

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA
IMUNODIAGNÓSTICO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE CAUSADA
POR *Paracoccidioides lutzii***

FRANCINY MARA DE LIMA NEVES

ORIENTADOR: Prof. Dr. Andrei Moroz

ARARAQUARA - SP

2020

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

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA
IMUNODIAGNÓSTICO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE CAUSADA
POR *Paracoccidioides lutzii***

FRANCINY MARA DE LIMA NEVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Andrei Moroz

ARARAQUARA - SP

2020

N514p

Neves, Franciny Mara de Lima.

Produção de anticorpos monoclonais para imunodiagnóstico de paracoccidiodomicose causada por *Paracoccidoides lutzii* / Franciny Mara de Lima Neves. – Araraquara: [S.n.], 2020.
102 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Andrei Moroz.

1. Anticorpos monoclonais. 2. Imunização. 3. Paracoccidiodomicose.
I. Moroz, Andrei, orient. II. Título.

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

CAPES: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA
IMUNODIAGNÓSTICO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE CAUSADA POR
Paracoccidoides lutzii

AUTORA: FRANCINY MARA DE LIMA NEVES

ORIENTADOR: ANDREI MOROZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ENGENHARIA DE
BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão
Examinadora:

Prof. Dr. ANDREI MOROZ

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

Profa. Dra. ELENICE DEFFUNE

Departamento de Urologia / Faculdade de Medicina - UNESP Botucatu

Profa. Dra. MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI

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

Araraquara, 31 de julho de 2020

A ciência se compõe de erros que, por
sua vez, são os passos até a verdade.

Júlio Verne

Dedico a Ronaldo José Neves, meu padrinho que deixou eternamente em mim a consciência da beleza que o conhecimento emana, um exemplo de dedicação e conquista e um sentimento de saudade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre esteve à frente dos meus passos nesta jornada.

Após, agradeço aos meus pais e meu irmão, os quais me apoiaram e fizeram o possível e o impossível – sem medir quaisquer esforços – para que eu pudesse chegar nesta etapa.

À toda minha família que sempre incentivou e me deu força para continuar a buscar meus objetivos, não deixando jamais o desânimo tomar conta de mim.

Ao meu namorado, Glauco, pelo incentivo, compreensão e parceria em todo esse caminho.

Agradeço também ao professor Andrei Moroz, que aceitou a missão de orientar o presente trabalho.

À Marina, que trouxe muito conhecimento e auxílio em toda essa caminhada e à toda equipe da Proteômica, em especial ao Breno, que tornou essa fase da minha vida agradável de ser vivida.

Aos professores e equipe do programa de pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos e que se sacrificam para reverterem as dificuldades oferecidas pelo sistema público de ensino e tornarem esse curso possível.

A todos meus amigos, especialmente ao Víttor Paulo, pois estiveram sempre ao meu lado apoiando e aliviando todas as dificuldades.

A vocês, que tornaram este sonho realidade, o meu muito obrigada.

RESUMO

Doenças relacionadas ao reino *Fungi* vem aumentando consideravelmente devido as alterações do sistema imunológico, resultando em 1,5 a 2 milhões de mortes por ano. Uma destas é a paracoccidioidomicose (PCM) - uma micose sistêmica, endêmica da América Latina causada por *P. brasiliensis* e espécies relacionadas como o *P. lutzii*. Com a descoberta de novas espécies de *Paracoccidioides* spp e sua alta variabilidade antigênica, seu diagnóstico pode ter um número substancial de resultados falsos negativos. Assim, o desenvolvimento de novas ferramentas capazes de reconhecer antígenos diferencialmente expressos é de suma importância. Com a finalidade de melhorar parâmetros sorológicos para o diagnóstico de PCM causado por *P. lutzii*, este estudo apresenta uma estratégia inovadora de imunização, que visa a obtenção de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer epítomos antigênicos específicos. Para isto, foi utilizada a técnica de imunização subtrativa de múltiplas tolerizações, utilizando como tolerógeno antígenos livres da parede do fungo (CFA) derivado de *P. brasiliensis* e como imunógeno o CFA derivado de *P. lutzii*. A ciclofosfamida foi empregada durante as etapas de tolerização, a fim de depletar linfócitos T e B responsivos a epítomos antigênicos de *P. brasiliensis*, aumentando o direcionamento da resposta imune a epítomos determinantes de *P. lutzii*. A obtenção do CFA de ambas as espécies de *Paracoccidioides* foi conduzida com sucesso e através dos ensaios de eletroforese e *western blotting*, pode-se constatar que o material antigênico de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* possui um vasto repertório de conteúdo proteico, otimizando seu emprego para a obtenção de anticorpos monoclonais voltados a novos biomarcadores da doença. Durante a execução do protocolo subtrativo, a dose do fármaco empregada (200 mg/kg) foi altamente tóxica para os camundongos, culminando com a mortalidade de 100% destes antes do término da etapa de tolerização. Dessa maneira, um segundo protocolo de imunização foi realizado, utilizando uma dose menor (150 mg/kg) que demonstrou diminuição dos efeitos colaterais, prologando a sobrevivência desses, embora tenha sido ineficiente em mantê-los vivos até o final do protocolo. Assim, padronizou-se o protocolo com doses de 100 mg/kg, o qual garantiu a sobrevivência dos animais, enquanto apresentou resultados satisfatórios quanto a imunossupressão dos mesmos. A reatividade do soro policlonal dos camundongos submetidos a imunização demonstrou baixa reatividade pelo tolerógeno, predizendo que múltiplos ciclos de tolerização culminam com a depleção de linfócitos T e B reativos a antígenos não desejados, como era esperado. Os hibridomas gerados na fusão celular apresentaram resultados promissores em seus *screenings* para 32 diferentes hibridomas policlonais, dos quais três foram selecionados para clonagem devido a sua alta reatividade aos antígenos de *P. lutzii* quando comparada aos antígenos de *P. brasiliensis*. Da clonagem, foi obtido um clone único com reatividade não exclusiva a *P. lutzii*, mas, ainda assim, com potencial uso no diagnóstico da doença.

Palavras-chaves: anticorpos monoclonais, imunização, paracoccidioidomicose.

ABSTRACT

Diseases related to the Fungi kingdom are increasing considerably due to changes in the immune system, resulting in 1.5 to 2 million deaths per year. One of these is paracoccidioidomycosis (PCM) - a systemic mycosis, endemic to Latin America caused by *P. brasiliensis* and related species such as *P. lutzii*. With the discovery of new species of *Paracoccidioides* spp and their high antigenic variability, their diagnosis can have a substantial number of false negative results. Thus, the development of new tools capable of recognizing differentially expressed antigens is of paramount importance. To improve serological parameters for the diagnosis of PCM caused by *P. lutzii*, this study presents a novel immunization strategy, which aims to obtain monoclonal antibodies capable of recognizing specific antigenic epitopes. For this, the technique of multiple tolerations subtractive immunization was used, using as tolerogen the fungal wall antigens (CFA) derived from *P. brasiliensis* and as immunogen the CFA derived from *P. lutzii*. Cyclophosphamide was used during the toleration steps to deplete T and B lymphocytes responsive to *P. brasiliensis* antigenic epitopes, increasing the targeting of the immune response towards *P. lutzii* determinant epitopes. CFA of both species of *Paracoccidioides* was successfully obtained and through electrophoresis and western blotting assays, it can be seen that the antigenic material of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* has a vast repertoire of protein content, optimizing its use to obtaining monoclonal antibodies and new disease biomarkers. During the execution of the subtractive protocol, the dose of the drug used (200 mg / kg) was highly toxic to the mice, culminating in 100% mortality before the end of the tolerization stage. In this way, a second immunization protocol was performed, using a lower dose (150 mg / kg) that demonstrated a decrease in side effects, extending their survival, although it was inefficient in keeping them alive until the end of the protocol. Thus, the protocol was standardized with doses of 100 mg / kg, which guaranteed the survival of the animals, while presenting satisfactory results regarding their immunosuppression. The reactivity of the polyclonal serum of mice submitted to immunization demonstrated low reactivity to the tolerogen, predicting that multiple cycles of toleration results in the depletion of T and B lymphocytes reactive to unwanted antigens, as expected. The hybridomas generated in cell fusion showed promising results in their screenings for 32 different polyclonal hybridomas, of which three were selected for cloning due to their high reactivity to *P. lutzii* antigens when compared to *P. brasiliensis* antigens. From cloning, a single clone was established with reactivity not exclusive to *P. lutzii*, but, even so, with potential use in the diagnosis of the disease.

Keywords: monoclonal antibodies, immunization, paracoccidioidomycosis.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Preparo da emulsão para imunização	19
Figura 2. Extração do timo para obtenção dos timócitos	30
Figura 3. Clonagem por diluição limitante	33
Figura 4. Número de artigos relacionados as palavras chaves “ <i>monoclonal antibodies</i> ; <i>hybridoma</i> ”	34
Figura 5. Análise obtida no software VOSviewer relacionando Citações e Documentos	35
Figura 6. Número de artigos relacionados a palavra chave “ <i>paracoccidioidomycosis</i> ”	35
Figura 7. Análise obtida no software VOSviewer relacionando Citações e Documentos	36
Figura 8. Crescimento de colônias leveduriformes após 7 dias de cultivo em meio Ágar Fava-Netto.....	37
Figura 9. Observação microscópica dos fungos <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> corados com CFW e analisados com auxílio do equipamento In Cell Analyzer 2000 (GE).	38
Figura 10. Perfil proteico do CFA de Pb18 e PI01 obtidos por técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – <i>SDS PAGE</i>	40
Figura 11. Avaliação do perfil proteico em ambos os CFAs de Pb18 e PI01 por técnica de Western Blotting	42
Figura 12. Aspectos físicos dos camundongos controles e imunizados durante a execução dos protocolos de imunização subtrativa de múltiplas tolerizações	45
Figura 13. Bandas quimioluminescentes obtidas através WB do soro policlonal dos animais utilizados no protocolo de imunização subtrativa frente aos antígenos usados durante a tolerização e a imunização	65
Figura 14. Comparação entre baço proveniente de protocolo no qual houve a utilização de adjuvante de Freund e de protocolo que não houve	66
Figura 15. Acompanhamento das características morfológicas das células mielomatosas da linhagem Sp2/0 cultivados em meio sem adição de HAT	67
Figura 16. Acompanhamento das características morfológicas das células mielomatosas da linhagem Sp2/0 cultivados em meio com a adição de HAT	68
Figura 17. Acompanhamento das características morfológicas dos linfócitos.....	69
Figura 18. Acompanhamento das características morfológicas dos timócitos.....	70

Figura 19. Acompanhamento das características morfológicas dos hibridomas, bem como do crescimento das colônias dos mesmos	71
Figura 20. Comparação entre as células de mieloma e hibridomas presentes em um poço de uma das placas de 96 poços utilizadas na fusão celular	72
Figura 21. Poços com hibridomas múltiplos (a e c) e únicos (b e d). Poços com hibridomas múltiplos (a e c) e únicos (b e d)	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das fases de empilhamento e resolução do gel de poliacrilamida	17
Tabela 2. Constituintes do tampão de amostra utilizado no preparo da amostra a ser submetida a eletroforese	17
Tabela 3. Protocolo de Imunização Subtrativa de Múltiplas Tolerizações	21
Tabela 4. Quantificação proteica dos CFAs obtidos dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> em diferentes lotes: (LT1), (LT2) e (LT3).	39
Tabela 5. Número de mortes no decorrer dos ciclos de tolerização durante a primeira agenda de imunização.	49
Tabela 6. Número de mortes no decorrer dos ciclos de tolerização durante a segunda agenda de imunização.	49
Tabela 7. Diferentes diluições do soro de camundongo imunizado com <i>Paracoccidioides</i> spp para obtenção da diluição padrão a ser utilizada em testes de ELISA	56
Tabela 8. Comparação do desempenho obtido nas diferentes fusões celulares	72
Tabela 9. Número de hibridomas obtidos em cada fusão celular após cada <i>screening</i>	73
Tabela 10. Hibridomas das fusões A5 (A), A4 (B) e A3 (C) que apresentaram, em algum dos <i>screenings</i> , reatividade abaixo de 0.7.....	75
Tabela 11. Hibridomas das fusões A5 (A), A4 (B) e A3 (C) que apresentaram reatividade acima de 0.7 em todas testagens	76
Tabela 12. Coeficiente de variação para hibridomas com reatividade elevada para antígenos do imunógeno quando comparada a antígenos do tolerógeno.....	80
Tabela 13. Porcentagem de poços com colônias de hibridomas oriundas de uma única célula obtidos nas diferentes clonagens.....	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de calibração e construção da equação da reta necessárias para a quantificação de proteínas através do método de Bradford	16
Gráfico 2. Peso médio com desvio padrão dos camundongos durante os protocolos de imunização	47
Gráfico 3. Contagem de leucócitos totais/mm ³ para avaliação da imunossupressão	50
Gráfico 4. Contagem de leucócitos totais/mm ³ para averiguação do reestabelecimento do sistema imune	54
Gráfico 5. Resultados de densidade óptica obtidos por método de ELISA para avaliação dos controles do experimento	58
Gráfico 6. Resultados de densidade óptica obtidos por método de ELISA	59
Gráfico 7. Comparação de soros policlonais frente a diferentes antígenos.	62
Gráfico 8. Intervalo de reatividades obtidas nos diferentes hibridomas	74
Gráfico 9. Reatividade dos anticorpos policlonais a diferentes antígenos.....	78
Gráfico 10. Reatividade dos anticorpos obtidos dos clones únicos.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMs	Anticorpos monoclonais
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CFA	<i>Cell free antigen</i>
CV	Coeficiente de variação
Cy	Ciclofosfamida
DAB	Diaminobenzidina
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HAT	<i>Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine</i>
HGPRT	Hipoxantina-guanosina-fosfo-ribosiltransferase
HT	<i>Hypoxanthine-Thymidine</i>
i.p.	Intra peritoneal
IC95%	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
MC	Meio completo
ME	Meio enriquecido
MN	Membrana de nitrocelulose
MTSI	<i>Multiple Tolerization Subtractive Immunization</i>
OF	<i>Overflow</i>
Pb18	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cepa 18
PCM	<i>Paracoccidioidomicose</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PI01	<i>Paracoccidioides lutzii</i> cepa 01
PM	Peso Molecular
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sobrenadante de cultura
TA	Temperatura ambiente
TEMED	Tetrametiletenodiamino
WB	<i>Western Blotting</i>

SUMÁRIO

1	Introdução	4
2	Objetivo	5
2.1	Objetivos específicos	5
3	Revisão da literatura	6
3.1	Cenário Global das Doenças Fúngicas.....	6
3.1.1	Doenças Tropicais Negligenciadas.....	7
3.1.1.1	Paracoccidioidomicose (PCM)	8
3.1.1.1.1	Diagnóstico da PCM.....	10
3.2	Anticorpos Monoclonais	11
3.2.1	Imunização Subtrativa	12
4	Materiais e Métodos	14
4.1	Levantamento bibliográfico da relevância do tema	14
4.2	Obtenção e caracterização de exoantígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	14
4.2.1	Quantificação de proteínas totais utilizando reagente de Bradford.....	15
4.2.2	Análise do perfil proteico dos exoantígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS PAGE.....	16
4.2.3	Identificação de proteínas relevantes presentes nos exoantígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> por técnica de <i>Western Blotting</i>	18
4.3	Preparação da emulsão antigênica para imunização	19
4.4	Protocolo de imunização subtrativa de múltiplas tolerizações	20
4.5	Coletas de sangue Venoso	22
4.5.1	Avaliação da imunossupressão e reestabelecimento do sistema imune por contagem de leucócitos totais/mm ³	22
4.5.2	Obtenção do soro policlonal e avaliação da reatividade dos anticorpos circulantes por ELISA.....	23
4.6	Fusão celular para produção de anticorpos.....	24

4.6.1	Reativação da célula parceira de fusão	25
4.6.2	Eutanásia dos camundongos.....	26
4.6.2.1	Coleta de sangue cardíaco.....	26
4.6.2.1.1	Avaliação da reatividade dos anticorpos policlonais contra antígenos provindos do CFA Pb18 e CFA PI01 por <i>ELISA</i>	26
4.6.2.1.2	Análise, através da técnica de <i>Western Blotting</i> , do repertório de anticorpos reativos aos diferentes antígenos utilizados no protocolo de imunizações	26
4.6.2.2	Esplenectomia	27
4.6.3	Fusão Celular.....	28
4.6.3.1	Timectomia para obtenção de <i>feeder cells</i>	29
4.6.3.2	Seleção dos Hibridomas.....	30
4.6.3.2.1	<i>Screening</i> dos Hibridomas por <i>ELISA</i>	31
4.6.3.2.2	Clonagem Celular	32
5	Resultados e Discussão	34
5.1	Levantamento bibliográfico da relevância do tema	34
5.2	Obtenção e caracterização de exoantígenos de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	36
5.2.1	Análise das diferenças morfológicas macro e microscópicas das espécies fúngicas.....	36
5.2.2	Quantificação de proteínas totais através do método de Bradford (1976)	38
5.2.3	Perfil proteico das amostras de <i>P. brasiliensis</i> e de <i>P. lutzii</i>	40
5.2.4	Avaliação proteica do exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> por <i>western blotting</i>	42
5.3	Protocolo de imunização subtrativa de múltiplas tolerizações	44
5.3.1	Efeitos dos ciclos de tolerização nos animais	44
5.3.1.1	Acompanhamento do peso corporal dos camundongos.....	46
5.3.1.2	Mortalidade dos camundongos ao decorrer dos ciclos.....	49
5.3.2	Avaliação da imunossupressão e reestabelecimento do sistema imune, através da reatividade dos anticorpos policlonais presentes no soro dos camundongos	50

5.3.3 Avaliação da reatividade dos anticorpos circulantes frente a tolerização por teste de <i>ELISA</i>	56
5.4 Fusão celular para produção de anticorpos	62
5.4.1 Reatividade dos anticorpos policlonais contra antígenos provindos do CFA Pb18 e CFA PI01 por <i>ELISA</i>	62
5.4.2 Comparativo através da técnica de <i>Western Blotting</i> para análise do repertório de anticorpos policlonais reativos a diferentes antígenos	64
5.4.3 Esplenectomia	65
5.4.4 Fusão celular, seleção dos hibridomas por HAT e <i>screening</i> por teste <i>ELISA</i> .	66
5.4.4.1 Clonagem celular.....	77
6 Conclusões	84
Referências	85

1 INTRODUÇÃO

Dentro de um reino extremamente diverso como o reino *Fungi*, cerca de 300 espécies são atualmente descritas como patógenos aos seres humanos, infectando bilhões de pessoas em todo mundo e matando mais de 1,5 milhão por ano. Visando mudar este cenário e se obter um resultado clínico bem-sucedido, faz-se necessário o diagnóstico precoce e terapia antifúngica eficaz (HAWKSWORTH & LUECKING, 2017; PERLIN *et al.*, 2017; PRESTERL *et al.*, 2019; WHITESELL *et al.*, 2019).

Muitas barreiras são encontradas na realização de testes diagnósticos. Devido a isto, há crescentes taxas de mortalidade e sequelas, com mais de 80% dos pacientes podendo ser salvos com a disponibilidade de diagnósticos mais adequados, evidenciando a necessidade de soluções inovadoras neste cenário (GIACOMAZZI, J. *et al.* 2016; BONGOMIN, F. *et al.* 2017; PERLIN *et al.*, 2017; RODRIGUES & ALBUQUERQUE, 2018).

Dentre as doenças fúngicas que carecem de inovações em seu diagnóstico está a Paracoccidioidomicose (PCM), segunda micose endêmica mais prevalente na América Latina (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

A PCM é causada por *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e pelas espécies relacionadas: *P. americana*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis* e *P. lutzii*. De todos os casos no mundo, 80% ocorrem no Brasil, onde prevalecem as espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii* como patógenos da doença. As diferenças entre as espécies causam uma maior dificuldade na obtenção de um diagnóstico correto, denotando a necessidade biomarcadores específicos a estas espécies (HRYCYK *et al.*, 2018; MILLINGTON *et al.*, 2018; SIFUENTES-OSORNIO *et al.*, 2012).

Com esse intuito, o presente trabalho propõe a utilização da metodologia para a produção de anticorpos monoclonais (AcMs) pela técnica de fusão celular. Visando obtenção de anticorpos que reconheçam antígenos raros ou infimamente antigênicos, que possam ser utilizados no diagnóstico da PCM causada por *P. lutzii*, utilizou-se concomitantemente a técnica inédita de Imunização Subtrativa de Múltiplas Tolerizações (*Multiple Tolerization Subtractive Immunization* - MTSI) com cinco ciclos de tolerização, padronizada no Laboratório de Anticorpos Monoclonais – FCF/UNESP (KOHLER & MILSTEN, 1974; WEINER, 2015).

2 OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo produzir anticorpos monoclonais anti-*P. lutzii* visando aplicação diagnóstica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de *pools* antigênicos dos fungos *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, através da técnica de *cell free antigen* (CFA) e avaliação dos mesmos para então empregá-los durante as etapas de tolerização e imunização, respectivamente;
- Padronizar os parâmetros do protocolo de MTSI, a fim de torná-lo efetivo na manutenção da sobrevivência dos camundongos, bem como aumentar o direcionamento da resposta imune dos linfócitos obtidos frente a antígenos de interesse;
- Determinar a eficiência do protocolo MTSI através da avaliação da reatividade dos anticorpos policlonais presentes no soro dos camundongos imunizados contra antígenos de *P. brasiliensis* e de *P. lutzii*;
- Obter clones de hibridomas de alta prioridade secretores de anticorpos monoclonais voltados à identificação da espécie *P. lutzii*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CENÁRIO GLOBAL DAS DOENÇAS FÚNGICAS

O reino *Fungi* é extremamente diverso. Hawksworth & Luecking (2017) sugerem que a quantidade estimada de 1,5 milhões de espécies de fungos, comumente citada, é conservadora, citando 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos uma estimativa mais adequada. No entanto, apenas 120.000 espécies são aceitas, das quais 300 são atualmente descritas como patógenos aos seres humanos (DENNING & BROMLEY, 2015; HAWKSWORTH & LUECKING, 2017; Stop...,2017).

Infecções fúngicas têm sido uma grande ameaça nas últimas décadas. Estima-se que cerca de um bilhão de pessoas no mundo tenham alguma forma de infecção fúngica, desde as mais simples – mucocutâneas até as mais agressivas, que ocorrem em mais de 300 milhões de pessoas. Muitas são sistêmicas, potencialmente letais, invasivas e crônicas, difíceis de diagnosticar e tratar, chegando a atingir uma mortalidade de 1,6 milhões de pessoas por ano (DENNING & BROMLEY, 2015; BONGOMIN *et al.*, 2017; STOP...,2017).

Dados de sua incidência são mal definidos devido à indisponibilidade de diagnósticos adequados, a falta de sistemas de vigilância regulatórios, a não obrigatoriedade de produção de relatórios detalhados e, também, devido a algumas doenças fúngicas só terem sido descobertas recentemente. Os principais determinantes de suas ocorrências são características socioeconômicas, geoecológicas e o crescente número de populações de risco, onde encontramos infecções fúngicas invasivas como consequência das condições de saúde associadas à imunossupressão, a qual teve um aumento ainda mais significativo nas últimas duas décadas (WENGENACK & BINNCKER, 2009; BONGOMIN *et al.*, 2017; PERLIN *et al.*, 2017; SWAT & KHANT, 2017; RODRIGUES & ALBUQUERQUE, 2018).

Geralmente, essas infecções estão associadas à alta mortalidade e o resultado clínico bem-sucedido requer diagnóstico precoce e terapia antifúngica eficaz. Porém, o desenvolvimento de fármacos menos tóxicos, que possam ser aplicados em uma variedade de pacientes com enfermidades distintas, contribui para a expansão do uso de antifúngicos de amplo espectro para profilaxia e terapia empírica, o que leva ao

aumento da resistência a medicamentos, limitando a terapia a poucas opções de tratamento disponíveis (PERLIN *et al.*, 2017).

Os métodos diagnósticos convencionais disponíveis, como testes sorológicos, de cultura e histopatologia, para a maioria das infecções fornecem resultados subótimos em termos de sensibilidade e especificidade ou exigem procedimentos médicos invasivos difíceis de serem realizados em pacientes gravemente enfermos. Já os testes moleculares são difíceis de serem implementados devido à falta de recursos nesses países e de equipes laboratoriais com o conhecimento necessário, bem como apoio financeiro para adquirir equipamentos e insumos. Como consequência, o diagnóstico tardio de infecções fúngicas é geralmente acompanhado de taxas crescentes de mortalidade e sequelas. Assim, mais de 80% dos pacientes poderiam ser salvos com a disponibilidade de diagnósticos mais adequados. Portanto, é de extrema necessidade a implementação de políticas públicas específicas que incorporem novas estratégias para o diagnóstico precoce de infecções fúngicas em centros médicos de referência no Brasil, a fim de evitar altos custos e a baixa eficácia das abordagens, bem como para alertar as equipes médicas sobre a prevenção, cuidados e tratamento de uma gama de micoses relevantes. O complexo cenário de doenças fúngicas exige soluções inovadoras, mas ações concretas ainda não são comuns (GIACOMAZZI, J. *et al.* 2016; BONGOMIN, F. *et al.* 2017; PERLIN *et al.*, 2017; RODRIGUES & ALBUQUERQUE, 2018).

3.1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas são definidas como uma série de doenças infecciosas endêmicas que prevalecem em climas tropicais ou subtropicais em todo mundo. Afetam pessoas que vivem em países de baixa renda, com pouca voz política e baixa visibilidade, muitas vezes as populações mais pobres do mundo, que vivem em áreas rurais remotas, favelas urbanas ou zonas de conflito. Muitas dessas doenças não estão no radar da saúde pública (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

As micoses endêmicas sistêmicas ocorrem após a inalação de propágulos assexuados de fungos termodimórficos endêmicos, produzidos durante a fase micelial no solo, causando infecções que podem se disseminar. O termodimorfismo dos fungos dá-se pela característica desses de apresentarem-se em duas formas

morfológicas, variando principalmente de acordo com a temperatura, mas também com a alteração de teores de CO₂ e condições nutricionais. São encontradas principalmente nas Américas, na África e no sudeste da Ásia (LEVY, 2004; QUEIROZ-TELLES *et al*, 2017).

As doenças fúngicas têm sido continuamente negligenciadas ao longo dos anos, apesar de seu impacto alarmante na saúde humana. A maioria das micoses ainda demanda atenção das autoridades de saúde pública. O financiamento para doenças fúngicas é incrivelmente pequeno em comparação com o financiamento disponível para doenças infecciosas que causam mortalidade semelhante (GIACOMAZZI, J. *et al.*, 2016; RODRIGUES & ALBUQUERQUE, 2018).

3.1.1.1 Paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM é uma doença endêmica, sistêmica, causada por fungos dimórficos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2018). Na América Latina, ela é a segunda micose endêmica mais prevalente, causando um impacto substancial na saúde pública dos países da área endêmica, com até 10 milhões de latino-americanos infectados. Ocasionalmente, casos não autóctones de PCM foram relatados fora da América Latina, podendo apresentar reativação da infecção latente que ocorre até 50 anos (média de 15 anos) após a saída da área endêmica (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; RODRIGUES & ALBUQUERQUE, 2018).

A PCM é causada por *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e as espécies relacionadas *P. americana*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis*, e *P. lutzii* (HRYCYK *et al.*, 2018). Na Argentina, Venezuela e Colômbia, a incidência é cerca de 2,4 casos por 1.000.000 habitantes. Há também casos esporádicos reportados no México e na América Central (SIFUENTES-OSORNIO *et al.*, 2012).

Em contraste, 80% de todos os casos são relatados no Brasil, sendo causados pelas espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii* encontrados em diferentes áreas geográficas, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. A incidência anual de PCM aumentou de 1 para 3.6 casos por 100 mil habitantes, atingindo mortalidade de 1.65 por milhão de habitantes, sendo a principal causa fúngica de mortalidade em indivíduos não imunossuprimidos no Brasil, a oitava causa mais frequente de morte por doenças infecciosas e parasitárias crônicas ou recorrentes (SIFUENTES-OSORNIO *et al.*,

2012; COUTINHO, Z. F. *et al.*, 2015; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; RODRIGUES & ALBUQUERQUE, 2018).

Homens e mulheres têm a mesma probabilidade de serem infectados, mas o desenvolvimento clínico da doença, principalmente a forma crônica, é mais frequente em homens, com uma proporção média de 13:1. Mulheres são protegidas da doença pelo estradiol, que impede que as formas filamentosas inaladas do fungo se convertam em forma de levedura patogênica (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

Semelhantemente a outras micoses endêmicas sistêmicas, a infecção pulmonar primária é inaparente e a maioria dos indivíduos infectados permanece livre da doença por toda a vida. Uma pequena proporção de pacientes desenvolverá um dos dois padrões da doença: a forma aguda ou subaguda (juvenil) ou a forma crônica (adulto). Em ambas, a disseminação pode ocorrer e muitos órgãos podem ser afetados, especialmente os pulmões, orofaringe, linfonodos, pele, glândulas suprarrenais e sistema nervoso central. A forma aguda é caracterizada por um curto período de evolução, de 15 dias a 3 meses, e é mais grave, com disseminação para outros órgãos. Se não diagnosticada, a evolução natural da doença geralmente resulta em morte. Ambas as formas clínicas podem mimetizar vários distúrbios infecciosos e não infecciosos, incluindo câncer, sarcoidose, tuberculose e histoplasmose (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

No Brasil, casos de PCM são subestimados devido a variabilidade de manifestações clínicas, semelhança com outras doenças e menor valorização das micoses. Constantemente a doença é negligenciada em relação a tuberculose, sendo em grande parte do país não incluída entre as hipóteses diagnósticas de pacientes sintomáticos respiratórios, mesmo com testes de intradermorreação indicando que mais de 40% da população que vive em áreas endêmicas já tiveram contato com o fungo (BERTONI, T. *et al.*, 2010).

Bertoni *et al.* (2010) relataram o caso de um paciente que somente após 15 anos de investigação foi diagnosticado com PCM. Durante este período, ele foi diagnosticado com tuberculose, mesmo com a baciloscopia sempre ter sido negativa, e tratado exclusivamente de forma empírica para tal doença, por mais de uma vez, mesmo não apresentando melhora do caso clínico. Com este relato, os autores visam alertar os profissionais de saúde para a importância da investigação da PCM.

3.1.1.1.1 Diagnóstico da PCM

O diagnóstico da PCM pode ser efetuado a partir de cortes histopatológicos de órgãos possivelmente acometidos ou por meio do exame a fresco de amostras clínicas (escarro, lavado bronco-alveolar, aspirado de linfonodos). A coleta do escarro é viável somente em pacientes com a forma pulmonar crônica da doença, e ainda assim ela só se mostra eficiente em 60-70% dos casos. Já o diagnóstico a partir de aspirados de linfonodo possuem maior sensibilidade, porém, assim como os exames histopatológicos, são invasivos, razão pela qual outros procedimentos são preferíveis inicialmente (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

Nestes diagnósticos, após a cultura, é realizada a observação das formas típicas de leveduras multiformes com múltiplos brotamentos, indicando infecção fúngica ocasionada por *Paracoccidioides* spp. Assim, obtém-se resultados geralmente conclusivos, porém o tempo para o crescimento do fungo pode ser longo, com duração de até um mês, uma vez que o mesmo apresenta crescimento lento (LACAZ *et al.*, 2002; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Outras formas de diagnóstico incluem a titulação de anticorpos séricos, que é útil não somente para o diagnóstico, como também para o monitoramento da terapia, onde sua diminuição pode indicar um resultado positivo (ZANCOPE-OLIVEIRA *et al.*, 2014; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2018).

Dentre as técnicas imunológicas empregadas na detecção de anticorpos circulantes contra antígenos de *Paracoccidioides*, podemos destacar o ensaio imunoenzimático (ELISA), a imunodifusão dupla, a contraímuno eletroforese e o *western blotting*, os quais possuem baixo valor preditivo devido à similaridade antigênica entre as espécies de *Paracoccidioides* spp e delas com outros fungos, como o *Histoplasma capsulatum*, o que acarreta elevados índices de resultados falso-positivos e falso-negativos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; MOREIRA, 2008; AMBRÓSIO *et al.*, 2014; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Estes métodos apresentam sensibilidade que varia entre 85% e 100%. Deles, o principal método de diagnóstico sorológico da PCM é a reação de imunodifusão dupla, por ser mais simples, de menor custo, ter 100% de sensibilidade e especificidade (também com valor preditivo de 100%). No entanto, a preparação do antígeno utilizado pode gerar variações nos resultados (CAMARGO *et al.*, 1991; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2008; MOREIRA, 2008; AMBRÓSIO *et al.*, 2014; GEGEMBAUER *et al.*, 2014).

Apesar do teste de ELISA ser usado na detecção de anticorpos em quase todas as micoses sistêmicas, em relação a PCM ele ainda oferece grandes percentuais de reatividade cruzada, inclusive frente ao soro de pessoas sadias residentes em área endêmicas da doença (MENDES-GIANNINI *et al.* 1984; MOREIRA, 2008; GEGEMBAUER *et al.*, 2014). Técnicas moleculares incluindo hibridização *in situ*, reação em cadeia de polimerase (PCR) e PCR em tempo real, embora exibam maior sensibilidade e especificidade para a detecção da doença, não estão disponíveis na prática clínica devido ao alto custo, encontrando-se restritos a centros de referência e/ou pesquisa, e pela necessidade de validação, a qual não está totalmente estabelecida para PCM (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

Mesmo com a diversidade de diagnósticos existentes, apenas há pouco tempo descobriu-se que a PCM não era unicamente causada por *P. brasiliensis* (LEITÃO JR. *et al.*, 2014). Com a descoberta de novas espécies de *Paracoccidioides* spp, a sorologia de PCM tem sido desafiadora para o diagnóstico (MILLINGTON *et al.*, 2018). Vários estudos destacam a variabilidade antigênica deste complexo, principalmente ao que se refere a espécie *P. lutzii*, a qual foi distinguida com base não apenas em sua filogenia, mas também quando comparadas suas genômicas, analisadas suas recombinações e suas características morfológicas com as outras espécies, sendo estas distinções, possivelmente, o principal motivo para o substancial número de resultados falsos negativos, denotando, assim, a necessidade de estudos que descrevam biomarcadores de *P. lutzii* para sorologia da PCM (BATISTA *et al.*, 2010; LEITÃO JR. *et al.*, 2014; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2018).

3.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Em 1975, Georges J. F. Köhler e César Milstein descreveram a metodologia para a produção de anticorpos monoclonais (AcMs) com a técnica de hibridização celular, também denominada de fusão celular. Essa técnica possibilitou a geração de híbridos estáveis capazes de se manterem em cultivo por tempo indeterminado e secretarem imunoglobulinas com elevada especificidade por um único alvo antigênico. Isso foi possível frente a fusão de linfócitos B derivados do baço de animais imunizados com o antígeno de interesse e células de mieloma, com capacidade de vida infinita, expandidas em cultura, resultando nessas células híbridas, ou seja,

células que herdaram metade dos genes do mieloma e metade dos genes dos linfócitos B. Estas células não entram em apoptose, sendo assim capazes de produzir anticorpos com especificidade pré-definida em grande quantidade para um único epítopo (KOHLENER & MILSTEN, 1974).

Atualmente, os AcMs possuem alto valor agregado e são rotineiramente usados para diagnóstico de diversas enfermidades, devido a sua altíssima especificidade (SIDDIQUI, 2010). É necessário reconhecer que é praticamente impossível, por exemplo, obter um diagnóstico tumoral sem o uso dos AcMs. Tratando-se de doenças ocasionados por fungos, os AcMs também vêm ganhando importância (DA SILVA *et al.*, 2003; DOS SANTOS *et al.*, 2015). Desde 1976, anticorpos já são utilizados na rotina diagnóstica de PCM, como, por exemplo, em ensaios do tipo ELISA (DA SILVA *et al.*, 2016). Em 2015, dos Santos e colaboradores descreveram um *kit* de diagnóstico rápido de alta especificidade para *P. brasiliensis* utilizando plataforma de látex acoplada a AcMs reativos a glicoproteína gp43. Apesar de se esperar certa atividade com relação ao *P. lutzii*, ainda há importantes lacunas acerca da especificidade destes AcMs à esta espécie, o que evidencia a necessidade de estudos mais aprofundados, no sentido de otimizar os parâmetros sorológicos associados ao diagnóstico de PCM causado por esse patógeno.

3.2.1 Imunização Subtrativa

Ainda que a tecnologia clássica proposta por Kohler & Milstein (1975) resultou na criação de AcMs específicos a diversos epítopos antigênicos, o isolamento de um anticorpo específico que reconheça antígenos raros ou infimamente antigênicos é um desafio, pois epítopos imunodominantes podem mascarar esses epítopos raros ou imunogênicos, que poderiam gerar anticorpos altamente direcionados (DE ALMEIDA *et al.*, 2018).

Assim, em 1985, Sharpe *et al.* propuseram modificações a este protocolo, sugerindo que uma tolerância prévia a imunização, aumentaria a especificidade da produção de anticorpos monoclonais. Para executar essa tolerização Matthew & Sandrock (1987) desenvolveram uma abordagem onde se ativava seletivamente os linfócitos estimulados por antígenos indesejados (tolerógeno, tolerização) e sequencialmente usava-se o fármaco citotóxico ciclofosfamida (Cy) para manipular a

tendência da resposta imune, depletando/tolerizando células em proliferação acarretando imunossupressão celular. Assim, esta técnica elimina os linfócitos T e B estimulados pelos antígenos imunodominantes, bloqueando as respostas imune e inibindo a geração de células de memória. Em seguida faz-se uma imunização com antígenos semelhantes (imunógeno, imunização), onde, por fim, seria possibilitado a produção aumentada de anticorpos direcionados que distinguem os dois conjuntos de antígenos.

O fármaco é preferencialmente administrado 24 e 48 horas após a tolerização. A exposição repetida de antígenos imunodominantes presentes no tolerógeno, seguido da administração da Cy, minimiza a geração da resposta imune frente a epítomos antigênicos de não interesse, resultando na eliminação de grande parte desses linfócitos reativos e direcionando a resposta imune contra antígenos de interesse após a imunização (DE ALMEIDA *et al.*, 2018). Em consequência, é compreendida a riqueza que essa alteração no protocolo pode trazer a este estudo, em especial ao se repetir a tolerização múltiplas vezes.

Há poucos estudos disponíveis descrevendo a padronização de antígenos específicos de *P. lutzii* para sorologia da PCM. Figueiredo *et al.* (2018) depositaram uma patente que prevê o uso de anticorpos monoclonais para diagnóstico de PCM também causada por *P. lutzii*, porém este não é altamente específico contra ambos os patógenos, pois a glicoproteína gp43 expressa por eles possui diferenças na sequência de aminoácidos, sendo pouco evidente em *P. lutzii*, o que leva o anticorpo produzido ser mais específico para o diagnóstico de *P. brasiliensis*. Há também, ainda, uma diferença substancial quanto a técnica de imunização utilizada para obtenção dos anticorpos, uma vez que a descrita na patente emprega método clássico e o presente utiliza múltiplas tolerizações, onde o antígeno utilizado é obtido de um *pool* de proteínas que em uma primeira etapa induz um estado de tolerização contra *P. brasiliensis*, direcionando a resposta imune e produção de anticorpos contra antígenos exclusivamente presentes em *P. lutzii*.

Sendo assim, a técnica de MTSI foi escolhida para esse estudo, visto que não há relatos na literatura que demonstrem o uso desta técnica na obtenção/geração de anticorpos voltados ao reconhecimento de espécies causadoras de doenças fúngicas, incluindo PCM, e que resultaria em diagnósticos assertivos da doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DA RELEVÂNCIA DO TEMA

Foi feita a busca de temas relacionados ao projeto no *Web of Science* por tópico, classificando por número de citações, selecionando artigos originais e artigos de revisão. Os resultados obtidos foram compilados, exportados e analisados no programa VOSviewer®.

4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOANTÍGENOS DE *P. brasiliensis* E *P. lutzii*

Os fungos, *P. brasiliensis*, cepa 18 (Pb18), e *P. lutzii*, cepa 01 (PI01), foram obtidos da micoteca do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP.

Foi realizada a passagem das cepas em células MRC-5 para reativação das mesmas e, posteriormente, seus cultivos se deram - após no máximo três repiques das cepas reisoladas - em meio Ágar Fava-Netto por até sete dias a 37°C. Após o crescimento das colônias fúngicas, foram realizadas análises macro e micro morfológicas em ambas cepas.

Para a análise microscópica, além da realizada diretamente em microscópio, uma pequena quantidade de massa fúngica foi ressuspensa em solução salina tamponada (PBS) e submetida ao vórtex por 2 minutos. Em seguida, esta foi corada com 5% de *Calcofluor White* (CFW), e centrifugada a 2200 rpm por 5 minutos, então o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensa em PBS para retirada do excesso de corante. Na sequência, foi submetido às mesmas condições de centrifugação e novamente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensa em PBS. Plaqueou-se, então, 100 µL da ressuspensão em placa de 96 poços para análise de suas estruturas utilizando o equipamento *In Cell Analyzer 2000* (GE) do Núcleo de Proteômica UNESP - FCFar.

Concomitantemente ao exposto no parágrafo anterior, deu-se início à etapa de obtenção dos exoantígenos de parede celular, também denominados antígeno livre da parede do fungo (CFA) (CAMARGO *et al.*, 1991). Para tanto, a massa fúngica foi

coletada com o auxílio de alça descartável e transferida para tubo cônico contendo solução inibidora de proteases diluída em 1 mL de PBS na proporção de 1:100. O conteúdo total foi agitado em vórtex por um minuto com posterior centrifugação a 10.000 g por um minuto. O sobrenadante de cultura (SNC) contendo o CFA foi transferido para microtubo e em seguida, realizou-se a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976).

Após verificar a obtenção de quantidades suficientes dos exoantígenos para realização do protocolo de imunização, foi feita a junção dos diferentes lotes de CFAs adquiridos para obtenção de um *pool* antigênico uniforme em cada espécie. Então, foi realizada a análise do perfil proteico através de eletroforese em gel de poliacrilamida - *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e determinação da presença de adesinas/glicoproteínas por *western blotting* utilizando como anticorpos primários, um soro policlonal murino anti-PCM.

O material obtido foi aliquoteado em criotubo na quantidade suficiente para cada imunização, congelados a -20°C e descongelados no momento do uso.

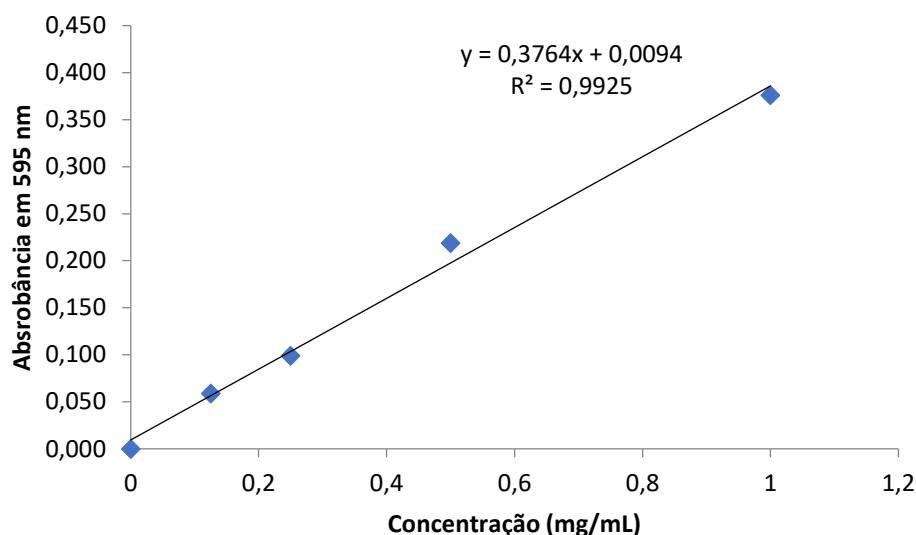
Dada a necessidade da repetição dos experimentos de imunização subtrativa de múltiplas tolerizações, a obtenção e caracterização do CFA teve de ser realizada em mais de um momento.

4.2.1 Quantificação de proteínas totais utilizando reagente de Bradford

Após toda obtenção do CFA de ambas as espécies de *Paracoccidioides*, foi realizada a quantificação do conteúdo proteico por método de Bradford. Para a quantificação foi construída uma curva de calibração, representada no gráfico 1, utilizando albumina de soro bovino – BSA (*bovine serum albumin*) como amostra proteica, em triplicata e em cinco diluições diferentes.

Essa curva foi utilizada para quantificação de proteínas totais de todos os CFAs obtidos no presente trabalho devido a obtenção de uma relação linear (com alto parâmetro de correlação) evidenciando a plausibilidade de detecção das proteínas por análise em espectrofotômetro com leitura a 595 nm.

Gráfico 1. Curva de calibração e construção da equação da reta necessárias para a quantificação de proteínas através do método de Bradford



Para o cálculo da quantificação proteica foi utilizada a equação 1, a qual foi obtida pela curva de calibração:

$$\text{Proteínas Totais} = \frac{\text{Valor da amostra} - 0,0094}{0,3764} \quad (1)$$

4.2.2 Análise do perfil proteico dos exoantígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* por eletroforese em gel de poliacrilamida – *SDS PAGE*

O perfil proteico dos exoantígenos foi analisado através de observações das bandas separadas de acordo com suas respectivas massas moleculares pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante – *SDS PAGE*. O mini-gel (Bio-Rad®: dimensões 8.3 x 10.2 cm e espaçadores de 1.5 mm) foi produzido em sistema descontínuo, constituído por duas fases, porção de empilhamento a 4% e a de resolução a 12%, que diferem na concentração de acrilamida presente e no pH como descritos na tabela 1.

Tabela 1. Composição das fases de empilhamento e resolução do gel de poliacrilamida

<i>Composição dos géis</i>	<i>Empilhamento 4%</i>	<i>Resolução 12%</i>
<i>Mix acrilamida + Bis acrilamida 30%</i>	0.67 mL	4 mL
<i>Tris-HCl 1,5 mol.L⁻¹ pH 8.8</i>	0	2.5 mL
<i>Tris-HCl 1 mol.L⁻¹ pH 6.8</i>	0.5 mL	0
<i>SDS 10% (m/v)</i>	0.04 mL	0.1 mL
<i>TEMED* P. A.</i>	0.004 mL	0.004 mL
<i>Persulfato de amônio 10% (m/v)</i>	0.04 mL	0.1 mL
<i>Água tipo Mili-Q</i>	2.7 mL	3.3 ML

* TEMED: N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamino

Terminada a etapa de polimerização de ambas a fases, o gel foi inserido na cuba para dar início a pipetagem dos exoantígenos. A cuba foi preenchida com tampão de corrida à base de Tris (0.25 mol/L), Glicina (1.92 mol/L) e SDS [10%(m/v)]. Dada a quantificação proteica dos CFAs estabelecida anteriormente, calculou-se o volume de 20 µg de proteína total para cada poço do gel. Essas foram incubadas junto ao tampão de amostra (composição apresentada na tabela 2), na razão de 4:1, seguido de ebulição por cinco minutos, a fim de promover a desnaturação das proteínas. O volume pipetado em cada canaleta do gel de empilhamento foi de aproximadamente 30 µl. O padrão de peso molecular usado para indicar as massas específicas das proteínas foi o *BenchMark® pre-stained protein ladder*.

Tabela 2. Constituintes do tampão de amostra utilizado no preparo da amostra a ser submetida a eletroforese

<i>Composição do tampão de amostra</i>	<i>Volumes (mL)</i>
<i>Tris-HCl 1 mol.L⁻¹ pH 6.8</i>	0.8
<i>Glicerol P. A.</i>	1
<i>SDS 10% (m/v)</i>	2
<i>β-mercaptoetanol P. A.</i>	0.5
<i>Água tipo Mili-Q</i>	q.s.p. 10 mL

A corrida eletroforética foi conduzida a 80V para o gel de empilhamento e 100V para o gel de resolução. Ao seu término, o gel foi submetido à coloração *overnight* em agitador, usando o corante composto por sulfato de amônia [8%(m/v)], ácido fosfórico [1.6%(m/v)], metanol:água (1:4) e *comassie brilliant blue G250* [0.08%(m/v)].

Finalmente, o corante foi removido em agitador com solução descorante à base de 10% de ácido acético e 25% de metanol, a qual era trocada até descoloração desejada, a fim de garantir a melhor visualização das bandas.

4.2.3 Identificação de proteínas relevantes presentes nos exoantígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* por técnica de *Western Blotting*

Com intuito de identificar a presença de proteínas de relevância nos CFAs de ambas espécies fúngicas, realizou-se o procedimento de *western blotting*. De prômio, as proteínas dos antígenos foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, como descrito no tópico anterior e transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (MN) através do aparelho *Amersham Biosciences® MIGHTY SMALL TRANSPHOR* a 0.4 amperes por 6 horas. Após a transferência, a MN foi corada em *Ponceau* por um minuto e descorada com água destilada, para verificação da eficiência da transferência do conteúdo proteico, a qual foi cortada em tiras para incubação com cada anticorpo. Após, foram depositadas em uma caixa de canaletas, onde foram bloqueadas com solução de bloqueio, composta por 5% de leite em pó desnatado e 1% de BSA diluído em PBS, em leve agitação por 4 horas.

Próximo ao fim deste período, foi preparada a solução de anticorpos primários policlonais murinos anti-*Paracoccidioides* spp, diluídos em solução de bloqueio na concentração de 1:1000. A solução das canaletas foi descartada, substituída pela solução de anticorpos primários e retornada ao agitador *overnight* em temperatura ambiente (TA). Passado este período, as fitas foram submetidas a três lavagens, com PBS-*Tween* (0,05%) em agitador, com duração de 10 minutos cada, havendo a substituição do PBS-*Tween* para o início das lavagens subsequentes.

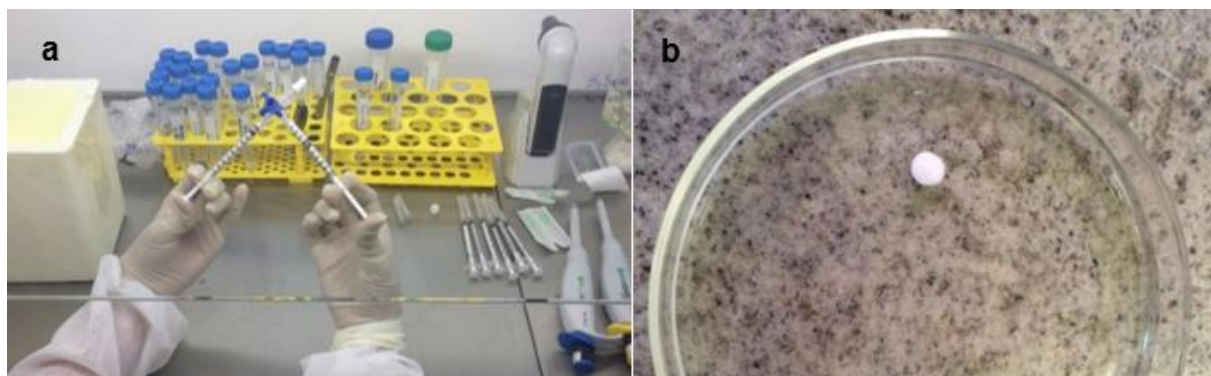
Neste ínterim, foi preparado a solução de anticorpo secundário anti-IgG murino conjugado com peroxidase (Elabscience® E-AB-1001), diluído na concentração de 1:300 (recomendada pelo fabricante) em solução de bloqueio. A incubação com anticorpo secundário foi realizada durante duas horas em agitador, em TA. Ao fim da incubação, o anticorpo secundário foi retirado e as fitas foram lavadas 3X com PBS. Preparou-se, então, a solução de revelação, contendo 0.005g de diaminobenzidina

(DAB), 150µL água oxigenada (H₂O₂) e 30 mL de PBS, a qual foi adicionada nas canaletas. Após a visualização das bandas, a reação foi interrompida com água.

4.3 PREPARAÇÃO DA EMULSÃO ANTIGÊNICA PARA IMUNIZAÇÃO

Anteriormente à imunização, foi realizado o preparo da emulsão antigênica através da junção do adjuvante de *Freund* ao CFA, por meio de um aparato denominado de torneira de três vias, como demonstrado na figura 1a. Com o término do preparo da emulsão, prosseguiu-se com o teste da gota, figura 1b, para avaliar a integridade da mesma. Esse teste basicamente avalia a capacidade de dispersão da emulsão em água gelada. A emulsão ideal é aquela na qual a gota se mantém íntegra na interface ar/líquido, para então poder ser administrada e gerar o estímulo desejado da resposta imune.

Figura 1. Preparo da emulsão para imunização. a) Aparato para preparar a emulsão, duas seringas acopladas em uma torneira de três vias. b) Teste da emulsão com gota íntegra



O volume de exoantígeno utilizado durante o preparo das emulsões levou em consideração sua concentração proteica, respeitando a quantidade de 70 µg de proteína a ser administrada por animal com igual volume de adjuvante completo de *Freund* no primeiro ciclo de tolerização e adjuvante incompleto de *Freund* nos demais ciclos, não ultrapassando 100 µL, a fim de que um volume máximo de 200 µL fosse injetado por via intraperitoneal (i.p.) por camundongo imunizado.

Devido a morte dos camundongos nas duas primeiras agendas de imunizações e visando menor dano a saúde dos animais, reduziu-se a quantidade de exoantígeno

utilizado durante a preparação das emulsões para 50 µg de proteína a ser administrada por animal no terceiro e último protocolo de imunizações.

4.4 PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO SUBTRATIVA DE MÚLTIPLAS TOLERIZAÇÕES

O estudo contou com a realização de três protocolos de imunização subtrativa de múltiplas tolerizações. Em cada experimento foram utilizados oito camundongos machos da linhagem isogênica BALB/c de 6-8 semanas de vida, provenientes do Serviço de Biotério Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório, UNICAMP. Todos os procedimentos com os animais respeitaram os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da própria Instituição de Ensino (CEUA/FCF/CAR:20/2018).

Iniciou-se a agenda de imunização no dia 0, utilizando como tolerógeno o CFA derivado do Pb18 e como imunógeno o CFA derivado do PI01. O fármaco imunossupressor, ciclofosfamida (Sigma-Aldrich®), foi administrado 24 e 48 horas após a imunização com o tolerógeno, na concentração de 200 mg/kg por animal. Essa etapa repetiu-se quatro vezes mais, com um espaçamento de 14 dias entre os ciclos. Todas as imunizações assim como a administração da Cy foram realizadas pela via i.p., exceto a última imunização com o imunógeno, a qual foi realizada por via intravenosa - *booster*. Esse protocolo baseou-se em estudos descritos por Brooks, Jin e Almeida (BROOKS *et al.*, 1993; JIN *et al.*, 2012; DE ALMEIDA *et al.*, 2017).

No protocolo, foram utilizados dois camundongos como controle, tendo um deles recebido apenas os veículos do protocolo (solução salina tamponada/água e adjuvantes), enquanto o outro não recebeu qualquer inoculação. A agenda de imunização inicialmente utilizada está descrita na tabela 3.

Tabela 3. Protocolo de Imunização Subtrativa de Múltiplas Tolerizações

	<i>Dia</i>	<i>Antígeno</i>
<i>Primeiro</i>	0	Tolerógeno – CFA Pb18
<i>Ciclo</i>	1	Ciclofosfamida
	2	Ciclofosfamida
<i>Segundo</i>	16	Tolerógeno – CFA Pb18
<i>Ciclo</i>	17	Ciclofosfamida
	18	Ciclofosfamida
<i>Terceiro</i>	32	Tolerógeno – CFA Pb18
<i>Ciclo</i>	33	Ciclofosfamida
	34	Ciclofosfamida
<i>Quarto</i>	48	Tolerógeno – CFA Pb18
<i>Ciclo</i>	49	Ciclofosfamida
	50	Ciclofosfamida
<i>Quinto</i>	64	Tolerógeno – CFA Pb18
<i>Ciclo</i>	65	Ciclofosfamida
	66	Ciclofosfamida
<i>Ciclos de administração do imunógeno</i>	76	Imunógeno – CFA PI01
	86	Imunógeno – CFA PI01
	93	Imunógeno – CFA PI01
	107	Imunógeno – CFA PI01
	108	Imunógeno – CFA PI01
		(Booster)

Durante a execução deste primeiro protocolo, todos os camundongos imunizados vieram a óbito. Assim, um novo protocolo foi realizado, como o descrito anteriormente, porém com a concentração de Cy reduzida para 150 mg/kg por peso corporal de cada animal, baseado no estudo conduzido por Huyan *et al.* (2011). Novamente houve a morte de todos os animais antes que o protocolo terminasse, fazendo com que um terceiro protocolo fosse realizado também da mesma forma, porém com uma concentração de Cy ainda mais reduzida (100 mg/kg). Anota-se que nesse protocolo houve a redução de proteínas dos exoantígenos utilizados nas imunizações.

4.5 COLETAS DE SANGUE VENOSO

As coletas de sangue caudal dos animais foram realizadas em três momentos do protocolo: após o segundo e quinto ciclo de tolerização, passados 10 dias da submissão da última dose de Cy, a fim de se obter o soro policlonal e avaliar a eficácia da tolerização frente ao reconhecimento dos anticorpos policlonais circulantes contra os exoantígenos do Pb18 por método de ELISA (ENGVALL, 1980), e após o terceiro ciclo, precisamente depois de 72-120 horas após a última dose de Cy, visando avaliar a eficácia do fármaco na supressão do sistema imunológico através da contagem de leucócitos totais/mm³ (nas coletas direcionada para o protocolo de ELISA uma alíquota do sangue também foi retirada para contagem de leucócitos).

4.5.1 Avaliação da imunossupressão e restabelecimento do sistema imune por contagem de leucócitos totais/mm³

Os animais foram alojados em contensor próprio para coletas e suas caudas foram imergidas em água morna visando a vasodilatação. Após, com uma tesoura cirúrgica, cortou-se a ponta de suas caudas para coleta do sangue, a qual foi feita com auxílio de pipetas com ponteiros umedecidas com heparina sódica 5.000 UI/mL (Hepamax-S®) no intuito de se evitar a coagulação do sangue. Foram coletados em média 20 µL de sangue total de cada animal e armazenados em microtubos para as contagens. Estas amostras foram diluídas em líquido de Turk, visando a lise das hemácias, na razão de 1:20 e os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer. O resultado obtido na contagem dos quatro quadrantes laterais da câmara foi multiplicado por 50, de acordo com a regra expressa na equação 2.

$$\frac{N^{\circ} \text{ total de leuc.}}{\text{mm}^3} = \frac{n^{\circ} \text{ leuc. contados} \times \text{diluição} \times \text{correção da altura da câmara}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \quad (2)$$

$$\frac{N^{\circ} \text{ total de leucócitos}}{\text{mm}^3} = \frac{n^{\circ} \text{ leuc. contados} \times 20 \times 10}{4}$$

4.5.2 Obtenção do soro policlonal e avaliação da reatividade dos anticorpos circulantes por ELISA

Com a finalidade de avaliar a eficiência das tolerizações, utilizou-se a técnica de ELISA para determinação qualitativa de IgG murina presente no soro policlonal de todos os animais imunizados, incluindo os dois controles não imunes.

Dessa maneira, coletou-se em média 150 μ L de sangue para obtenção de soro policlonal, utilizando-se do mesmo procedimento descrito no tópico anterior, porém sem o uso de anticoagulante. O sangue coletado foi mantido em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas, com posterior centrifugação a 1500 rpm e 4°C por 10 minutos. Com a separação, o soro foi coletado e armazenado em criotubos a -20°C, até o momento do seu uso.

Para definição da diluição ideal a ser utilizada nos experimentos de ELISA um camundongo BALB/c passou por três imunizações com os antígenos utilizados no experimento, seu sangue foi coletado, o soro foi obtido e armazenado como de descrito anteriormente. Posteriormente, este soro foi testado em cinco diluições diferentes, a saber: 1:500, 1:750, 1:1000, 1:1500 e 1:2000, com o intuito de identificar a diluição mínima necessária para atingir o máximo da faixa de leitura no comprimento de onda a 492 nm.

Para isso, procedeu-se a preparação do CFA (proveniente da cepa Pb18) na concentração de 10 μ g/mL em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,2M, pH 9.6. Pipetou-se 100 μ L do preparo por poço necessário de uma placa de 96 poços com alta capacidade de adesão (Nunc-Immuno®) com posterior incubação *overnight* a 4°C. Após, houve três lavagens com PBS+*Tween* 20 a 0.05%, prosseguindo com a incubação da solução de bloqueio, a qual continha PBS com 5% de leite em pó desnatado e 2.5% de BSA, no volume de 200 μ L por poço, a 37°C por 2 horas, seguido novamente da repetição de lavagens.

Então, prosseguiu-se para etapa de incubação (2 horas a 37°C) com o anticorpo primário (soro policlonal obtido dos camundongos tolerizados), onde este foi diluído na proporção 1:1500 em solução de bloqueio, seguindo-se das mesmas lavagens anteriores. Posteriormente, realizou-se a etapa de incubação (2h a 37°C) com o anticorpo secundário anti-IgG murino conjugado com peroxidase

(Elabscience® E-AB-1001), utilizando a diluição de 1:5000, conforme orientação do fabricante. Após, repetiu-se uma quarta etapa de lavagens.

Por fim, adicionou-se 100 µL da solução de revelação (ortofenilenodiamina 1mg/mL em tampão citrato-fosfato, pH 4.8), incubando-a por 20 minutos fora do alcance da luz, concluindo a reação através da solução de parada (50µL por poço de H₂SO₄, 4M). Os resultados foram obtidos atrás de leitura a 492 nm em espectrofotômetro.

Além disso, foi adicionado o controle positivo (soro policlonal anti-Pb18), controle negativo (incluindo os soros obtidos dos controles não imunes e soro de camundongos imunizados durante protocolo para diagnóstico de células tumorais prostáticas humanas) e controle secundário (CFA incubado ao anticorpo comercial anti-IgG murino + HRP).

Todo o ensaio foi realizado em triplicata e foram acompanhados de leituras de controles do experimento.

4.6 FUSÃO CELULAR PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Após o encerramento do protocolo de imunização onde a dose de Cy administrada foi de 100 mg/kg do peso corporal de cada animal, prosseguiu-se para a realização do protocolo de fusão celular. Devido a uma contaminação das células parceiras de fusão com *Mycoplasma* sp, foi necessário adiar o protocolo até a descontaminação das mesmas.

Nesse período, os animais foram imunizados somente mais duas vezes, com o intervalo de um mês após o fim da programação inicial do protocolo de imunizações, a fim de garantir que permanecessem saudáveis, uma vez que eles já haviam sido expostos ao adjuvante diversas vezes e mantê-los em regime com mais imunizações poderia ofertar riscos à saúde dos mesmos. Então, optou-se por interromper as imunizações até dois dias antes da fusão, quando a dose via caudal (*booster*), apenas com o antígeno, foi administrada, sendo aplicada 50 µg deste.

4.6.1 Reativação da célula parceira de fusão

Duas semanas antes da fusão, descongelou-se uma ampola do banco celular do laboratório e deu-se início à expansão de células mielomatosas murinas da linhagem Sp2/0, adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro, as quais foram mantidas incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, em meio DMEM com alta concentração de glicose e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), até a fase exponencial de crescimento.

Análises macroscópicas e microscópicas da linhagem em cultivo foram realizadas a cada 48 horas, com posterior troca de meio, sendo feitas avaliações do crescimento celular e da possível presença de contaminação por microrganismos. Neste ínterim, bancos celulares de trabalhos foram criados. Todas recomendações de manejo e cultivo celular postuladas pela ATCC, foram empregadas.

Uma vez verificada a viabilidade celular igual ou superior a 80% e uma quantidade mínima de 5×10^7 células por animal que se intenciona usar para fusão celular, prosseguiu-se para a mesma. A viabilidade celular foi verificada através da coloração por azul de *Trypan* em câmara de Neubauer, onde também é realizada a contagem celular.

Para contagem celular é utilizada a equação 3.

$$\text{Número total de células} = \frac{NC}{NQ} \times FD \times VR \times 10^4 \quad (3)$$

Onde:

NC é o número de células contadas na câmara

NQ é o número de quadrantes da câmara que foram contados

FD representa o fator de diluição da amostra de células

VR é o volume de ressuspensão do *pellet* contendo as células de interesse

10^4 é o valor de correção da câmara

4.6.2 Eutanásia dos camundongos

Os camundongos foram anestesiados por sedação profunda, via intramuscular com cloridrato de ketamina (40mg/kg) e cloridrato de xilazina (5mg/kg) em associação, seguido da coleta de sangue cardíaco (item 4.6.2.1) e posterior deslocamento cervical.

4.6.2.1 Coleta de sangue cardíaco

Com o animal ainda vivo, porém sedado, foi realizada a punção cardíaca para a obtenção do sangue total do coração. Este sangue foi mantido em microtubo por pelo menos 2 horas a temperatura ambiente para a separação do soro policlonal e, após, centrifugado por 15 minutos a 1500 rpm e 4°C.

O soro foi então armazenado a 20°C negativos e utilizado nos dois experimentos consequentes, em momento posterior à finalização do protocolo de fusão celular (item 4.6.3).

4.6.2.1.1 Avaliação da reatividade dos anticorpos policlonais contra antígenos provindos do CFA Pb18 e CFA PI01 por ELISA

Com o intuito de avaliar a reatividade do soro obtido da punção cardíaca dos animais experimentais quanto aos diferentes antígenos empregados no protocolo (CFA Pb18 e CFA PI01), o teste de ELISA foi realizado nos mesmos parâmetros estabelecidos no item 4.5.2, com a diferença de que duas placas de ELISA foram sensibilizadas, cada qual com um antígeno diferente.

4.6.2.1.2 Análise, através da técnica de *Western Blotting*, do repertório de anticorpos reativos aos diferentes antígenos utilizados no protocolo de imunizações

Da mesma forma que foi descrito no item 4.2.3, a técnica de *Western Blotting* foi empregada na intenção de se analisar o perfil proteico obtido através do soro dos

camundongos imunizados. Diferentemente, como anticorpo primário, foi utilizado o soro obtido do sangue de cada um dos animais imunizados na diluição de 1:3000. Isso ocorreu devido ao diferente método de revelação utilizado nessa análise – método quimioluminescente. A diluição do anticorpo secundário foi de 1:4000, como recomendado pelo fabricante para esta forma de revelação.

Para isto, foi preparada a solução revelação contendo Tris 100mM em água MiliQ com pH 8.6, com 1.25mM de luminol e 2 mM de ácido 4-para-iodofenilborônico e uma solução de peróxido de hidrogênio. Essas soluções foram homogeneizadas na proporção de 1:1, na quantidade suficiente para cobrir as tiras de membranas, as quais foram incubadas por 5 minutos na ausência de luz. Então, a solução foi descartada e as membranas foram dispostas em equipamento para detecção das bandas quimioluminescentes.

4.6.2.2 Esplenectomia

Após a coleta de sangue cardíaco, o camundongo foi mergulhado em hipoclorito de sódio para descontaminação do pelo e a assepsia da região cirúrgica foi feita com aplicação de solução de iodopovidona a 10%.

Dentro do fluxo laminar, o baço do animal foi coletado de forma mais estéril possível para isolamento dos esplenócitos (linfócitos B produtores de anticorpos). O órgão foi transferido para uma placa de Petri contendo 10 mL de Meio Enriquecido [ME: O qual usa como base o meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640, Gibico®, acrescido de glicose-piruvato, L-glutamina, antibiótico/antimicótico, ácido oxalacético, insulina bovina, 2-mercaptoetanol, aminoácidos essenciais e aminoácidos não essenciais] para lavagens e remoção de tecidos indesejáveis.

Na sequência, o órgão foi transferido para outra placa de Petri, também contendo 10 mL de ME. Este foi, então, perfurado por uma agulha de 22G acoplada a uma seringa de 10 mL, enquanto outra seringa, com agulha dobrada em formato de Z, imobilizou o tecido. Após a cápsula esplênica ser perfurada, injetou-se o meio no interior do baço, repetidas vezes, permitindo assim que todos esplenócitos fossem expelidos.

Ao fim do procedimento, todo conteúdo da placa foi aspirado através de uma seringa e deixado verticalmente em repouso por 10 minutos, a fim de se decantar restos celulares indesejados. O sobrenadante foi, então, transferido para um tubo cônico de 50 mL. Repetiu-se essa etapa lavando-se a placa com mais meio. Após, o meio contendo os linfócitos foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm para sedimentação dos linfócitos.

O *pellet* celular foi ressuspendido em ME e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Intencionando hemolisar os eritrócitos para fazer uma contagem correta do número de células, a amostra analisada na câmara de Neubauer foi diluída em líquido de Turk, já para verificar a viabilidade essas foram coradas em azul de Trypan. A contagem seguiu a mesma regra descrita no item 4.6.1.

4.6.3 Fusão Celular

Após a determinação do número de linfócitos, separou-se a quantidade de células parceiras necessárias para a fusão, respeitando as proporções de 10:2 esplenócitos/mieloma, como indicado pela empresa fornecedora, e os controles da fusão foram plaqueados em uma placa de 96 poços, sendo que um poço conteve uma alíquota de mieloma e o outro uma alíquota de linfócitos.

Os esplenócitos e mielomas foram colocadas em contato e homogeneizados, seguidos de uma centrifugação de 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* foi descolado com leves batidas do tubo em um monte de gaze. Após, o polietilenoglicol (PEG – Hybri-Max™) foi adicionado lentamente na proporção de 1 mL de PEG a cada 1×10^8 células totais. Em seguida cronometrou-se um minuto, no qual o PEG foi homogeneizado com todas células através de leves movimentos circulares e foi mantido em repouso pelo tempo restante.

Na sequência, as células foram centrifugadas por 1 minuto a 1200 rpm e, sem que a centrífuga parasse, a rotação foi aumentada para 1500 rpm por mais dois minutos e seu freio foi reduzido a 1 para evitar o rompimento das células recém-fusionadas. Em seguida, o conteúdo de PEG foi aspirado.

Adicionou-se delicadamente o SFB, na proporção de 5 mL a cada 1×10^8 células totais, e o tubo foi mantido em repouso por 10 minutos. Atenta-se a importância desta etapa (do momento em que o PEG entra em contato com as células até o momento em que o SFB entra em contato com o *pellet*) ser realizada em no máximo oito minutos, para que não haja danos às células devido à toxicidade que o composto químico causa após este período (DEFFUNE, 1992).

Por fim, foi adicionado ME na proporção de 19 mL a cada 1×10^8 células totais, seguido de uma delicada homogeneização de todo conteúdo. A suspensão celular foi distribuída em placas de 96 poços (100 μ L por poço) e condicionadas em incubadora. Após 24 horas, foi adicionado ME suplementado com 20% de SFB e HAT (*Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine*) 50x, Gibco®, na quantidade de 100 μ L/poço.

4.6.3.1 Timectomia para obtenção de *feeder cells*

Ainda no primeiro dia pós-fusão, camundongos Balb/c recém desmamados, com aproximadamente três semanas de vida, foram utilizados para obtenção de timócitos (*feeder cells*) destinados à fusão celular como fontes de citocinas e fatores de crescimento necessários para otimizar o crescimento dos hibridomas. Os animais foram eutanasiados e desinfetados da mesma forma citada anteriormente. A cirurgia foi realizada sob condições assépticas.

O timo, como observado na figura 2, foi removido e o procedimento para isolamento dos timócitos foi o mesmo utilizado na esplenectomia, com a diferença que ao fim do procedimento o conteúdo aspirado através de uma seringa foi deixado em repouso verticalmente por apenas cinco minutos.

A contagem do número de timócitos seguiu a mesma regra de contagem de esplenócitos e estes ficaram em cultura por dois dias para verificação de uma possível contaminação de células indesejadas aderidas ao frasco de cultura, para assim, quando necessário, essas serem separadas e descartadas no momento do uso.

Figura 2. Extração do timo para obtenção dos timócitos



Por fim, após 96 horas decorridas da fusão, foram adicionados 1×10^5 *feeders cells* por poço.

4.6.3.2 Seleção dos Hibridomas

Durante a fusão, o PEG, agente químico fusiogênico, altera a permeabilidade da membrana das células permitindo que linfócitos e mielomas se fundam, como desejado. No entanto, indesejavelmente, mielomas também se fundem entre si e algumas tantas outras células permanecem não fusionadas.

Visando obter apenas hibridomas provenientes da fusão ocorrida entre mielomas e linfócitos, suplementou-se o meio de cultura celular com HAT por 15 dias (a troca do meio foi realizada a cada 48 horas) então, como descrito por Szybalski (1961 apud SZYBALSKI, 1992; BIGDA & KOSZALKA, 2013), este começou a selecionar os hibridomas de interesse.

Isso acontece devido a uma característica bioquímica da linhagem de mieloma utilizada, a qual é ausente de hipoxantina-guanosina-fosfo-ribosiltransferase (HGPRT). Em meio contendo hipoxantina e timidina como precursores da síntese de nucleotídeos, a única via existente para a sintetização desses, os quais são essenciais

para a sobrevivência e proliferação celular, é uma via alternativa ativada pela aminopterina, a qual não pode ser ativada na ausência de HGPRT.

Já os linfócitos B (esplenócitos obtidos dos camundongos imunizados) são capazes de ativar essa via por possuírem HGPRT. Assim, mielomas não fusionados ou fusionados entre si não são capazes de sobreviver. Desta forma, para se manterem em proliferação, necessitam da HGPRT dos linfócitos fundidos. Já os linfócitos, por si próprios, possuem um limitado tempo de sobrevivência *in vitro*. Assim, esses necessitam da característica de crescimento indefinido dos mielomas, fazendo com que somente os hibridomas desejados consigam gerar novas colônias celulares e poderão se expandir indefinidamente em cultura.

A cada 48 horas após a fusão, as placas foram averiguadas quanto a morte das células não desejadas, usando o poço controle como comparativo, e quanto ao crescimento de colônias celulares de hibridomas. Assim que híbridos começaram a se proliferar, os poços onde estavam contidos foram marcados para acompanhamento do crescimento celular e futuros *screenings*.

Após 15 dias utilizando meio suplementado com HAT, este foi substituída por HT (*Hypoxantine-Thymidine*) durante uma semana. Ao final deste período, usou-se apenas o ME com 10% de SFB, o qual denomina-se Meio Completo (MC). Os protocolos apresentados respeitam as técnicas clássicas descritas por Earley & Osterling (1985).

4.6.3.2.1 *Screening* dos Hibridomas por ELISA

Dada uma semana após a fusão celular, poços com confluência de hibridomas igual ou superior a 90% foram selecionados para que, após 3 dias, os anticorpos retidos no sobrenadante fossem testados quanto a sua reatividade ao antígeno proveniente do PI01 através do teste de ELISA. Neste período, o meio dos poços selecionados não foi trocado a fim de se concentrar a maior quantidade de anticorpos possíveis.

A técnica utilizada foi realizada da mesma maneira que a descrita no item 4.5.2, diferenciando-se apenas na etapa de incubação com anticorpo primário, que neste

caso foi utilizado 100 µl do sobrenadante de cultura de cada poço selecionado. Como nesta etapa cada poço suportava um total de 200 µl de meio por poço, o teste foi feito apenas em duplicata.

Os hibridomas que apresentaram reatividade no teste foram transferidos para um poço de uma placa de 24 poços e, ao atingirem a confluência igual ou superior a 90%, foram submetidos às mesmas condições de análise. Então, da mesma forma, os hibridomas selecionados foram novamente divididos em três poços de uma placa de 24 poços e igualmente retestados. Devido a maior quantidade de meio disponível, os retestes foram realizados em triplicata.

Após os testes, hibridomas altamente reativos ao antígeno de interesse foram criopreservados e uma alíquota deles foi mantida em cultura para expansão e formação de um banco de células.

4.6.3.2.2 Clonagem Celular

Primeiramente, após a finalização dos *screenings* dos hibridomas, foi realizada a análise dos mais propícios à clonagem. Para isto, foi realizado novo teste de ELISA (como descrito no tópico anterior, porém sem a repetição das testagens) para avaliação da reatividade do sobrenadante de cultura dos hibridomas aos diferentes antígenos do protocolo, a fim de se averiguar quais hibridomas são altamente reativos a antígenos de *P. lutzii* e menos reativos aos de *P. brasiliensis*. Desta forma, os hibridomas a serem clonados foram selecionados.

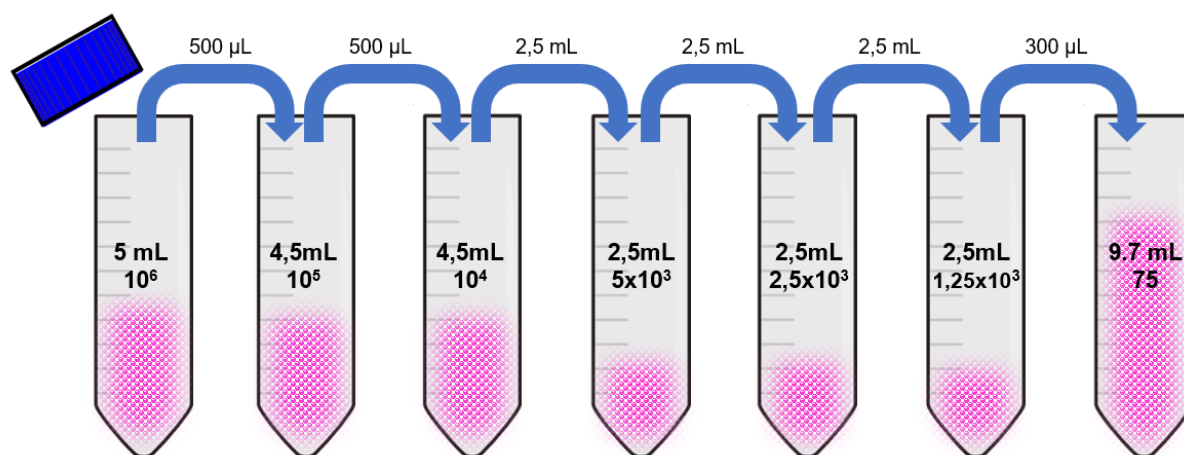
Previamente à clonagem celular, procedeu-se a timectomia para nova obtenção de *feeder cells* da mesma forma descrita no item 4.6.3.1. Diferencialmente, o número de células utilizadas para a clonagem celular é o dobro da usada em poços de fusão celular (2×10^5 timócitos/poço). Os timócitos foram, então, pré-distribuídos nas placas em que se desejava realizar a clonagem de 24 a 48 horas antes da realização do protocolo. Optou-se por duas placas de 96 poços por hibridoma selecionado.

A concentração celular escolhida de hibridomas depositados nas placas foi de 0.75 célula por poço. Testes realizados no Laboratório de Anticorpos Monoclonais (UNESP/FCFar) indicam que esta concentração maximiza a probabilidade de apenas

uma célula ser transferida a cada poço, garantindo-se, assim, que os hibridomas oriundo destas células darão origem a clones de composição genética idêntica.

Decorrido este período, procedeu-se com a técnica de clonagem por diluição limitante como demonstrada na figura 3.

Figura 3. Clonagem por diluição limitante. Os hibridomas foram diluídos a partir de 10^6 até atingir a diluição de 0.75 célula por poço. Para uma placa de clonagem utiliza-se a diluição demonstrada no último tubo, enquanto que para mais placas esse valor é corrigido para o necessário. Todas as diluições foram realizadas em ME e o último tubo foi suplementado com 20% de SFB. Da mesma forma, manteve-se o cultivo dos hibridomas



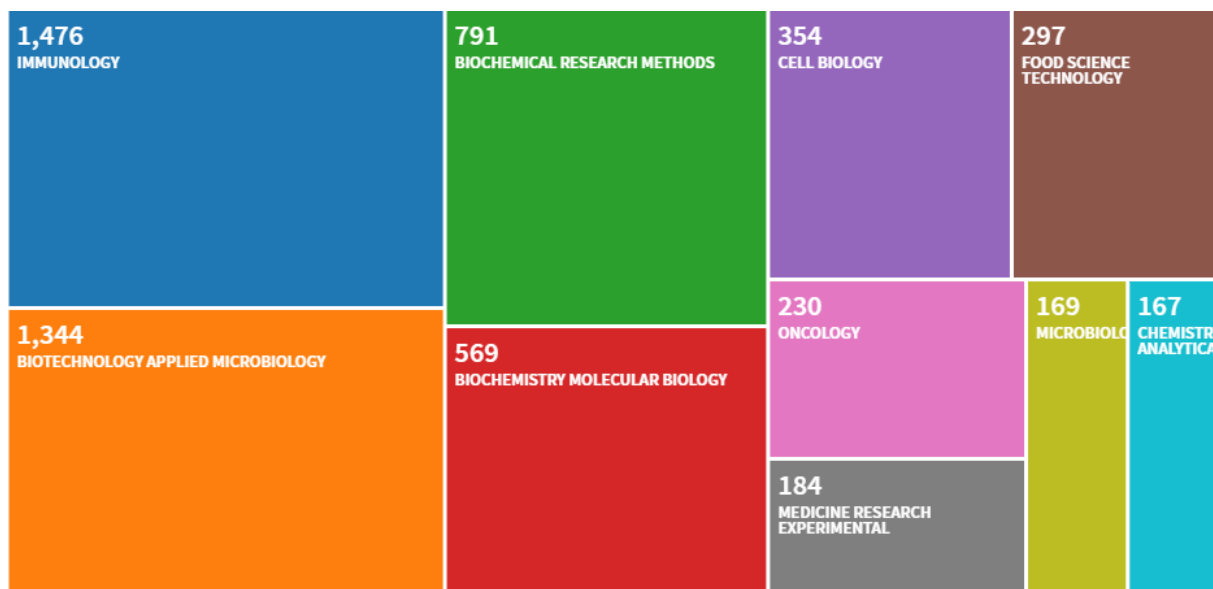
As células foram então plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Três dias após a clonagem celular, as placas foram analisadas por microscopia para identificação dos poços contendo clones únicos. Estes clones foram então submetidos a seleção por teste de ELISA, realizado como citado no item 4.6.3.1., porém, com somente duas repetição do teste, sendo avaliada frente aos diferentes antígenos empregados no protocolo, aspirando, assim, selecionar clones de alta prioridade secretores de anticorpos monoclonais altamente reativos ao imunógeno e não reativos ao tolerógeno.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DA RELEVÂNCIA DO TEMA

Primeiramente, foram escolhidas como palavras chaves “*hybridoma; subtractive immunization; multiple tolerization*” para as quais ocorreu um resultado. Então, usando “*hybridoma; subtractive immunization*” obteve-se apenas 9 resultados. Para “*monoclonal antibodies; subtractive immunization*” 50 resultados foram obtidos, evidenciando o quanto esta é uma tecnologia pouco explorada, sendo que nenhum resultado possuía ligação com “*fungal disease*”. Por outro lado, pesquisando “*monoclonal antibodies; hybridoma*” obteve-se 4.623 registros (figura 4), ressaltando a relevância que esta tecnologia possui, porém, ainda assim, somente 10 resultados foram encontrados relacionados a “*fungal disease*”, demonstrando o quanto ainda pode ser explorada.

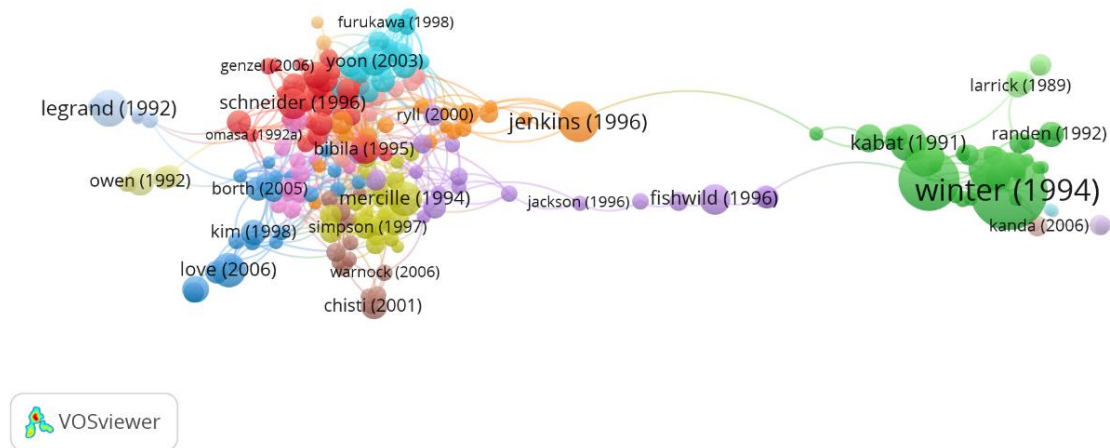
Figura 4. Número de artigos relacionados as palavras chaves “*monoclonal antibodies; hybridoma*” separados por área de interesse



Então o tema foi filtrado por áreas de relevância para a presente pesquisa, como imunologia, biotecnologia aplicada a microbiologia, doenças infecciosas e patologia, exportando os 500 principais registros de arquivos baseado em número de

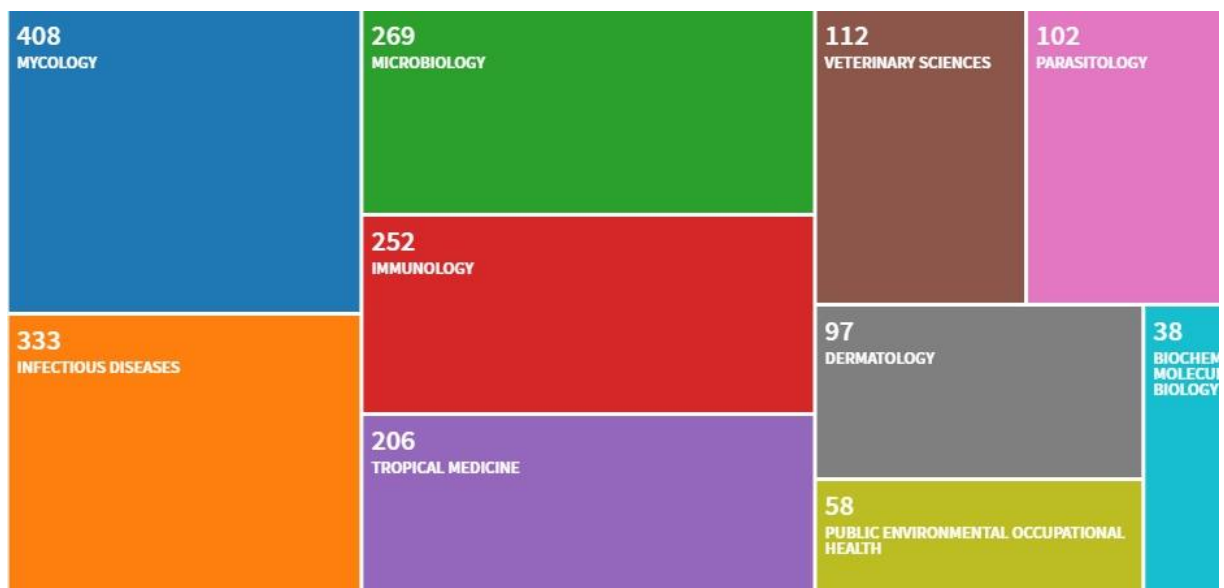
citações, criando um gráfico bibliográfico elaborado através da análise de Citações e Documentos (figura 5).

Figura 5. Análise obtida no software VOSviewer relacionando Citações e Documentos: só foi possível correlacionar 225 dos 500 principais artigos



Uma vez que esta primeira etapa do projeto foca principalmente em aspectos relacionados a PCM, foi realizada uma busca sobre este termo (figura 6), onde obteve-se 1407.

Figura 6. Número de artigos relacionados a palavra chave “*paracoccidioidomycosis*” separados por área de interesse



Foram aplicados filtros a este tema, como micologia, doenças infecciosas, imunologia e medicina tropical, exportando 500 principais registros de arquivos

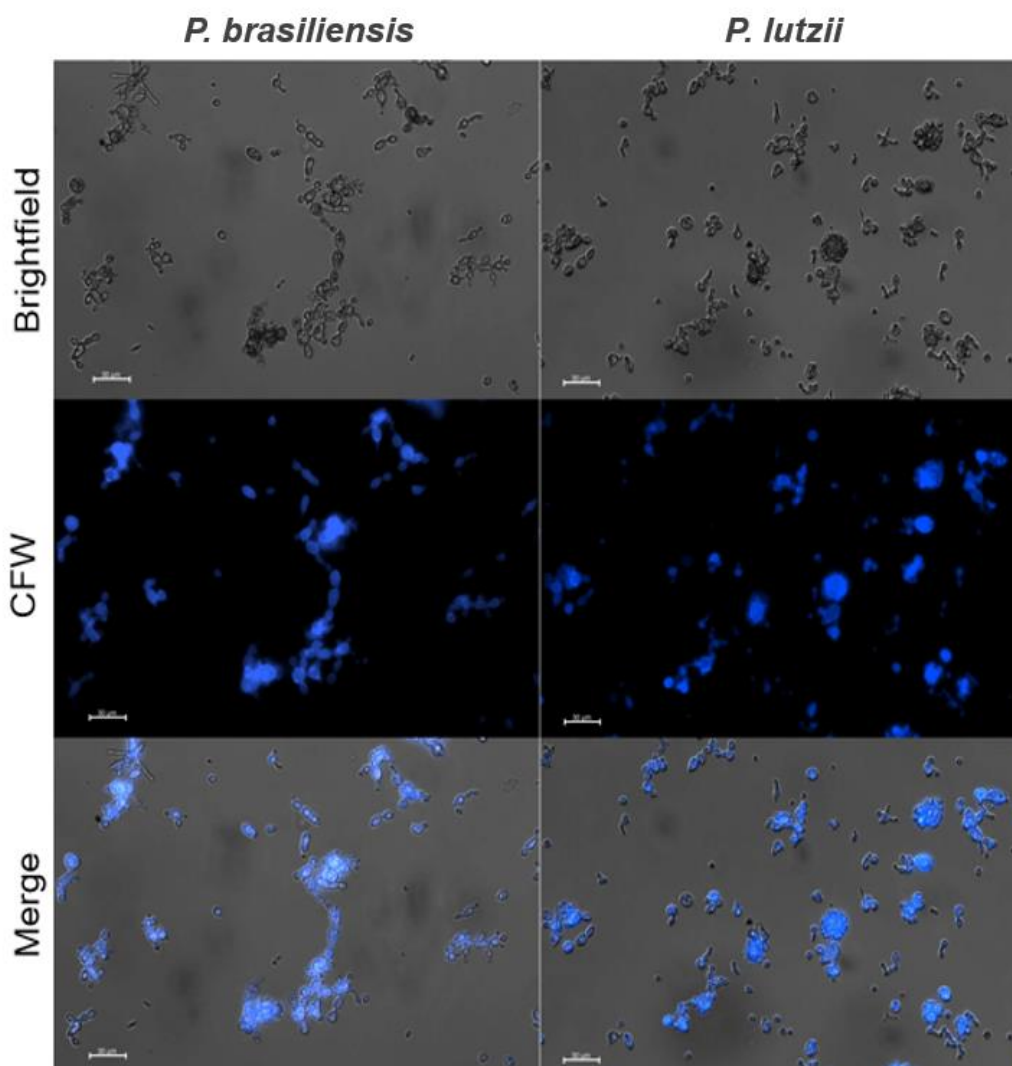
lutzii, respectivamente, foram cultivados em meio Fava-Netto em temperatura de 37°C. Nota-se que macroscopicamente ambas espécies são morfologicamente semelhantes, de aspecto cerebriforme, cor creme e consistência cremosa, como observado na figura 8. Como relatado por Teixeira *et al* (2014), estas características semelhantes levam a dificuldades de identificação das diferentes espécies de *Paracoccidioides*.

Figura 8. Crescimento de colônias leveduriformes após 7 dias de cultivo a 37 °C em meio Ágar Fava-Netto. Colônias de aspecto cerebriforme provenientes do cultivo dos fungos **8a)** *P. brasiliensis* e **8b)** *P. lutzii*



Microscopicamente, pode-se observar a presença de células arredondadas, de parede espessa e de diferentes tamanhos, multiplicando-se por brotamento simples ou múltiplo (figura 9). Siqueira *et al.* (2015) destaca que as células mães em ambas as espécies não possuem diferenças morfométricas significativas, porém entre os brotamentos é observada distinção entre os dois isolados, onde em *P. lutzii* são usualmente homogêneos e globosos, conectados as células-mãe na porção basal e suas células são menores, quando comparadas aos brotamentos da espécie *P. brasiliensis*, que por sua vez são heterogêneas e elípticas. Shikanai-Yasuda *et al.* (2018) ainda salienta que para definição da espécie observada, além do isolamento em cultivo, faz-se necessária a utilização de técnicas moleculares.

Figura 9. Observação microscópica dos fungos *P. brasiliensis* e *P. lutzii* corados com CFW e analisados com auxílio do equipamento *In Cell Analyzer 2000* (GE). A escala em todas as figuras é de 30µm



5.2.2 Quantificação de proteínas totais através do método de *Bradford* (1976)

Após obtenção do CFA de ambas as espécies de *Paracoccidioides*, foi realizada a quantificação do conteúdo proteico por método de Bradford. Os resultados advindos da concentração proteica derivada dos exoantígenos dos fungos *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (PI01) realizados em três momentos diferentes são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Quantificação proteica dos CFAs obtidos dos isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* em diferentes lotes: (LT1), (LT2) e (LT3)

	Concentração observada (mg/mL)	Branco (mg/mL)	Proteínas Totais (mg/mL)
<i>PoolPb18 LT1</i>	0.715	0.540	0.440
<i>PoolPI01 LT1</i>	0.702	0.555	0.365
<i>PoolPb18 LT2</i>	0.671	0.364	0.790
<i>PoolPI01 LT2</i>	0.747	0.366	0.988
<i>PoolPb18 LT3</i>	1.011	0.390	1.625
<i>PoolPb01 LT3</i>	0.805	0.296	1.449

Camargo *et al.* (1991) relataram a quantificação de proteínas totais obtidas em diferentes dias de cultivo (do dia 2 ao dia 7) de *P. brasiliensis* em meio Sabouraud Glicose Agar/35 °C e descreveram que após três dias de crescimento o rendimento de proteínas totais é maior, sendo de 0.208 mg/mL, em contraste com o sétimo dia, quando o rendimento foi de apenas 0.0362 mg/mL. Observa-se ainda que estes possuem alta correlação direta com a viabilidade do fungo. No presente estudo, o CFA foi obtido em diferentes dias do cultivo, não tendo ultrapassado o limite de sete dias. Os resultados obtidos mostraram um rendimento proteico maior mesmo no experimento de menor rendimento – 0.365 mg/mL.

Sabendo-se que não é recomendado inoculações com volumes maiores que 100 µl de adjuvante de *Freund* em camundongos (JACKSON, 1995; CCAC, 2002; LEENAARS, 2005), considera-se satisfatória a concentração de proteínas totais obtidas por meio de CFA no segundo e terceiro lote, uma vez que foi administrada a quantidade máxima de 70 µg de proteína em cada imunização, respeitando-se o limite de volume. Vale salientar as variações que ocorrem quanto a quantidade proteica resultada de antígenos produzidos em momentos distintos.

É de grande importância a concentração obtida no CFA uma vez que a quantidade inoculada no animal possui impacto na saúde do mesmo devido a quantidade de adjuvante usada, o qual é emulsionado ao antígeno, em igual volume, servindo de imunopotenciador (STILS JR, 2005), uma vez que o uso dos adjuvantes causa danos ao organismo do animal, sendo que o adjuvante de Freund completo

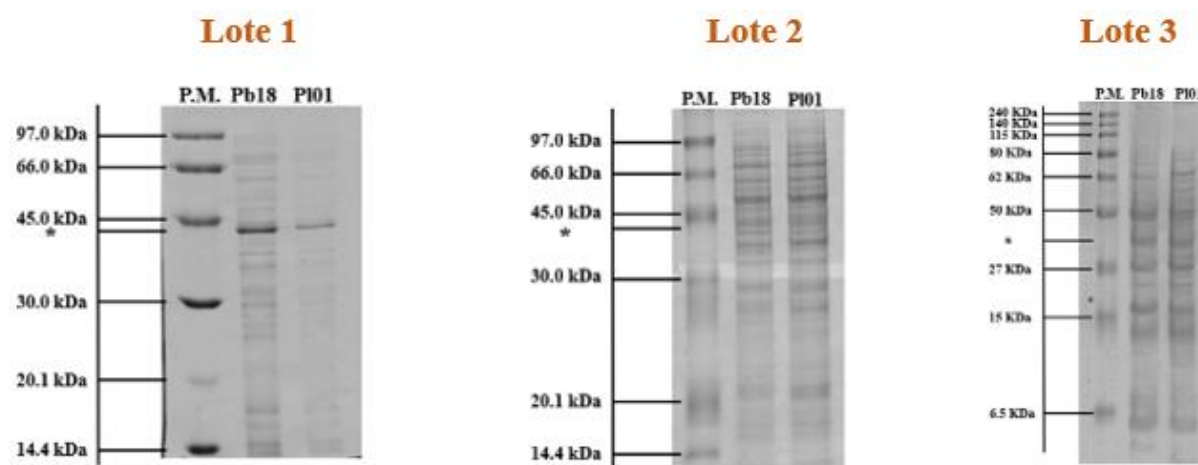
acarreta efeitos ainda mais maléficos, em contraste com sua alta eficiência (CCAC, 2002; STILS JR, 2005).

Deste modo, o segundo experimento trouxe menos comprometimento ao animal, porém ainda acarretou a morte dos mesmos, contrastando com o terceiro experimento, no qual todos animais se mantiveram aparentemente saudáveis até o final do protocolo. Isso pode ter sido favorecido pela diminuição da quantidade de proteínas empregadas durante as imunizações (redução de 70 µg para 50 µg) e pela maior concentração proteica dos antígenos em ambas espécies no terceiro lote, o que, conseqüentemente, acarretou na diminuição do volume dos adjuvantes, não se utilizando volume maior que 35 µL por animal.

5.2.3 Perfil proteico das amostras de *P. brasiliensis* e de *P. lutzii*

Os perfis proteicos dos CFAs de Pb18 e PI01 nos diferentes lotes também foram avaliados, como demonstrado na figura 10, através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – *SDS PAGE*. Resultados similares foram obtidos em ambas as produções de CFA.

Figura 10. Perfil proteico do CFA de Pb18 e PI01 dos três lotes obtidos por técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – *SDS PAGE*. A linha 1 refere-se ao peso molecular (PM) e as linhas 2 e 3 aos extratos antigênicos de ambos os fungos. O asterisco demarca a presença de uma importante banda em 43 kDa



O perfil proteico dos diferentes lotes de CFA de Pb18 e PI01 demonstra a presença de bandas que se estendem desde 97 kDa a 14 kDa, evidenciando o seu

complexo repertório de proteínas. Padrões moleculares semelhantes foram encontrados por GEGEMBAUER *et al.* (2014). É interessante notar que quando o PM utilizado compreendia a faixa de 240 kDa a 6.5 kDa, não houve visualização de bandas entre 240 e 115 kDa.

Embora semelhantes, os diferentes lotes obtidos demonstram uma variação no padrão de bandas, notavelmente do primeiro lote para os dois seguintes, no que diz respeito a presença da banda em 43 kDa, que é altamente evidente no CFA derivado do Pb18 e que mesmo presente, essa banda é menor nos demais lotes. Essa variação pode ser resultado de alterações de temperatura, umidade e até mesmo número de repiques realizados com o fungo durante o seu cultivo (TELES & MARTINS, 2011). É importante salientar que esse vasto repertório proteico está envolvido com diversos processos biológicos de ambas as espécies, incluindo patogenicidade, virulência, evasão imune, entre outros (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Ainda assim, em todos os lotes de CFA pode-se verificar a presença de uma banda em 43 kDa referente a glicoproteína gp43. Entre as proteínas de importância na detecção da doença (20, 43, 45, 55 e 70 kDa) há um destaque para essa glicoproteína, a qual é reativa em 100% dos soros de pacientes com PCM causada por *P. brasiliensis*, sendo, portanto, considerada o principal componente antigênico e principal fator de virulência deste (CAMARGO *et al.*, 1991). Já em *P. lutzii*, encontra-se apenas um ortólogo subexpresso com 81% de semelhança, nomeado por Leitão Jr. *et al.* (2014) de Plp43.

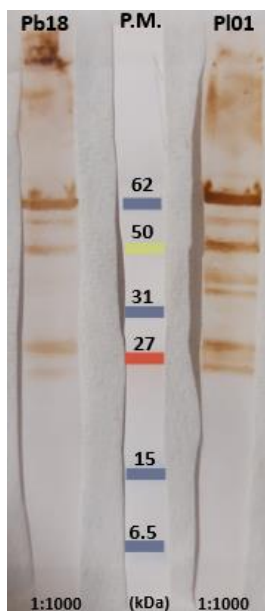
Nos estudos de Batista *et al.* (2010) e Gegembauer *et al.* (2014), soros de pacientes com PCM causada por *P. brasiliensis* não reconheceram nenhum antígeno do CFA de *P. lutzii*. Em contraste, soros de pacientes com PCM devido a *P. lutzii* foram capazes de reconhecer antígenos de ambas as preparações antigênicas, evidenciando a complexidade antigênica deste e sugerindo que ele possui tanto antígenos específicos, quanto antígenos compartilhados com o *P. brasiliensis*. No entanto, antígenos com predominância da gp43 tendem a mascarar a resposta imune frente a outras moléculas antigênicas. Assim, uma vez que a gp43 é fracamente expressa em PCM causada por *P. lutzii*, ela não serve para diagnóstico da mesma. Ademais antígenos específicos de *P. lutzii* ainda precisam ser identificados.

Tendo em vista que se deseja obter anticorpos que sejam capazes de diferenciar as duas espécies de fungos, um vasto perfil proteico é desejado. Dessa forma, considera-se que o perfil obtido nos lotes 2 e 3 foi mais satisfatório do que o lote 1, o qual havia sido filtrado em filtro de seringa KASVI® 0.22 µm, processo o qual não foi repetido nos demais lotes devido a necessidade de diluição da amostra, o que acarretava em uma baixa concentração proteica para ser utilizada nas imunizações, além de trazer um perfil proteico limitado.

5.2.4 Avaliação proteica do exoantígeno de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* por *Western Blotting*

Os CFAs obtidos das cepas Pb18 e PI01 foram avaliados para constatar se estes continham proteínas notoriamente conhecidas que possuem um papel representativo na doença (figura 11).

Figura 11. Avaliação do perfil proteico em ambos os CFAs de Pb18 e PI01 por técnica de *Western Blotting*, utilizando soro murino anti-*Paracoccidioides* spp. Os CFAs avaliados foram derivados do lote 3



A análise da membrana possibilita constatar a presença de um *spot* proeminente em aproximadamente 62 kDa, dois na faixa de 58 a 50kDa, dois entre 45 a 31 KDa, o qual ficou pouco visível na fita referente ao Pb18, e outros próximos a 27 kDa em ambas amostras. O de 27 kDa representa possivelmente a proteína p27, que

é um antígeno protetor de *P. brasiliensis* capaz de desencadear uma resposta imune efetiva, que ao ser utilizado como biomarcador em ensaios de *dot blot* demonstrou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 98%, divergentemente do que é encontrado no *P. lutzii*, no qual, normalmente, ela é fracamente expressa (DA SILVA *et al.*, 2016).

Na outra faixa, encontra-se algumas possibilidades, como as proteínas de 52 e 54 kDa, as quais são, comumente, fracamente expressas, porém encontradas em reações com soros de *P. brasiliensis*. Proteínas nessa faixa de peso molecular costumam pertencer a família das adesinas, sendo a de 54 kDa responsável pela ligação à fibronectina (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2016).

Já o da faixa de 62 kDa, possivelmente representa a Hsp60, membro da família das proteínas de choque térmico, as quais participam de vários processos celulares, sendo importantes na modulação do sistema imunológico (CUNHA, DA. *et al.*, 2002; PERON, G. *et al.*, 2017).

Ainda neste experimento, um *spot* duplo na faixa de 40 kDa também foi revelado. Possivelmente, este representa a já citada glicoproteína gp43. O referido *spot* ficou de difícil visualização na fita relativa ao Pb18. Isto pode ter se dado em razão de algum problema durante a aplicação da amostra no gel ou na transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, o que pode ser corroborado ao se observar que todos outros *spots* da mesma fita também se encontram com uma marcação mais fraca quando comparado as marcações da fita referente ao PI01.

Sabe-se que, ao menos, duas imunizações no animal do qual se coletou soro policlonal utilizado no experimento foram realizadas com antígenos de CFA PI01. Contudo, não se sabe se também houve inoculações com antígenos de CFA Pb18, impossibilitando análises mais conclusivas.

Ainda assim, considerando o soro utilizado como sendo equivalente ao soro de um paciente com PCM causada por *P. lutzii*, observa-se que, igualmente ao que foi relatado nos estudos de Gegembauer *et al.* (2014), o aparecimento de *spots* na faixa da proteína gp43 pode ocorrer e um padrão mais diverso de *spots* é esperado, diferentemente do que se esperaria de um soro de PCM causada por *P. brasiliensis*, o qual dificilmente reagiria ao CFA de PI01 e onde a seria esperado uma marcação

muito mais evidente e exclusiva do *spot* da faixa de 43 quando utilizado o CFA de Pb18.

A partir desses resultados pode-se constatar que os antígenos escolhidos para serem utilizados durante a imunização subtrativa e geração de anticorpos tratam-se de amostras complexas, idealmente representativas para a geração de imunoglobulinas específicas a novos biomarcadores, que podem futuramente ser aplicadas na prática diagnóstica da PCM ocasionada pela espécie *P. lutzii*.

5.3 PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO SUBTRATIVA DE MÚLTIPLAS TOLERIZAÇÕES

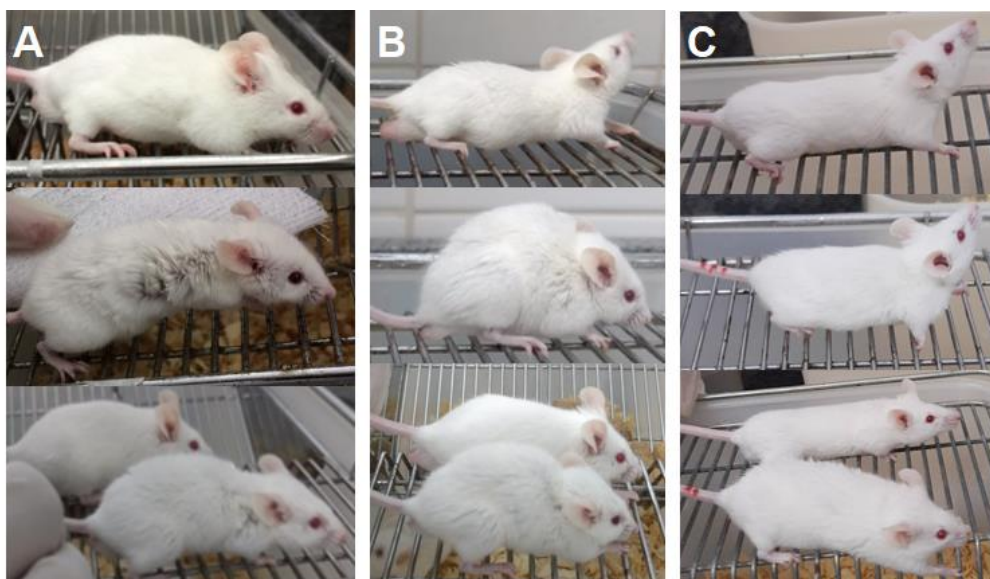
5.3.1 Efeitos dos ciclos de tolerização nos animais

Durante a execução do protocolo de imunização, notoriamente no decorrer dos ciclos de tolerização, ficou evidente que a dose de ciclofosfamida administrada estava gerando efeitos altamente deletérios aos camundongos imunizados, como perda de pelo, queda brusca do peso e postura arqueada (observados nas figuras 12A e 12B) - efeitos colaterais como alopecia, anorexia, perda de peso, náuseas, entre outros, estão relatados no próprio documento informativo que acompanha a Cy.

Estas características foram observadas desde a primeira semana após o primeiro ciclo de tolerização e culminaram com a morte de quase todos os camundongos após o 2º ciclo de tolerização, referente à primeira agenda, sobrevivendo apenas um único animal que passou pelo 3º e 4º ciclo e, após, também veio a falecer.

A primeira dose utilizada, 200 mg/kg, foi escolhida com base no estudo de Brooks *et al.* (1993). Todavia, neste estudo a repetição dos ciclos de tolerização não foi realizada, de modo que os resultados advindos da combinação da dose com a repetição do seu uso não poderiam ser previstos.

Figura 12. Aspectos físicos dos camundongos controles e imunizados durante a execução dos protocolos de imunização subtratativa de múltiplas tolerizações, sendo A referente ao primeiro protocolo, B referente ao segundo e C referente ao terceiro. As fotografias da parte superior da figura correspondem aos camundongos controles, enquanto as fotografias medianas referem-se aos camundongos imunizados. Já as inferiores, referem-se a um comparativo entre os dois animais. Em todas as imagens o animal registrado foi o último animal vivo da agenda a qual pertencia



Dado os ocorridos, decidiu-se reduzir a dose desse fármaco na segunda tentativa (segundo protocolo) de imunizações, o que se mostrou parcialmente efetivo, pois permitiu que três dos seis camundongos imunizados resistissem até o 5º ciclo de tolerização, com visível melhora em seus estados físicos. Somente a partir do terceiro ciclo os efeitos da droga começaram a se manifestar, ainda assim, de forma mais tênue. Contudo, novamente todos vieram a falecer, em dias distintos, anteriormente à etapa de imunização onde seria administrado o antígeno de interesse (*P. lutzii*).

Com os resultados apresentados, foi constatado que a morte de todos os camundongos imunizados parece estar envolvida com a toxicidade do fármaco empregado, onde seus efeitos parecem se acumular frente às inúmeras doses adotadas no protocolo. Além disso, o agravamento dos efeitos adversos, principalmente o quadro de anorexia constatado, pode ter sido potencializado com o uso do adjuvante completo/incompleto de *Freund* durante o preparo das emulsões com o tolerógeno, que culminava em diarreia e perda de peso observada em todos os camundongos nos

dois dias seguintes após a sua administração, contribuindo no insucesso do protocolo proposto.

Diante o exposto, como elucidado anteriormente, houve a realização de um terceiro protocolo de imunizações, no qual os animais se apresentaram aparentemente mais saudáveis e com uma considerável redução dos sintomas apresentados anteriormente (figura 12C).

5.3.1.1 Acompanhamento do peso corporal dos camundongos

A pesagem dos camundongos submetidos aos protocolos foi realizada e registrada, podendo ser observadas nos gráficos 2A, 2B e 2C referentes ao primeiro, segundo e terceiro protocolo de imunização, respectivamente.

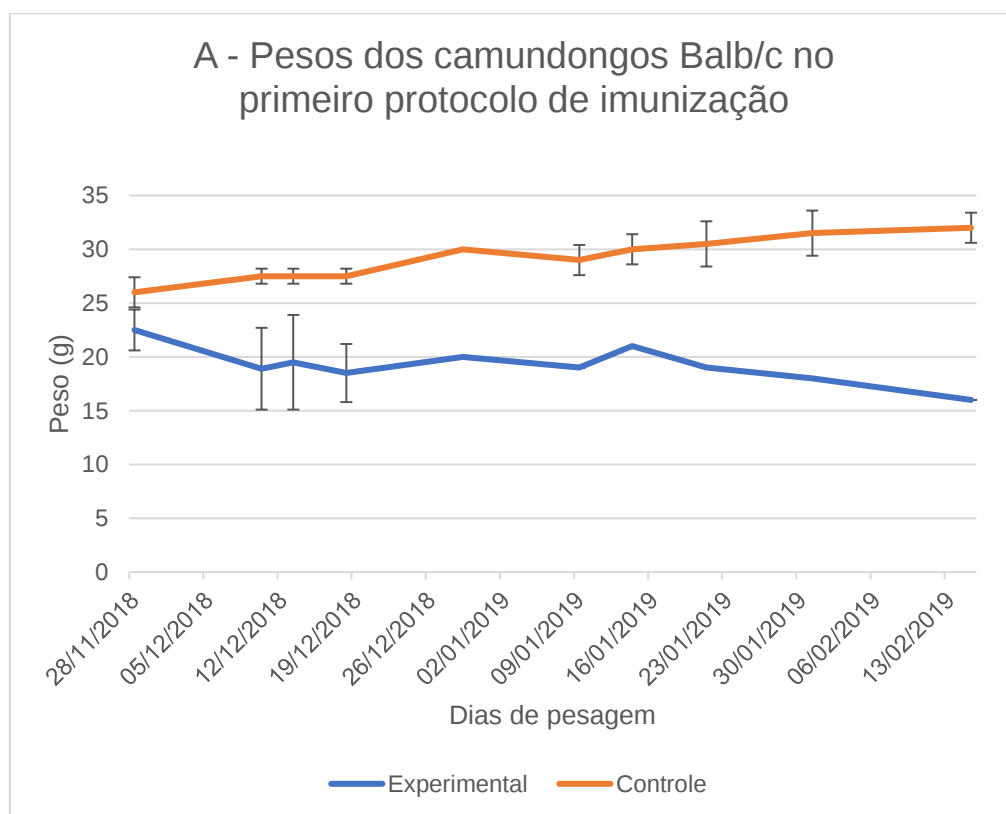
Através dos gráficos 2A e 2B fica claro que houve uma significativa perda de peso dos animais imunizados quando comparados aos controles, os quais, como esperado, continuaram a ganhar peso, incluindo o controle que recebera os veículos. Já no gráfico 2C, verifica-se que a média dos pesos dos animais experimentais ficou próxima as dos animais controles. Nele também é possível observar que o período de tolerização dos animais correspondeu ao que houve maior variabilidade no peso dos animais (período o qual se encerrou ao final do mês de outubro).

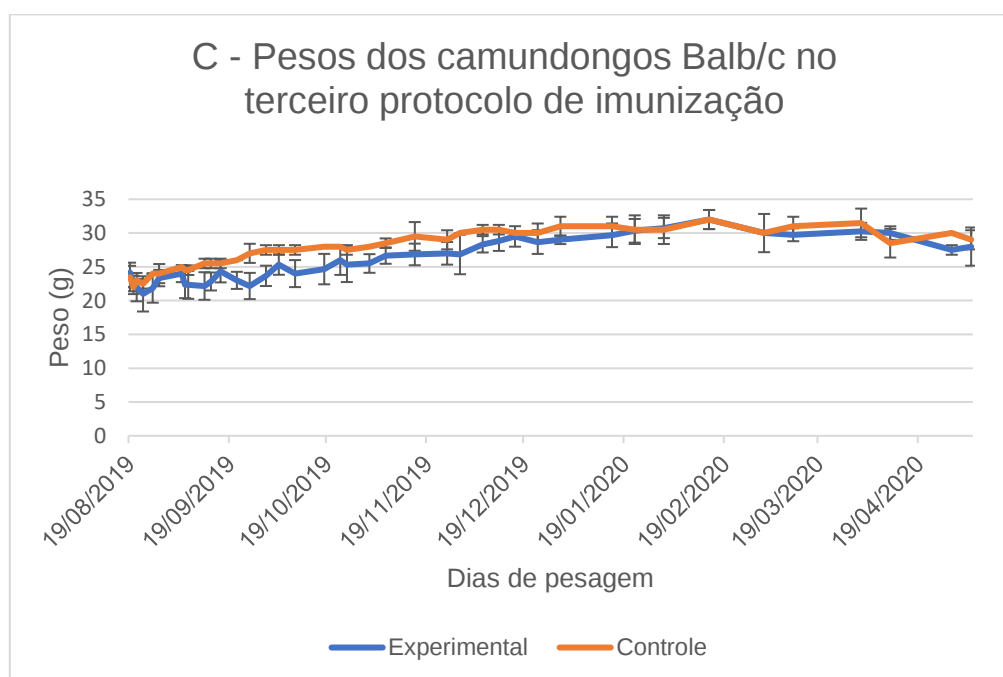
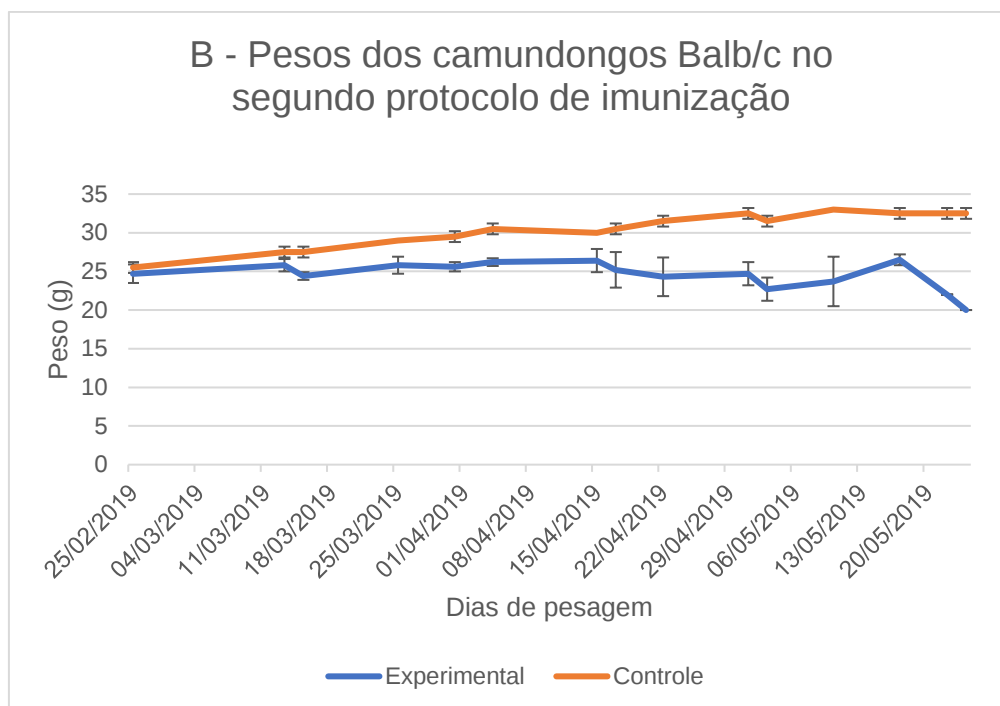
Vale ressaltar ainda que o menor peso registrado dos camundongos durante o primeiro protocolo foi de 14g, contrastando com os controles que no mesmo momento pesavam em média 27,5g, enquanto no segundo, foi de 20g *versus* 33g e no terceiro 20g enquanto os controles possuíam peso médio de 27g, sendo estes pesos menores ao de quando eles começaram os protocolos, quando seus pesos médios eram de aproximadamente 24g.

Destaca-se ainda que os gráficos 2A e 2B demonstram vários momentos onde houve um aumento no peso dos animais experimentais, contudo tais números se devem ao fato de que, em geral, os animais que chegavam a pesar de 20 a 14 gramas vieram à óbito, fazendo, portanto, com que a média de peso aumentasse ao ser retirado do cálculo.

Da mesma forma, as maiores reduções do desvio padrão ocorreram em razão do óbito dos camundongos. Embora tenham ocorrido variações pelo motivo exposto, ainda é possível observar o quanto os desvios são maiores nos animais experimentais quando comparados aos controles, salientando a instabilidade que o protocolo causa em seus organismos, mesmo sendo oriundos de uma linhagem isogênica. O mesmo não se aplica ao que é observado no gráfico 2C, devido a este se referir a um protocolo onde não houve mortes de animais.

Gráfico 2. Peso médio com desvio padrão dos camundongos durante os protocolos de imunização, sendo A referente ao primeiro protocolo, B ao segundo e C ao terceiro. A média e o desvio foram calculados com base no peso dos camundongos vivos no momento das datas de pesagem





Fica, assim, demonstrado que a redução da dose de ciclofosfamida foi evidentemente benéfica, no sentido de diminuir os efeitos lesivos ocasionados pela sua administração, embora a concentração de 150 mg/kg do peso corporal do animal não tenha sido suficiente para mantê-los vivos durante toda a execução do primeiro protocolo subtrativo. Já no terceiro protocolo, reiterando que houve uma diminuição ainda maior da dose, todos animais mantiveram-se vivos.

5.3.1.2 Mortalidade dos camundongos ao decorrer dos ciclos

A redução da dose garantiu um aumento na sobrevivência dos camundongos, evidenciado pelo fato de que na primeira agenda apenas um camundongo sobreviveu até o terceiro ciclo, enquanto na segunda agenda apenas um havia morrido no momento do terceiro ciclo, como observado nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Número de mortes no decorrer dos ciclos de tolerização durante a primeira agenda de imunização

	<i>Ciclo de Tolerização</i>	<i>Número de mortes</i>
<i>1ª Agenda</i>	1º	0
	2º	5
	3º	1

Tabela 6. Número de mortes no decorrer dos ciclos de tolerização durante a segunda agenda de imunização

	<i>Ciclo de Tolerização</i>	<i>Número de mortes</i>
<i>2ª Agenda</i>	1º	1
	2º	0
	3º	0
	4º	1
	5º	4

Anote-se que a primeira morte observada durante a segunda agenda de imunização pode ter ocorrido devido ao animal ter um peso inicial (23g) já abaixo dos demais (média de 25.1 g), sendo isto considerável uma vez que o experimento começa antes que os animais atinjam a fase adulta.

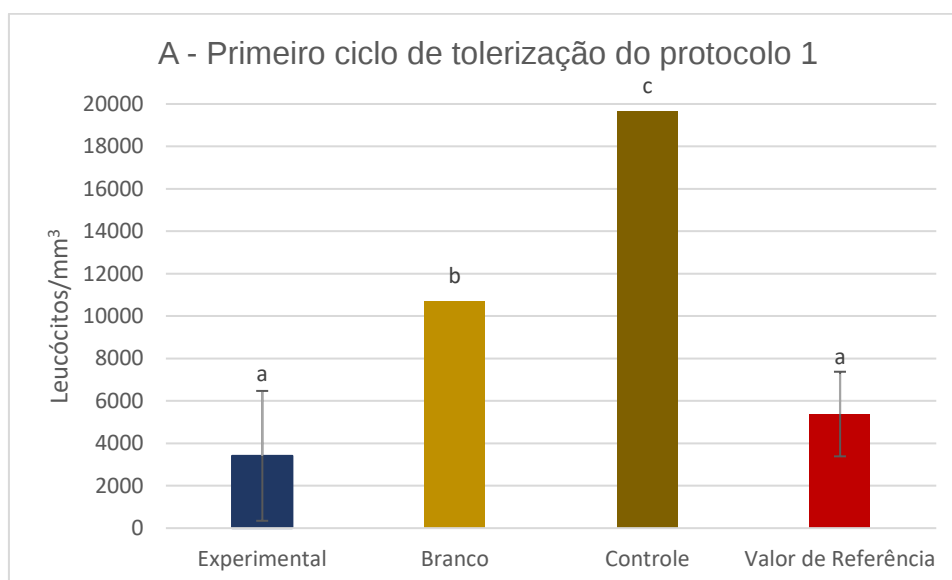
Já na terceira agenda não houve morte de nenhum camundongo durante todo o protocolo. Decorridos quatro meses da finalização do mesmo, ocorreu o óbito de um camundongo, sendo que este aparentava estar saudável e sua causa não foi apurada. Deste modo, sugere-se que a redução da dose de Cy viabilizou a sobrevivência dos camundongos até o momento da fusão celular.

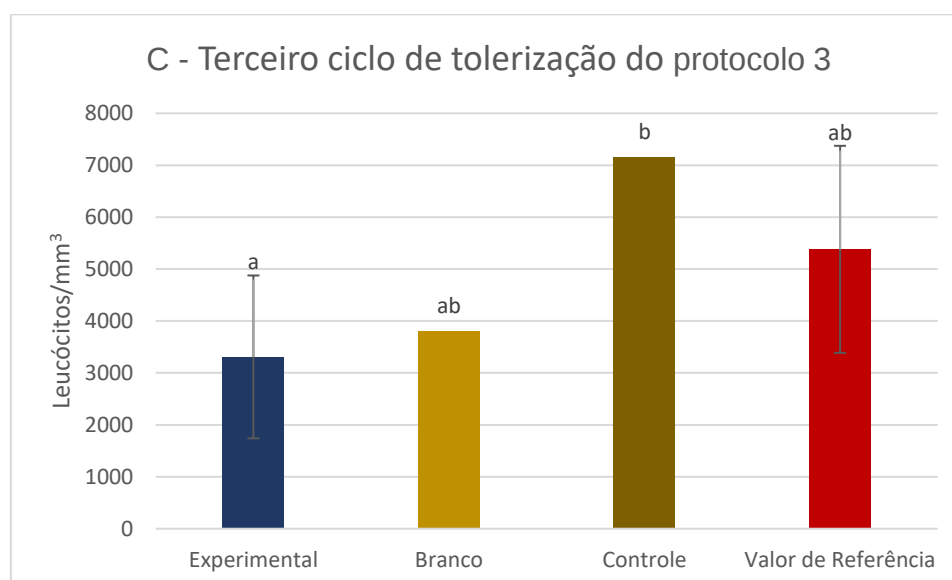
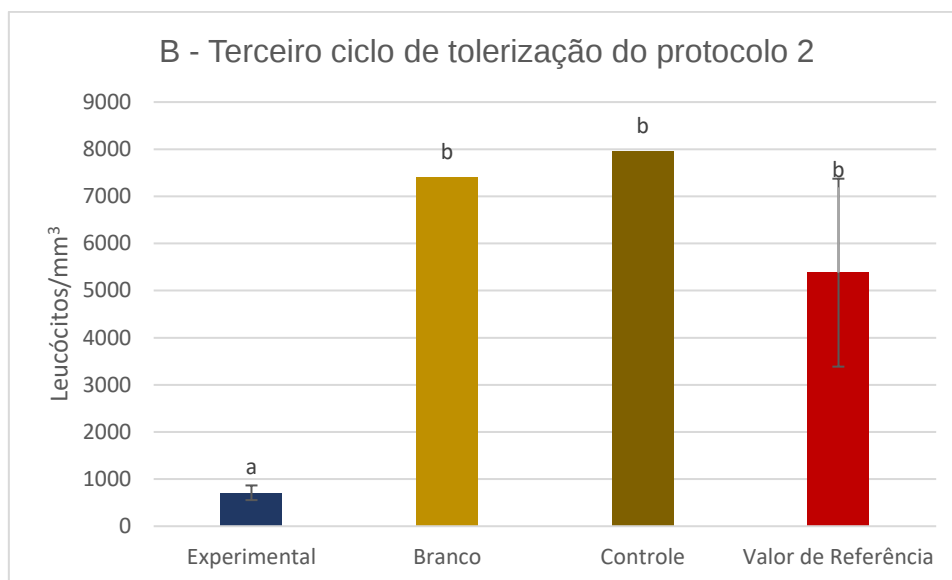
5.3.2 Avaliação da imunossupressão e reestabelecimento do sistema imune, através da reatividade dos anticorpos policlonais presentes no soro dos camundongos

Para avaliar se a ciclofosfamida estava imunossuprimindo os animais conforme esperado, embora já evidenciado pelos efeitos adversos observados pelo fármaco mencionados acima, realizou-se a contagem de leucócitos totais circulantes no sangue periférico, conforme demonstrado nos gráficos 3A, 3B, 3C referentes, respectivamente, aos protocolos de imunização 1, 2 e 3.

Baseado em Barbosa *et al.* (2017) o valor de referência empregado no experimento para camundongos BALB/c machos adultos é de 5380 ± 1994 . Com o intuito de se analisar a diferença entre os animais imunizados, os controles e o valor de referência, utilizou-se da análise estatística através do Teste ANOVA juntamente ao Teste *Tukey* através do software BioEstat 5.3 (AYRES, et al., 2007). O p-valor adotado foi $<0,005$ e os gráficos foram plotados no Software Microsoft Excel® versão 2005. Entende-se que devido ao tamanho reduzido do espaço amostral, as análises não podem ser dadas como estatisticamente precisas e foram utilizadas apenas para auxiliar no direcionamento da análise dos resultados.

Gráfico 3. Contagem de leucócitos totais/mm³ para avaliação da imunossupressão. A coleta apresentada no gráfico 3A se deu cinco dias após a última dose de Cy e do 3B e 3C após três dias. O branco representa o animal que recebeu apenas os veículos e o controle se refere ao animal que não foi submetido a qualquer inoculação





Verificou-se que durante a primeira agenda de imunização quatro animais imunizados estavam abaixo do valor de referência, indicando a imunossupressão causada pelo fármaco, enquanto os outros dois apresentavam contagem maior ou dentro do valor de referência, o que fez com que o grupo apresentasse um valor estatístico igual ao valor de referência. Isso pode ter ocorrido devido ao restabelecimento do sistema imune como descrito por Huyan *et al.* (2011), que avaliou os efeitos do fármaco (50 – 200 mg/kg) na linhagem BALB/c, assim como o perfil de decaimento e restabelecimento de diferentes populações celulares do sistema imune após a sua administração, demonstrando que no 4º dia se inicia o processo de restabelecimento da imunidade, o que está em concordância uma vez que essa

primeira coleta de sangue se deu 5 dias após a aplicação da última dose de Cy no primeiro ciclo de tolerização.

Ainda assim, o grupo experimental apresentou diferença estatística quando comparado aos dois controles do experimento. Estes exibiram contagens de leucócitos acima dos valores de referência, porém essa variação pode se dar em diferentes ninhadas da mesma linhagem de camundongos. Uma vez que estes provêm de uma mesma ninhada, a comparação com os controles reforça a imunossupressão.

O mesmo efeito imunossupressor também foi constatado durante a segunda agenda de imunização, embora tenha se utilizado uma dose menor do fármaco, o efeito imunossupressor encontrava-se ainda mais evidente nesse momento, visto que a contagem de leucócitos foi realizada após 3 dias da última dose da Cy.

A variação do momento da coleta de sangue periférico para a contagem de leucócitos totais da primeira agenda (após o 1º ciclo de tolerização) para a segunda agenda (após o 3º ciclo de tolerização) foi proposital, uma vez que se atentou que o 1º ciclo de tolerização é aquele que mais debilita os camundongos por tratarem-se de animais mais jovens e por se utilizar o adjuvante de *Freund* completo durante o preparo da emulsão antigênica, o qual é mais agressivo ao animal, pelos mesmos motivos as mesmas condições foram repetidas na terceira agenda de imunizações (LEENAARS, 1998; STILS JR, 2005).

De modo similar ao encontrado na análise do primeiro protocolo de imunizações, o terceiro protocolo apresentou quatro animais com contagem de leucócitos abaixo do valor de referência e abaixo do valor do controle que não foi submetido a nenhuma inoculação. Isso sugere que a dose mais baixa de Cy possivelmente acarreta uma resposta menos uniforme do sistema imune dos animais, uma vez que a coleta se deu no período mais indicado para análise (como já citado, antes do decurso de quatro dias após a última dose de Cy). Todavia, ainda assim, para a maioria dos animais, a contagem de leucócitos indicou que a dose foi suficientemente imunossupressora, não de forma tão evidente quanto nos protocolos anteriores, mas satisfatória, uma vez que os animais sobreviveram até o encerrar do protocolo.

Além disso, coletas de sangue periférico foram realizadas após dez dias do 2º e 5º ciclo de tolerização, a fim de se obter soro policlonal para a avaliação da responsividade dos anticorpos circulantes contra o tolerógeno. Aproveitou-se, então, para coletar uma quantidade mínima de sangue (10ul) por animal, a qual foi utilizada para verificar o restabelecimento do sistema imune pela nova contagem de leucócitos totais/mm³. Os resultados encontram-se nos gráficos 4A, 4B, 4C, 4D, 4E e 4F. O valor de referência e as condições de análise estatística foram as mesmas das análises precedentes.

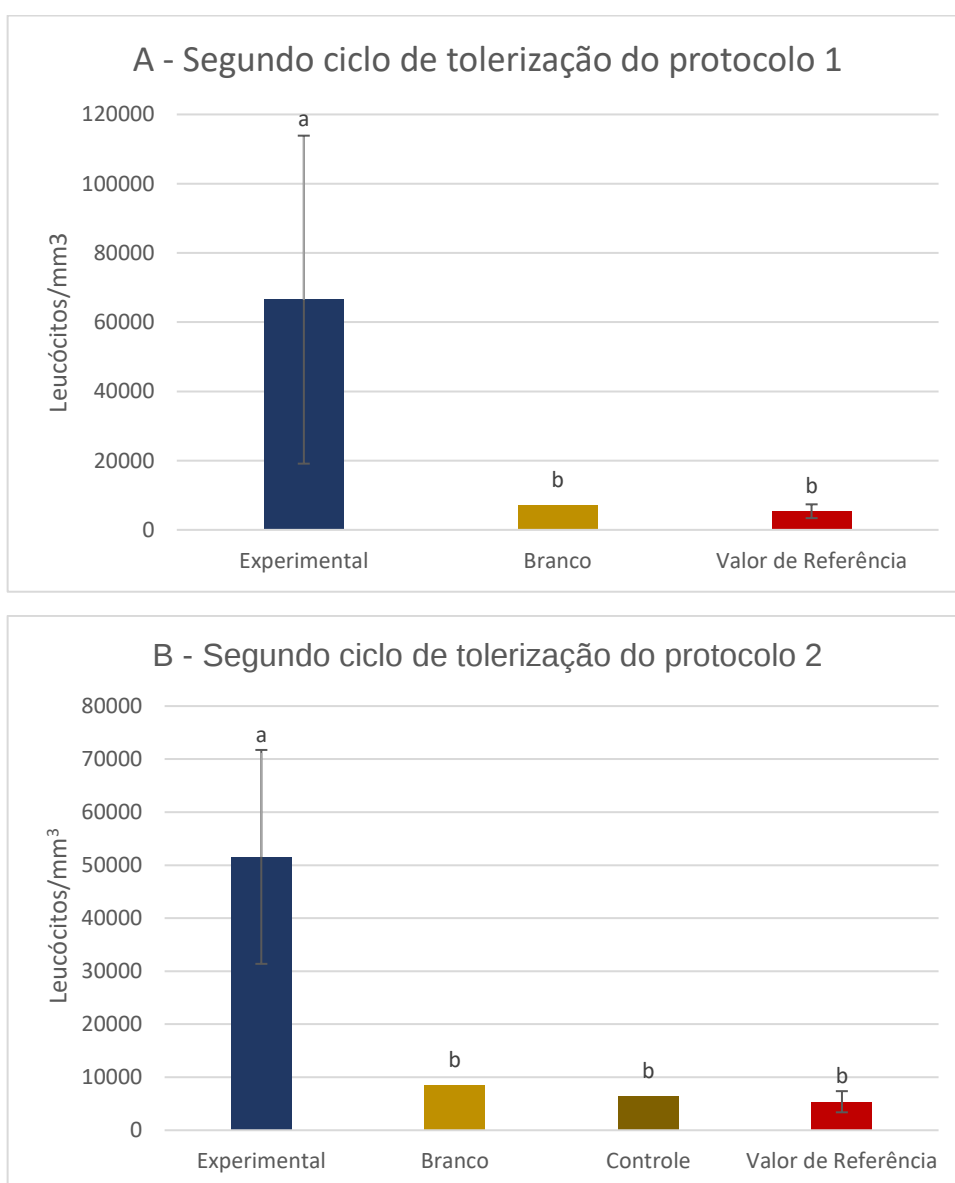
O gráfico 4A refere-se à coleta de sangue realizada na primeira agenda de imunizações. Nesta, houve coleta apenas após o segundo ciclo de tolerizações devido a não sobrevivência dos animais até o quinto ciclo. O sangue do animal controle, o qual não é submetido a nenhum tipo de imunização, não foi coletado devido a este apresentar necrose em sua cauda.

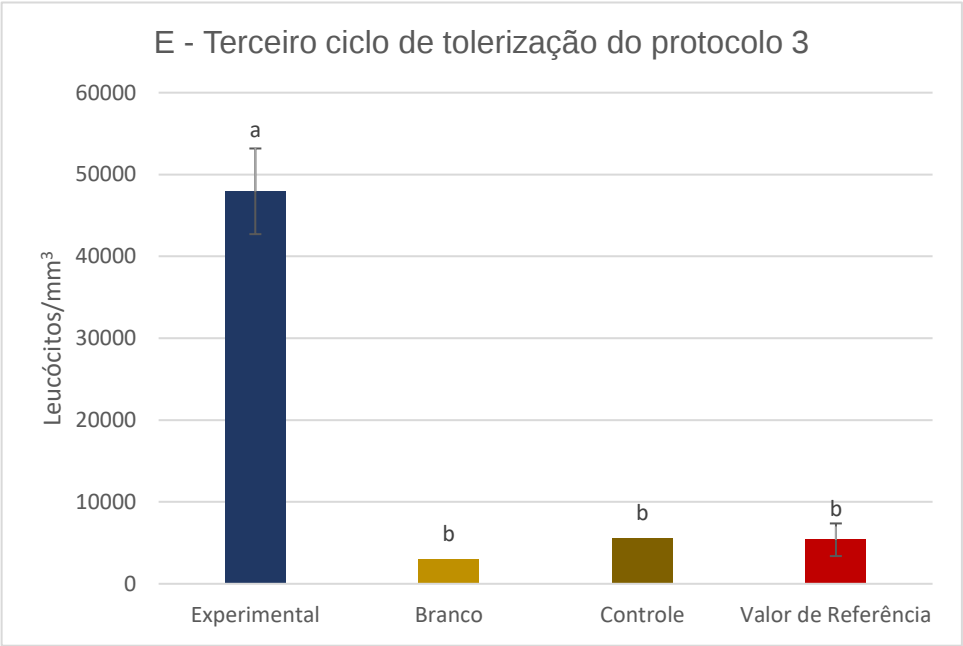
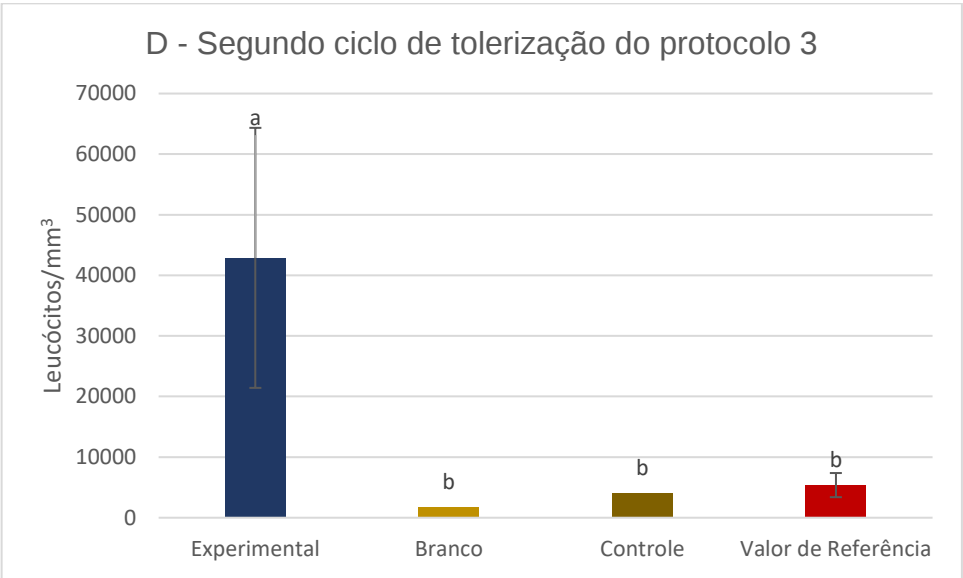
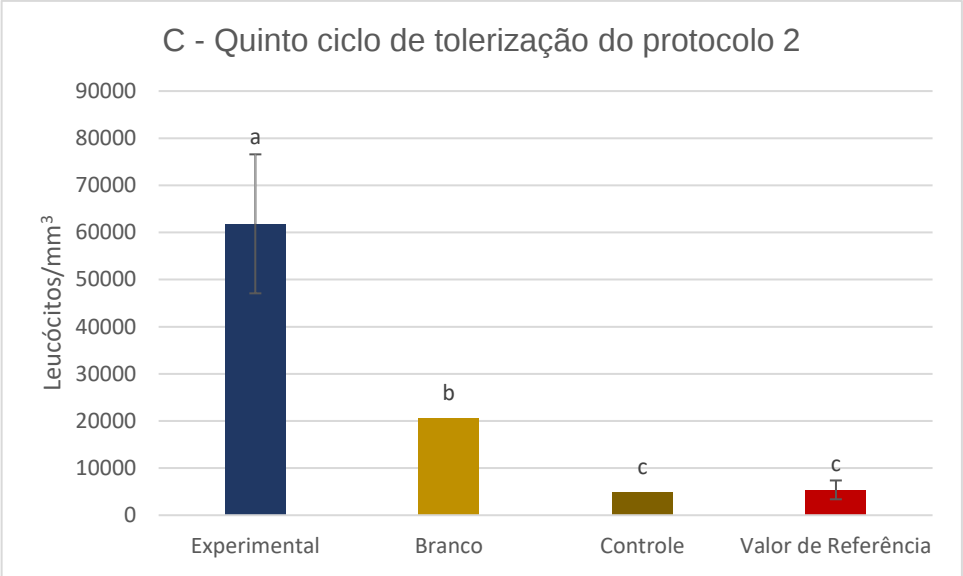
Por sua vez, o gráfico 4B refere-se à coleta realizada na segunda agenda de imunizações após o segundo ciclo de tolerizações e o 4C após o quinto ciclo da mesma agenda.

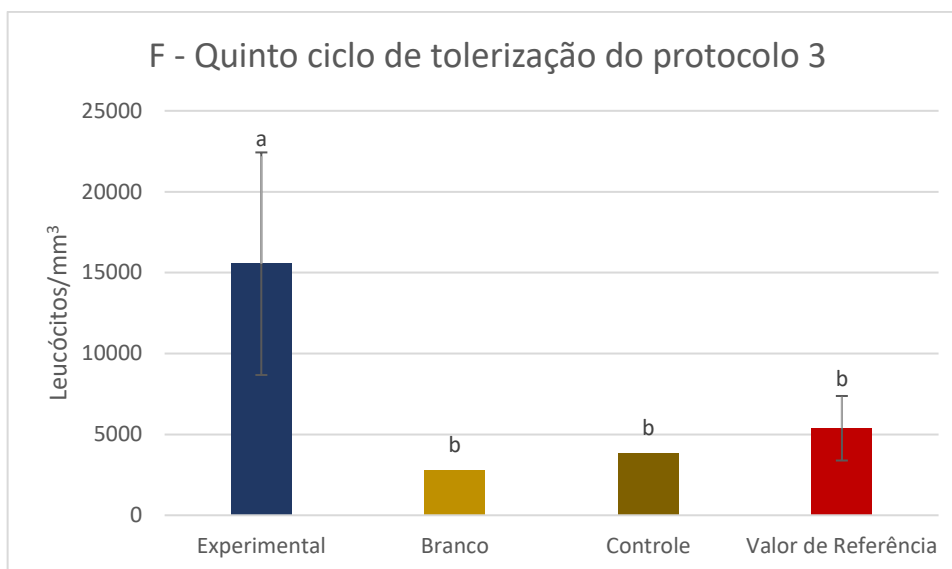
Por fim, o 4D se refere a coleta realizada após o segundo ciclo do terceiro protocolo. A fim de se evitar novamente a perda de todos animais durante o protocolo, optou-se por submeter dois animais a apenas 3 ciclos de tolerizações. Desta forma, ao fim do terceiro ciclo também foi coletado sangue desses animais, juntamente aos controles (gráfico 4E), e os demais animais seguiram o protocolo como o programado (gráfico 4F).

Em todos os ciclos e em todos os protocolos, torna-se evidente o número elevado de leucócitos totais/mm³ que ultrapassa os valores de referência e dos controles, isso pode ser explicado pelo fato de que o fármaco empregado causa um desequilíbrio (diminuição acentuada) de células produzidas pela medula óssea, incluindo populações de linfócitos T e B, gerando um mecanismo de compensação por parte do organismo dos animais, também denominado *feedback* negativo, que possui como função gerar uma resposta contrária ao efeito do fármaco, ou seja, induzir um hiperestímulo por parte da medula óssea, culminando com o aumento de sua capacidade proliferativa e, conseqüentemente, com um maior número de leucócitos circulantes no sangue periférico.

Gráfico 4. Contagem de leucócitos totais/mm³ para averiguação do restabelecimento do sistema imune após dez dias da última dose de Cy referente ao 2º e 5º ciclos de tolerização dos protocolos de imunizações. O branco representa o animal que recebeu apenas os veículos, enquanto o controle se refere ao animal que não foi submetido a qualquer inoculação. O primeiro protocolo conta com apenas uma coleta devido a não sobrevivência dos animais e não apresenta dados do animal controle devido a necrose ocorrida em sua cauda. Já o protocolo 3 apresenta, também, uma coleta após o terceiro ciclo por consequência de dois animais terem sido submetidos a apenas três ciclos de tolerizações, tendo tais coletas sido realizadas apenas nestes animais







5.3.3 Avaliação da reatividade dos anticorpos circulantes frente as tolerizações por teste de ELISA

Preliminarmente, visando a definição da diluição ideal a ser utilizada nos experimentos de ELISA, o soro de um camundongo imunizado com *Paracoccidioides* spp foi testado em diferentes diluições. O resultado pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7. Diferentes diluições do soro de camundongo imunizado com *Paracoccidioides* spp para obtenção da diluição padrão a ser utilizada em testes de ELISA

Diluição	Média dos resultados em Densidade Óptica
1:500	Overflow
1:750	Overflow
1:1000	Overflow
1:1500	3.951333
1:2000	3.013

A diluição definida como ideal foi de 1:1500, uma vez que esta é a primeira diluição com resultado visível à leitora. Valores maiores que 3.9 são dados como *overflow* (OF).

Visando manter as áreas dos gráficos dos experimentos de ELISA limpas, foram demonstrados apenas os controles de interesse. Todavia, vale salientar que objetivando demonstrar a não ocorrência de interferências nos experimentos, outros controles também foram testados ao longo dos mesmos e os resultados destes estão apresentados no gráfico 5 e valem-se para estes e outros experimentos de ELISA realizado durante toda a pesquisa.

O primeiro controle, controle branco para placa de ELISA (BP), consiste em densidades ópticas de poços que não foram incubados com anticorpos ou poços que não receberam nenhum tratamento. O segundo é o controle de anticorpo secundário, no qual todo o procedimento do teste foi seguido normalmente, porém sem a adição do anticorpo primário para assim verificar se não há ligação direta entre o antígeno e o anticorpo secundário. Como nos testes para avaliação do meio de cultura dos hibridomas obtidos da fusão se testa o meio no qual eles estão contidos, testou-se também somente o meio no qual eles se proliferam: Meio Enriquecido acrescido de 20% de Soro Fetal Bovino (ME+SFB).

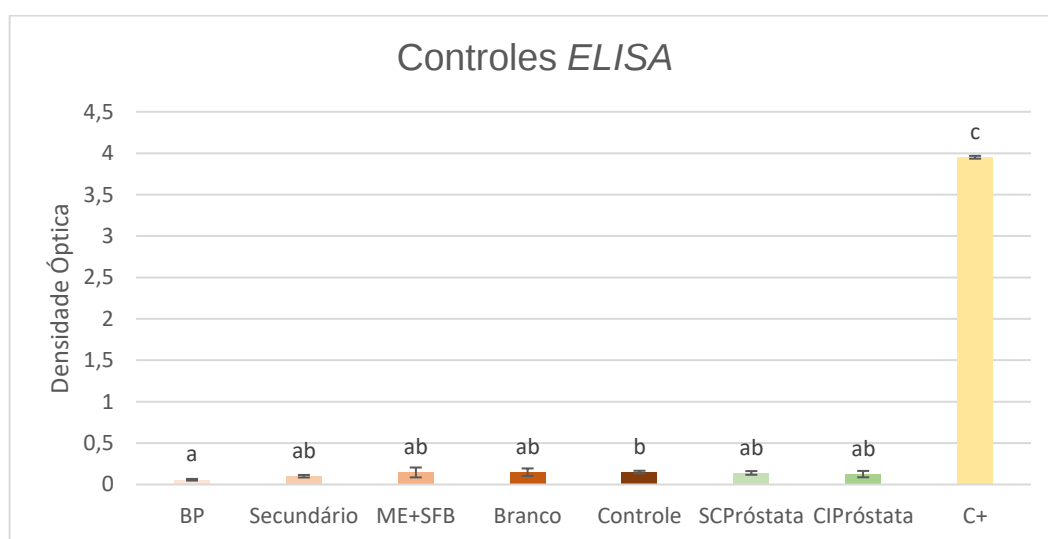
O branco, no gráfico, consiste em testes realizados com soros de camundongos que receberam os veículos do protocolo de imunização subtrativa, enquanto o controle se refere ao soro dos camundongos que não receberam qualquer inoculação durante o protocolo de imunizações.

Adicionalmente, também foram testados os sobrenadantes de culturas de hibridomas (SCPróstata) e o soro de camundongos imunizados (CIPróstata) obtidos de outros protocolos de imunização realizados no Laboratório de Anticorpos Monoclonais da Faculdade UNESP - FCFar, nos quais a pesquisa refere-se à produção de anticorpos monoclonais murinos reconhecedores de células tumorais prostáticas humanas.

Por fim, o controle positivo (C+) se deu através do soro de um camundongo imunizado com *Paracoccidioides* spp.

No gráfico estão apresentadas as médias das densidades ópticas obtidas dos controles no experimento de ELISA.

Gráfico 5. Resultados de densidade óptica obtidos por método de ELISA para avaliação dos controles do experimento. BP: Branco para placa de ELISA; Secundário: Controle de anticorpo secundário; ME+SFB: Meio enriquecido suplementado com soro fetal bovino; Branco: animal que recebeu apenas os veículos do protocolo; Controle: animal que não recebeu quaisquer inoculações; SCPróstata: Sobrenadante de cultura de hibridomas provindo de protocolo para diagnóstico de células tumorais prostáticas humanas; CIPróstata: Soro de camundongos imunizados durante protocolo para diagnóstico de células tumorais prostáticas humanas; C+: Controle positivo que refere-se a um soro murino anti-*Paracoccidioides* spp



No gráfico é possível observar que os controles negativos (soros obtidos de camundongos controles desse protocolo e do referente às células tumorais prostáticas juntamente ao sobrenadante de cultura de hibridomas obtidos no protocolo referente às células tumorais prostáticas) não apresentam reatividade significativa ao antígeno utilizado nos experimentos, assim como os controles do experimento (BP, Secundário, ME+SFB), indicando que não houve interferência destes nos testes. Diferentemente, o controle positivo, como esperado, apresentou uma alta reatividade comparado aos demais controles.

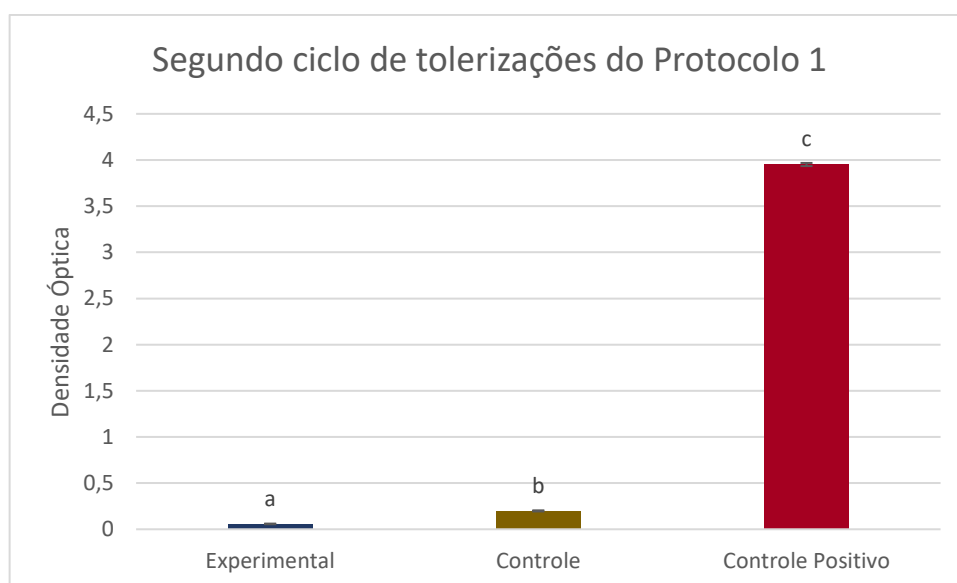
Por conseguinte, em relação a avaliação da reatividade do soro policlonal após o 2º e 5º ciclos de tolerização, os resultados obtidos foram expressos de acordo com a densidade óptica (DO) obtida por ensaio de ELISA, demonstrados no gráfico 6. As análises estatísticas foram realizadas nas mesmas condições e propósitos já mencionados.

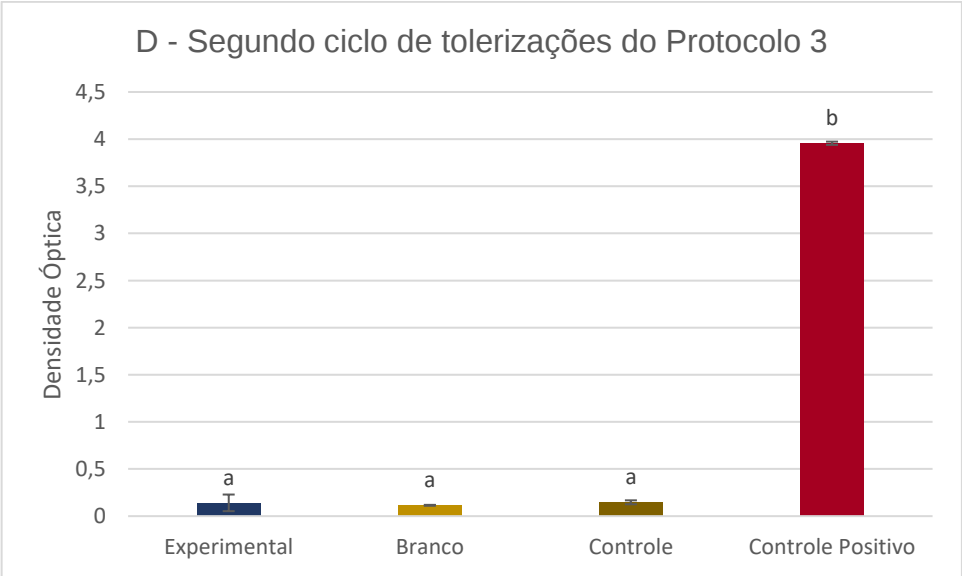
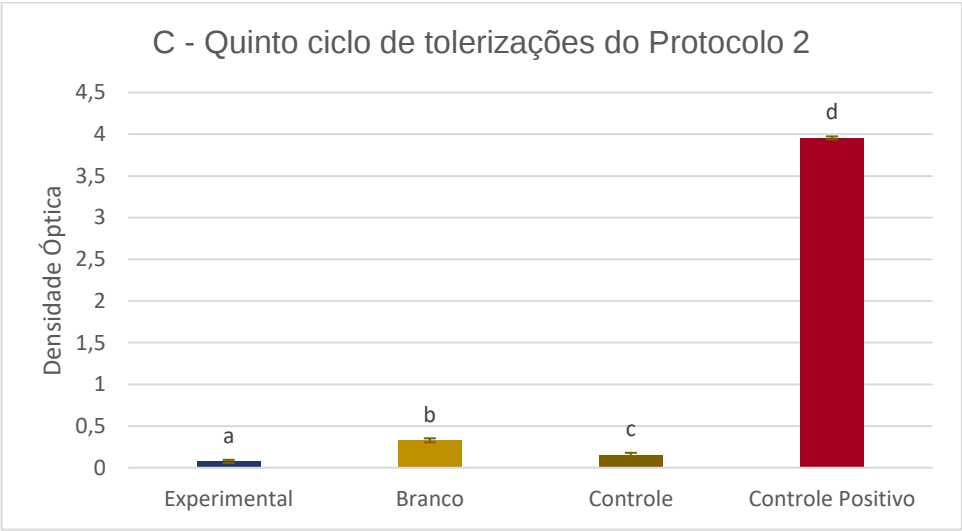
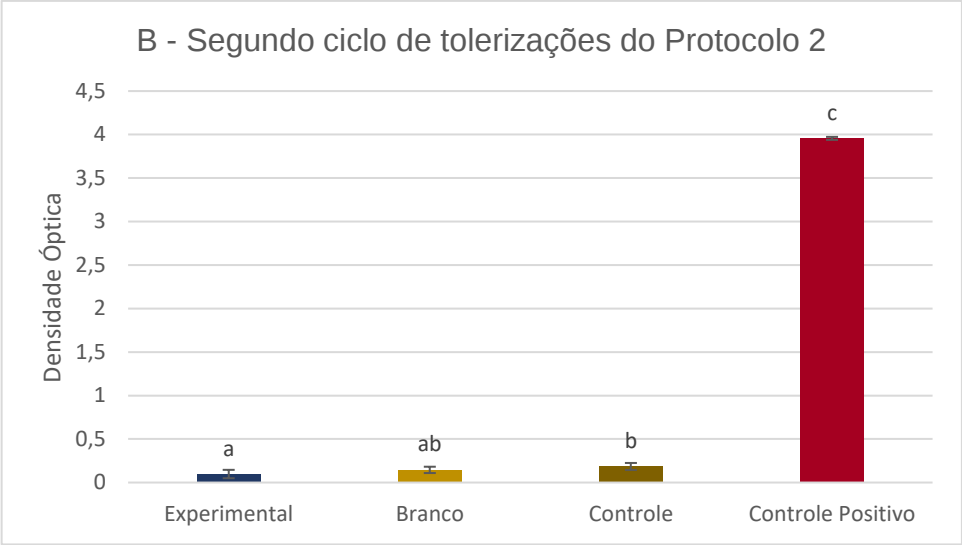
O gráfico 6A se refere ao primeiro protocolo de imunizações o qual contou apenas com dados obtidos referentes ao 2º ciclo de tolerização devido a morte dos animais.

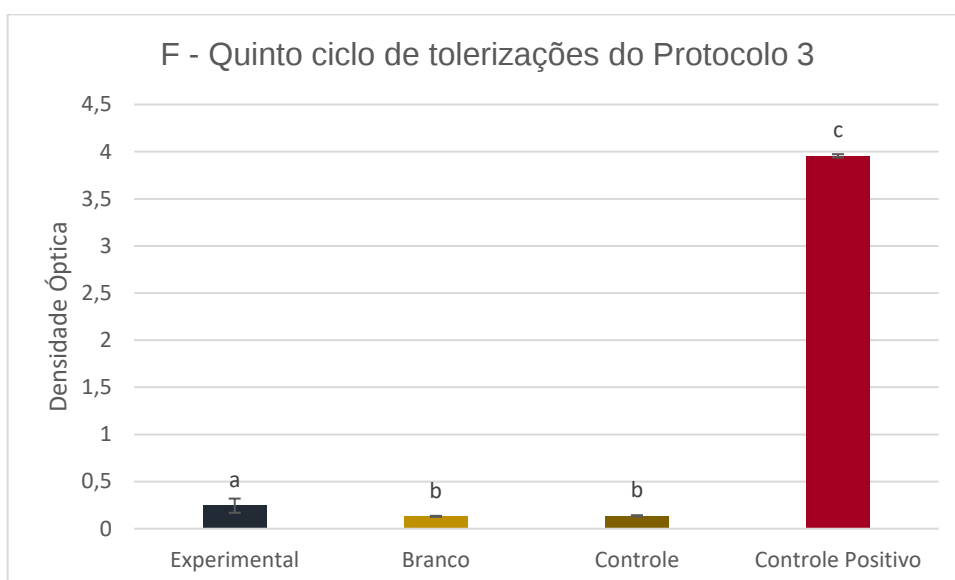
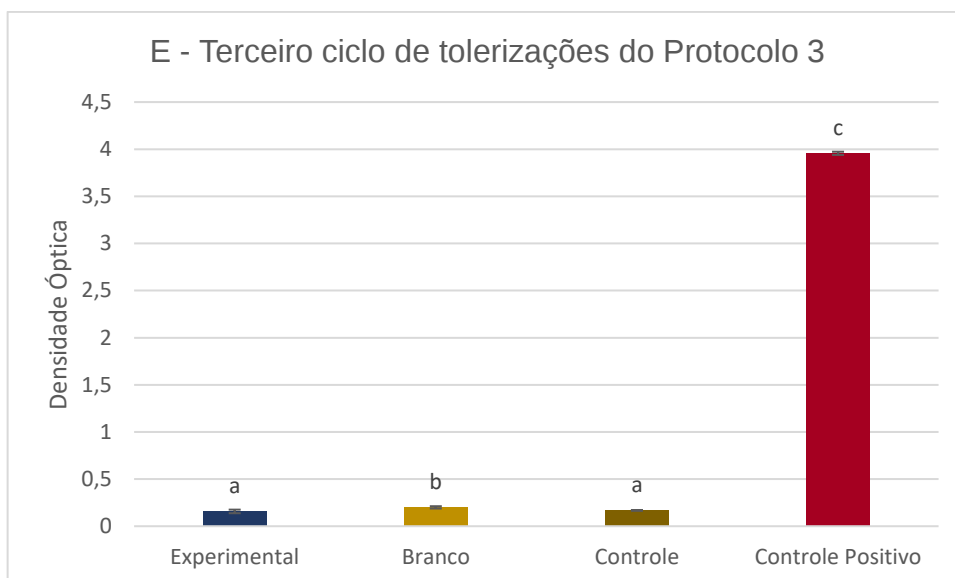
Já o gráfico 6B e 6C referem-se ao segundo protocolo de imunizações, respectivamente referentes às coletas realizadas após os 2º e 5º ciclos de tolerizações.

Por fim, como já citado anteriormente, devido a dois animais do terceiro protocolo de imunizações passarem por apenas três ciclos de tolerizações, este protocolo resultou em três análises, referentes ao 2º, 3º e 5º ciclo de tolerizações, apresentadas respectivamente nos gráficos 6D, 6E e 6F.

Gráfico 6. Resultados de densidade óptica obtidos por método de ELISA. O branco representa o animal que recebeu apenas os veículos, enquanto o controle se refere ao animal que não foi submetido a qualquer inoculação. Por sua vez, o controle positivo utilizado refere-se a um soro murino anti-Pb18. O primeiro protocolo conta com apenas uma coleta devido a não sobrevivência dos animais e não apresenta dados do animal controle devido a necrose ocorrida em sua cauda. Já o protocolo 3 apresenta, também, uma coleta após o terceiro ciclo por consequência de dois animais terem sido submetidos a apenas três ciclos de tolerizações, tendo tais coletas sido realizadas apenas nestes animais. As coletas se deram após 10 dias da última dose de Cy de cada ciclo em questão







Pode-se afirmar, como esperado, que os animais imunizados submetidos ao protocolo subtrativo, exibiram valores de DO baixíssimos, como também observado nos animais brancos e controles, contrastando com o resultado observado no controle positivo, que exibiu um valor de DO evidentemente maior. Deste modo, infere-se que, possivelmente, a técnica de imunização empregando o protocolo subtrativo foi eficiente na depleção de linfócitos T e B reativos contra epítomos/determinantes antigênicos presentes no CFA do Pb18.

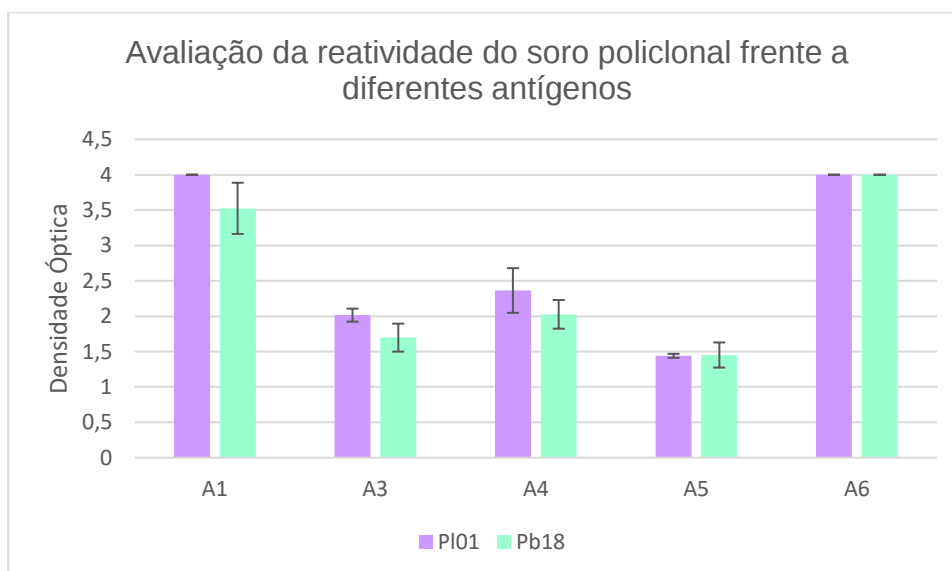
5.4 FUSÃO CELULAR PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Anteriormente ao protocolo de fusão celular propriamente dito, é apresentado a análise proveniente dos soros adquiridos através de punção cardíaca realizada antes da retirada do baço dos animais imunizados.

5.4.1 Reatividade dos anticorpos policlonais contra antígenos provindos do CFA Pb18 e CFA PI01 por ELISA

Visando avaliar a reatividade dos soros dos camundongos imunizados quanto aos antígenos utilizados no protocolo, CFA Pb18 (tolerógeno) e CFA PI01 (imunógeno), o teste de ELISA foi realizado e a média das DO obtidas no experimento estão apresentadas no gráfico 7. Os animais utilizados durante o protocolo foram nomeados como A1, A3, A4, A5 e A6.

Gráfico 7. Comparação de soros policlonais frente a diferentes antígenos. A letra A seguida do número representa os animais que foram imunizados durante o protocolo. Há a ausência do animal 2 devido a este ter ido a óbito antes que seu soro fosse coletado



No gráfico é possível observar que não há grandes diferenças entre os soros analisados para diferentes tipos de antígenos, mesmo estatisticamente não há diferença entre eles, o que pode ser observado através do desvio padrão. Ainda assim, mesmo que sutilmente, observa-se uma leve tendência a valores de DO

maiores nos resultados referentes ao *P. lutzii*. Soros com resultados de DO apresentados em *overflow* foram plotados como 4.0.

Outra observação interessante a se fazer é referente ao fato dos animais A1 e A6 apresentarem um valor de DO maior se comparados aos demais, diferença a qual é significativa. Isso pode ter se dado devido ao momento ao qual o sangue foi coletado, uma vez que nestes animais a coleta ocorreu aproximadamente um mês após o término do protocolo de imunizações, enquanto nos demais as coletas ocorreram entre quatro e cinco meses após o fim dele.

O período de um mês entre o final do protocolo e a primeira fusão deu-se devido a contaminação das linhagens de mielomas por *Mycoplasma* spp., como anteriormente citado. Após a descontaminação, foi realizada uma fusão referente ao animal 1, a qual foi perdida devido à uma contaminação bacteriana ocorrida em razão de uma queda de energia no momento do plaqueamento das células. Após 5 dias, repetiu-se a fusão, porém desta vez referente ao animal 6, a qual seu insucesso se deu por conta dos mielomas da linhagem NS1 terem adquirido resistência ao HAT, provavelmente em razão do protocolo de descontaminação.

Visto estas desventuras, finalizou-se o processo de descontaminação (que já estava em andamento no momento da ocorrência destes fatos) em outra linhagem de mielomas estabelecida no banco de células do laboratório: a Sp2/0, para o qual foram necessários quatro meses.

Neste ínterim, o animal 2 veio a óbito, impossibilitando a realização de qualquer procedimento e análise do mesmo.

Ao fim deste período, seguiu-se com as fusões planejadas. Primeiramente foi feita a fusão do animal 5. Com o objetivo de verificar que o procedimento adotado não sofreu com problemas externos, aguardou-se o período de 20 dias. Constatado a inocorrência de interferências externas e o sucesso do procedimento, realizou-se a fusão referente ao animal 4. Por fim, com o mesmo espaçamento de tempo, foi realizada a fusão referente ao animal 3.

5.4.2 Comparativo através da técnica de *Western Blotting* para análise do repertório de anticorpos policlonais reativos a diferentes antígenos

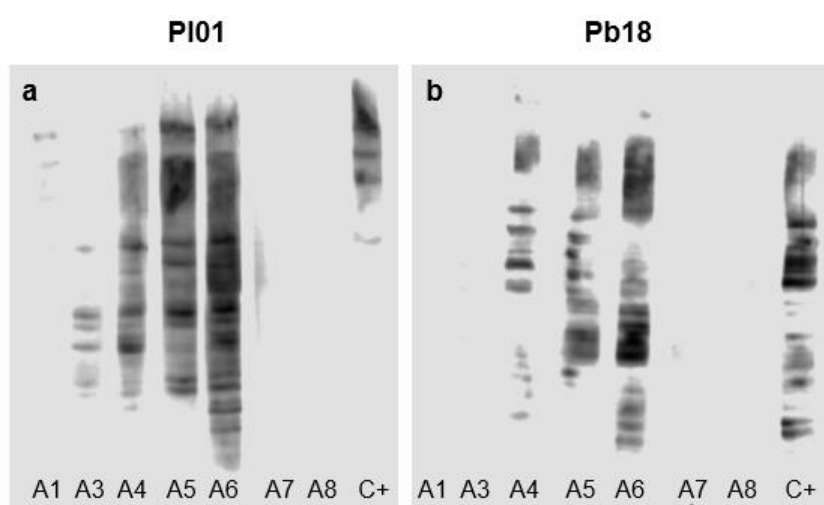
Através de equipamento para detecção de reações quimioluminescentes, imagens de bandas quimioluminescente oriundas da técnica de *WB* foram captadas e estão apresentadas na figura 13.

Na figura 13a é possível observar que os animais 4, 5 e 6 produziram anticorpos policlonais com reatividade a um perfil de antígenos mais vasto, principalmente se referindo aos anticorpos dos animais 5 e 6, enquanto os animais 1 e 3 reconheceram um perfil de antígenos mais restrito do imunógeno. Esta diferença possivelmente se deu devido a quantidade de ciclos de tolerizações submetidos a estes diferentes animais durante o protocolo subtrativo, sendo que os três primeiros (A1, A3 e A4) passaram por cinco ciclos, enquanto os outros dois (A5 e A6) passaram por apenas três. Isto pode indicar que o maior número de tolerizações foi benéfico à depleção de anticorpos voltados ao reconhecimento de antígenos de não interesse.

Já em relação ao perfil observado na imagem 13b, nota-se um mesmo padrão referente aos animais que possuíam maior gama de reatividade aos antígenos, porém todos em menor intensidade (com exceção do controle positivo), o que reforça que o número de tolerizações é um importante mediador da modulação da resposta imune humoral e produção de anticorpos específicos voltados a cepa fúngica de interesse, posto que os soros dos animais 1 e 3 não apresentaram nenhuma reatividade ao antígeno utilizado em suas tolerizações (Pb18), igualmente aos soros dos animais controles, constatado pelo não aparecimento de nenhum *spot* na membrana.

O animal 4, por sua vez, não apresenta reatividade tão baixa quanto a demonstrada nos animais 1 e 3 no reconhecimento de antígenos de ambas as cepas. Ainda assim, o reconhecimento dos anticorpos deste animal é menor quando comparado aos animais que foram submetidos a menos ciclos de tolerizações, principalmente quando analisada a reatividade a antígenos referentes ao *P. brasiliensis*.

Figura 13. Bandas quimioluminescentes obtidas através WB do soro policlonal dos animais utilizados no protocolo de imunização subtrativa frente aos antígenos usados durante a tolerização (b) e a imunização (a). A letra A seguida do número representa os animais que foram imunizados durante o protocolo (há a ausência do animal 2 devido a este ter ido a óbito antes que seu soro fosse coletado), com exceção do A7, o qual representa o animal que foi inoculado apenas com os veículos do protocolo, e do A8 que não sofreu nenhum tipo de inoculação. O C+ foi proveniente de um animal que foi imunizado com *P. lutzii* (a) e com *P. brasiliensis* (b) e serviu ao experimento como controle positivo



5.4.3 Esplenectomia

Durante a retirada do baço precedente ao protocolo de fusão, observou-se que a cápsula esplênica deste se encontrava recoberta por uma pronunciada camada de tecido fibroso aderida a outros órgãos e ao peritônio. O provável motivo que levou o órgão a este estado foi a utilização dos adjuvantes de *Freund*, uma vez que comparadas as características desse as de um baço que passou pelo protocolo de imunizações subtrativas sem o uso de adjuvantes, o mesmo não é verificado. Anota-se que outros órgãos também se encontraram com características diferentes das convencionais.

Para comparações foram usadas imagens do baço de um animal do presente protocolo e imagens oriundas de outro protocolo que está em andamento no

Laboratório de Anticorpos Monoclonais da UNESP/FCFar, o qual não faz uso do adjuvante (figura 14).

Figura 14. Comparação entre baço proveniente de protocolo no qual houve a utilização de adjuvante de Freund (a) e de protocolo que não houve (b)



Salienta-se que todos animais, mesmo os que passaram por menos ciclos de tolerizações, apresentaram as mesmas características no órgão.

A circunstância na qual o órgão se encontrava dificultou não só sua retirada da cavidade abdominal, mas também o isolamento dos esplenócitos presentes em seu interior. Reforçou ainda que, mesmo não sendo provavelmente o principal fator causa *mortis* dos protocolos anteriores, este pode ter agravado significativamente a debilidade dos animais.

5.4.4 Fusão celular, seleção dos hibridomas por HAT e *screening* por teste ELISA

Após a realização do protocolo de fusão celular, as características morfológicas das células foram acompanhadas através de microscopia e podem ser observadas nas figuras: 15 – mielomas da linhagem Sp2/0 sem adição de HAT, 16 – mielomas da

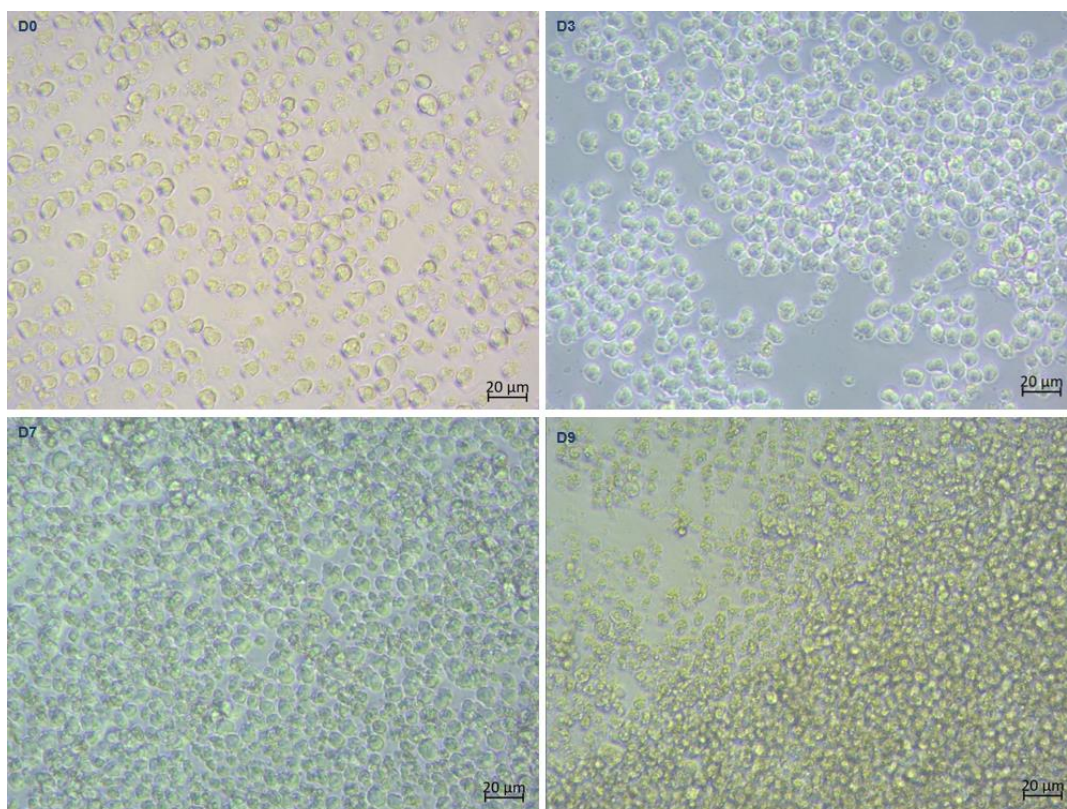
linhagem Sp2/0 com adição de HAT, 17 – linfócitos, 18 – timócitos e 19 – acompanhamento da fusão celular entre células mielomatosas e linfócitos.

As figuras a seguir representam todas as fusões, uma vez que o perfil das características foi semelhante em todas.

Devido à perda de uma das fusões por conta do mieloma da linhagem NS1 ter adquirido resistência ao HAT, optou-se por fazer, entre os controles das fusões subsequentes, um controle de mielomas com e sem a suplementação do meio com o mesmo.

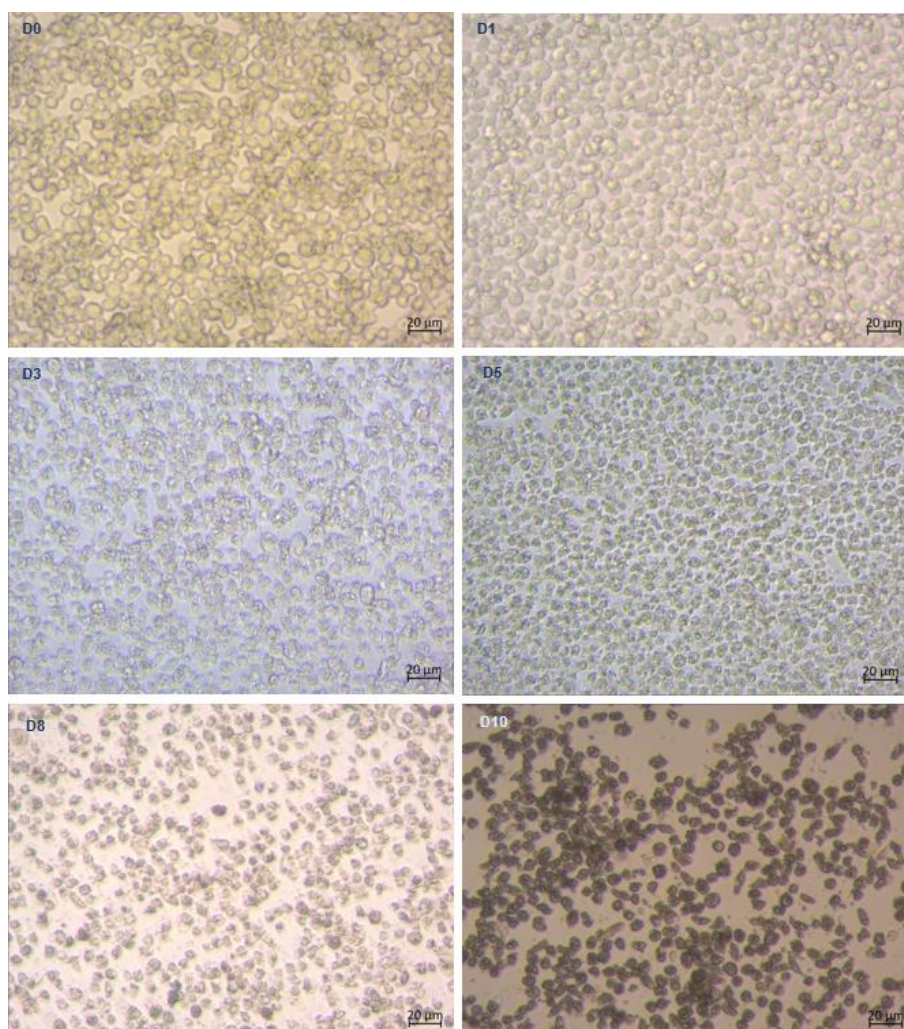
Pode-se observar que no controle com meio ausente de HAT (figura 15) os mielomas mantiveram-se vivos e começaram a morrer apenas após 9 dias de cultivo das células, uma vez que foi atingida a confluência máxima do poço. Todavia, ainda no D7 observa-se que as células estão arredondadas e com suas membranas lisas, íntegras e translúcidas.

Figura 15. Acompanhamento das características morfológicas das células mielomatosas da linhagem Sp2/0 cultivados em meio sem adição de HAT. A letra D0 representa o dia em que foi realizada a fusão celular e os demais, os dias subsequentes



Diferentemente do que foi observado nos poços controles de mieloma com meio suplementado com HAT, no qual após dois dias de cultivo com o meio HAT é possível observar que as células começaram a se deteriorar, sua membrana já possuía falhas, aspecto granuloso, cor ocre e estas já não estavam mais arredondadas, como observado na figura 16.

Figura 16. Acompanhamento das características morfológicas das células mielomatosas da linhagem Sp2/0 cultivadas em meio com a adição de HAT. A letra D0 representa o dia em que a fusão celular foi realizada e os demais, os dias subsequentes



Após 8 dias da fusão, este controle já apresentava morte na maioria de suas células e após 10 dias não havia nenhuma célula viável, demonstrando que esta linhagem celular não adquiriu resistência ao agente de seleção, mesmo após esta ter sido submetida ao mesmo processo de descontaminação da linhagem NS1.

Já em relação aos linfócitos (figura 17), é possível observar que suas células se mantiveram viáveis durante os doze dias em que foram mantidas em cultura. De forma semelhante, os timócitos (figura 18), só passaram a apresentar redução em sua viabilidade após doze dias. Passados quinze dias, a grande maioria dos timócitos já não estavam mais viáveis.

Figura 17. Acompanhamento das características morfológicas dos linfócitos. A letra D0 representa o dia em que a fusão celular foi realizada e os demais, os dias subsequentes

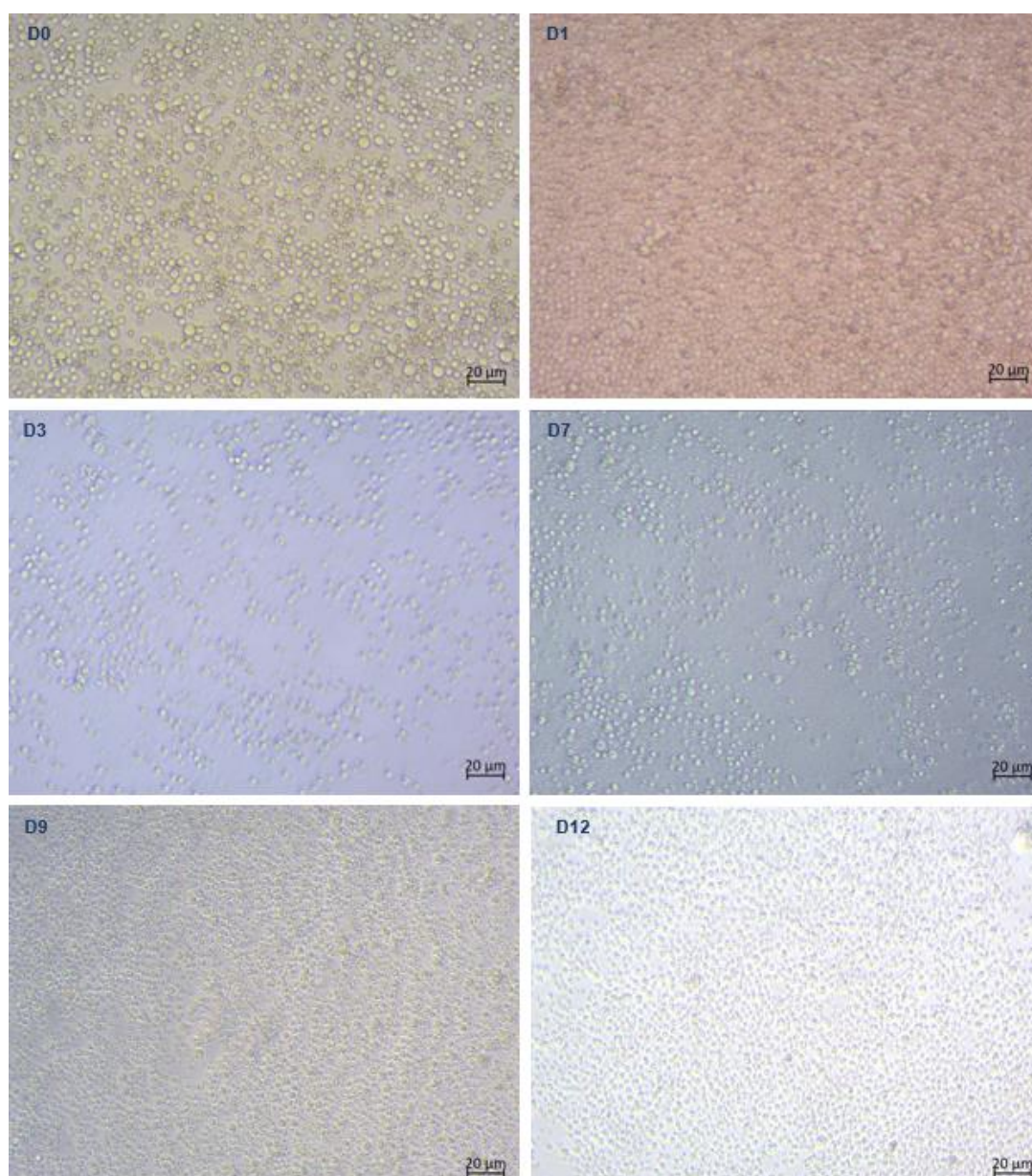
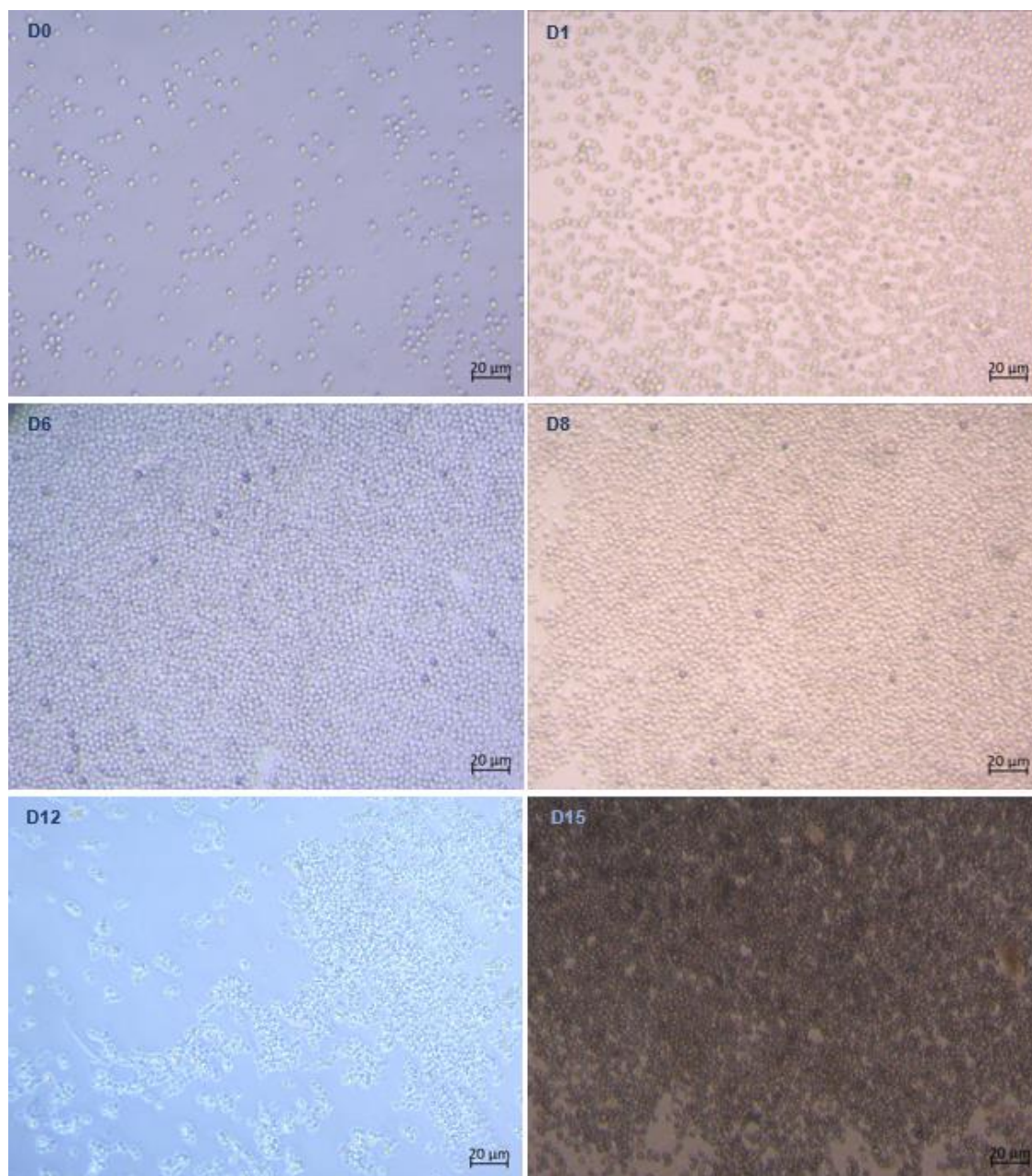


Figura 18. Acompanhamento das características morfológicas dos timócitos. A letra D0 representa o dia em que a timectomia foi realizada e os demais, os dias subsequentes

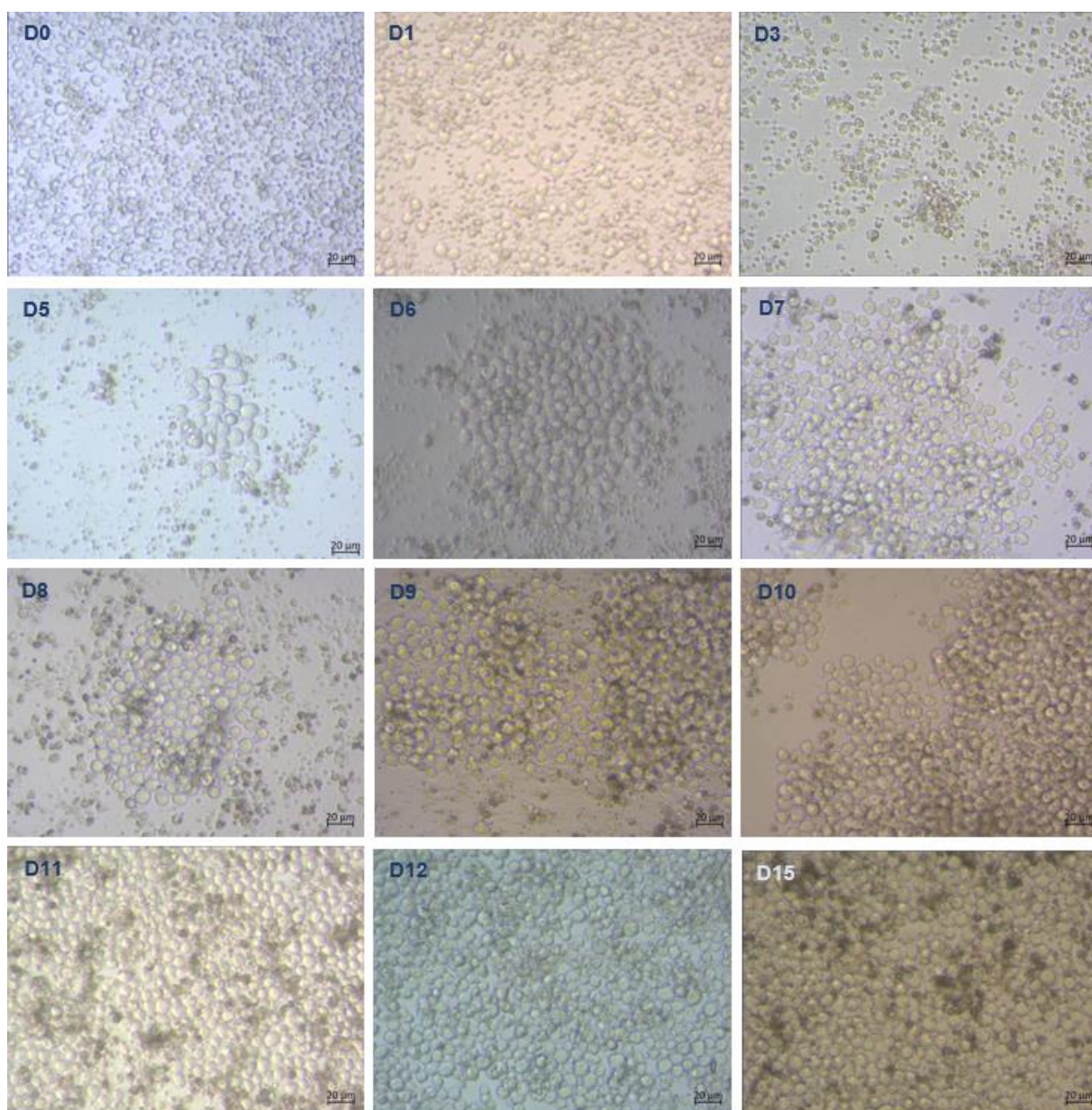


Por último, porém de suma importância, a figura 19 apresenta o crescimento das colônias de hibridomas.

Nela é possível notar que nos dois primeiros dias há uma diversidade de mielomas e linfócitos e a deterioração dos mielomas se inicia a partir do terceiro dia.

Após 5 dias, é possível observar as primeiras colônias de hibridomas, ainda pequenas, mas de aspecto translúcido, membranas lisas e íntegras em células arredondadas. E nos dias seguintes, nota-se o aumento da colônia até a confluência total do poço, o que ocorreu, em sua maioria, quinze dias após a fusão.

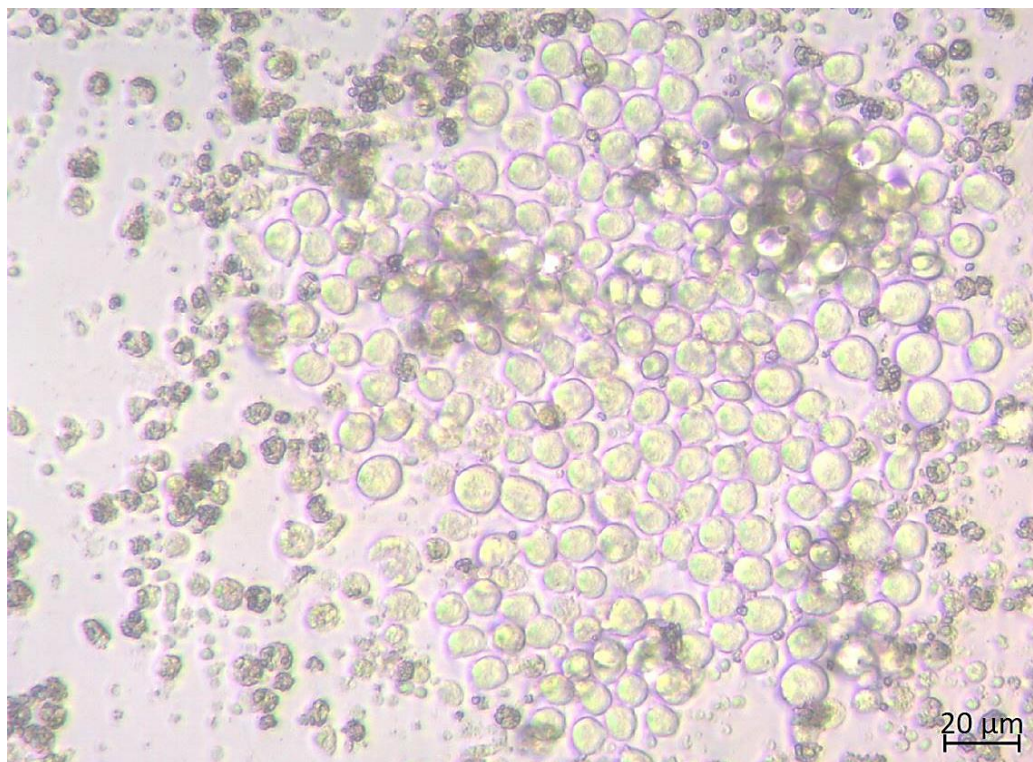
Figura 19. Acompanhamento das características morfológicas dos hibridomas, bem como do crescimento de suas colônias. A letra D0 representa o dia em que a fusão foi realizada e os demais, os dias subsequentes



Vale ainda observar, a partir do terceiro dia após a fusão, que os mielomas que circundavam as colônias estavam visivelmente entrando em apoptose, o que fica totalmente evidente a partir do décimo dia, que como já citado anteriormente, não é

possível encontrar característica de células viáveis nesses, como demonstrado na figura 20.

Figura 20. Comparação entre as células de mieloma e hibridomas presentes em um poço de uma das placas de 96 poços utilizadas na fusão celular



Dado o exposto, relata-se na tabela 8 os dados referentes às condições as quais se deram as fusões celulares, bem como seus desempenhos.

Tabela 8. Comparação do desempenho obtido nas diferentes fusões celulares. Os animais estão apresentados na ordem em que as fusões ocorreram

	<i>Balb/c</i>	<i>A5</i>	<i>A4</i>	<i>A3</i>
<i>Número de ciclos de tolerizações</i>		3	5	5
<i>Número de linfócitos obtidos</i>		1.25×10^8	1.37×10^8	9.5×10^7
<i>Número de mielomas utilizados</i>		2.5×10^7	2.7×10^7	1.73×10^6
<i>Tempo de ação do PEG</i>		6'43"	7'25"	7'43"
<i>Número de poços totais</i>		359	382	280
<i>Número de poços vazios</i>		58	20	3
<i>Nº de poços cujo hibridomas estacionaram</i>		15	2	-
<i>Percentual de poços com hibridomas</i>		80%	94%	99%

Anteriormente às discussões, ressalta-se que durante o processo de crescimento celular algumas colônias pararam de se proliferar não atingindo a confluência necessária para o teste de ELISA. Assim, nem todos poços que apresentaram colônias de hibridomas foram testados.

Relata-se ainda que 15 poços foram descartados da fusão do camundongo A3, antes de iniciarem os testes (exceto 1), em razão a uma contaminação bacteriana. Por este motivo, esta fusão não apresenta dados sobre o número de hibridomas que pararam de se proliferar, pois todos hibridomas observados passaram pelo teste de ELISA. Todavia, dentro do grupo que não foi testado, isto poderia ter ocorrido. Nesta mesma fusão ainda foram perdidos três poços de hibridomas devido às suas células terem entrado em apoptose.

Assim, nota-se na tabela, que não necessariamente um maior número de linfócitos resultou em uma maior quantidade proporcional de poços com híbridos, visto que a fusão na qual houve menor número de linfócitos obtidos foi a mesma que apresentou um percentual de mais poços com hibridomas. Ainda assim, em todas as fusões, a taxa de poços que apresentaram crescimento de hibridomas obtida foi considerada satisfatória.

Atingida a confluência de 100% de células no poço, seguiu-se com o *screening* dos hibridomas através do teste de ELISA. Os dados obtidos estão dispostos na tabela 9. Os hibridomas que se mantiveram reativos aos antígenos de interesse (encontrados no CFA referente ao *P. lutzii*), após serem testados três vezes, constituíram o banco de células de hibridomas referentes ao protocolo de fusão.

Tabela 9. Número de hibridomas obtidos em cada fusão celular após cada *screening*. Os números entre parênteses representam o número de hibridomas que passaram para o reteste subsequente

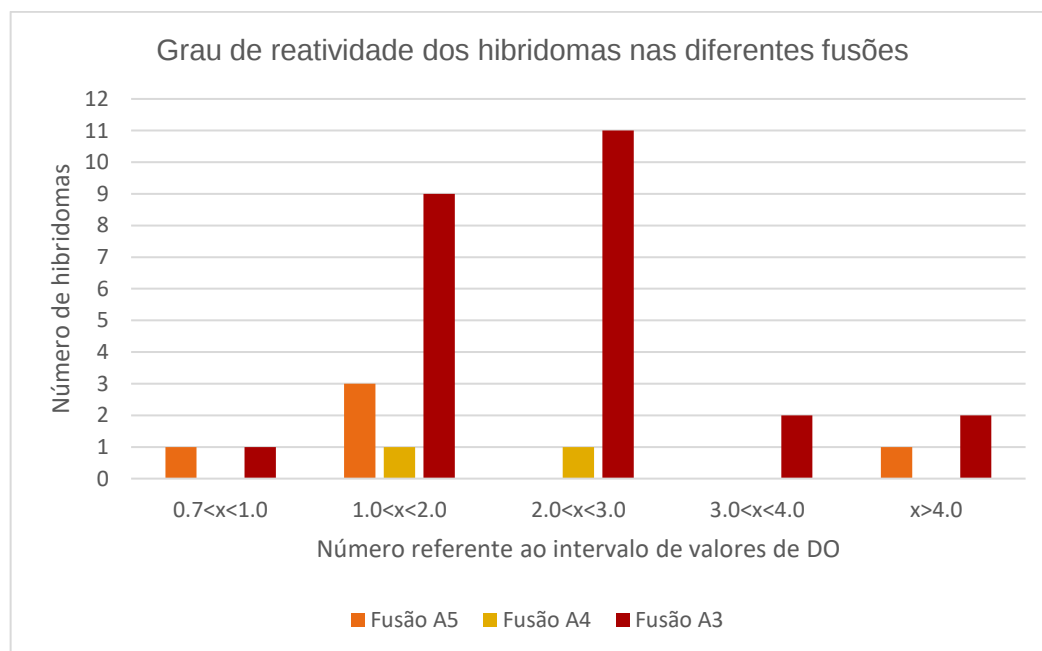
	<i>Fusão A5</i>	<i>Fusão A4</i>	<i>Fusão A3</i>
<i>Número de poços testados</i>	286	360	262
<i>% de hibridomas obtidos após o 1º screening</i>	3.15% (9)	2.2% (8)	17.6% (46)
<i>% de hibridomas obtidos após o 2º screening</i>	2.09% (6)	0.8% (3)	10.3% (27)
<i>% de hibridomas obtidos após o 3º screening</i>	1.75% (5)	0.55% (2)	9.54% (25)
<i>% de hibridomas que mantiveram a reatividade</i>	55.5%	25%	54.3%

Na tabela é possível observar a discrepância de hibridomas obtidos nas diferentes fusões. Isto pode ter se dado, no caso da fusão A4, devido ao animal do qual foi obtido o baço para isolamento de linfócitos ter apresentado um líquido branco em sua cavidade peritoneal, o que poderia indicar que este animal estava com algum tipo de infecção, e em razão disto apresentou as taxas mais baixas referentes aos *screenings* dos hibridomas, o que também poderia estar relacionado a baixa taxa de hibridomas que mantiveram sua reatividade.

Já a fusão do A5 pode também ter resultado em um número inferior de hibridomas reativos devido ao menor número de ciclos de tolerizações ao qual ele foi submetido, sugerindo que um maior número de tolerizações pode ser benéfica na modulação de resposta imune, fazendo com que os linfócitos provindos destas resultassem em uma maior reatividade frente ao antígeno de interesse.

Outro ponto interessante a se analisar refere-se à qualidade desses hibridomas em termo de reatividade, a qual pode ser analisada no gráfico 8.

Gráfico 8. Intervalo de reatividades obtidas nos diferentes hibridomas



Na fusão A3, como resultado positivo, observa-se que além de uma maior quantidade de hibridomas obtida, há também uma maior quantidade de hibridomas dentro ou acima da mediana observada em relação à reatividade ao antígeno de interesse, representada em valores de DO, enquanto os hibridomas procedentes das outras fusões apresentaram o resultado oposto.

Para se determinar a faixa de corte para os hibridomas nas leituras de DO, analisou-se a quantidade de hibridomas que se mantiveram reativos durante os retestes na primeira fusão avaliada.

A princípio, considerando que valores de DO inferiores a 0.2 são obtidos mesmo em controles do experimento e em controles negativos, foi descartada essa faixa de leitura e, assim, foi estabelecido valores próximos a 0.5 como sendo referentes a uma reatividade mínima para os hibridomas.

Após os *screenings* subsequentes, notou-se que valores inferiores a 0.7 tendiam, na maioria dos casos, a decaírem (tabela 10A). Assim, adotou-se o valor de 0.7 como valor de corte. Na tabela 10 estão apresentados os hibridomas que não mantiveram suas reatividades acima de 0.7 durante os *screenings*.

Ressalta-se que hibridomas que apresentaram reatividade inferior a 0.7 não estão descritos nas tabelas abaixo e que hibridomas que se mantiveram constantemente abaixo de 1.0 (em valores de DO) também foram descartados.

A fim de se referir especificamente a determinados hibridomas, estes foram denominados com base no poço da placa de 96 poços da qual foram obtidos inicialmente.

Tabela 10. Hibridomas das fusões A5 (A), A4 (B) e A3 (C) que apresentaram, em algum dos *screenings*, reatividade abaixo de 0.7

A – Fusão Animal 5

<i>Hibridoma</i>	<i>1º screening</i>	<i>2º screening</i>	<i>3º screening</i>
A4	1.1	0.7	0.4
B2	1.15	0.59	0.2
B3	0.7	0.5	0.2
D4	0.75	0.66	-

B – Fusão Animal 4

<i>Hibridoma</i>	<i>1º screening</i>	<i>2º screening</i>	<i>3º screening</i>
A5	0.75	0.4	-
D8	0.7	0.4	-
D9	0.7	0.3	-
D11	1.3	0.6	0.75
F2	0.85	0.6	-
H9	1.1	1.3	0.6

C – Fusão Animal 3

Hibridoma	1º screening	2º screening	3º Screening
A12	0.7	Morte	-
B2	1.2	0.6	-
B61	0.9	0.3	-
B62	0.7	0.4	-
B8	0.9	0.6	-
B9	0.8	0.4	-
C1	3.9	0.5	-
C3	1.2	0.4	-
C7	1.0	0.6	-
C10	1.4	0.6	-
C11	2.0	Contaminação	-
D5	0.85	0.2	-
D9	0.8	0.2	-
E7	0.85	1.7	0.4
F5	0.7	0.8	-
F7	1.5	0.4	-
F9	1.3	0.3	-
G1	0.8	0.8	-
G4	1.3	Morte	-
H3	0.7	0.5	-
H9	1.35	Morte	-

Por fim, a tabela 11, mostra a relação de hibridomas que se mantiveram, ao longo dos experimentos, reativos, como estipulado, ao imunógeno.

Tabela 11. Hibridomas das fusões A5 (A), A4 (B) e A3 (C) que apresentaram reatividade acima de 0.7 em todas testagens

A – Fusão Animal 5

Hibridoma	1º screening	2º screening	3º screening
A2	1.4	1.5	1.1
A5	1.45	2.7	1
A9	0.7	0.7	1.19
A11	OF	OF	OF
G4	1.65	0.83	0.87

B – Fusão Animal 4

Hibridoma	1º screening	2º screening	3º screening
D10	0.7	1.2	1.0
H12	2.7	3.5	2.55

C – Fusão Animal 3

Hibridoma	1º screening	2º screening	3º screening
A7	1.0	1.35	1.7
B3	0.8	0.9	1.0
B41	1.1	1.3	1.8
B42	1.2	1.0	2.6
C81	1.55	1.0	1.6
C82	1.8	1.3	2.0
C91	3.4	OF	3.9
C92	OF	3.9	3.2
D8	1.0	1.4	1.3
E1	OF	OF	OF
E2	0.7	1.3	2.9
E3	1.3	1.5	2.2
E4	1.9	1.5	2.5
E9	3.7	3.5	2.9
E12	1.4	1.2	1.8
F1	3.6	2.6	2.1
F4	1.3	1.2	2.3
G1	1.7	2.6	2.3
G5	1.5	1.9	2.3
G6	0.9	2.0	1.5
G12	1.1	1.0	1.6
H2	1.2	1.8	0.8
H11	1.3	2.1	2.1
H41	2.8	OF	OF
H42	1.3	1.4	1.4

5.4.4.1 Clonagem celular

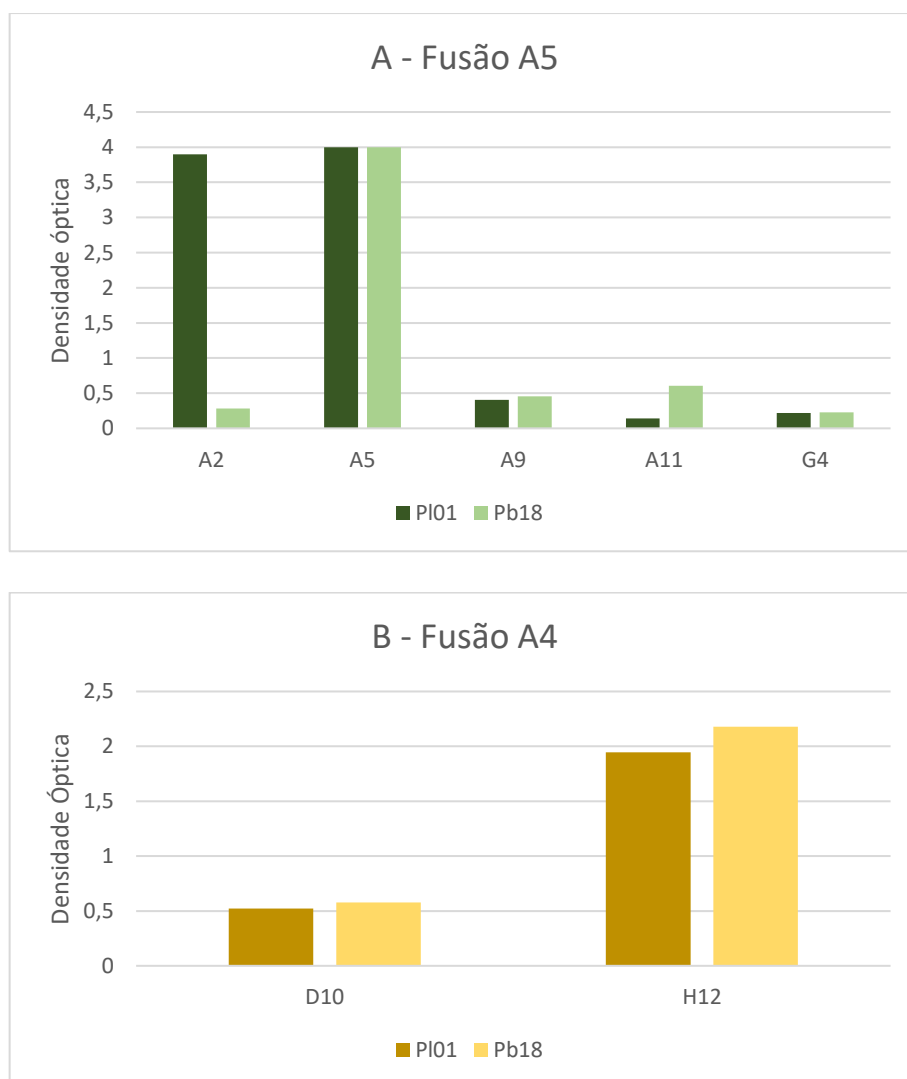
Intencionando a obtenção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais altamente reativos a *P. lutzii*, foi realizado um *screening* dos hibridomas selecionados pós-fusão para análise destes quanto a reatividade tanto a antígenos de *P. lutzii*, quando a antígenos de *P. brasiliensis* (gráfico 9).

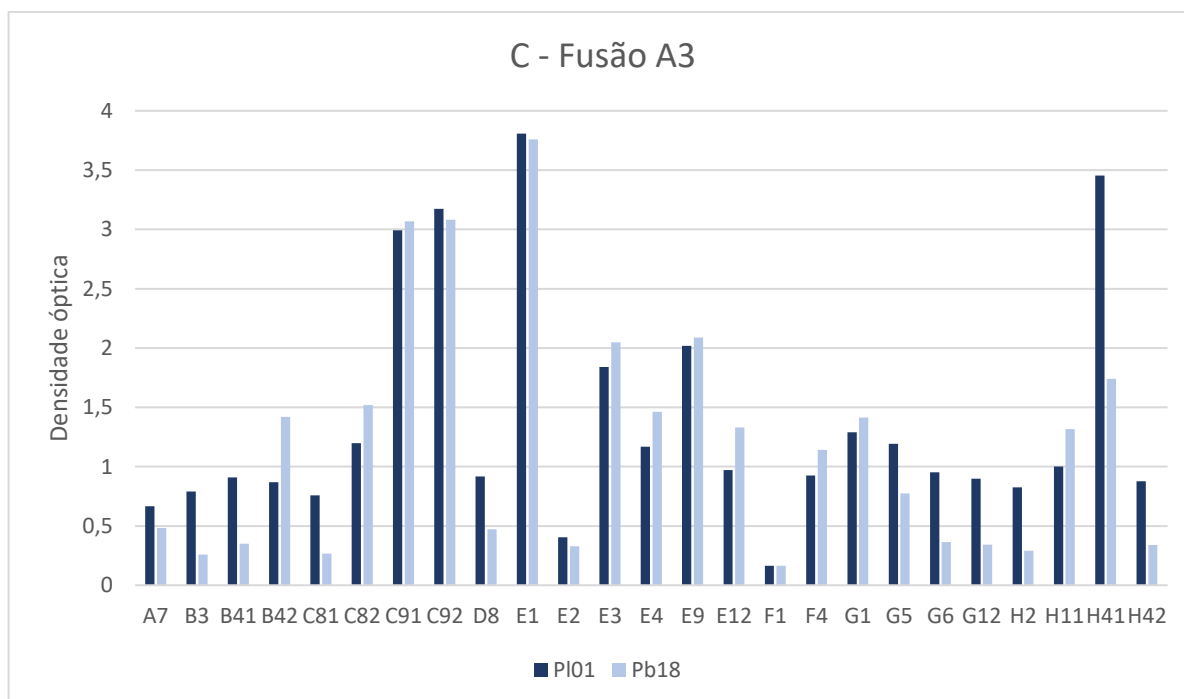
Entende-se que estes hibridomas são policlonais e que esta análise não é usualmente realizada em razão de não necessariamente indicar que esses, por serem também altamente reativos ao tolerógeno, possam resultar em clones únicos de reatividade especificamente alta apenas ao imunógeno.

Todavia, devido a obtenção de mais de um híbrido com alta reatividade ao imunógeno, esperou-se que este procedimento poderia ser oportuno ao direcionamento da escolha dos hibridomas ideais a serem submetidos à técnica de clonagem.

Uma vez que este teste foi realizado após os hibridomas passarem por consecutivos repiques, para serem criopreservados e constituírem um banco de hibridomas, os resultados apresentados no gráfico 9 possuem divergências quando comparados com os obtidos ao final da sequência de *screenings*, devido a uma seleção não intencional dos hibridomas.

Gráfico 9. Reatividade dos anticorpos policlonais a diferentes antígenos. Em 9A estão apresentadas as reatividades referentes à fusão do animal 5, 9B refere-se à fusão dos esplenócitos obtidos do animal 4 e o 9C refere-se ao que foi obtido do animal 3. As letras seguidas dos números representam os hibridomas obtidos





Anota-se ainda que devido a priorização de se manter a viabilidade dos hibridomas alta, uma vez em que se encontravam em proliferação para constituição do banco de células, esses não foram submetidos à parte do protocolo em que se aguarda a verificação de confluência máxima para então mantê-los sem troca de meio por três dias, ficando apenas dois dias sem troca de meio em uma confluência média de 80% do poço. Isso explica os valores apresentados estarem, em sua maioria, menor que o esperado.

Destaca-se, ainda, que os hibridomas que apresentaram maior diferença entre os resultados dos *screenings* foram os referentes à primeira fusão, provavelmente devido esses terem passado por mais repiques.

Para os hibridomas que apresentaram maior reatividade a antígenos do imunógeno e menor a antígenos do tolerógeno, foram realizadas análises estatísticas através do teste *T-student* e do “coeficiente de variação”, com auxílio do *software* Microsoft Excel® versão 2005 e do *software* BioEstat 5.3. Os hibridomas que apresentaram diferença estatística no teste-T foram analisados através do intervalo de confiança (IC95%) e do “coeficiente de variação (CV)”, sendo este, um coeficiente calculado através da diferença das médias de diferentes amostras e do desvio padrão.

Dessa forma, um coeficiente de variação alto indicaria que as médias possuem uma diferença significativa, em termos práticos, entre seus valores.

Assim, selecionou-se o hibridoma A2 referente à primeira fusão (Fusão Animal 5) por apresentar um CV e um IC95% altos e o B3, referente à fusão proveniente do animal 3, que apesar do seu intervalo de confiança baixo, apresenta um dos maiores coeficientes de variação. Os resultados expostos na tabela 12 estão apresentados a partir das maiores variações encontradas.

Vale reforçar que os testes estatísticos servem apenas para um direcionamento, não sendo estatisticamente precisos devido ao reduzido tamanho amostral.

Tabela 12. Coeficiente de variação (CV) e Intervalo de confiança (IC95%) para hibridomas com elevada reatividade aos antígenos do imunógeno quando comparada aos antígenos do tolerógeno

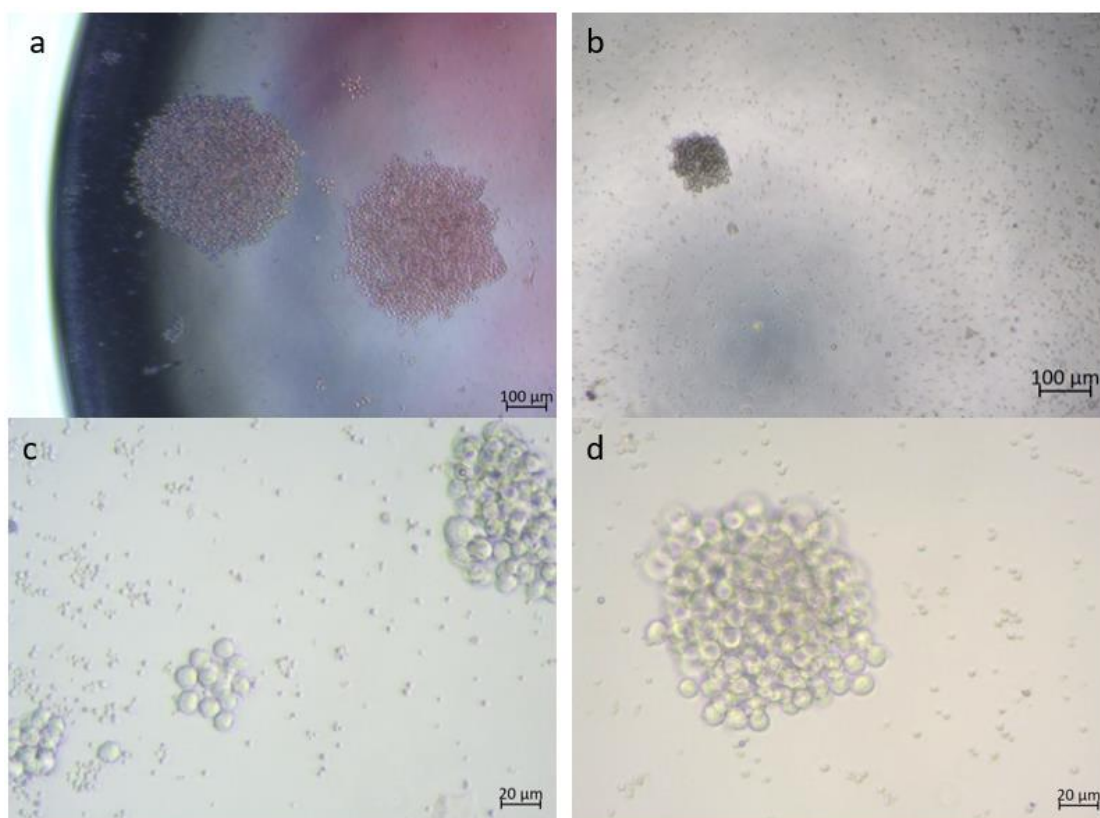
	<i>PI01 (DO)</i>	<i>Pb18 (DO)</i>	<i>IC95%</i>	<i>CV</i>
A2	3.9	0.2805	[3.52 3.72]	1.224434
B3	0.791	0.2595	[0.42 0.64]	0.715521
C81	0.758	0.2655	[0.45 0.54]	0.680508
H2	0.826	0.2915	[0.52 0.55]	0.676418
G12	0.8995	0.342	[0.53 0.59]	0.635058
G6	0.951	0.3645	[0.56 0.62]	0.63051
B41	0.9085	0.351	[0.49 0.63]	0.625982
H42	0.877	0.3405	[0.52 0.55]	0.623183
H41	3.4545	1.741	[1.63 1.80]	0.466414
D8	0.918	0.4715	[0.38 0.51]	0.454441
G5	1.1925	0.7735	[0.38 0.45]	0.301402
A7	0.6675	0.483	[0.16 0.21]	0.22679
E2	0.404	0.329	[0.06 0.09]	0.144701

Para a clonagem, selecionou-se também o Hibridoma H41, mesmo este tendo apresentado um coeficiente de variação abaixo da média, pois seu intervalo de confiança apresenta uma das diferenças mais significativas, além de também apresentar valores de reatividade altos, demonstrando grande potencial para sua clonagem.

Uma vez que os hibridomas foram escolhidos e clonados, procedeu-se a seleção dos poços de clonagem que apresentaram células oriundas de um único hibridoma. A seleção se deu ao observar poço a poço em sua totalidade e uma amostra do parâmetro pode ser observada na figura 21.

Pode-se observar que as imagens da esquerda apresentam mais de uma colônia de hibridomas, enquanto as da direita apresentam apenas uma.

Figura 21. Poços com hibridomas múltiplos (a e c) e únicos (b e d)



As imagens b, c e d foram registradas três dias após a clonagem, enquanto imagem “a” foi obtida sete dias após a clonagem, quando os poços foram analisados novamente para se confirmar quais poços possuíam colônia únicas de hibridomas e quais possuíam colônias múltiplas. A quantidade de poços com colônias múltiplas e únicas está descrita na tabela 13.

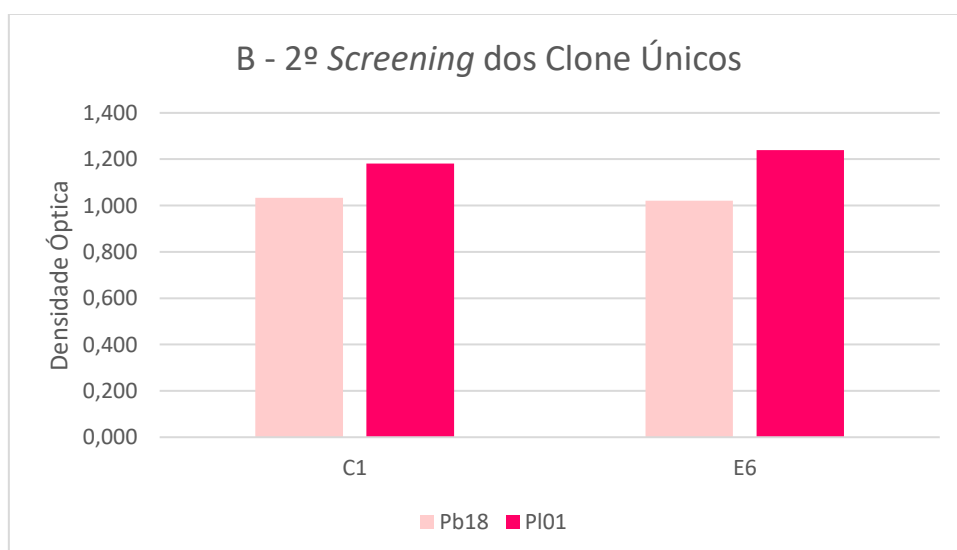
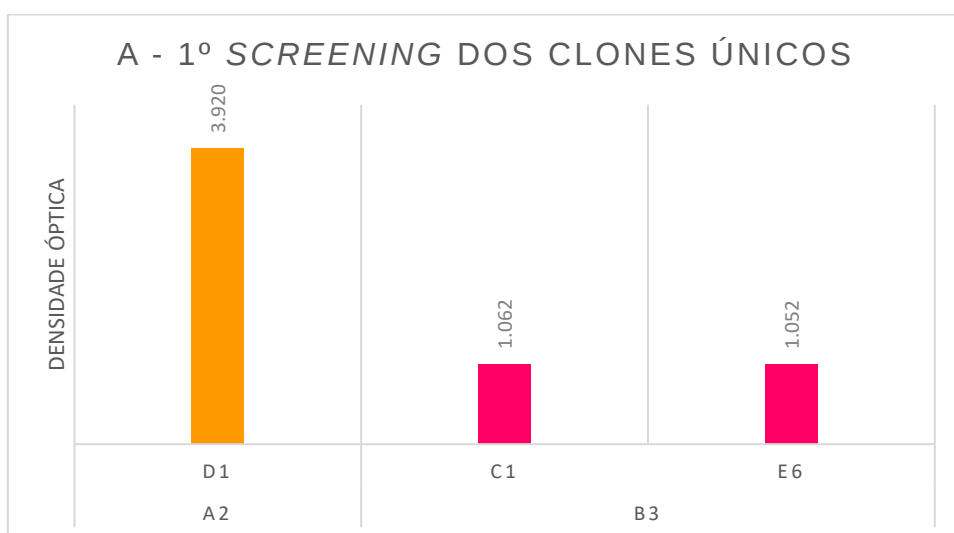
Tabela 13. Porcentagem de poços com colônias de hibridomas oriundas de uma única célula obtidos nas diferentes clonagens. Os números entre parênteses representam o número de hibridomas obtidos

<i>Hibridoma policlonal</i>	<i>A2</i>	<i>B3</i>	<i>H41</i>
<i>Nº de poços totais</i>	192	192	192
<i>Nº de poços com célula única</i>	49	53	49
<i>Nº de poços com células múltiplas</i>	7	17	21
<i>% de poços com células únicas</i>	25.5%	27.6%	25.5%
<i>Nº de poços com célula única testados</i>	28	39	41
<i>% de clones únicos obtidos</i>	3.57% (1)	5.13% (2)	0% (0)

Nota-se que em média a quantidade de poços de clones únicos obtidos nas clonagens dos diferentes hibridomas foi semelhante, enquanto a quantidade de poços com células múltiplas variou mais.

Observa-se também que um número muito pequeno de clones únicos (três) foi obtido em comparação ao número de poços testados. Suas reatividades podem ser observadas nos gráficos 10A e 10B.

Gráfico 10. Reatividade dos anticorpos obtidos dos clones únicos nos dois *screenings* realizados. Em 10A estão apresentadas as reatividades referentes ao primeiro *screening* dos clones únicos e em 10B as reatividades referentes ao segundo, onde foram testados frente aos dois antígenos (CFA Pb18 e CFA PI01)



Nota-se que uma alta reatividade foi obtida no clone único D1, porém, por motivo desconhecido, este entrou em apoptose, impossibilitando que novos testes fossem realizados. Posteriormente, o C1 apresentou contaminação bacteriana, precisando ser descartado antes de sua expansão.

Em relação aos clones obtidos do hibridoma policlonal B3, visualiza-se reatividade satisfatória semelhante entre ambos nos dois testes. A mesma semelhança e considerável reatividade foram observadas nos clones frente aos antígenos CFA Pb18 e CFA PI01, mostrando que sua reatividade não é exclusiva ao *P. lutzii*, como aspirava o estudo.

Todavia, a obtenção de anticorpos monoclonais com alta especificidade para o diagnóstico da doença causada por ambas espécies é tão importante quanto a de anticorpos que determinem a ocorrência de *P. lutzii* como sendo a espécie que ocasionou a mesma. Isso porque um dos maiores desafios no diagnóstico da PCM é a numerosa quantidade de resultados falso-negativos, o que se dá devido a maioria dos testes realizados tenderem a ter uma maior sensibilidade ao *P. brasiliensis* em razão do seus enfoques na glicoproteína gp43, a qual não pode ser usada no diagnóstico de pacientes com PCM causada por *P. lutzii* (LEITÃO JR. *et al.*, 2014).

Assim, um exame capaz de identificar a doença independente do patógeno causador acarretaria a diminuição do montante de casos falsos negativos, em maior velocidade na obtenção do diagnóstico e menores custos para tal.

Mesmo para este caso, o protocolo subtrativo adotado foi adequado, uma vez que as etapas de tolerização que são cerne deste possuem como principal finalidade eliminar epítomos imunodominantes compartilhados, os quais frequentemente mascaram antígenos fracamente expressos e impedem a geração de novas moléculas voltadas ao reconhecimento de biomarcadores ainda não descobertos, os quais poderiam ter relevância ao PI01, como estipulado, mas também a ambas cepas.

Sendo assim, sabe-se que para maiores prospecções relacionadas ao clone é necessária a caracterização do mesmo, mas, ainda assim, ele apresentou resultados preliminares promissores ao diagnóstico da doença. Por fim, ressalta-se que, embora tenha sido obtido apenas um clone, foram obtidos 32 hibridomas policlonais com vasto potencial para a obtenção de anticorpos monoclonais adequados tanto para o diagnóstico da doença, quanto específicos ao *P. lutzii*.

CONCLUSÕES

- Obtiveram-se *pools* antigênicos dos fungos *P. brasiliensis* e *P. lutzii* que, quando avaliados por técnicas de análise proteica, demonstraram a presença de um vasto perfil antigênico com a presença de bandas indicativas de proteínas importantes e de referência para estes microrganismos, sendo, portanto, adequados à utilização nas etapas de tolerização e imunização;
- A diminuição da dose de Cy utilizada na tolerização dos animais ainda permitiu o estado de imunossupressão destes, a depleção de anticorpos policlonais reativos ao tolerógeno e, sobretudo, a sobrevivência dos camundongos, padronizando-se assim, os parâmetros do protocolo perante as repetições dos ciclos de tolerizações.
- Com o término da agenda de imunizações a coleta do soro policlonal da maioria dos animais indicou uma reatividade razoavelmente maior frente à cepa de interesse, quando comparada à cepa utilizada como tolerógeno, indicando que o protocolo pode ter de fato gerado anticorpos reativos a epítomos exclusivos do PI01, o qual foi confirmado pelo WB realizado com os mesmos soros.
- Foram obtidos 32 hibridomas policlonais com desmedido potencial para obtenção de clones únicos de alta especificidade. Destes, por ora, um clone único foi obtido com alta reatividade a *P. lutzii*, não exclusivo a este, mas ainda assim, com potencial uso em um diagnóstico de alta sensibilidade e especificidade para PCM.

REFERÊNCIAS

- AMBRÓSIO, Alexandre Vasconcellos Alvim *et al.* Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): propedêutica complementar, diagnóstico diferencial, controle de cura. **Revista médica de Minas Gerais**. n.1, v.24, p.81-92, 2014.
- BATISTA JR, Joao *et al.* Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis?. **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 176-180, 2010.
- BERTONI, T. *et al.* Paracoccidioidomicose e tuberculose: diagnóstico diferencial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 17-21, 2010.
- BIGDA, Jacek J.; KOSZAŁKA, Patrycja. Wacław Szybalski's contribution to immunotherapy: HGPRT mutation & HAT selection as first steps to gene therapy and hybrid techniques in mammalian cells. **Gene**, v. 525, n. 2, p. 158-161, 2013.
- BONGOMIN, Felix *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BROOKS, Peter C. *et al.* Subtractive immunization yields monoclonal antibodies that specifically inhibit metastasis. **The Journal of cell biology**, v. 122, n. 6, p. 1351-1359, 1993.
- CAMARGO, Z. P. *et al.* The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 29, n. 1, p. 31-38, 1991.
- CARVALHO, K. C. *et al.* Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 4, p. 622-629, 2008.
- CCAC [Canadian Council on Animal Care]. 2002. CCAC Guidelines on: Antibody Production, Ottawa ON: CCAC. Disponível em: https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf. Acesso em 30/06/2019.
- COUTINHO, Ziadir Francisco *et al.* Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998–2006). **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 5, p. 673-680, 2015.

CUNHA, Daniela A. *et al.* Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, p. 374-377, 2002.

DA SILVA, Julhiany de Fatima *et al.* Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 84, n. 1, p. 87-94, 2016.

DA SILVA, Silvia Helena Marques *et al.* Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3675-3680, 2003.

DE ALMEIDA, Rodrigo *et al.* Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies. **MAbs**, v. 10, n.1, p.46-54, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1331804>

DE CURCIO, Juliana Santana *et al.* Identification of membrane proteome of *Paracoccidioides lutzii* and its regulation by zinc. **Future Science OA**, v. 3, n. 4, p. FSO232, 2017.

DE OLIVEIRA, Haroldo C. *et al.* Paracoccidioides-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1319, 2015.

DE SOUSA BARBOSA, Brenna *et al.* Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1-5, 2017.

DEFFUNE, E. **Obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre le troisième composant du complément: intérêt en immunohématologie**. 1992. 146p. Thesis (Doutorado em Imunologia) - Universidade Pierre et Marie Curie, LISE / CNRS, França.

DENNING, David W.; BROMLEY, Michael J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414-1416, 2015.

DOS SANTOS, Priscila Oliveira *et al.* Immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* using a latex test: detection of specific antibody anti-gp43 and specific antigen gp43. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003516, 2015.

EARLEY, E. M.; OSTERLING, M. C. Fusion of mouse-mouse cells to produce hybridomas secreting monoclonal antibody: **Journal of Tissue Culture Methods**, v.9, n.3, p. 141-146, 1985.

ENGVALL, Eva. [28] Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1980. p. 419-439.

FIGUEIREDO, L. F. M. *et al.* **Anticorpo monoclonal para diagnóstico da paracoccidioidomicose e usos**. Depositante: Universidade Federal De Minas Gerais; Universidade Federal Do Paraná; Centro De Produção E Pesquisa De Imunobiológicos – CPPI. BR 102016025687-9 A2. Depósito: 31 nov. 2016. Concessão: 29 maio 2018.

GEGEMBAUER, Gregory *et al.* Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e2986, 2014.

GIACOMAZZI, Juliana *et al.* The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.

HAWKSWORTH, David L.; LUECKING, Robert. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, 2017.

HRYCYK, Marluce Francisca *et al.* Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical mycology**, v. 56, n. 8, p. 950-962, 2018.

HUYAN, Xiao-Hui *et al.* Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1293-1297, 2011.

JACKSON, Lynn R.; FOX, James G. Institutional policies and guidelines on adjuvants and antibody production. **ILAR journal**, v. 37, n. 3, p. 141-152, 1995.

JIN, Min *et al.* A rapid subtractive immunization method to prepare discriminatory monoclonal antibodies for food *E. coli* O157: H7 contamination. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31352, 2012.

KOHLER G; MILSTEIN C. A. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, 1975; 256: 495-7.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9ª edição, p. 649-713, 2002. São Paulo, SP: Sarvier.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LEENAARS, Marlies; HENDRIKSEN, Coenraad FM. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. **Ilar Journal**, v. 46, n. 3, p. 269-279, 2005.

LEENAARS, Marlies *et al.* Immune responses and side effects of five different oil-based adjuvants in mice. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 61, n. 2-4, p. 291-304, 1998.

LEITÃO JR, Natanael P. *et al.* Paracoccidioides lutzii Plp43 is an active glucanase with partial antigenic identity with P. brasiliensis gp43. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e3111, 2014.

LEVY, C. E. Detecção e identificação dos fungos de importância médica. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 1-27, 2004.

MATTHEW, William D.; SANDROCK JR, Alfred W. Cyclophosphamide treatment used to manipulate the immune response for the production of monoclonal antibodies. **Journal of immunological methods**, v. 100, n. 1-2, p. 73-82, 1987.

MENDES-GIANNINI, M. J. *et al.* Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 20, n. 1, p. 103-108, 1984.

MILLINGTON, Maria Adelaide *et al.* Paracoccidioidomicose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e0500002, 2018.

MOREIRA, Adriana Pardini Vicentini. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 5, n. 51, p. 11-24, 2008.

PERLIN, David S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 12, p. e383-e392, 2017.

PERON, G. *et al.* Recombinant 60-kDa heat shock protein from Paracoccidioides brasiliensis: is it a good antigen for serological diagnosis of paracoccidioidomycosis?. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 4, 2017.

PRESTERL, Elisabeth *et al.* Medical mycology: Fungal infections. **Basic Microbiology and Infection Control for Midwives**. Vienna, Austria: Springer, Cham, 2019. p. 155-159.

QUEIROZ-TELLES, Flavio *et al.* Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367-e377, 2017.

RODRIGUES, Marcio L.; ALBUQUERQUE, Priscila C. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006479, 2018.

SAWANT, Bhakti; KHAN, Tabassum. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1478-1490, 2017.

SHARPE, Richard J.; SCHWEIZER, Robert T.; BOW, Laurine M. Neonatal tolerance increases efficacy of antisera production. **Medical hypotheses**, v. 17, n. 3, p. 265-270, 1985.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida *et al.* Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Brasília**. Vol. 39, n. 3 (maio/jun. 2006), p. 297-310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida *et al.* II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose-2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e0500001, 2018.

SIDDIQUI, M. Z. Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 72, n. 1, p. 12, 2010.

SIFUENTES-OSORNIO, Jose; CORZO-LEÓN, Dora E.; PONCE-DE-LEÓN, L. Alfredo. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. **Current fungal infection reports**, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012.

SIQUEIRA, Isaque Medeiros *et al.* Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). **Sabouraudia**, v. 54, n. 2, p. 177-188, 2015.

STILS JR, Harold F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **ILAR journal**, v. 46, n. 3, p. 280-293, 2005.

Stop neglecting fungi. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 17120, número 8, 2017.

SZYBALSKI, Wacław. Roots. Use of the HPRT gene and the HAT selection technique in DNA-mediated transformation of mammalian cells: First steps toward developing hybridoma techniques and gene therapy. **Bioessays**, v. 14, n. 7, p. 495-500, 1992.

TEIXEIRA, Marcus M. *et al.* Paracoccidioides species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014.

TELES, F. R. R.; MARTINS, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2254-2264, 2011.

ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely Maria *et al.* Diagnostic aspects of paracoccidioidomycosis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 2, p. 111-118, 2014.

WEINER, George J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 6, p. 361, 2015.

WENGENACK, Nancy L.; BINNICKER, Matthew J. Fungal molecular diagnostics. **Clinics in chest medicine**, v. 30, n. 2, p. 391-408, 2009.

WHITESELL, Luke *et al.* Structural basis for species-selective targeting of Hsp90 in a pathogenic fungus. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2019.