mL; 5: MRSA *pellet* 6,63 mg/mL; 6: MRSA SNC fervura, 2,50mg/m; 7 :MSSA *pellet*, 3,41mg/mL;8:E. coli *pellet*,6,68mg/mL;9: MRSASNCfervura 1mg/mL; 10: MRSASNCfervura, 0,50mg/mL.
Foto Arquivo Pessoal, 2014.

Quadro 6 – Amostras dos extratos antigênicos de diferentes cepas utilizadas para a caracterização antigênica da amostra utilizada.

Caracterização das amostra	Gel A (PM em kDa)	Gel B (PM em kDa)
1 - MRSA SN fervura	65, 50, 30, 25	
2- MRSA: SN TA + filtração	50 e 45 kDa	
3 - MSSA	-	
4- SNC de MRSA		Arrasto proteico por excesso de proteínas
5- MRSA <i>pellet</i>		50, 23 e 18
6 -MRSA SN fervura		Arrasto proteico por excesso de proteínas
7 - MSSA <i>pellet</i>		50, 30, 23 e 18
8 - E. coli <i>pellet</i>		37, 30, 25 e 15
9 – MRSA SN fervura		Arrasto proteico por excesso de proteínas
10 - MRSA SN fervura		Arrasto proteico por excesso de proteínas

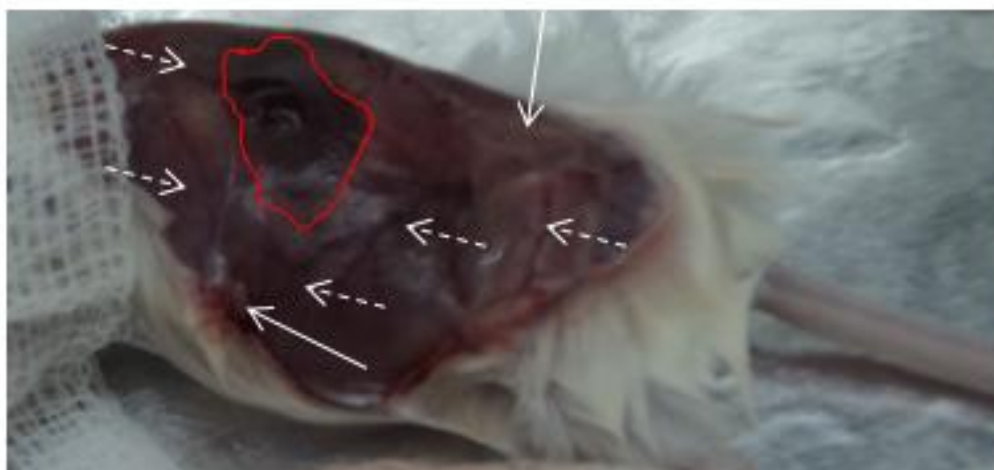
Legenda: PM=Peso Molecular; SN=Sobrenadante
Foto Arquivo Pessoal, 2014.

Quanto à taxa de sobrevivência dos camundongos Balb/C que foram utilizados nos protocolos de imunização, no protocolo clássico foram utilizados por Querino, 2013, 5 animais. Não houve mortalidade de nenhum dos camundongos. No presente protocolo

utilizando a imunização subtrativa, foram utilizados 10 animais sendo que 3 deles foram à óbito. A morte de 30% dos animais está relacionada ao uso da droga imunossupressora, a ciclofosfamida, estes dados corroboram aqueles de McDonald, 2003 que relata o aumento da taxa de mortalidade em humanos transplantados que receberam a dose de 60mg/Kg de peso de CFM no protocolo de quimioterapia ablativa pré-transplante de medula-óssea. A mortalidade identificada relacionou-se com a obstrução de sinusóides hepáticos e trombose determinada pela toxicidade da droga. No presente trabalho, utilizamos a concentração proposta por Jin, 2012, muito superior, no entanto, os autores não relatam se houve ou não aumento da mortalidade, para que se pudesse fazer análise comparativa dos resultados.

Após o período de imunização, procedeu-se a fusão celular dos linfócitos extraídos dos baços dos camundongos imunizados com células de mieloma murino. Durante o procedimento técnico de remoção dos baços, a denominada esplenectomia, foi identificado uma importante aderência dos tecidos adjacentes como epiplon ou omento com aumento importante da vascularização. Este aspecto pode ser observado na figura 10. Esta dificuldade técnica é outra observação relevante no protocolo, pois nos demais protocolos de obtenção e geração de novos hibridomas isto não é apontado. Alguns autores relacionam esta dificuldade às características do antígeno.

Figura 10 - Aspecto operacional da esplenectomia.



Legenda: seta branca contínua mostra tecidos fortemente aderidos; seta branca pontilhada aponta importante vascularização; forma circular em vermelho delimita contorno do baço, com 3X o tamanho normal. Foto Arquivo Pessoal, 2014.

Apesar das dificuldades técnicas para a remoção do baço, em função da importante aderência identificada, o procedimento de remoção dos linfócitos procedeu-se de forma adequada, sendo que o número total de linfomononucleares contados (em cada baço dos sete animais que permaneceram vivos) foi de: $12,6 \times 10^7$; $20,3 \times 10^7$; $2,2 \times 10^7$; $13,7 \times 10^7$; $19,5 \times 10^7$; $16,5 \times 10^7$ e $23,6 \times 10^7$ células. Sendo que nos animais em que foi observada a aderência e hipervascularização periférica, a contagem celular foi menor.

Uma vez obtidos os linfócitos, foi procedida a fusão celular. O resultado de cada uma destas fusões está registrado na tabela 2.

Tabela 2 – Resultado das sete fusões celulares do protocolo de Imunização Subtrativa.

Fusão	Número de Híbridos Construídos	Efetividade da fusão (%)	Número de Híbridos Viáveis	Número de Híbridos Testados	Híbridos Retidos
1	478	40,4	193	193	0
2	670	51,8	347	347	0
3	766	23,1	177	177	0
4	478	12,3	59	59	0
5	670	19,7	132	132	1
6	574	28,5	164	164	0
7	766	41,6	319	319	3
Total	4.402	Média~31,59	1.391	1.391	4

Foram construídos 4.402 híbridos, sendo que a denominação “construído” é utilizada, pois as células colocadas em cultura após a fusão celular, não se tratava nem do linfócito oriundo do baço dos animais nem especificamente da célula neoplásica usada como parceira da fusão. Tratava-se do hibridoma, ou célula construída. A efetividade média das fusões foi de 31,59%. Essa média é baixa quando comparada a taxa de efetividade de fusão obtida nos

protocolos de imunizações tradicionais feitos no Laboratório de Engenharia Celular (LEC). Nos protocolos de obtenção de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos da hemácia humana, foram realizados 7 protocolos denominados ED, por imunização clássica, obtendo um total de 2861 híbridos. A taxa de fusão nestes protocolos foi de 74,56% (MURADOR, 2007). Isto representa uma efetividade 2,42 vezes maior do que a obtida no protocolo de imunização subtrativa.

Dos 4.402 híbridos construídos no protocolo de MRSA's (imunização subtrativa), 1.391 híbridos mantiveram estabilidade em cultura e os respectivos sobrenadantes de cultura foram testados, e 4 células foram identificadas como interessantes e amplificadas, dando uma proporção de 1 híbrido a cada 347 testados. Durante os retestes, apenas um híbrido manteve estabilidade e positividade nos testes. Este fato se dá por conta do rearranjo cromossômico que ocorre nas células após a fusão celular, sendo, portanto, os re-testes obrigatórios.

A comparação dos métodos de Imunização Clássica realizada no projeto de Querino, 2013 e dados referentes ao LEC, com imunização clássica usando a hemácia humana como imunógeno *versus* Imunização Subtrativa pode ser observada na tabela 3.

Tabela 3 – Comparação dos métodos de Imunização Clássica e Imunização Subtrativa.

Método de Imunização	Nº de Híbridos viáveis	Nº de Híbridos positivos	Relação de híbridos positivos/ total de híbridos
Clássica, Querino, 2013	1236	9	1/137
Clássica, LEC, 2007 (imunógeno=hemácia humana)	2861	36	1/80
Subtrativa	1391	1	1/1391

Fonte: arquivo LEC e dados pessoais, 2014

Segundo, Harlow e Lane, autores do livro *Antibodies*, na 6ª edição em 2006, eles propõem que no protocolo clássico deve-se esperar 1 híbrido positivo a cada 1.000 testados; e em um protocolo com hiperimunização (mais que 3 injeções de antígeno), como o realizado por Querino, deve-se esperar obter 1 híbrido positivo a cada 300 testados. Querino, 2013 conseguiu uma média acima da citada pelos autores, evidenciando a maturidade tecnológica do laboratório associada à escolha da técnica de imunização. No entanto, apesar de se obter mais hibridomas, estes obtidos por Querino em 2013 apresentam reação cruzada com a *E. coli*. Comparando a imunização subtrativa com o proposto para protocolos clássicos pelos

autores Harlow e Lane, infere-se que foi alcançada nesse projeto a proporção esperada, sendo essa igual a 1/1391.

O *screening* dos híbridos foi feito pelo método de ELISA Indireto, com os seguintes resultados exemplificados na tabela 4. Das três primeiras fusões realizadas, foram testados 717 híbridos, sendo que nenhum deles apresentou reatividade com o antígeno utilizado no *coating* na concentração de 25µg/mL. Esta concentração foi definida em função dos protocolos de Harlow & Lane na publicação “Antibodies. Após estes resultados, decidiu-se ajustar a concentração de antígeno para 40µg/mL conforme POP do Laboratório e experiência anterior de Vicentini-Oliveira, 2010.

Tabela 4 – Resultado do *screening* dos híbridos por Elisa indireto.

Screening	Híbridos testados	Resultados	Tipo de <i>coating</i>
Fusão 1, 2, 3	717	Todos negativos	25µg/mL (<i>pellet</i> e SNC)
Fusão 4,5,6,e7	674	1 ^o <i>screening</i> : 4 híbridos positivos; 2 ^o <i>screening</i> : 3 negativos e 1 positivo	40µg/mL(<i>pellet</i> e SNC)
7 fusões	1391	1	

O controle negativo teve uma densidade óptica (D.O.) igual a 0,034. O padrão de positividade deve ser três vezes maior ou igual a D.O. do controle negativo ($\geq 3 \times 0.034$: $\geq 0,102$). O controle positivo utilizado foi o soro do camundongo imunizado, com uma D.O. igual a 0,287. A D.O. dos sobrenadantes dos híbridos negativos ficaram entre 0.038 e 0.050. Dos quatro híbridos inicialmente positivos, apenas 1 manteve seu perfil de secreção de AcMm (anticorpo monoclonal), com D.O. aproximada de 0,450.

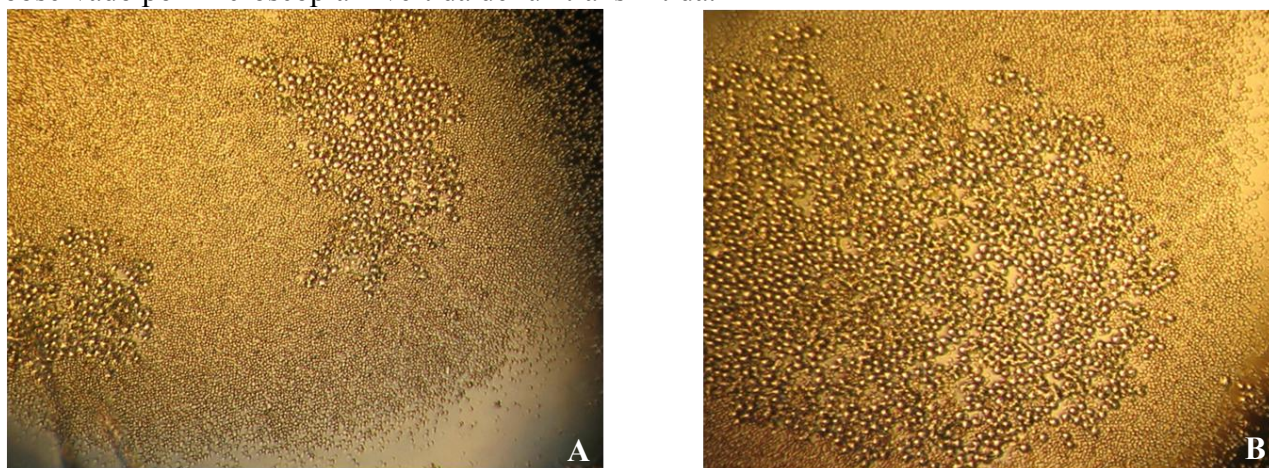
Em relação à clonagem, realizada pela técnica de diluição limitante, foram clonados 1 híbrido do protocolo de imunização subtrativa, denominado MRSAS 5-23 e 1 híbrido do protocolo de Querino, 2013, denominado MRSA 2-196. No total foram construídos 956 clones, com 144 clones viáveis, 64 clones múltiplos e 80 clones únicos, como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 - Resultado das clonagens do híbrido MRSA 2-196 e MRSAS 5-23.

Clonagem	Número de clones construídos	Número de clones Viáveis	Clones Múltiplos	Clones Únicos
MRSAS 5-23	478	60	28	32
MRSA 2-196	478	84	36	48
Total	956	144	64	80

Na figura 11 visualizam-se fotos de um clone único, com apenas um agrupamento de células e na outra foto, um exemplo de clone múltiplo, podendo ter dois ou mais grupos de células.

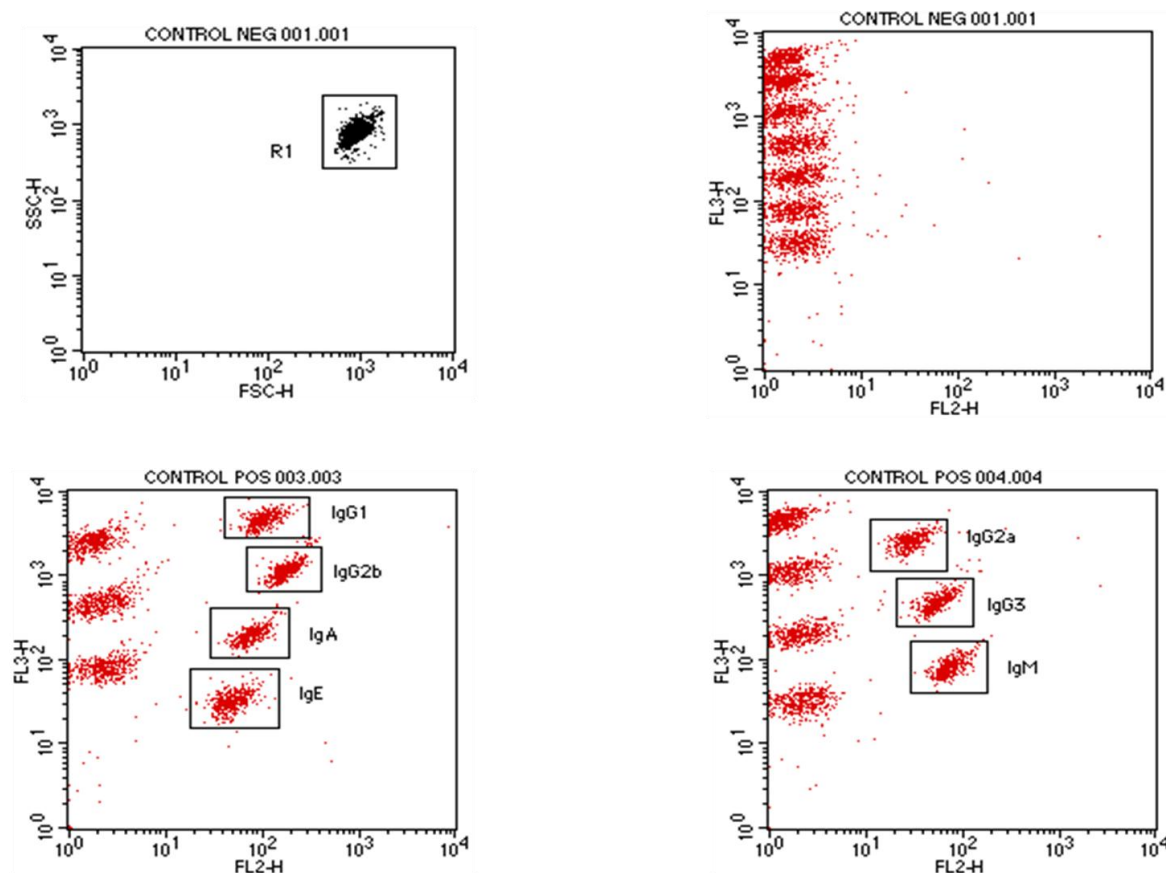
O processo de clonagem envolve o isolamento de uma célula adaptada para crescimento em colônias, portanto, considerado como um processo agressivo e adaptativo. Nem todas as células conseguem esta adaptação desejada. Para minimizar o efeito da “solidão”, são utilizadas *feeders cells*, na forma de tapete. Como pode se observar, a viabilidade da clonagem foi baixa. Dos 956 clones distribuídos a viabilidade média foi de 15,06%. Esta viabilidade corrobora com achados de Jesuíno, 2009.

Figura 11 –Fotomicrografia da clonagem realizada pela técnica de Diluição Limitante, observado por microscopia invertida de luz transmitida.

Legenda: Figura A – exemplo de clone múltiplo; Figura B – exemplo de clone único; ambos sob o tapete de *feeder cells*. Aumento de 5 vezes. Fonte: arquivo pessoal, 2014

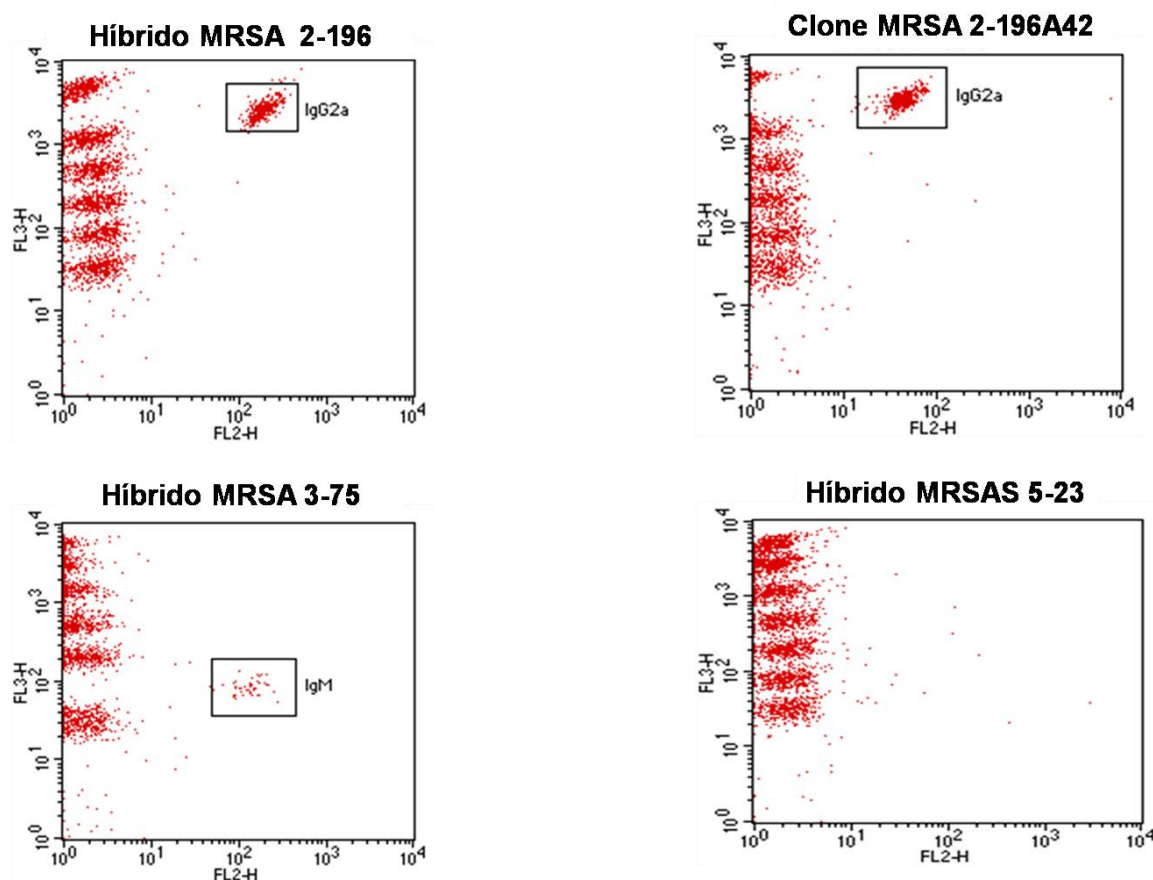
A Determinação de Classe e sub-classe dos híbridos e clones escolhidos foi feita por citometria de fluxo, utilizando o kit CBA flex - IgA, IgG e IgM (BD Biosciences®) – *Cytometric Bead Array* (CBA). Na figura 12, identifica-se no primeiro *plot* à direita a delimitação da população de *beads* e ao lado a marcação do controle negativo. Nos *plots* abaixo temos a marcação dos controles positivos das diferentes classes e sub-classes presentes no kit, como IgG1; IgG2b; IgA; IgE; IgG2a; IgG3 e IgM. Na figura 13, identifica-se que tanto o híbrido MRSA 2-196 como o clone MRSA 2-196A42 são pertencentes a mesma classe e subclasse IgG2a. Isso é devido ao fato de que o híbrido foi extensivamente repicado e selecionado, adquirindo dessa forma as características do clone. O híbrido MRSA 3-75 demonstrou uma marcação fraca para IgM, este híbrido não foi selecionado para testes posteriores. O híbrido MRSAS 5-23 foi negativo no teste CBA, mas foi selecionado como um bom híbrido com resultados importantes em testes posteriores pela técnica de *Western Blotting*.

Figura 12 –Resultado da Determinação de Classe e Subclasse dos anticorpos produzidos pelo kit CBA flex - IgA, IgG e IgM (BD Biosciences®).



Fonte: arquivo compartilhado com o Laboratório de Citometria de Fluxo- Hemocentro de Botucatu, 2014.

Figura 13 - Resultado da Determinação de Classe e Subclasse dos anticorpos produzidos pelo kit CBA flex - IgA, IgG e IgM (BD Biosciences®).

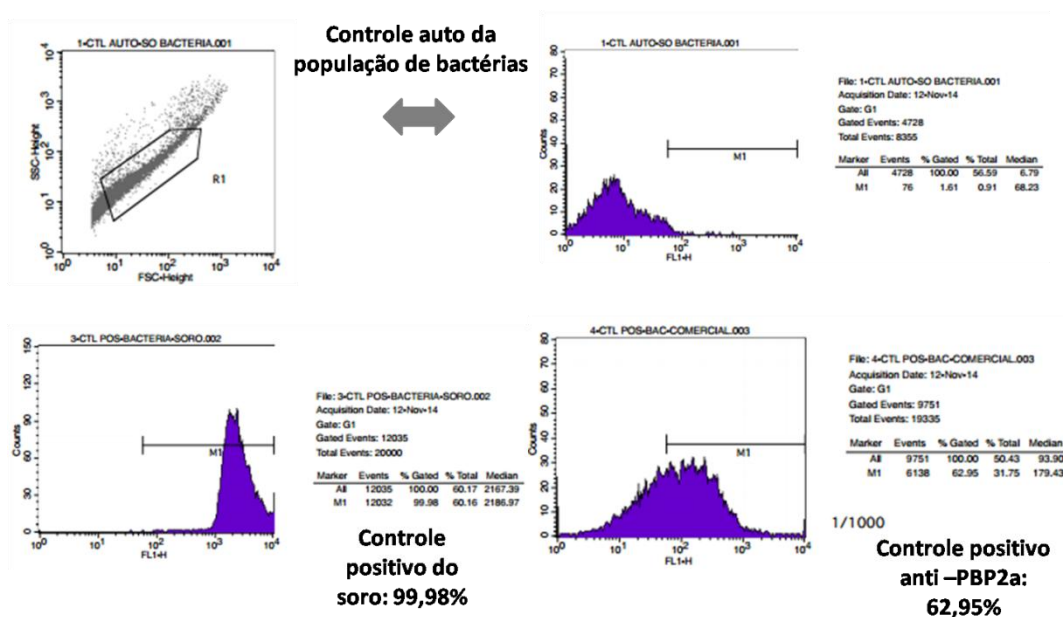


Fonte: arquivo compartilhado com o Laboratório de Citometria de Fluxo- Hemocentro de Botucatu, 2014

Tendo em vista que os testes de *screening* foram realizados por Elisa indireto, optamos também por testar a especificidade dos anticorpos por citometria de fluxo. Estes resultados preliminares foram motivadores. Como observado na figura 14, na primeira imagem temos a delimitação do *gate* de bactérias a ser analisadas. Ao lado, o histograma do controle auto, ou seja, a determinação da taxa de autofluorescência da bactéria, observa-se que 1,61% delas tem auto fluorescência. Foram utilizados 2 controles positivos: 1 o soro do animal imunizado, utilizado como controle nos testes de Elisa e o anticorpo comercial anti-PBP2a, que reconhece *S. aureus* multirresistente. A escolha deste anticorpo foi baseada na hipótese de que obteríamos anticorpos desta especificidade, e de que este imunomarcador seria o controle positivo, o guia para nortear a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos confirmadamente comprovados como cepas de MRSA. O controle do soro do animal imunizado evidencia que o protocolo de imunização subtrativa teve realmente sucesso, com 99,98% de positividade. Já com o uso do anticorpo comercial,

observa-se um achatamento do histograma com desvio para a direita e uma positividade de 62,95%. O número de eventos analisados foi de 20.000, portanto largamente suficiente para que a análise seja considerada válida.

Figura 14—Resultado da Citometria de Fluxo realizada para avaliar a especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos.



Legenda: Controle auto – só bactéria (os dois gráficos acima); controle positivo – bactéria + soro do camundongo (gráfico abaixo e lado esquerdo); controle positivo – bactéria + anticorpo comercial anti-PBP2a (gráfico abaixo e a direita). Fonte: arquivo compartilhado com o Laboratório de Citometria de Fluxo- Hemocentro de Botucatu, 2014.

Abaixo, na figura 15, no primeiro histograma temos o controle negativo do secundário, onde observamos 2,65% de positividade. O primeiro híbrido e clone analisados mostram positividade superior a 96% sendo que o líquido ascítico do clone, não purificado, teve um desempenho um pouco menor, mas ainda assim de 88%.

Figura 15 – Resultado da Citometria de Fluxo realizada para avaliar a especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos.

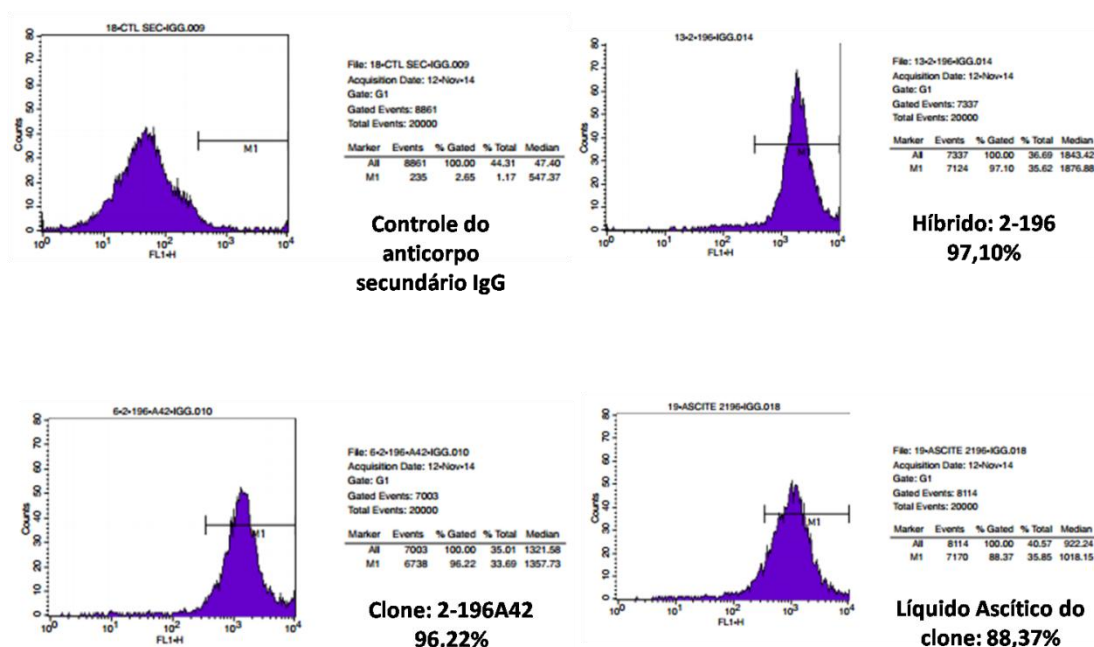


Gráfico acima e a esquerda: controle secundário IgG (bactéria + secundário); gráfico acima e a direita: híbrido 2-196; gráfico abaixo e a esquerda: clone 2-196A42; gráfico abaixo e a direita: líquido ascítico do clone 2-196A42

Fonte: arquivo compartilhado com o Laboratório de Citometria de Fluxo- Hemocentro de Botucatu, 2014

Na figura 16, o histograma acima é o controle do anticorpo secundário de uma IgM. O histograma abaixo é o híbrido da imunização subtrativa (MRSAS 5-23) onde teve positividade de 14,19%. Estes resultados devem ser otimizados após a devida clonagem do híbrido e estabilidade da produção de imunoglobulinas. Na realidade, a clonagem foi realizada, mas por questões técnicas o screening por ELISA não resultou satisfatório e não houve a possibilidade de agendamento para screening por citometria de fluxo. Estas análises deverão ser realizadas na continuidade do projeto. No entanto, resultados do *Western blotting* mostram que se trata de um anticorpo fortemente reagente. Sabe-se que determinados anticorpos podem funcionar bem em uma técnica e não em outra. Isto é facilmente identificável na leitura dos *datasheets* dos reagentes.

Figura 16 – Resultado da Citometria de Fluxo realizada para avaliar a especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos.

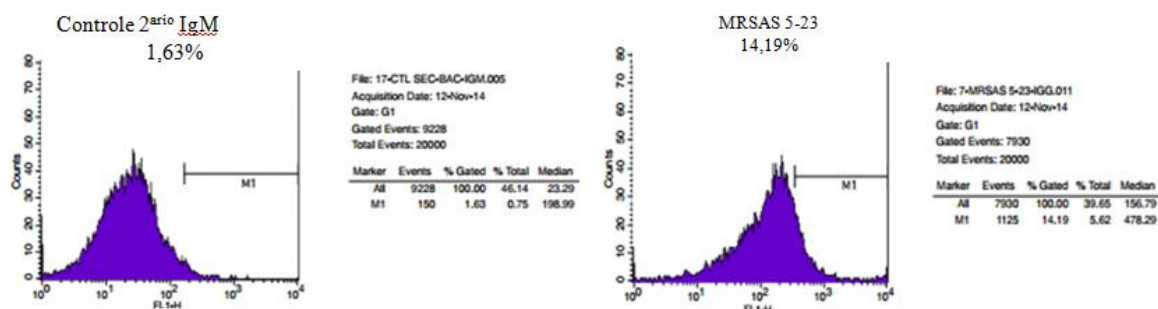


Gráfico acima: controle secundário IgM (bactéria + secundário); gráfico abaixo e a esquerda: MRSAS (subtrativa); híbrido 5-23. Fonte: arquivo compartilhado com o Laboratório de Citometria de Fluxo- Hemocentro de Botucatu, 2014.

Para facilitar a análise da citometria de fluxo, a tabela 6, resume os dados relevantes dos histogramas acima. Observou-se, como esperado, uma grande diferença entre o controle “auto” (1,61%), do controle positivo utilizando o soro do animal imunizado, que portanto tinha a produção de um anticorpo policlonal anti-MRSA (99,98%), enquanto que o anticorpo comercial anti PBP2a (BBI solution®) teve uma positividade de 62,95%. O desempenho, tanto do híbrido MRSA2-196, como de seu clone (2-196A42) foi superponível ao controle positivo usando o soro do animal imunizado.

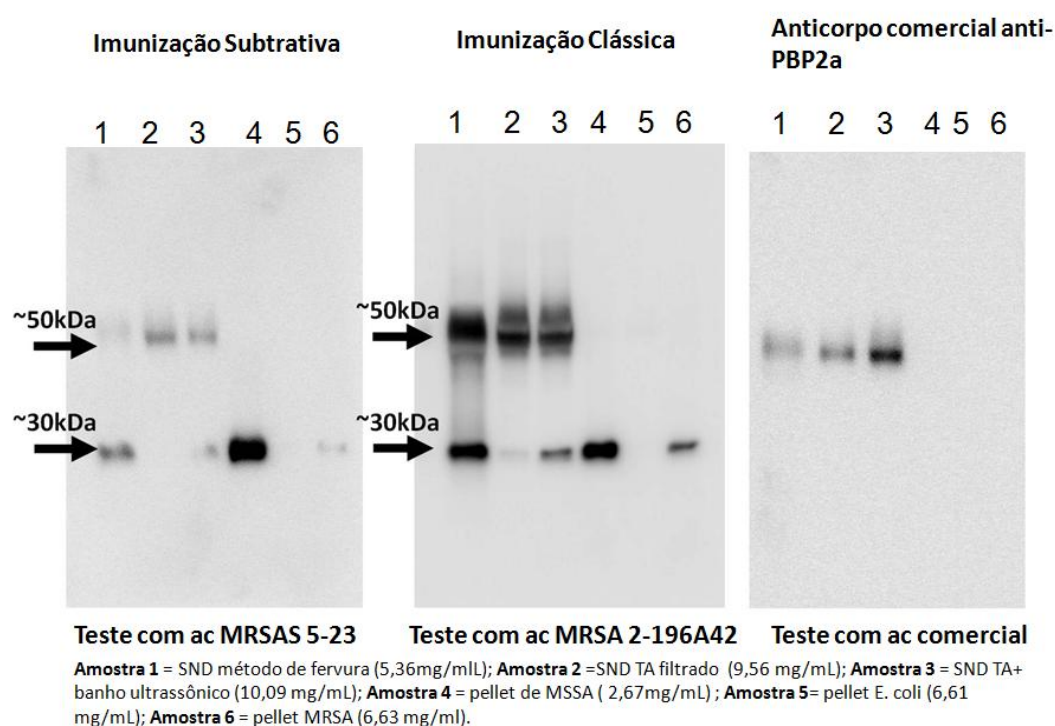
Tabela 6 – Média de Intensidade de Fluorescência, por Citometria de Fluxo.

Amostra	Média de intensidade de Fluorescência
Controle auto da população bacteriana MRSA	1,61%
Controle positivo do soro do camundongo	99,98%
Controle positivo comercial anti-PBP2a	62,95%
Controle secundário – IgG	2,65%
Híbrido MRSA 2-196	97,10%
Clone MRSA 2-196A42	96,22%
Líquido ascítico do clone MRSA 2-196A42	88,37%
Controle secundário - IgM	1,63%
Híbrido MRSAS 5-23	14,19%

A Caracterização da reatividade imunológica dos anticorpos monoclonais obtidos (clone MRSA 2-196A42 e Híbrido MRSAS 5-23) e do anticorpo comercial anti-PBP2a foi realizada pela técnica de *Western Blotting*. Visualizando afigura 17, pode-se discutir que:

- ✓ O extrato antigênico da amostra 2 (SNC+filtração) por ter sido filtrado em filtro de 0,22µm de diâmetro perdeu-se a banda de 30 kDa;
- ✓ Nenhum dos anticorpos apresentam reação com a E.coli (amostra 5);
- ✓ O anticorpo comercial anti-PBP2a indicou a presença de proteína nas amostras 1, 2 e 3, demonstrando a presença dessa proteína no preparado antigênico obtido a partir do sobrenadante mas não no extrato membranário obtido a partir do *pellet* (amostra 6).

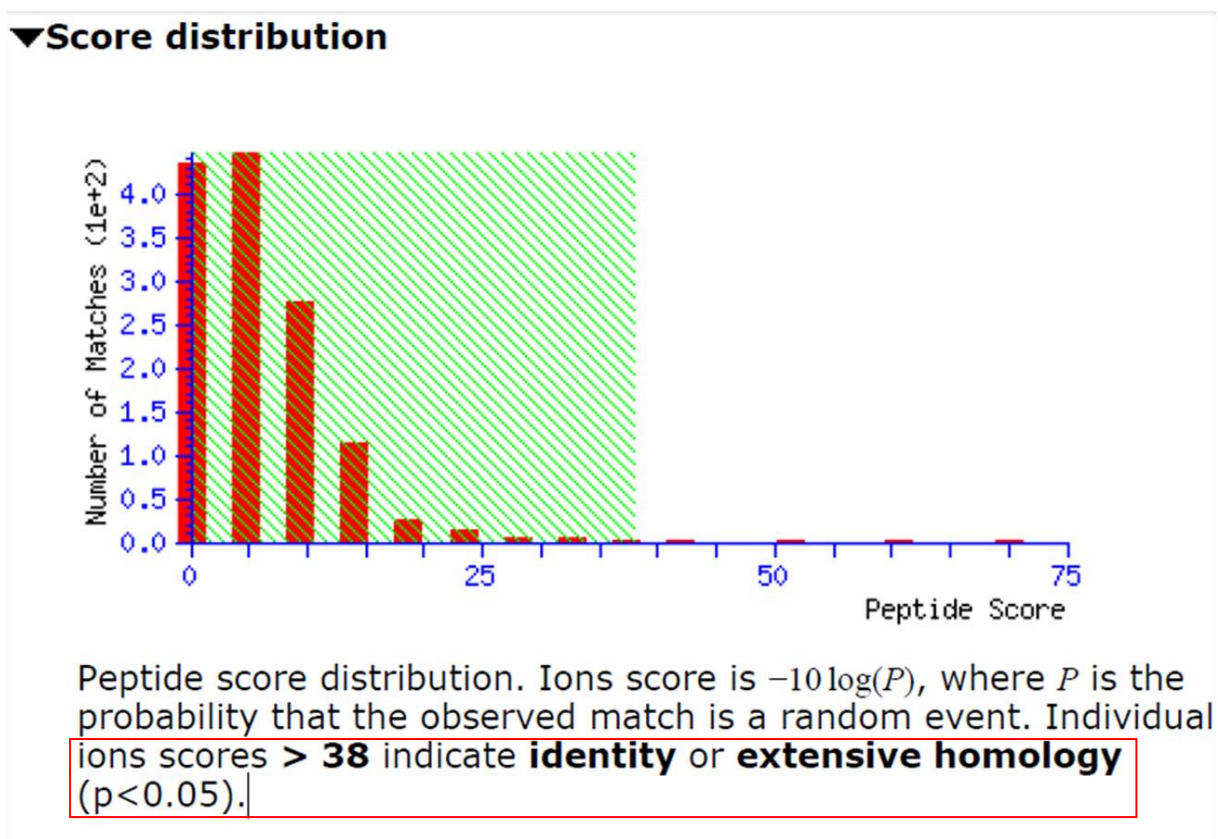
Figura 17 – *Western Blotting* dos anticorpos MRSA 2-194A42, MRSAS 5-23 e do anti-PBP2a comercial.



Em virtude desses resultados, foi proposto fazer a caracterização proteômica das bandas de 30 kDa e de 50 kDa, para a identificação de qual proteína os anticorpos monoclonais produzidos reconhecem. A análise protêomica foi realizada no laboratório da Prof. Dra Lucilene Delazari dos Santos, no CEVAP no Campus Lageado da Unesp de Botucatu-SP.

A banda de 30 kDa , quando analisada por técnicas de proteômica, foi identificada como uma proteína denominada **IsaA**, conforme dados abaixo obtidos da ferramenta de bioinformática MASCOT, vide figura 18. A identidade proteômica está registrada como ISAA_STAAC, Q5HCY1 integrante do UniProtKB/Swiss-Prot a partir de dezembro de 2005, correspondendo ao mesmo perfil da cepa bacteriana utilizada no presente projeto.

Figura 18 – Gráfico de distribuição da pontuação peptídica.



Na figura acima, observa-se a distribuição do escore dos peptídeos, onde o valor de P é menor que 0,05, portanto com significância estatística. Outra observação é sobre a área de distribuição dos peptídeos, que quando $>$ que 38 indica identidade ou homologia extensa. O escore encontrado nesta análise foi de 110, conforme figura 19.

Figura 19 – Proteínas correspondentes ao mesmo conjunto de peptídeos. Análise proteômica realizada com uso da ferramenta MASCOT.

ISAA STAAC	Mass: 24188	Score: 110	Matches: 8(2)	Sequences: 4(1)	emPAI: 0.34
Probable transglycosylase isaA OS=Staphylococcus aureus (strain COL) GN=isaA PE=1 SV=1					
Proteins matching the same set of peptides:					
ISAA STAAE	Mass: 24188	Score: 110	Matches: 8(2)	Sequences: 4(1)	
Probable transglycosylase isaA OS=Staphylococcus aureus (strain Newman) GN=isaA PE=3 SV=1					
ISAA STAAM	Mass: 24189	Score: 110	Matches: 8(2)	Sequences: 4(1)	
Probable transglycosylase isaA OS=Staphylococcus aureus (strain Mu50 / ATCC 700699) GN=isaA PE=1 SV=1					
ISAA STAAU	Mass: 24189	Score: 110	Matches: 8(2)	Sequences: 4(1)	
Probable transglycosylase isaA OS=Staphylococcus aureus (strain N315) GN=isaA PE=1 SV=1					
ISAA STAAS	Mass: 24188	Score: 110	Matches: 8(2)	Sequences: 4(1)	
Probable transglycosylase isaA OS=Staphylococcus aureus (strain MSSA476) GN=isaA PE=3 SV=1					
ISAA STAAU	Mass: 24188	Score: 110	Matches: 8(2)	Sequences: 4(1)	
Probable transglycosylase isaA OS=Staphylococcus aureus GN=isaA PE=1 SV=1					
ISAA STAAW	Mass: 24188	Score: 110	Matches: 8(2)	Sequences: 4(1)	
Probable transglycosylase isaA OS=Staphylococcus aureus (strain MW2) GN=isaA PE=3 SV=1					
ISAA STAA1	Mass: 24189	Score: 110	Matches: 8(2)	Sequences: 4(1)	
Probable transglycosylase isaA OS=Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698) GN=isaA PE=3 SV=1					
ISAA STAA3	Mass: 24188	Score: 110	Matches: 8(2)	Sequences: 4(1)	
Probable transglycosylase isaA OS=Staphylococcus aureus (strain USA300) GN=isaA PE=3 SV=1					
ISAA STAA8	Mass: 24188	Score: 110	Matches: 8(2)	Sequences: 4(1)	
Probable transglycosylase isaA OS=Staphylococcus aureus (strain NCTC 8325) GN=isaA PE=1 SV=1					

Esses dados corroboram com Lorenz e colaboradores, 2000, que identificaram IsaA como uma proteína extracelular do *Staphylococcus aureus* com peso molecular aproximado de 29kDa, durante um estudo para avaliar estruturas imunodominantes que foram expressas in vivo durante a sepse causada por MRSA através de análise de soros humanos.

Em 2002, Vytvytska e colaboradores, através da análise proteômica de soro de pacientes saudáveis e com infecção por *S. aureus* identificaram 15 proteínas candidatas a vacinas, dentre elas, o antígeno imunodominante estafilocócico A, isaA. Os autores classificaram a proteína como tendo uma função putativa de adesão e agregação. Trata-se de uma proteína do tipo transglicosilase lítica ligada à parede celular de forma não-covalente que pode ser encontrada também no sobrenadante de cultura (LORENZ *et al.*, 2000; SAKATA *et al.*, 2005; STAPLETON *et al.*, 2007; Van den BERG, *et.al.*, 2014), dados estes confirmados nesta pesquisa através da análise imunoquímica por *Western Blotting*, onde identifica-se a banda de 30 kDa (IsaA) em amostras de sobrenadante de cultura (amostra 1) e também no *pellet* (amostra 4).

Segundo Ziebandt e colaboradores, 2010, IsaA é uma proteína conservada que é invariavelmente produzida por todos os *S.aureus* isolados e testados até agora, conhecida como antígeno imunodominante estafilocócico A. Devido a essas características, Van den Berg *et. al.*, 2014, consideram IsaA como uma proteína padrão de arrumação celular (“housekeeping”).

Lorenz e colaboradores, em 2011, desenvolveram um anticorpo monoclonal visando a proteína IsaA (anti-IsaA murino IgG1), e testou a sua eficácia terapêutica em um modelo de infecção relacionada com o cateter venoso central (camundongos imunocompetentes) e um modelo de sobrevivência em casos de sepse. Ambos os modelos de infecção demonstraram que a aplicação passiva de anticorpos anti-IsaA reduz significativamente a carga bacteriana em tecidos do hospedeiro em relação aos animais não tratados. *Ex-vivo*, anti-IsaA ativa fagócitos e induz metabólitos reativos de oxigênio altamente microbicida de uma maneira dose-dependente, resultando em morte bacteriana. Este anticorpo, denominado UK-66P, reconheceu todas as cepas de *S. aureus* testadas, incluindo cepas de *S. aureus* resistente à metilicina – hospitalar e adquiridas da comunidade. Quanto ao reconhecimento das cepas de *S. aureus*, os dados obtidos por Lorenz, 2011, corroboram com os dados descritos por van den Berg e colaboradores em 2014, onde afirmam que o anticorpo monoclonal anti-IsaA (IgG 1) humano, chamado 1D9, desenvolvido por eles, reconheceu 26 isolados de *S. aureus* testados, incluindo cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à metilicina (MSSA e MRSA).

Na pesquisa feita por Van den Berg e colaboradores, em 2014, num modelo murino de bacteremia, o tratamento profilático com uma dose única de 5 mg/kg de 1D9 aumentou a sobrevivência de camundongos infectados com *S. aureus* (MSSA) significativamente, porém o tratamento terapêutico com a mesma dose não influenciou a sobrevivência dos animais. Os dados encontrados na eletroforese de proteínas realizadas neste trabalho, com a identificação das mesmas bandas de proteínas no MRSA e MSSA corroboram com os achados de Van den Berg. Somando-se a isso, nem o tratamento profilático e nem o terapêutico com 5 mg / kg 1D9 resultaram na melhoria da sobrevivência de camundongos com bacteremia de MRSA. Os autores propuseram então que o MAb humano 1D9, possivelmente conjugado com, por exemplo, um outro anticorpo, citocinas, antibióticos, quimiocinas, podem resultar em mecanismos valiosos para combater infecções por *S. aureus* em pacientes.

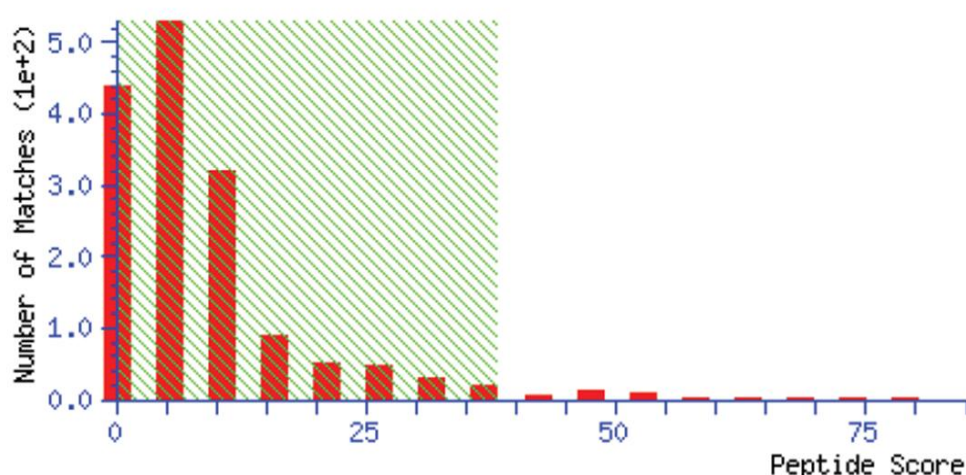
Em 2014, trabalho de Oesterreich e colaboradores, abordando caracterização das funcionalidades biológicas anti-estafilocócica do clone HUK-66, da sub classe IgG1, um anticorpo monoclonal humanizado, anti-IsaA em abordagem imunoterapêutica, concluem que o anticorpo age em amostras de sangue total de paciente em septicemia por *S. aureus*, em especial de pacientes portadores de diabetes, insuficiência renal e doença arterial oclusiva.

Pode-se projetar a utilização deste anticorpo monoclonal para vacinas e imunoterapia.

O segundo anticorpo caracterizado, MRSA2-196A42, reconheceu fortemente uma banda de 50 kDa, a qual através da análise proteômica confirmou a identificação de uma proteína denominada ATP sintase. Na figura 20 e 21, tem-se os dados obtidos do MASCOT. Observa-se que a identidade analisada obteve um escore de 303, quase 10 vezes maior do que a de 38, que já tem significância. Portanto, não há dúvida nesta identidade biológica. O que trouxe preocupação é de que o anticorpo comercial anti-PBP2a utilizado como controle positivo, reconhece uma banda proteica na análise do *W. blotting* correspondente à banda do clone produzido no LEC. Estaria o anticorpo comercial caracterizado de forma equivocada? Esta pergunta merece análises complementares. Quando formulada a hipótese de que a banda reconhecida poderia ser um dímero de uma proteína de peso molecular maior, a análise do software MASCOT, ferramenta de alta precisão, não aponta como válida. Portanto, não há dúvida da identidade proteômica da banda de 50 kDa que os anticorpos produzidos no LEC reconhecem. Em trabalhos anteriores no laboratório, usando anticorpos monoclonais disponíveis no mercado, com registro na ANVISA, para a técnica de citometria de fluxo, problema semelhante já fora identificado. Quando informado sobre o problema, a empresa retirou o anticorpo do mercado.

Figura 20 - Gráfico de distribuição da pontuação peptídica.

▼Score distribution



Peptide score distribution. Ions score is $-10\log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores **> 38** indicate **identity** or **extensive homology** ($p < 0.05$).

Figura 21 - Proteínas correspondentes ao mesmo conjunto de peptídios.

ATPB STAAB	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	emPAI: 1.49
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain bovine RF122 / ET3-1) GN=atpD PE=3 SV=1					
Proteins matching the same set of peptides:					
ATPB STAAC	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain COL) GN=atpD PE=3 SV=1					
ATPB STAAE	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain Newman) GN=atpD PE=3 SV=1					
ATPB STAAM	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain Mu50 / ATCC 700699) GN=atpD PE=1 SV=1					
ATPB STAAH	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain N315) GN=atpD PE=1 SV=1					
ATPB STAAR	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain MRSA252) GN=atpD PE=3 SV=1					
ATPB STAAS	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain MSSA476) GN=atpD PE=3 SV=1					
ATPB STAAAT	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain USA300 / TCH1516) GN=atpD PE=3 SV=1					
ATPB STAAW	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain MW2) GN=atpD PE=3 SV=1					
ATPB STAA1	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698) GN=atpD PE=3 SV=1					
ATPB STAA2	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain JH1) GN=atpD PE=3 SV=1					
ATPB STAA3	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain USA300) GN=atpD PE=3 SV=1					
ATPB STAA8	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain NCTC 8325) GN=atpD PE=3 SV=1					
ATPB STAA9	Mass: 51368	Score: 303	Matches: 47(10)	Sequences: 21(8)	
ATP synthase subunit beta OS=Staphylococcus aureus (strain JH9) GN=atpD PE=3 SV=1					

A descrição para a proteína ATP sintase, segundo o site Uniprot (Universal Protein Resource), é de que ela produz ATP a partir de ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana. As ATP sintases são complexos multiproteicos, de grande tamanho (630 kDa), encontrados nas membranas de bactérias, mitocôndrias e cloroplastos tendo atividades extremamente diferentes, conforme a origem, diferindo seu mecanismo de regulação e suas bases moleculares (WALKER, 2013), sendo fundamentais nos processos de fosforilação oxidativa microbiana. Os sítios catalíticos estão localizados, principalmente, nas subunidades beta, de peso molecular de 50kDa, correspondendo à identidade dos anticorpos produzidos no LEC de Botucatu.

De acordo com Bald e colaboradores, em 2010, as vias metabólicas de energia das bactérias são pouco exploradas como alvos de drogas para os patógenos resistentes gram-positivos e negativos. As bactérias podem produzir ATP por níveis de fosforilação de fontes de carbono fermentáveis ou por fosforilação oxidativa usando a cadeia respiratória e ATP sintase. Em 2005 foi demonstrado por Andries e colaboradores que o bloqueio da enzima ATP sintase por um novo medicamento diarylquinoline, é uma estratégia altamente eficaz para o tratamento de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a drogas.

Balemans e colaboradores em 2012, identificaram um novo fármaco, a diarylquinoline, com atividade inibitória potente contrapatógenos gram-positivos e rápida atividade bactericida em *S. aureus*. Foi confirmado que este inibidor diarylquinoline interage com a subunidade c de ATP sintase e atua como inibidores da síntese de ATP. Esses resultados demonstram uma forte diminuição do número de unidade formadora de colônias (UFC) sobre a regulação negativa da transcrição de genes *atpE*, que codifica a subunidade c F₀ da ATP sintase, indicando uma função importante da enzima ATP sintase, em crescimento e sobrevivência de *S. aureus* (BALEMANS, *et. al.*, 2012).

Ahmad e Cox em 2014 publicaram um artigo definindo a ação da ATP sintase como nanomotor. Nanomotores biológicos são máquinas moleculares encontradas nas células. Estas nanomáquinas “são projetadas” naturalmente para realizar funções específicas, entre elas está a tarefa de usar energia e convertê-la em trabalho mecânico. Os nanomotores moleculares, na sua maioria, proteína como a ATP sintase, fazem o trabalho químico de produção do ATP e energia. Estes nanomotores são denominados como integrantes da categoria biológica, uma vez que existem aqueles não biológicos. Os nanomotores biológicos são máquinas moleculares incríveis que se responsabilizam por processos fundamentais da vida celular, animal, microbiana e vegetal.

As nanobiotecnologias cobrem uma variedade extensa de tecnologias. Trata-se da fusão de biologia celular/molecular com os denominados *nanodevices*, as nanopartículas, os nanomotores de proteínas, as nanoescalas para utilização no estudo ou intervenção das células vivas. O objetivo desta nanotecnologia é o de produzir nanoferramentas relevantes para a solução de problemas médicos e biológicos. A ATP sintase é *um modelo básico, pioneiro no desenvolvimento de nanomotores para uso na nanomedicina. Vai ser de grande interesse para o desenvolvimento de tecnologias híbridas que ligam microfabricação para vários nanomotores biológico* (AHMAD & COX, 2014). O anticorpo obtido no LEC pode ser utilizado entre outras coisas, para a purificação destes nanomotores.

As proteínas IsaA e ATP sintase identificadas pelos anticorpos monoclonais MRSA 2-196A42 e MRSAS 5-23 não foram encontradas por Enany e colaboradores em 2012 quando analisaram exoproteínas e fatores de virulência de dois isolados de MRSA da comunidade europeia ER13 e ER21. Enany e colaboradores propuseram uma classificação para as 174 proteínas encontradas baseada nas respectivas funções biológicas. Dentre as funções citadas por Enany e colaboradores, pode-se encaixar a proteína IsaA na categoria de “divisão celular

e manutenção da célula”, devido o seu papel *housekeeping* citado por Van den Berg e colaboradores em 2014. A proteína ATP sintase pode ser incluída na função de “transporte de carboidrato e metabolismo”, como ressaltado por Balemans e colaboradores em 2012, devido ao papel crucial dessa proteína no crescimento e metabolismo das células bacterianas.

Uma alternativa, e talvez bem sucedida, seria a estratégia de criar uma preparação de mAb que consiste em anticorpos contra diferentes toxinas e, possivelmente, outros fatores de virulência de *S. aureus*, como as proteínas de superfície, para atingir simultaneamente o estabelecimento e exacerbação da infecção. Em teoria, uma terapia de anticorpo seria capaz de inibir aspectos diferentes da patogênese de *S. aureus* (CHEUNG, G.Y.C., & OTTO, M. 2012).

Não foi possível até a conclusão deste trabalho de proceder a purificação de proteínas por imunoafinidade, tendo em vista que o equipamento quebrou. No entanto, amostras dos anticorpos estão no Laboratório da Unesp de Araraquara, em lista de espera para a utilização do equipamento. Na ocasião da defesa desta dissertação será apresentado o resultado da purificação e sua utilização no protótipo do biosensor.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- ✓ Foi estabelecido a produção de anticorpos monoclonais contra antígenos do *S. aureus* pelo método de imunização subtrativa.
- ✓ Foi procedida a clonagem de dois híbridos: 1 do protocolo de imunização clássica e outro do protocolo de imunização subtrativa sendo que a sub-classe determinada foi IgG2a;
- ✓ A caracterização imunoquímica dos anticorpos testados evidenciam que os mesmos tem especificidade anti-IsaA e anti-ATP sintase;

Perspectivas

6. PERSPECTIVAS

- ✓ Purificar os anticorpos e compor o protótipo do biosensor comparando o teste rápido com tecnologias de referência como a citometria de fluxo.
- ✓ Anticorpos anti-IsaA podem ser um componente útil na terapia baseada em anticorpos para profilaxia ou em tratamento adjuvante em casos de infecções com *S. aureus* em humanos.
- ✓ Estabelecer estudos comparativos da ATP sintase de origem microbiana, mitocondrial e vegetal utilizando o anticorpo obtido, para se analisar a possibilidade de uso do mesmo como nanoferramentas.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z.; COX, J. L. ATP Synthase: The Right Size Base Model for Nanomotors in Nanomedicine. **The Scientific World Journal**, p. 1-10, 2014.

ANDRIES, K. et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 307, p.223–227, 2005.

BALD, D.; KOUL, A. Respiratory ATP synthesis: the new generation of mycobacterial drug targets? **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 308, p.1–7, 2010.

BALEMANS, W. et al. Novel Antibiotics Targeting Respiratory ATP Synthesis in Gram-Positive Pathogenic Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v.56, p. 4131–4139, 2012.

BARBER, M. Methicilin – resistant staphylococci. **J Clin Pathol**. v. 14, p. 385-393, 1961.

BLANCO, M. et al. Factores de virulencia y serogrupos o de *E.coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias. **Enferm. Infecc. Microbiol**. v. 13, p. 236-241, 1995.

BOUKERCHE, H. et al. A new Mr 55,000 surface protein implicated in melanoma progression: association with a metastatic phenotype. **Cancer Res**. v. 60, p. 5848-5856, 2000.

BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PREVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. **FEMS Microbiol Rev** **28**, p. 183–200, 2004.

BROOKS, P.C.; LIN, J.M.; FRENCH, D.L.; QUIGLEY, J.P. Subtractive immunization yields monoclonal antibodies that specifically inhibit metastasis. **J Cell Biol**, v. 122: p. 1351-1359, 1993.

BURKE, J. P. Infection control - a problem for patient safety. **N Engl J Med.**, v. 348, p. 651-656, 2003.

CAVASSINI, M.; WENGER, A.; JATON, K.; BLANC, D. S.; BILLE, J. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, v.37, n.5, p. 1591-4, 1999.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Review: Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature**, v. 7, p. 629 – 64, 2009.

CHAPINI, K. C.; MUSGUNUG, M. C. Evaluation of Penicillin Binding Protein 2a Latex Agglutination Assay for identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* directly from Bloods Cultures. **J. Clin Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1283-84, 2004.

CHEUNG, G. Y. C.; OTTO, M. The potential use of toxin antibodies as a strategy for controlling acute *Staphylococcus aureus* infections. **Expert Opin Ther Targets**, v. 16, p. 601–612, 2012.

CLSI/ NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute / National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Normas de desempenho para testes de suscetibilidade antimicrobiana**; 21º suplemento informativo, documento M100-S21,; v. 31, n.1, p. 68-80, 2011.

CUEVAS, O.; CERCENADO, E.; GUINEA, J.; SANCHEZ-CONDE, M.; BOUZA, J. Evaluation of the MRSA latex agglutination test (PBP2a) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and performance against borderline oxacillin-resistant isolates. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 43rd, 2003.

DEFFUNE, E. **Obtention d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre le troisième composant Du complément**. Interet in immunohematologie. 1992. Tese (Doutorado) – Universidade Pierre et Marie Curie – VI, Paris, 1992.

DEURENBERG, R. H. et AL. Review: The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ;**Clin Microbiol Infect.**, v. 13, p. 222–235, 2007.

DIAB, M.; EL-DAMARAWY, M.; SHEMIS, M. Rapid identification of methicillin-resistant staphylococci bacteremia among intensive care unit patients. **Medscape J Med**, v. 10, n. 5, p. 126, 2008.

DOVER, J. E.; HWANG, G. M.; MULLEN, E. H.; PROROK, B. C.; SUH, S. J. Review: Recent advances in peptide probe-based biosensors for detection of infectious agents. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, p.10–19, 2009.

DUERDEN, B. MRSA: why have we got it and can we do anything about it? **Eye (Lond)**, v. 26, p. 218-221, 2012.

ENANY, S. et al. Extensive proteomic profiling of the secretome of European community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone. **Peptides**, v. 37, p. 128–137, 2012.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, New York: Springer Verlag,, p. 119-166, 2001.

GRUNDMANN, H.; AIRES-DE-SOUSA, M., BOYCE, J.; TIEMERSA, E. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **Lancet Infect Dis.**, v. 368, p. 874-885, 2006.

GOLIM, M. A. **Obtenção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos de superfície de linfócitos B humanos para aplicação diagnóstica e terapêutica (fase murina)**. 2008. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. Gel Electrophoresis of Proteins: A Pratical Approach 3rd Edition, **The Pratical Approach Series**. Oxford University Press, 1998.

HARLOW, E.; LANE, D. Les anticorps monoclonaux. In: HARLOW, E.; LANE, D. **Anticorps: un manuel de laboratoire**. Paris: Éditions Pradel, p. 196-214, 1991.

JESUÍNO, D. B. **Implementação da clonagem por micromanipulação versus clonagem por diluição limitante**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

JIN, M. et al. A Rapid Subtractive Immunization Method to Prepare Discriminatory Monoclonal Antibodies for Food *E. coli* O157:H7 Contamination. **Plos One**, v. 7, p. 1-7, 2012.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Staphylococcus and Micrococcus. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Eds). **Manual of Clinical Microbiology**, American Society for Microbiology, p. 264-282, 1999.

KONEMAN, E. W. et. al. **Diagnostico microbiológico. Texto e atlas colorido**. 5 ed., Brasil, MDSI Editora Médica Científica LTDA, p.1465, 2001.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-684, 1970.

LEDFORD, H. Biosimilar drugs poised to penetrate market. **Nature**, v. 468, p. 18–19, 2010.

LOPES, H. V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Rev Panam Infectol.**, v. 7, p. 34-36, 2005.

LORENZ, U. et al. Functional Antibodies Targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* Augment Host Immune Response and Open New Perspectives for Antibacterial Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 165–173, 2011.

LORENZ, U. et al. Human anti-body response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 29, p. 145–153, 2000.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 1265-73, 2003.

MCDONALD, G. B. et al. Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 101, p. 2043-2048, 2003.

MÍMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, p. 399-406, 2007.

MORGAN, E. et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinic. Immun.** v. 110, p. 252-266, 2004.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29; p. 168-178, 2007.

OESTERREICH, B. et al. Characterization of the biological anti-staphylococcal functionality of hUK-66 IgG1, a humanized monoclonal antibody as substantial component for an immunotherapeutic approach. **Hum. Vaccin. Immunother.** v. 10, p. 926-937, 2014.

QUERINO, G. **Produção de Anticorpo monoclonal murino dirigido contra a PBP2a do *S. aureus* resistente a metilina.** Tese (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

RASMUSSEN, N.; DITZEL, H. J. Scanning the cell surface proteome of cancer cells and identification of metastasis-associated proteins using a subtractive immunization strategy. **J. Proteome Res.**, v. 8, p. 5048-5059, 2009.

ROBERTS, R.R. et al. The use of economic modeling to determine the hospital costs associated with nosocomial infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 1424-1432, 2003.

SAKATA, N., TERAUBO, S., MUKAI, T. Subcellular location of the soluble lytictransglycosylase homologue in *Staphylococcus aureus*. **Curr. Microbiol.**,v. 50, p. 47–51, 2005.

SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J. V., MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2856-2860, 2006.

SILVA, P. Hospital infection in the context of the health policies established by the state of Santa Catarina. **Rev Lat Am Enf.**, v. 11, p. 108-114, 2003.

STAPLETON, M. R. et al. Characterization of IsaA and SceD, two putative lytic transglycosylases of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 7316–7325, 2007.

TESTA, J. E.; BROOKS, P. C.; LIN, J. M.; QUIGLEY, J. P. Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. **Cancer Res.**, v. 59, p. 3812-3820, 1999.

TOWBIN, J.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

VAN DEN BERG, S. et al. A human monoclonal antibody targeting the conserved staphylococcal antigen IsaA protects mice against *Staphylococcus aureus* bacteremia. **International Journal of Medical Microbiology**, p. 1-10, 2014.

VANDENESCH, F.; LINA, G.; HENRY, T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 2, p. 1-15, 2012.

VANDIJCK, D. M. et al. Daily cost of antimicrobial therapy in patients with Intensive Care Unit-acquired, laboratory-confirmed bloodstream infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 161-165, 2008.

VICENTINI-OLIVEIRA, J. C. et al. *Taenia saginata*: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens. **Exp Parasitol.**, v. 126, p. 621-625, 2010.

VYTVYTSKA, O. et al. Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. **Proteomics**, v. 2, p. 580–590, 2002.

WALKER, J. E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 41, p. 1–16, 2013.

WILLIAMS, C. V.; STECHMANN, C. L.; MCLOON, S. C. Subtractive immunization techniques for the production of monoclonal antibodies to rare antigens. **Biotechniques**, v. 12, p. 842-847, 1992.

YANG, L. J.; WANG, W. L. Preparation of monoclonal antibody against apoptosis-associated antigens of hepatoma cells by subtractive immunization. **World J Gastroenterol.**, v. 8, p. 808-814, 2002.

ZETOLA, N.; FRANCIS, J. S.; NUERMBERGER, E. L.; BISHAI, W. R. Review: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. **Lancet Infect. Dis.**, v. 5, p. 275–286, 2005.

ZIEBANDT, A.K. et al. Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. **Proteomics**, v. 10, p. 1634–1644, 2010.