



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**EFEITOS DAS REGIÕES CONSTANTES DE IGG1 E IGG3  
NA LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MURINOS À CÁPSULA  
DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS***

**Autora: Adrielle Veloso Caixeta**  
**Orientador: Dr. André Moraes Nicola**

**Brasília - DF**  
**2017**

**ADRIELLE VELOSO CAIXETA**

**EFEITOS DAS REGIÕES CONSTANTES DE IGG1 E IGG3 NA LIGAÇÃO DE  
ANTICORPOS MURINOS À CÁPSULA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Dr. André Moraes Nicola

**Brasília  
2017**

Dissertação de autoria de Adrielle Veloso Caixeta, intitulada EFEITOS DAS REGIÕES CONSTANTES DE IGG1 E IGG3 NA LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MURINOS À CÁPSULA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*, apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular da Universidade de Brasília em 24/08/2017, sido defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

---

Prof<sup>o</sup> Dr. André Moraes Nicola (Orientador)  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular – UnB

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Andréa Queiroz Maranhão (Membro interno)  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular - UnB

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola (Membro externo)  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - UnB

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca (Suplente)  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Brasília  
2017

## **AGRADECIMENTOS**

Inicio meus agradecimentos a Deus, já que Ele me deu força e sabedoria para enfrentar as dificuldades e por ter guiado todos os meus caminhos e decisões até aqui.

A minha família, meu Pai Geraldo, minha mãe Sandra, minha irmã Ayla e minha sobrinha Isabelle, pois sem o apoio de vocês esse sonho jamais teria se tornado realidade. Pai e Mãe, saibam que o incentivo de vocês, tanto pessoal quanto psicológico, foram determinantes nesta vitória.

Meu namorado Igor Leali Costa, por me ajudar em momentos em que nem eu mesma acreditava que pudesse ser capaz de ir além, momentos de angústia, de medo e também por compartilhar momentos de alegria. Não houve nenhum momento em que ele não cuidasse de mim e me dissesse palavras de conforto e de carinho. Agradeço ainda sua irmã Dra. Michelle Leali Costa por me instruir por diversas vezes com seus aprendizados e profissionalismo como pesquisadora. Estes foram de fundamental importância durante o meu processo de crescimento.

Ao professor Dr. André Moares Nicola por me ter dado a oportunidade de desenvolver um projeto no qual sempre tive o prazer de executar e por ter confiado em mim desde o primeiro instante para o desenvolvimento de tal. E ainda por ter me dado conselhos e ensinamentos que foram e são muito preciosos para minha vida profissional e pessoal.

Aos meus irmãos de coração Rafael Correa e Pauline Mikaela por terem me incentivado e estado do meu lado sempre que precisei, para desabafos, trabalhos, brincadeiras, conselhos e toda a atenção e tempo que dedicaram a mim durante esta jornada.

A todos os colegas de trabalho do laboratório que sempre me deram apoio, de modo enfático a minha colega de trabalho Diane, que entrou como um anjo enviado por Deus em minha vida, que fez todas as dificuldades se tornarem mais leves, me ajudando de forma tão completa e profissional. Sua doçura e sua humildade deixam a vida de qualquer pessoa e o ambiente de trabalho muito mais prazeroso. Tão pequena no tamanho e tão grande na sabedoria, no companheirismo, na inteligência, na forma de enxergar e enfrentar o mundo. Serei grata para sempre por todo apoio psicológico, prático e pessoal que você me dedicou.

A Dra. Patricia Albuquerque por ajudar de forma tão solícita a todos os pedidos realizados por mim e ainda a todos os professores, alunos, amigos, tios e primos de que alguma forma participou desse processo. Agradeço infinitamente a vocês.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A  
TODOS!

## RESUMO

A criptococose é uma doença com mais de 223 mil novos casos por ano, acarretando a morte de aproximadamente 181 mil pessoas, principalmente indivíduos HIV positivos. *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* são as principais espécies causadora da meningoencefalite criptocócica, dentre outras complicações. Os tratamentos utilizados atualmente são antifúngicos como anfotericina B, flucitosina e fluconazol. Contudo, essas drogas possuem limitações como toxicidade, custo e o surgimento de resistência em algumas linhagens. Dessa forma, terapias alternativas como uso de citocinas e anticorpos monoclonais vem sendo criados no intuito de desenvolver novas ferramentas para o tratamento e diagnóstico desta doença. Alguns estudos mostram que mAbs (IgGs) contra glicuronoxilomanana (GXM) da cápsula de *C. neoformans* podem proteger contra a infecção em camundongos, mas que variantes isotípicas IgG3 podem na verdade agravar a doença, diminuindo assim a sobrevivência desses animais. Além disso, já foi descrito que diferenças na região constante de IgGs com paratopos idênticos podem levar a alterações no padrão de ligação ao antígeno, o que contrasta com a definição já consolidada de que a região variável é a única responsável pela afinidade ao antígeno. O mecanismo molecular da diversidade de ligação aos antígenos da cápsula de *C. neoformans* por esses anticorpos de diferentes isotipos ainda é desconhecido e seu estudo possui grande importância, já que parece promover alteração na resposta imunitária, tendo assim um grande potencial para terapia da doença. No intuito de produzir variantes de anticorpos recombinantes para elucidar quais regiões são responsáveis pela mudança no padrão de ligação à cápsula de *C. neoformans*, foram desenvolvidos, construídos e sintetizados quatorze vetores que codificam híbridos entre isotipos IgG1 e IgG3, sendo 7 derivados do anticorpo 2H1 (um hibridoma secretor de IgG contra GXM) e sete dos anticorpos 3E5 (outro hibridoma secretor de anticorpo contra GXM). Sua produção foi realizada por meio de expressão heteróloga em células CHO DHFR<sup>-/-</sup> e HEK 293F. Por fim, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta para observar seu padrão de ligação à cápsula de *C. neoformans*. Neste foi observado que os anticorpos recombinantes 2H1 produzidos são funcionais e que as alterações realizadas em 2H1 CH1, geraram padrões de ligação de puntiforme (IgG3) e anular (IgG1), como esperado. Porém, quando a dobradiça do anticorpo 2H1 IgG3 foi substituída pela dobradiça de IgG1, o padrão de ligação à cápsula parece mudar de puntiforme para anular. Quando o inverso é feito, substituindo em um anticorpo IgG1 a dobradiça de IgG3, o padrão continua anular. Estes resultados indicam que a dobradiça é uma região necessária, mas não suficiente para determinar o padrão de ligação de um anticorpo à cápsula do fungo.

**Palavras Chave:** Anticorpos monoclonais IgG murinos, *C. neoformans*, mecanismos moleculares

## ABSTRACT

Cryptococcosis is a disease with more than 223 thousand new cases per year, resulting in the death of approximately 181 thousand people, mainly HIV positive individuals. *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* are the main species responsible for cryptococcal meningoencephalitis, among other complications. The treatments currently used for this disease involves the antifungals amphotericin B, flucytosine and fluconazole. However, these drugs have limitations such as toxicity, cost and the emergence of resistance in some strains. Thus, alternative therapies such as the use of cytokines and monoclonal antibodies have been created in order to develop new tools for the treatment and diagnosis of this disease. Some studies show that mAbs (IgGs) against *C. neoformans* capsule glucuronoxylomannan (GXM) may protect against infection in mice, but that IgG3 isotypic variants may actually enhance the disease, thereby decreasing the survival of these animals. In addition, it has been described that differences in the constant region of IgGs with identical paratopes may lead to changes in the antigen binding pattern, which contrasts with the already established definition that the variable region is the only one responsible for the antigen affinity. The molecular mechanism of *C. neoformans* capsule antigen-binding diversity by these antibodies of different isotypes is still unknown and its study is of great importance, since it seems to affect the immune response and thus have therapeutic potential. In order to produce recombinant antibody variants to elucidate which regions are responsible for the change in *C. neoformans* capsule binding pattern, fourteen vectors encoding hybrids between IgG1 and IgG3 isotypes were developed, constructed and synthesized, 7 of which were derived from 2H1 antibody (IgG secreting hybridoma against GXM) and seven of the 3E5 antibodies (another GXM antibody secreting hybridoma). The antibodies were produced by heterologous expression in CHO DHFR <sup>-/-</sup> and HEK 293F cells. Finally, indirect immunofluorescence assays were performed to observe their binding patterns to the *C. neoformans* capsule. We observed that the 2H1 recombinant antibodies are functional and that the changes made in 2H1 CH1 have generated punctate (IgG3) and annular (IgG1) binding patterns, as expected. However, when we replaced the hinge of the 2H1 IgG3 antibody with its IgG1 counterpart, the capsule binding pattern appeared to change from punctate to annular. When the reverse is done by substituting the hinge in an IgG1 antibody for its IgG3 counterpart, the pattern remained annular. These results indicate that the hinge is necessary but not sufficient to determine the pattern by which an antibody binds to the *C. neoformans* capsule.

**Key-words:** murine IgG monoclonal antibodies, *C. neoforms*, molecular mechanisms

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Incidência anual de infecção por criptococose. ....	18
Figura 2- Casos de infecção criptocócica por região. ....	18
Figura 3- Estrutura de GXM e GXMGal. ....	20
Figura 4- Estruturas esquemáticas de uma IgG humana. ....	24
Figura 5- Imunofluorescência indireta de <i>C. neoformans</i> corados com mAbs 3E5. ....	27
Figura 6- Mapa do vetor de expressão pFUSE-CHlg-mG1 (Invivogen) para clonagem dos insertos VH. ....	33
Figura 7- Mapa do vetor de expressão pFUSE-CHlg-mG3 (Invivogen) para clonagem dos insertos VH. ....	34
Figura 8- Mapa do vetor de expressão pFUSE2-CLlg-mk (Invivogen) para clonagem dos insertos VL. ....	34
Figura 9- Análise de DNA dos vetores 2H1 por gel de agarose 1%. ....	46
Figura 10- Análise de DNA de vetores 3E5 por gel de agarose 1%. ....	46
Figura 11- Ensaio de sobrevivência das células CHO DHFR-/- à Blasticidina. ....	48
Figura 12- Ensaio de sobrevivência das células CHO DHFR-/- à Zeocina. ....	49
Figura 13- Ensaio de sobrevivência das células CHO DHFR-/- na presença e ausência de HT. ....	50
Figura 14- Ensaio de sobrevivência ao MTX com células transfectadas com 3E5 IgG3 com D de IgG1. ....	51
Figura 15- Ensaio de quantificação de anticorpos 2H1 por ELISA. ....	53
Figura 16- Ensaio de quantificação de anticorpos 3E5 por ELISA. ....	55
Figura 17- Transfecção de células HEK293F com vetores 2H1. ....	57
Figura 18- Diluição limitante do anticorpo 2H1mG3. ....	58
Figura 19- Quantificação de anticorpos concentrados mensuradas por ELISA. ....	60
Figura 20- Ensaio de IFI com anticorpos 2H1. ....	64
Figura 21- Porcentagem de fagocitose de <i>C. Neoformans</i> opsonizado com anticorpos 2H1. ....	65
Figura 22- Imagem de microscopia fagocitose de <i>C. neoformans</i> opsonizados por anticorpos 2H1. ....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação de vetores produzidos e seus respectivos isotipos .....	36
Tabela 2-Quantificação de anticorpos concentrados 2H1 por ELISA-GXM.....	61
Tabela 3-Descrição do padrão de ligação observados em ensaio de IFI.....	62

## LISTA DE SIGLAS

5-FU – 5-fluorouracilo	GXM – Glucuronoxilomanana
5-FC – 5-Flucitosina	GXM-TT – Glucuronoxilomanana conjugada a toxina de tétano
ADCC– Citotoxicidade celular dependente de anticorpo	GXMGal – Glucuronoxilomanogalactana
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência adquirida	H – Cadeia pesada
AmB – Anfotericina B	HEK 293F– Células de rim embrionário humano
AmBd – Anfotericina B deoxicolato	HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
BSA – Albumina de soro bovino	IDSA– Doenças Infecciosas da América
C – Região constante do anticorpo	IFI – Imunofluorescência indireta
CDR – Região determinante de complementariedade	Ig – Imunoglobulina
CH – Constante pesada	IMDM- <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
ChIg – Imunoglobulina quimérica	IMGT – <i>International ImMunoGeneTics Information System</i>
CHO – Células de Ovário de Hamster Chinês	ITC – Calorimetria por Titulação Isotérmica
CrAg – antígenos de criptococos	L – Cadeia leve
D – Dobradiça	LA – aglutinação de látex
DIC - Microscopia de contraste de interferência diferencial	LB - Luria-Bertani
DMSO – Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo	LCR – Líquido cefalorraquidiano
DNA – Ácido Desoxidoribonucléico	L-DOPA – Levodopa
EIA – Imunoensaio enzimático	mAbs – Anticorpos monoclonais
ELISA - Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima	MP – Manoproteínas
Fab – Fração de ligação ao antígeno	MTT – brometo de 3- 4,5- <b>dimetil</b> - tiazol-2-il -2,5-difeniltetrazólio
Fc- Fração Cristalizável	NMR – Ressonância Magnética Nuclear
FcγR – Receptor de fração cristalizável gamma	
FcRn – Receptor neonatal	

OMS – Organização Mundial da Saúde

Pb – Pares de bases

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PDB – *Protein Data Bank*

pH – Potencial hidrogeniônico

pNPP – substrato p-nitrofenil fosfato

SAXS – Raio-x de pequeno ângulo

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SFB – Soro fetal bovino

SNC –Sistema Nervoso Central

SPR – Ressonância Plasmônica de Superfície

TBE – Tris-Borato-EDTA

UV– Luz ultra-violeta com comprimento de onda em nm

V – Região variável do anticorpo

VDJ – Recombinação entre segmentos gênicos variável (V), junção (J) e, em alguns casos, diversidade (D).

VH – Variável pesada

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
2.1 CRIPTOCOCOS	17
2.1.1 Cápsula: Estrutura e função	19
2.1.2 Infecção e Tratamento	20
2.2 IMUNOGLOBULINAS: ESTRUTURA E FUNÇÃO	22
2.3 ANTICORPOS MONOCLONAIS NO TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE	24
2.4 O PAPEL DA REGIÃO CONSTANTE DOS MABS NA LIGAÇÃO À <i>C. NEOFORMANS</i>	26
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
4.1 GERAIS	31
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	31
4.2.1- Produzir anticorpos 2H1 recombinantes de isotipo IgG1, IgG3 e híbridos IgG1/IgG3	31
4.2.2- Produzir anticorpos 3E5 recombinantes de isotipo IgG1, IgG3 e híbridos IgG1/IgG3	31
4.2.3- Determinar se os anticorpos recombinantes se ligam à cápsula de <i>C. neoformans</i> e o padrão de ligação gerado por imunofluorescência	31
4.2.4- Determinar se os anticorpos recombinantes são funcionais por ensaio de fagocitose	32
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
5.1 VETORES E CLONES	33
5.2 SUBSTITUIÇÃO DE FRAGMENTOS	35
5.3 TRANSFORMAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ELETROCOMPETENTE E PURIFICAÇÃO DE VETORES	36
5.4 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS CHO DHFR-/- A BLASTICIDINA E ZEOCINA	37
5.5 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS CHO DHFR-/- A AUSÊNCIA DE HIPOXANTINA E TIMIDINA (HT)	38
5.6 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS AO METOTREXATO (MTX)	38
5.7 TRANSFEÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS CHO DHDR-/-	40
5.8 ENSAIO DE DILUIÇÃO LIMITANTE	40
5.9 TRANSFEÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS HEK 293F	41
5.10 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR ELISA	41
5.11 CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES 2H1	42
5.12 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE LIGAÇÃO IGG-CÁPSULA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	42
5.13 ENSAIO DE FAGOCITOSE COM CÉLULAS J774	43
5.14 ANÁLISE DE DADOS	44
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
6.1 TRANSFORMAÇÃO E PURIFICAÇÃO	45
6.2 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS CHO DHFR-/- A BLASTICIDINA E ZEOCINA	47
6.3 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS CHO DHFR-/- COM HT (HIPOXANTINA/TIMIDINA)	49
6.4 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA AO METOTREXATO DAS CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS	50
6.5 AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DOS ANTICORPOS 2H1 E 3E5	51
6.6 AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DOS ANTICORPOS 2H1 POR CÉLULAS HEK 293F	56
6.7 ENSAIO DE DILUIÇÃO LIMITANTE	57
6.8 QUANTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS 2H1 CONCENTRADOS	58
6.9 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	61
6.10 ENSAIO DE FAGOCITOSE COM ANTICORPOS 2H1	64
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>73</b>

<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>
--	-----------

## 1. INTRODUÇÃO

Diversos fungos patogênicos humanos causam doenças infecciosas graves em pessoas imunocomprometidas, como indivíduos com Vírus da imunodeficiência humana (HIV), câncer e imunossupressão pós-transplante (GEORGE et al., 2017). Isto, vem se tornando um problema de saúde pública, já que gera uma alta taxa de mortalidade e letalidade (CHAYAKULKEEREE; WANGCHINDA, 2014) (MÜLLER et al., 2010). As micoses oportunistas mais frequentes nessa classe da população são criptococose, aspergilose e candidíase (BORGES et al., 1997) (UNICEF, 1998).

A criptococose é uma infecção fúngica causada pelo *Cryptococcus*, acarretando complicações como meningite e meningoencefalite criptocócica (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006). Geralmente, ocorre por inalação de leveduras ou esporos, que se alojam nos pulmões e são disseminadas para outros órgãos de forma hematogênica (GAO et al., 2017). No ano de 2014, surgiram cerca de 223 mil novos casos de criptococose, com morte de 181 mil indivíduos. A África sub-saariana foi o local onde ocorreram 73% desses novos casos, enquanto que na América Latina estima-se cerca de 5.300 novos casos com 2.400 mortes (RAJASINGHAM et al., 2017).

O *Cryptococcus* é um gênero de basidiomicetos que se apresenta como leveduras globosas ou ovaladas. Existem dezenas de espécies, dentre as quais os complexos *C. neoformans* e *C. gatti* são responsáveis por doenças graves (ISHII; MATSUMOTO; SEKIMIZU, 2016) (BRITO C, MARQUEZ S, 2012). Sua cápsula é constituída por polissacarídeos, tendo como componentes principais glicuronoxilomanana (GXM), glicuronoxilomanogalactana (GXMGal) e manoproteínas (MP). Esses fungos podem ser encontrados no solo – principalmente em locais contaminados com excretas de aves e também em árvores (PEDROSO, 2008) (ELLIS; PFEIFFER, 1990).

A droga de escolha para o tratamento da criptococose é a anfotericina B, associada ou não a outras drogas como 5-flucitosina (5-FC) ou fluconazol (PAULA, 2007). Contudo, estas terapias disponíveis no mercado são ineficientes a eliminação do *Cryptococcus*, e ainda apresentam alta toxicidade e vários efeitos colaterais e adversos. Além disso, estudos já têm demonstrado a existência de fungos resistentes a essas drogas (SANUZI; MEDEIROS, 2010) (GULLO et al., 2013) (COELHO; CASADEVALL, 2016).

Outras alternativas terapêuticas têm se mostrado promissoras para criptococose, entre elas a terapia com anticorpos monoclonais, citocinas (BOULWARE, 2011), flavonóides (GULLO et al., 2013). Além da possível utilização como terapia da criptococose, os anticorpos monoclonais (mAbs) são relevantes para a delimitação do processo infeccioso por *Cryptococcus* por meio d

a modulação do sistema imunológico (NETO, 2011) (PIRES; GUIMARÃES; MOYA, 2000). Estes vêm sendo desenvolvidos para reconhecimento de GXM, glicosilceramidas, melanina e  $\beta$ -glucana, levando a opsonização e fagocitose do fungo. Poderiam também ser usados ainda em associação com outras terapias já disponíveis (GULLO et al., 2013) (CIÊNCIAS; PAULO, 2011). Apesar de existir estudos em desenvolvimento, ainda não está completamente esclarecido o mecanismo molecular pelo qual mAbs podem interagir com os antígenos polissacarídicos da cápsula de *C. neoformans* em camundongos e seres humanos (HARRISON, 2000).

Esta linha de pesquisa faz parte de um projeto amplo, desenvolvido em colaboração com o grupo do Dr. Arturo Casadevall, nos Estados Unidos, o qual visa entender de que forma os mAbs podem interagir com a cápsula de *C. neoformans*, a fim de criar novas terapias seguras e eficazes para a criptococose. Estudos realizados durante as últimas décadas mostram que mAbs IgG de diferentes isotipos apresentam respostas diferentes tanto em teste *in vitro* quanto *in vivo* (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1994) (MUKHERJEE et al., 1994b) (YUAN et al., 1995) (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992). Dessa forma, nosso grupo busca compreender como os mAbs de diferentes isotipos podem gerar respostas distintas no hospedeiro. Então, se torna fundamental entender quais os mecanismos moleculares estão envolvidos nessas alterações de resposta.

Trabalhos já desenvolvidos por alunos do nosso grupo de pesquisa mostram por meio de ensaios de imunofluorescência que mAbs produzidos, denominados 2H1 IgG3 e IgG1, que apresentam região variável idêntica e região constante distinta, se ligam de forma diferente à GXM da cápsula. Nesse intuito, este projeto busca identificar qual/quais regiões específicas da cadeia constante pesada dos anticorpos (CH1 e/ou dobradiça) fazem parte dessa mudança no padrão de ligação à GXM, podendo alterar assim seu padrão de resposta frente ao sistema imune do hospedeiro. Para isso, o projeto vem sendo desenvolvido em colaboração com o grupo do Dr.

Arturo Casadevall, com a expectativa de reforçar os achados anteriores e de investigá-los a fundo.

Para entender esses mecanismos moleculares torna-se fundamental compreender conceitos básicos. As imunoglobulinas são moléculas glicoprotéicas com funções importantes no sistema imune. Sua estrutura é composta de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010) (MARTIN, 1969)(SCHROEDER; CAVACINI, 2010). Já está consolidado na literatura que as regiões funcionais consistem na porção variável (V) que é a responsável pela ligação ao antígeno e na a porção constante que é a responsável pela ação efetora (JANDA et al., 2016). Alguns estudos sugerem que alterações feitas na região constante da cadeia pesada (CH) podem levar a mudanças no padrão de ligação a antígenos, alterando com isso a afinidade e especificidade dos anticorpos e desafiando dogmas já consolidados na literatura da imunologia (NUSSBAUM et al., 1997).

Alguns estudos mostram por imunofluorescência indireta que mAbs IgGs, de região variável idêntica e diferentes isotipos, alteram os padrões de ligação ao GXM presente na cápsula de *C. neoformans*. Anticorpos IgG3 foram capazes de se ligar em forma de pontos, enquanto anticorpos IgG1 se ligaram em forma de anel ao redor da cápsula do fungo. Como essas formas de ligação também foram observadas por outros anticorpos, elas passaram a ser denominadas “Padrão de ligação” (que pode ser puntiforme ou anular). Esses padrões foram associados ao comportamento desses anticorpos em modelos de camundongo, que podia ser protetor ou agravante da criptococose. O padrão puntiforme foi associado a um comportamento não protetor ou agravante de doença, enquanto que o anular foi associado a um comportamento protetor (CLEARE; CASADEVALL, 1998) (CLEARE; BRANDT; CASADEVALL, 1999) (CASADEVALL; PIROFSKI, 2005) (PIROFSKI; CASADEVALL, 1996). Visando compreender o mecanismo dos padrões de ligação à cápsula de *C. neoformans* e, conseqüentemente, da causa de tais comportamentos no hospedeiro, neste trabalho de Dissertação foram produzidos os anticorpos monoclonais IgG1 e IgG3 com alterações em suas cadeias constantes pesadas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CRIPTOCOCOS

Os fungos do gênero *Cryptococcus* são leveduras encapsuladas pertencentes ao filo Basidiomycota. Embora mais de 30 espécies estejam incluídas nesse gênero (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006), o *C. neoformans* e o *C. gattii* são os principais patógenos que causam criptococose em humanos, sendo a inalação a via mais usual de infecção. *C. neoformans* foi originalmente classificado em 4 sorotipos (A, B, C, D) com base na aglutinação de antígenos polissacarídicos capsulares, que podem ser determinados utilizando soros de coelho absorvidos (IKEDA et al., 1982) ou anticorpos monoclonais (DROMER et al., 1993). *C. neoformans* foi dividida em duas variedades: *C. neoformans var grubii* (anteriormente grupo A) e *C. neoformans var neoformans* (Anteriormente grupo D), e *C. gattii* (anteriormente grupos B e C) foram reconhecida como uma espécie distinta (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2009).

Embora a incidência de infecções esteja mais associadas a pessoas seriamente imunodeprimidas, como pessoas com HIV/AIDS, transplantadas, tratadas com imunossupressores e pacientes com imunodeficiência inata e adquirida, a criptococose também pode afetar aqueles que possuem sistemas imunológicos aparentemente "normais" (WILLIAMSON et al., 2016). Apesar dessa doença ter diminuído nos países desenvolvidos desde a introdução da terapia anti-retroviral, mesmo 100 anos após ter sido identificado por Sanfelice em 1894, os fungos do gênero *Cryptococcus* continuam causando morbidade e mortalidade significativas em todo o mundo, principalmente na África subsaariana (LA HOZ; PAPPAS, 2013) (SLOAN; PARRIS, 2014). No ano de 2014 surgiram cerca de 223.100 novos casos de criptococose, com 181.100 mortes. A África sub-saariana foi o local onde ocorreram 73% desses novos casos. Já na América Latina estima-se cerca de 5.300 novos casos com 2.400 mortes (RAJASINGHAM et al., 2017) (fig.1 e 2). Esta estimativa classifica a criptococose como uma das doenças infecciosas mais comuns que levam a morte na África sub-saariana. Em resposta a essas sombrias estimativas foi proposta uma série de medidas que incluíam otimização do diagnóstico, prevenção e tratamento de meningite criptocócica (JACKSON; VAN DER HORST, 2012). Ferramentas convencionais de diagnóstico para criptococose incluem microscopia, cultura e

detecção de antígenos de criptococos por imunocromatografia (CrAg LFA). Podem ser usados ainda imunoensaio enzimático (EIA)(LA HOZ; PAPPAS, 2013) (KOZEL; BAUMAN, 2012).

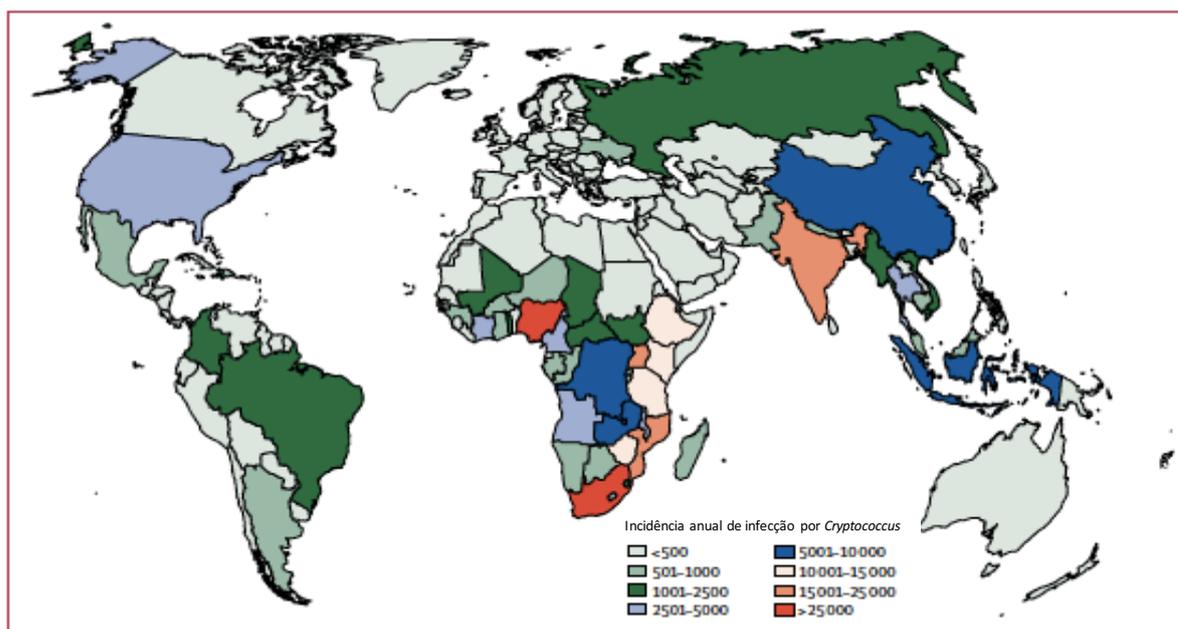


Figura 1- Incidência anual de infecção por criptococose.

Número anual de pessoas com antigenemia criptocócica positiva estimado em 278.000 globalmente em 2014. Estimativa de cerca de 223 mil casos de meningite criptocócica em 2014. Fonte: Adaptado de (RAJASINGHAM et al., 2017).

	Total de antigenemia positiva (intervalo de incerteza)	Casos anuais de criptococose meningocócica (intervalo de incerteza)	Morte por criptococose meningocócica (intervalo de incerteza)
América do Norte	204 300 (148 400-237 800)	162 500 (113 600-193 900)	135 900 (93 900-163 900)
Ásia e Pacífico	52 300 (32 900-74 100)	43 200 (25 300-64 700)	39 700 (20 600-59 700)
Caribenho	1800 (1300-2200)	1400 (1000-1800)	700 (500-900)
América Latina	7000 (3600-11 100)	5300 (2600-8900)	2400 (1100-4400)
América do Norte	3700 (3000-4600)	3000 (2300-3700)	700 (500-1000)
África do norte e Oriente Médio	3600 (2600-5000)	3300 (2400-4500)	1900 (1300-2700)
Europa	5200 (4000-6500)	4400 (3400-5600)	1800 (1300-2400)
Global	278 000 (195 500-341 000)	223 100 (150 600-282 400)	181 100 (119 400-234 300)

Figura 2- Casos de infecção criptocócica por região.

Fonte: Adaptado de (RAJASINGHAM et al., 2017)

### 2.1.1 Cápsula: Estrutura e função

*C. neoformans* possuem uma série de fatores de virulência como a cápsula(SLOAN; PARRIS, 2014), que tem atividade antifagocítica, a lacase e a melanina, que interferem na morte oxidativa por fagócitos, dificultando assim a eliminação do patógeno. A enzima lacase catalisa a produção de melanina por oxidação da levodopa (L-DOPA) e outras catecolaminas, podendo assim explicar a predileção do organismo para o sistema nervoso central (SNC)(ALSPAUGH, 2015) (EISENMAN et al., 2007).

O fungo é um parasita intracelular facultativo e pode sobreviver e se replicar dentro de fagolisossomas ácidos de macrófagos, dependendo da origem e do estado de ativação das células. Intracelularmente, os polissacarídeos da cápsula acumulam-se em vesículas levando à permeabilização da membrana fagolisossômica e assim liberando moléculas de virulência no espaço extracelular (BICANIC; HARRISON, 2004) (HAMILTON; GOODLEY, 1996). A evidência indica que a cápsula é um fator-chave de virulência para *C. neoformans*, sendo provavelmente o fator de virulência dominante, enquanto que mutantes acapsulares são tipicamente avirulentos. Assim os isolados encapsulados possuem diferentes graus de virulência. A estrutura da cápsula é induzida em resposta a várias condições associadas/relacionadas ao hospedeiro, como potencial hidrogeniônico (pH) neutro/alcalino, altos níveis de CO<sub>2</sub> e privação de ferro. Além disso, requer um complexo metabólico para fornecer a energia celular e ainda precursores de carboidratos necessários para criar rapidamente essa estrutura complexa (ALSPAUGH, 2015).

*C. neoformans* tem uma cápsula composta principalmente de um polissacárido de elevado peso molecular que tem uma espinha dorsal de  $\alpha$ -1,3-d-manopiranosose, unidades com resíduos únicos de  $\beta$ -d-xilopiranosilo e  $\beta$ -d-glucuronopiranosilo ligados (HAMILTON; GOODLEY, 1996) (CHERNIAK et al., 1980) (CHERNIAK; SUNDSTROM, 1994). Este polissacárido é referido como glucuronoxilomanana (GXM). Embora GXM seja o principal componente criptocócico em fluidos corporais é muito provável que o organismo também libere glicuronoxilomanogalactana (GXMGal) (fig.3), e MP (manoproteínas) *in vivo* (CHERNIAK; SUNDSTROM, 1994) (HEISS et al., 2013). Esses antígenos de *Cryptococcus* no soro ou no líquido espinhal são usados para diagnósticos da criptococose. Além disso, se os pacientes com criptococose têm

títulos de antígeno no início da terapia isso pode demonstrar menos propensão a responder à terapia ou morrer antes do término da terapia pelo qual os pacientes estão submetidos. A redução nos níveis séricos de glucuronoxilomanana (GXM) também pode contribuir para a sobrevivência prolongada, uma vez que o polissacarídeo parece ser responsável por inibir a migração de leucócitos, causar paralisia do sistema imune, interferir na fagocitose, aprimorar a infecção do vírus da imunodeficiência humana, induzir a respostas supressoras e aumentar a mortalidade em camundongos. Assim, a remoção de polissacarídeos pode ser benéfica para o hospedeiro (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1994) (MUKHERJEE et al., 1994a).

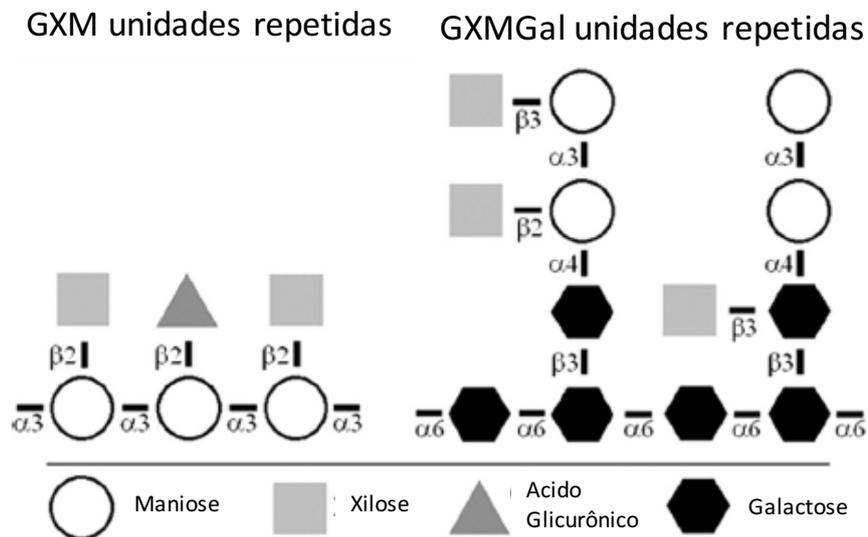


Figura 3- Estrutura de GXM e GXMGal.

Estrutura química de monômeros GXM e GXMGal. Estes monômeros formam polímeros de  $1 \times 10^6$  a  $7 \times 10^6$  para GXM e  $1 \times 10^5$  para GXMGal. As proporções variam de acordo com o sorotipo. São mostrados exemplos do sorotipo A. GXM refere-se a Glucuronoxilomanana e GXMGal refere-se a Glucuronoxilomanagalactana. Fonte: Adaptado de (GRIJPSTRA et al., 2009).

### 2.1.2 Infecção e Tratamento

A porta de entrada de *Cryptococcus* ocorre por inalação dos propágulos infecciosos presentes no ambiente (VELAGAPUDI et al., 2009), principalmente excretas de animais e pássaros (PAPPAS, 2013). Considerando o tamanho, as células de levedura desidratadas ou os basidiósporos podem ser inalados e

depositados nos alvéolos. Além dos tratos respiratório e gastrointestinal, a pele, próstata, olhos, ossos, trato urinário e sangue também podem ser acometidos em casos ocasionais. Após a entrada do fungo no organismo ele pode produzir uma infecção latente ou doença aguda. Manifestações iniciais são provavelmente determinadas pelo inóculo, o estado imunológico do hospedeiro ou a virulência da linhagem (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006) (JARVIS; HARRISON, 2008). Os pacientes geralmente apresentam cefaléia, febre, mal-estar e alteração do estado mental durante várias semanas. Os sinais são freqüentemente ausentes, mas podem incluir meningismo, papiledema, paralisia do nervo craniano e outros déficits neurológico focais (BICANIC; HARRISON, 2004) (FRANCO-PAREDES et al., 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou orientações de tratamento atualizadas para refletir os avanços na última década, mas a prática continua sendo impedida pela fraca disponibilidade de medicamentos (DISEASE; ADULTS; DECEMBER, 2011) (“WHO | Rapid advice: Diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children”, 2015).

O desoxicolato de anfotericina B (AmBd) é a pedra angular do tratamento para as formas graves de criptococose, incluindo meningoencefalite. A flucitosina (5-FC) é usada em combinação com AmBd como terapia de primeira linha em meningite criptocócica ou criptococose pulmonar. Esta combinação representa o regime fungicida mais potente (MAZIARZ; PERFECT, 2016) (SLOAN; DEDICOAT; LALLOO, 2014). Apesar disso o uso da anfotericina B causa diversos efeitos colaterais, possuindo alto custo de monitoramento e necessidade de profissional capacitado para sua administração e ainda locais adequados para o armazenamento desses medicamentos, o que pode dificultar em locais de poucos recursos (ABASSI; BOULWARE; RHEIN, 2015) (LARSEN et al., 2004). A anfotericina B na formulação lipossomal é ainda mais utilizada, pois podem ser administradas em doses menores, minimizando assim os efeitos tóxicos no organismo, como nefrotoxicidade (MOEN; LYSENG-WILLIAMSON; SCOTT, 2009) (STONE et al., 2016).

A anfotericina B, um polieno introduzido na década de 1950. É um agente fungicida que se liga ao ergosterol na membrana plasmática fúngica, aumentando a permeabilidade a prótons e catiões monovalentes tais como potássio. A atividade antifúngica também pode ser devida à indução de espécies reativas de oxigênio em células fúngicas bem como em células imunes e também a estimulação da produção

de citocinas pró-inflamatórias (BICANIC; HARRISON, 2004) (BRAJTBURG et al., 1990), podendo levar a ativação de macrófagos (MUKHERJEE et al., 1994a).

Já a flucitosina, que foi desenvolvida como droga anticâncer, foi introduzido na década de 1970 para tratamento da criptococose. A flucitosina é convertida pela citosina desaminase (uma enzima presente no fungos e bactérias, mas não em células de mamíferos) a 5-fluorouracilo (5-fu), que é um análogo de pirimidina, responsável pela inibição da síntese de ácidos nucleicos. Em estudos, a monoterapia com flucitosina levou ao desenvolvimento bastante rápido de resistência (HOSPENTHAL; BENNETT, 1998). Além disso causa hepatotoxicidade, efeitos gastrointestinais e efeitos de supressão da medula óssea, o que prejudica sua utilização em monoterapia (KUNKA et al., 2015; STAMM et al., 1987; VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000).

## **2.2 IMUNOGLOBULINAS: ESTRUTURA E FUNÇÃO**

Além das terapias convencionais com antifúngicos, existem terapias alternativas em uso e sendo desenvolvidas como uso de citocinas, flavonóides, vacinas e mAbs (BOULWARE, 2011) (GULLO et al., 2013) (LEOPOLD WAGER; WORMLEY; JR., 2015). Para entender a base do projeto que visa a produção de anticorpos monoclonais com alterações na cadeia pesada de IgG1 e IgG3 para avaliar sua diferença no padrão de ligação à GXM da cápsula são necessários o entendimento de conceitos básicos relacionados a imunologia dos anticorpos.

As imunoglobulinas são moléculas de glicoproteínas produzidas por linfócitos B ativados em resposta a um imunógeno, constituindo a base da resposta imune humoral (FERNÁNDEZ-CRUZ; ALECSANDRU; RAMÓN, 2009). Elas são assim denominadas, quando expressas na membrana do linfócito B; já quando secretadas são denominados "anticorpos". As imunoglobulinas são moléculas tetraméricas formadas por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves unidas entre si por pontes dissulfeto e ligações de hidrogênio. Ainda, segundo sua função, a molécula pode ser classificada em duas frações: o Fragmento de ligação ao antígeno (Fab) e Fração cristalizável (Fc). A região Fab é formada pela região variável (V) e região constante (C) que fazem parte tanto da cadeia pesada (H), quanto da cadeia leve (L); já a Fc é composta apenas pela região constante. Classicamente, a região V possui domínios

hipervariáveis ou regiões de complementariedade responsáveis pela especificidade e afinidade ao antígeno, enquanto a região C determina a estrutura do anticorpo e sua função efetora (SCHROEDER; CAVACINI, 2010) (MIMURA et al., 2007) (CHARLES A JANEWAY et al., 2001) .

Com base em sua região constante, as imunoglobulinas de mamíferos podem ser classificadas como IgA, IgD, IgM, IgE e IgG, que se diferenciam por suas funções e propriedades biológicas. Os isotipos possuem características diferentes, sendo que a classe IgG tem uma cadeia pesada do tipo  $\gamma$ , a IgM possui uma cadeia pesada do tipo  $\mu$ , IgA tem uma cadeia pesada do tipo  $\alpha$ , a IgE tem uma cadeia pesada do tipo  $\epsilon$  e a IgD terá uma cadeia pesada do tipo  $\delta$  (SCHROEDER; CAVACINI, 2010) (MARTIN, 1969).

As moléculas de IgG possuem atividades funcionais como: neutralização de micróbios e toxinas; opsonização e fagocitose de micróbios; Citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e ativação de complemento (fagocitose de microorganismos opsonizados com fragmentos do complemento, inflamação e lise de patógenos) (FERNÁNDEZ-CRUZ; ALECSANDRU; RAMÓN, 2009). Além disso, as IgGs exercem papel na apresentação de antígenos, maturação de células dendríticas (DCs) mediada por imunocomplexo, regulação da ativação de linfócitos B, sobrevivência de plasmócitos e transcitose. Essas respostas são geradas por ativação de receptor Fc da cadeia gama (FcR $\gamma$ ) inibitório (FcR $\gamma$ IIIB) e ativatórios (FcR $\gamma$ I, FcR $\gamma$ IIA, FcR $\gamma$ IIC, FcR $\gamma$ IIIA, FcR $\gamma$ IIIB e receptor neonatal (FcRn) expressos diferencialmente na membrana de leucócitos. Várias dessas funções de IgG mediada por receptor ocorrem de forma simultânea, um exemplo, é que a ligação de complexos imunes a Fc $\gamma$ R's em neutrófilos e macrófagos desencadeia a fagocitose, liberação de espécies reativas de oxigênio, mediadores de inflamação (leucotrienos e prostaglandinas) e indução de hidrolases neutras (GHETIE; WARD, 2002) (FRIDMAN, 1991) (SELA-CULANG; KUNIK; OFRAN, 2013).

Em humanos as IgGs são divididas em várias subclasses - IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, com diferentes cadeias pesadas, denominadas  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3 e  $\gamma$ 4, respectivamente (VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014). Já a IgGs murinas são divididas em IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG2c (LOBO; PATEL, 1997) (IGARASHI et al., 1990) (MARTIN; BRADY; LEW, 1998; PETRUSHINA et al., 2003; ZHANG; GOLDSCHMIDT; SALTER, 2012). As cadeias leves consistem em dois tipos - lambda ( $\lambda$ ) e kappa ( $\kappa$ ) (CHARLES A JANEWAY et al., 2001). Já a cadeia constante pesada é do tipo  $\lambda$

dividida em CH1, CH2 e CH3, (fig. 4). Em camundongos, a média da razão  $\kappa$  para  $\lambda$  é 20: 1, enquanto em seres humanos a razão é de 2: 1 (IGARASHI et al., 1990).

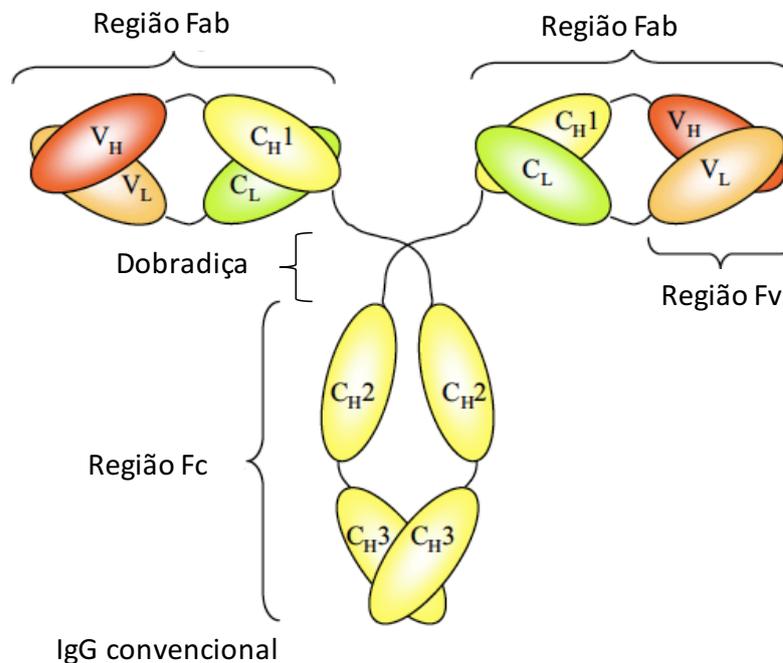


Figura 4- Estruturas esquemáticas de uma IgG humana.

Os domínios constantes de cadeia pesada CH1, CH2 e CH3 são mostrados em amarelo, o domínio de cadeia leve (CL) em verde e os domínios variável de cadeia pesada (VH) ou de cadeia leve (VL) em vermelho e laranja, respectivamente. Os domínios de ligação ao antígeno de um anticorpo convencional são compostos pela região Fab e Fv. A região Fc é responsável por funções efetoras.

### 2.3 ANTICORPOS MONOCLONAIS NO TRATAMENTO DA CRIPTOCOCOSE

Com o advento dos anticorpos terapêuticos no mercado farmacêutico, as terapias protéicas estão sendo cada vez mais adotadas (DIMITROV, 2012). As drogas protéicas geralmente são vantajosas por serem eficazes em baixas concentrações e porque comumente podem ser conjugados ou associados a outras terapias (ECKER; JONES; LEVINE, 2015).

Desde a aprovação do primeiro produto de mAb em 1986 (ECKER; JONES; LEVINE, 2015) mais de 23 fármacos mAb entraram no mercado e mais de 50 estão em fase avançada de estudos clínicos (REICHERT, 2017). O mercado

biofarmacêutico atingirá 25% do total de farmacêutico mundial esse ano, sendo que 25% desses relacionados a anticorpos monoclonais (CHUNG, 2017).

Os anticorpos monoclonais têm um papel importante em muitos tipos de doenças como câncer, doenças infecciosas, alergia, doenças auto-imunes, e inflamação (SAYLOR; DADACHOVA; CASADEVALL, 2009). Existem evidências de que mAbs modulem o metabolismo de *C. neoformans* e conseqüentemente a infecção fúngica (CASADEVALL; PIROFSKI, 2012) (NICOLA; CASADEVALL; GOLDMAN, 2008). Referente à modulação do metabolismo, pesquisas relatam que anticorpos contra a cápsula do fungo podem interferir na liberação de polissacarídeos e na formação de biofilme inibindo assim a infecção. Além disso, atuam na eliminação do fungo de forma indireta, uma vez que interagem e ativam células do sistema imune (POSCH et al., 2017).

A princípio, antes de investigar os anticorpos anti-criptocócicos relatados, um repertório de mAbs capazes de reconhecer o polissacarídeo de *C. neoformans* foram produzidos pela técnica de hibridoma: 3E5, 2H1, 2D10 18G9, 17E12, 21D2, 7G7, 9FII, 12A1, 13F1, 14EI, 15E8, 16E4, 18B7 e 25G12 (MUKHERJEE; CASADEVALL; SCHARFF, 1993). Uma vez que a resposta humoral contra o polissacarídeo ocorre por via T-independente, esse repertório foi gerado em resposta a imunização com GXM do sorotipo A (H99) conjugado ao toxóide tetânico (GXM-TT). Seus respectivos hibridomas parecem ter sido derivados de dois clones de células B muito siminales, pois os mAbs reagem contra os quatro sorotipos do fungo e apresentam alta similaridade no gene VH, variando apenas em poucos aminoácidos na CDR3 (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992).

Um ensaio clínico de fase I com o anticorpo monoclonal 18B7 (IgG1) foi conduzido em pacientes com HIV que se recuperaram de meningite criptocócica. A terapia foi bem tolerada para concentrações de anticorpos de até 1mg/kg de peso corporal. Portanto, existe um potencial evidente para produzir anticorpos anti-criptococos como terapia, ainda que seja existente o desafio de projetar estratégias de tratamento considerando a complexa farmacodinâmica de anticorpos administrados, bem como a toxicidade associada à droga (LARSEN et al., 2005).

O mAb 2H1 (IgG1) revelou ser uma opsina potente *in vitro* e em associação com anfotericina B demonstrou ser mais eficaz do que qualquer uma das duas terapias isoladas (MUKHERJEE et al., 1994a). O uso passivo deste anticorpo não associado também é uma opção atrativa para aumentar defesas do hospedeiro, promovendo a

depuração de fungos através de células efetoras (MUKHERJEE et al., 1994a). O anticorpo aumenta a fagocitose do fungo por macrófagos e micróglia, promove a morte por macrófagos J774.16 murinos e aumenta a produção de óxido nítrico por células J774.16. O mAb 2H1 pode aumentar a atividade das células NK contra *C. neoformans* (MUKHERJEE; FELDMESSER; CASADEVALL, 1996). Os camundongos tratados com o anticorpo também tiveram níveis significativamente reduzidos de GXM no soro, o que parece refletir em uma menor carga fúngica se comparada aos camundongos não tratados com este anticorpo (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1995). Dessa forma, o anticorpo poderia ser útil clinicamente como um complemento das terapias antifúngicas, diminuindo a incidência de recaída, encurtando a hospitalização e/ou reduzindo a mortalidade ou a dose de AmB necessária para o tratamento de pacientes.

#### **2.4 O PAPEL DA REGIÃO CONSTANTE DOS MABS NA LIGAÇÃO À *C. NEOFORMANS***

Em um dos estudos de CASADEVALL e colaboradores, observou-se que tanto a especificidade ao epítopo quanto o isotipo do anticorpo em questão são determinantes importantes da eficácia de mAbs para função protetora de camundongos estudados (CASADEVALL et al., 1998; YUAN et al., 1998). Os mAbs vindos de mesmos clones de células B possuem diferentes eficácias protetoras onde IgA>IgG1>IgM>IgG3. Contudo anticorpos anticriptocócicos podem ser também agravantes da doença. Quando administrado entre 24 e 48 horas IgG3 parece não conferir proteção ao hospedeiro (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992).

Na literatura clássica é estabelecido que a porção variável é a responsável pela interação aos antígenos, enquanto a porção constante pela interação com as células efetoras (JANDA et al., 2016). É sedimentado na literatura que a região Fc confere função efetora por interação a diferentes FcRs (JANDA et al., 2016). Contudo, novas pesquisas têm demonstrado que a porção constante também pode alterar a afinidade e especificidade do anticorpo. Dessa forma, vários anticorpos monoclonais murinos específicos para o GXM de *C. neoformans* foram produzidos e estudados a fim de reforçar esses achados (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992) (QUAST; PESCHKE; LÜNEMANN, 2017).

Os mAbs 3E5 IgG1, Ig2a e IgG2b mostraram em estudos diminuir a carga fúngica e prolongar a sobrevivência de camundongos infectados letalmente com *C. neoformans*. Esse achado foi correlacionado a forma como o anticorpo se ligou à cápsula do fungo em experimentos de imunofluorescência, sendo o padrão de ligação de 3E5 anular para IgG1 e puntiforme para IgG3 (fig. 5) (SAYLOR; DADACHOVA; CASADEVALL, 2010) (CORDERO et al., 2013) (YUAN et al., 1995) (CLEARE; BRANDT; CASADEVALL, 1999). Outra correlação foi que os mAbs protetores perdem sua reatividade ao GXM quando o polissacarídeo é de-O-acetilado, exceto no caso de 3E5 IgG3 que se ligou 10 vezes mais forte ao antígeno. Nessa situação, os anticorpos 3E5 apresentam o paratopo idêntico e variam apenas em seus isotipos (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), essas correlações sugerem que suas regiões constantes podem alterar de alguma forma a especificidade ao epítipo (TORRES et al., 2005). A partir dos dados cristalográficos de 3E5 IgG3 (4HDI), depositados no *Protein Data Bank* (PDB), várias ferramentas, tais como, Espelhamento de raio X de pequeno ângulo (SAXS) (ERYILMAZ et al., 2013), Ressonância plasmônica de Superfície (SPR) (TORRES et al., 2007), Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (KATO et al., 1991) (JANDA et al., 2015) e Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) (DAM et al., 2008) foram capazes de reforçar o achado. Esses estudos sugerem que alterações na estrutura da região constante podem mediar mudanças na região variável influenciando na especificidade e afinidade em IgG de isotipos diferentes (ERYILMAZ et al., 2013) (TORRES et al., 2007)(KATO et al., 1991)(DAM et al., 2008).

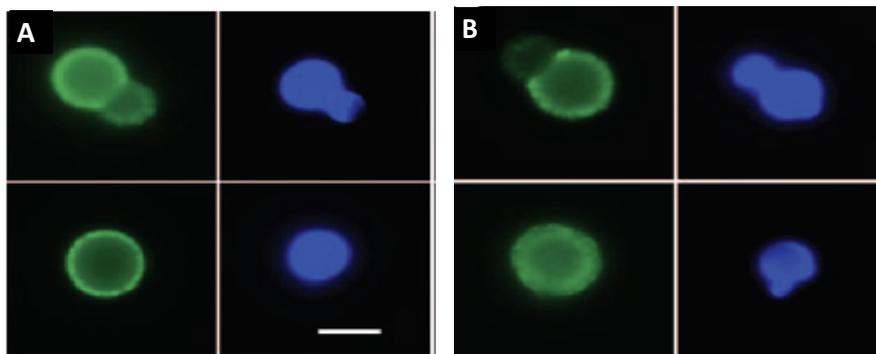


Figura 5- Imunofluorescência indireta de *C. neoformans* corados com mAbs 3E5.

A) 3E5 IgG1 ligada a cápsula e B) 3E5 IgG3 ligada a cápsula. A fluorescência verde representa o anticorpo contra cápsula e a fluorescência azul representa a parede celular de linhagem 24067C. *neoformans*. As células mostradas são representativas dos padrões de imunofluorescência observado. Barra, 5  $\mu$ m. Fonte: Adaptado de (TORRES et al., 2005).

Além dos estudos direcionados à influência da fração constante na especificidade ao antígeno, a cadeia constante também tem sido estudada com o objetivo de encontrar o sítio catalítico responsável pela atividade proteolítica de 3E5 IgG1. Essa atividade foi evidenciada por anticorpos 18B7 (IgG1) que demonstrou atividade catalítica hidrolisando substratos de oligossacarídeos da cápsula. Essa atividade catalítica tem gerado resultados positivos em pacientes com infecções e doenças autoimunes. A atividade desse anticorpo fornece novas informações sobre a capacidade de existir mais imunoglobulinas com a função de defesa no hospedeiro. Dessa maneira novas possibilidades terapêuticas dos anticorpos para a ligação contra polissacarídeos podem ser encontradas (BOWEN et al., 2017) (JANDA et al., 2012).

Os mAbs 12A1 e 13F1 são IgM que diferem em sua região VH por apenas 7 aminoácidos. O 12A1, ao contrário de 13F1, em concentrações menores que 1µg/ml inibe a ligação de 3E5 IgG1, e não de 3E5 IgG3, a GXM. Essa inibição indica que esteja ocorrendo uma competição pelo mesmo epítipo ou impedimento estérico, enquanto que a ausência dessa inibição sugere ligação a epítopos diferentes. Interessantemente, 13F1 competiu pelo mesmo sítio de ligação que o 3E5 IgG3. Isso confirma que os mAbs 12A1 e 13F1 diferem em especificidade (MUKHERJEE et al., 1995). Os dados de 13F1 foram relacionados ao padrão de ligação puntiforme observado em imunofluorescência e à resposta não protetora ou agravante de doença observada em camundongos tratados com o anticorpo e infectados com *C. neoformans*. A microscopia também revelou que o mAb 12A1 produziu um padrão de fluorescência anular homogêneo ao longo da cápsula celular da levedura (NUSSBAUM et al., 1997). Além disso, 12A1 aumentou a curva de sobrevivência dos camundongos igual a 2D10, que é um IgM protetor. Isso revela que o padrão de ligação do mAb ao GXM da cápsula parece estar associado a proteção do hospedeiro contra a doença (MUKHERJEE et al., 1995).

Os anticorpos 2H1 foram escolhidos neste trabalho para reforçar achados de 3E5, já que além de 3E5 IgG3 apenas 2H1 (porção Fab) possui sua estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios X, o que possibilita estudos posteriores e mais aprofundados sobre seus efeitos em humanos (YOUNG et al., 1997). Os mAbs 2H1 e 3E5 são derivados de uma única célula pre-B, possuindo genes de região variável idênticas e com especificidade semelhante e mesmo idiotipo (MUKHERJEE et al., 1995). Além disso, apesar de 2H1 ter sido um anticorpo

monoclonal amplamente caracterizado, sendo um dos principais candidatos ao desenvolvimento clínico, problemas de agregação após sua purificação dificultaram sua utilização. Dessa maneira foi criado o 18B7, que está intimamente relacionado a 2H1 na estrutura variável, contudo não idêntico. Esse novo anticorpo mostrou prolongar a sobrevivência de camundongos com infecções letais de *C. neoformans*, alta afinidade a GXM, ausência de toxicidade em ensaios com macacos e nenhum problema significativo relacionado a purificação (CASADEVALL et al., 1998). Dessa forma, o estudo de 2H1 pode ajudar a entender e ampliar os conhecimentos sobre o 18B7.

### 3. JUSTIFICATIVA

A criptococose ainda é uma doença negligenciada, apesar de causar muitas mortes em pacientes imunocomprometidos (SOARES, 2015). O uso de anticorpos monoclonais e o desenvolvimento de novas biotecnologias para o tratamento de diversas doenças tem se tornado cada dia mais importante. Nesse sentido, a produção de anticorpos monoclonais contra a cápsula de *C. neoformans* gera um novo potencial terapêutico para a criptococose. Diversos mAbs estão sendo testados em camundongos no intuito de gerar em um futuro próximo o seu uso em doenças humanas (ZARAGOZA et al., 2010). Alguns estudos mostram que alguns anticorpos ao invés de proteger o organismo da infecção, agravam a doença. Entender detalhadamente o mecanismo molecular pelo qual isso ocorre é crucial para evitar que cheguem a testes clínicos anticorpos com potencial de causar danos aos pacientes.

Um dos fatores associados, em estudos anteriores, a esse agravamento de doença é o isotipo IgG3, que de todas as imunoglobulinas de camundongo é a menos estudada. Anticorpos desse isotipo são mais difíceis de produzir por causa de agregação e insolubilidade, e seu mecanismo efetor não é ainda completamente conhecido (DIAMOND; YELTON, 1981). Já está consolidado na literatura que a região variável é a responsável pela ligação ao antígeno, enquanto a região constante é responsável pela função efetora dessa imunoglobulina. Contudo, diversos estudos têm mostrado que diferentes anticorpos que possuem a mesma região variável e diferentes regiões constantes apresentam alteração no seu padrão de ligação ao antígeno, modificando também sua eficácia na imunidade (CORDERO et al., 2013) (JANDA et al., 2015). Para isso, se torna fundamental o estudo do mecanismo pelo qual os anticorpos IgG1 e IgG3 recombinantes interagem a antígenos de *C. neoformans*.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 GERAIS**

Elucidar o mecanismo molecular pelo qual os anticorpos monoclonais IgG1 e IgG3 com modificações nas regiões constantes podem alterar o padrão de ligação à GXM da cápsula *C. neoformans*.

### **4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

#### **4.2.1- Produzir anticorpos 2H1 recombinantes de isotipo IgG1, IgG3 e híbridos IgG1/IgG3**

Produzir Anticorpos híbridos IgG3 que tenham a cadeia CH1 e a região de dobradiça trocadas pelas de IgG1, sendo três com substituições em CH1 (2H1 CH1F1, 2H1 CH1F2 e 2H1 CH1F3) e dois na região dobradiça (2H1 IgG3 com D de IgG1 e 2H1 IgG1 com D de IgG3). Os anticorpos 2H1 IgG1 e IgG3 (não híbridos) foram gerados para controle do padrão de ligação anular e puntiforme, respectivamente.

#### **4.2.2- Produzir anticorpos 3E5 recombinantes de isotipo IgG1, IgG3 e híbridos IgG1/IgG3**

Produzir anticorpos híbridos, IgG3 que tenham a cadeia CH1 e a região de dobradiça trocadas pelas de IgG, sendo três com alterações na cadeia CH1 (3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2 e 3E5 CH1F3) e dois na região da dobradiça (3E5 IgG1 com D de IgG3 e 3E5 IgG3 com D de IgG1). Além disso, é importante produzir os anticorpos 3E5 IgG1 e IgG3 (não híbridos) para controle padrões de ligação anular e puntiforme, respectivamente.

#### **4.2.3- Determinar se os anticorpos recombinantes se ligam à cápsula de *C. neoformans* e o padrão de ligação gerado por imunofluorescência**

Realizar o ensaio de imunofluorescência indireta com os anticorpos 3E5 e 2H1 recombinantes e reforçar os estudos baseados no padrão de ligação de 3E5 IgG3 à GXM obtidos na literatura; e compreender o mecanismo pelo qual as regiões CH1 e de dobradiça dos anticorpos híbridos podem alterar a interação ao antígeno.

#### **4.2.4- Determinar se os anticorpos recombinantes são funcionais por ensaio de fagocitose**

Para avaliar a funcionalidade dos anticorpos recombinantes, torna-se necessário realizar o ensaio de fagocitose por macrófagos da linhagem celular J774.1 utilizando *C. neoformans* (H99) opsonizados com os anticorpos.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

De forma geral e resumida, para a produção dos anticorpos monoclonais foi necessária a obtenção de vetores 2H1 e 3E5, sintetizados pela empresa (Genewiz), exceto 2H1 IgG1 e 2H1 IgG3 que foram produzidos por estudante de mestrado orientado pelo grupo do professor André Nicola. Após a transfecção foram realizados ensaios de validação como teste de sensibilidade ao MTX, à blasticidina, à zeocina e ao HT e o teste de fagocitose. Por fim ensaios de imunofluorescência para analisar os padrões de ligação dos anticorpos recombinantes à GXM da cápsula de *C. neoformans* foram feitos.

### 5.1 VETORES E CLONES

As clonagens das regiões variáveis VH e VL dos genes 2H1 em vetores pFUSE-CHIG-mG1 (fig. 6), pFUSE-CHIG-mG3 (fig. 7), pFUSE-CLIG-mK (*Invivogen*) (fig. 8) foram realizadas em trabalho anterior de estudante de mestrado orientado pelo grupo do professor André Nicola (DF, 2016).

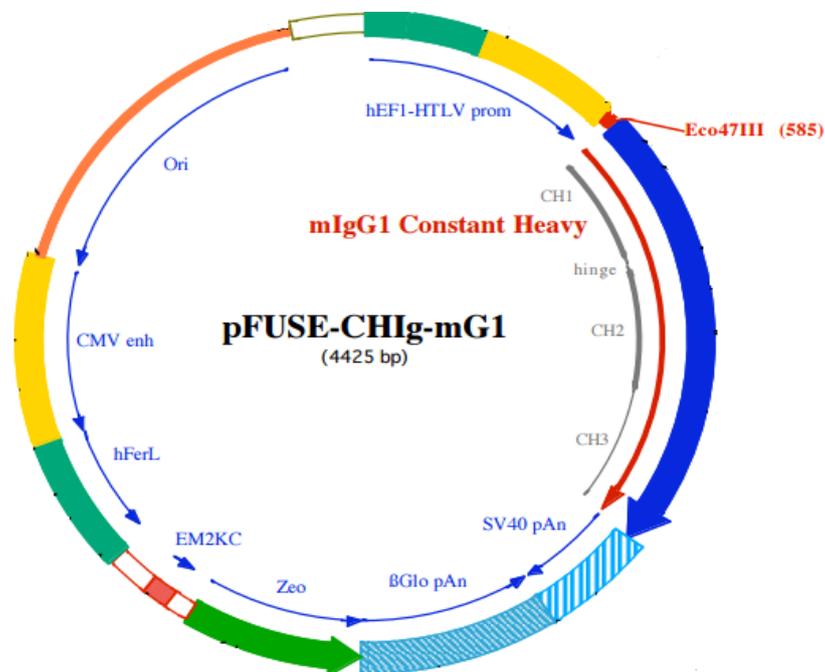


Figura 6- Mapa do vetor de expressão pFUSE-CHIG-mG1 (*Invivogen*) para clonagem dos insertos VH. Em verde claro, o sítio de resistência a zeocina.

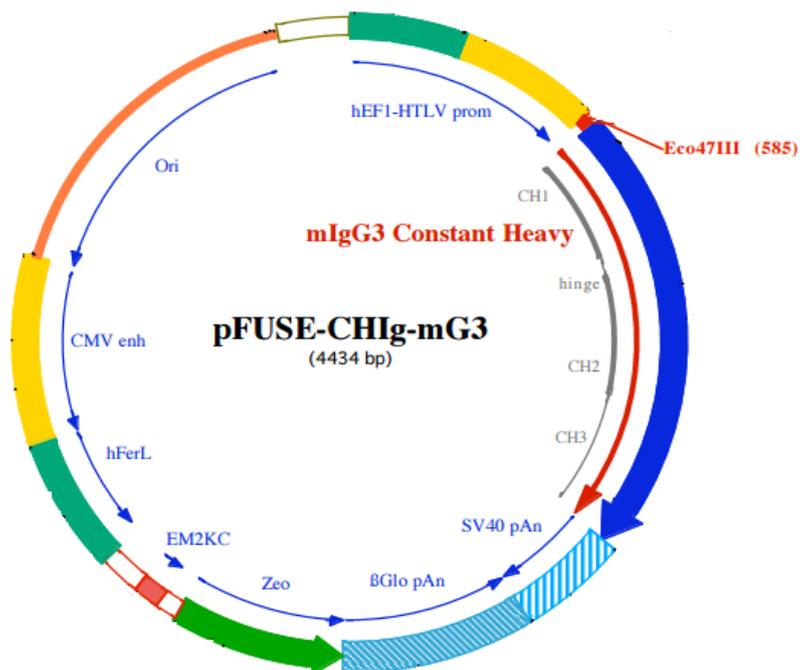


Figura 7-Mapa do vetor de expressão pFUSE-CHlg-mG3 (Invivogen) para clonagem dos insertos VH. Em verde claro, o sítio de resistência a zeocina.

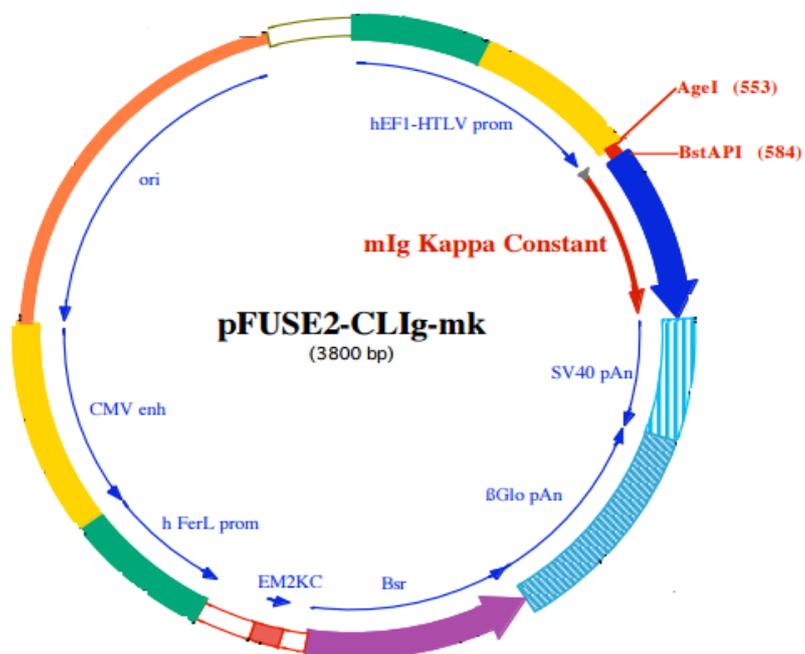


Figura 8-Mapa do vetor de expressão pFUSE2-CLlg-mk (Invivogen) para clonagem dos insertos VL.

## 5.2 SUBSTITUIÇÃO DE FRAGMENTOS

Com o objetivo de analisar qual região da cadeia pesada seria de fundamental importância na alteração da especificidade e afinidade do paratopo do anticorpo, levando a uma mudança no padrão de ligação a GXM e seu mecanismo, foi realizado anteriormente pelo nosso grupo, uma análise no banco de dados *International ImMunoGeneTics Information System* (IMGT). Dessa forma, o domínio CH1 foi dividido em 3 regiões com maior variabilidade, sendo estas denominadas de: F1 (KTTPPSVYPLAPGSAAQTNSM), F2 (TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD) e F3 (LYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDDK) de CH1 IgG1; F1 (TTTAPSVYPLVPGCSDTSGSS), F2 (KWNYGALSSGVRTVSSVLQSG) e F3 (FYSLSSLVTVPSSTWPSQTVICNVAHPASKTELIKR) de CH1 IgG3. A partir disso, foram gerados 5 DNA recombinates (Genewiz), sendo eles: 2H1-CH1F1 IgG3, 2H1-CH1F2 IgG3, 2H1-CH1F3 IgG3, 2H1 IgG1 com D de IgG3, 2H1 IgG3 com D de IgG1. Além destes, foram gerados DNA recombinates de 3E5, sendo eles: 3E5-CH1F1 IgG3, 3E5-CH1F2 IgG3, 3E5-CH1F3 IgG3, 3E5 IgG1 com D de IgG3, 3E5 IgG3 com D de IgG1. Ainda, foram sintetizados o 3E5mG1 e 3E5mG3 (tabela 1).

	Substituição	Isotipo
2H1 CH1F1	Adição de F1 de CH1 do anticorpo 2H1 IgG1	IgG3
2H1 CH1F2	Adição de F2 de CH1 do anticorpo 2H1 IgG1	IgG3
2H1 CH1F3	Adição de F2 de CH1 do anticorpo 2H1 IgG1	IgG3
2H1 IgG3 com D de IgG1	Adição de Dobradiça do anticorpo 2H1 IgG1	IgG3
2H1 IgG1 com D de IgG3	Adição de Dobradiça do anticorpo 2H1 IgG3	IgG1
2H1 IgG1	Sem alterações	IgG1
2H1 IgG3	Sem alterações	IgG3
3E5 CH1F1	Adição de F1 de CH1 do anticorpo 3E5 IgG1	IgG3
3E5 CH1F2	Adição de F2 de CH1 do anticorpo 3E5 IgG1	IgG3
3E5 CH1F3	Adição de F2 de CH1 do anticorpo 3E5 IgG1	IgG3
3E5 IgG3 com D de IgG1	Adição de Dobradiça do anticorpo 3E5 IgG1	IgG3
3E5 IgG1 com D de IgG3	Adição de Dobradiça do anticorpo 3E5 IgG3	IgG1
3E5 IgG1	Sem alterações	IgG1
3E5 IgG3	Sem alterações	IgG3

Tabela 1- Relação de vetores produzidos e seus respectivos isotipos

### 5.3 TRANSFORMAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* ELETROCOMPETENTE E PURIFICAÇÃO DE VETORES

Os quatorze vetores foram transformados em *E. coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetentes (*New England Biolabs*) e plaqueados em meio LB sólido com Zeocina<sup>TM</sup> *Invitrogen* (25

µg/mL) para seleção de clones de cadeia pesada; e com Blastidina (50 µg/mL) para seleção de clones de cadeia leve. Foi feito pré-inóculo das colônias em seleção com os mesmos antibióticos descritos para plaqueamento. As minipreparações dos quatorze vetores foram realizadas a partir do kit “*GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit*” (*Sigma Life Sciences*).

A qualidade da purificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a sua quantificação pelo método de leitura da absorbância em espectrofotômetro *Nanodrop 2000C* (*ThermoScientific*).

#### **5.4 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS CHO DHFR-/- A BLASTICIDINA E ZEOCINA**

A blastidina e a zeocina são eficientes antibióticos seletivos utilizados para selecionar células transfectadas com o vetor de interesse (Blasticidin | Selection Antibiotic | InvivoGen) (*Zeocin™* | Selection Antibiotic | InvivoGen). Para analisar se as células CHO DHFR-/- não transfectadas estavam resistentes a esse sistema de seleção realizamos o ensaio de MTT. Nesse intuito, para realizar este experimento foram plaqueadas  $3,75 \times 10^4$  de células CHO DHFR-/- em placa de 96 poços. Após 24h de incubação em estufa de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para aderência das células, foram adicionadas concentrações de 0,468 até 60µg/mL de blastidina e 50 até 4000µg/mL de Zeocina. Para avaliar os efeitos dos antibióticos após uma semana foram realizados teste de MTT.

Para o ensaio de viabilidade de cada célula foram adicionados em cada poço 50 µL de solução de MTT (brometo de 3- 4,5-dimetil-tiazol-2-il -2,5-difeniltetrazólio) a 10% (Solução estoque: 5mg/mL) (*Sigma-Aldrich, USA*). Após incubação de duas horas em 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> protegidos da luz. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram diluídos em 100µL de DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo). A leitura foi realizada no espectrofotômetro, na absorbância de 540nm, e a análise pelo *Graph Pad 7* e *Excel*. Para o cálculo da viabilidade, as células não estimuladas com os antibióticos foram consideradas como 100% viáveis e os demais estímulos foram calculadas proporcionalmente.

## **5.5 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS CHO DHFR-/- A AUSÊNCIA DE HIPOXANTINA E TIMIDINA (HT)**

O suplemento celular HT é utilizado por células CHO nocauteadas para o gene DHFR para a síntese de nucleotídeos por uma via alterativa, sendo estes necessários para sua sobrevivência e crescimento celular (FLORIN et al., 2011). Para analisar se as células CHODHFR-/- utilizadas estavam resistentes ou não a este sistema de seleção utilizando HT foi feito o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade de células na presença ou ausência desse suplemento.

Para realização deste experimento foram semeadas  $1 \times 10^4$  de células CHO DHFR-/- em placa de 96 poços. Metade da placa foi plaqueada com meio IMDM (Gibco®/ by life technology/12200-036), suplementado de SFB 10% e HT 1X enquanto a outra metade foi plaqueada com meio com os mesmos suplementos, porém sem o HT 1X. Essa placa ficou em cultivo por uma semana para avaliação do crescimento.

Para o ensaio de viabilidade de cada célula foram adicionados em cada poço 50  $\mu$ L de solução de MTT (brometo de 3- 4,5-dimetil-tiazol-2-il -2,5-difeniltetrazólio) a 10% (Solução estoque: 5mg/mL) (Sigma-Aldrich, USA). Após incubação de duas horas em 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> protegidos da luz. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram diluídos em 100 $\mu$ L de DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo). A leitura foi realizada no espectrofotômetro, na absorbância de 540nm, e a análise pelo Graph Pad 7e Excel. Para o cálculo da viabilidade, as células com HT foram consideradas como 100% viáveis e os demais estímulos foram calculadas proporcionalmente.

## **5.6 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS AO METOTREXATO (MTX)**

As células CHO utilizadas para produção dos anticorpos possuem o gene DHFR nocauteadas. O DHFR é uma enzima que converte diidrofolato em tetraidrofolato, que é um precursor de purinas e pirimidinas necessário para síntese de DNA, mantendo assim a sobrevivência das células. No processo de transfecção

deste tipo celular é inserido além dos vetores para a produção dos anticorpos de interesse, o vetor DHFR. Esses vetores são introduzidos de forma aleatória no DNA, podendo assim estar inseridos na mesma região dos vetores de interesse. Desta forma ao utilizar um inibidor da enzima DHFR, o metotrexato, apenas sobrevivem as células que possuem o gene DHFR integrado no DNA e ainda as células que amplificam esse gene para uma maior produção da enzima. De forma conjunta, à amplificação do gene DHFR, ocorre a amplificação dos genes de produção de anticorpos de interesse. Portanto, o metotrexato é utilizado para amplificação gênica, de forma que aumentar a produção de enzimas DHFR juntamente com os anticorpos de interesse (WANG et al., 2002).

Na literatura são descritas diversas concentrações de MTX para amplificação de genes. As células escolhidas para a realização deste teste foram 3E5 IgG3 com D de IgG1, selecionadas apenas com blasticidina, pois seu crescimento se comportou da mesma maneira que o crescimento das transfectadas com 2H1. Dessa forma, para identificar qual seria a melhor concentração de MTX necessária para amplificar essas células foi feito o ensaio de sobrevivência. Para a realização deste teste foram plaqueadas  $4 \times 10^4$  por poço em placa de 96 poços. Após 24h incubados em estufa de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para aderência das células, foram adicionadas concentrações seriadas de metotrexato a partir de 10mM. Para avaliar os efeitos dos antibióticos após uma semana foram realizados teste de MTT.

Para o ensaio de viabilidade de cada célula foram adicionados em cada poço 50 µL de solução de MTT (brometo de 3- 4,5-dimetil-tiazol-2-il -2,5-difeniltetrazólio) a 10% (Solução estoque: 5mg/mL) (*Sigma-Aldrich, USA*). Após incubação de duas horas em 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> protegidos da luz. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram diluídos em 100µL de DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo). A leitura foi realizada no espectrofotômetro, na absorvância de 540nm, e a análise pelo *Graph Pad 7* e *Excel*. Para o cálculo da viabilidade, as células não estimuladas foram consideradas como 100% viáveis e os demais estímulos foram calculadas proporcionalmente.

## 5.7 TRANSFEÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS CHO DHFR-/-

Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO/dhFr-/[CHO duk-, Nota: dhfr se refere a diidrofolato redutase] ATCC® CRL-9076™) aderentes foram plaqueadas para obter a confluência final de  $1 \times 10^5$  células por poço, em placa de 6 poços, cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> com meio IMDM (Gibco®/ by life technology/12200-036), suplementado de SFB 10% e HT 1X. Estas foram transfectadas com plasmídeos codificando cadeia pesada e cadeia leve dos anticorpos com o lipídeo catiônico Lipofectamina 2000 (Invitrogen) em meio OptiPRO (Gibco) na proporção DNA (ng): reagente (µL) 1:1. Além disso, foi adicionado o vetor contendo DHFR na proporção de 1:100 ng (DHFR/ DNA Total). A transfecção transiente foi realizada completando o volume final com meio já citado e seus suplementos, e após 3 dias foi retirado sobrenadante contendo HT e foram acrescentados meio sem HT com antibióticos para seleção. Após 2 semanas em seleção de clones com Zeocina (0,25 mg/mL) e Blastidina (20 µg/mL) foi realizado um processo de amplificação adicionando metotrexato a 10 µM para aumentar a produtividade de anticorpos. Após 3 semanas dessas células serem cultivadas em garrafas de cultura de células pequenas foram escalonadas para placas de petri de 100 mm 1301 (kasvi®). O sobrenadante de cultura celular proveniente de cada anticorpo foi colhido em *pool*, dando uma média de 500mL por anticorpo e armazenado a -20°C, até ocorrer sua concentração.

## 5.8 ENSAIO DE DILUIÇÃO LIMITANTE

Para a seleção de um clone capaz de produzir uma quantidade maior de anticorpo que o *pool* de células foi feito o ensaio de diluição limitante. Para isso, foi escolhido um dos transfectados em CHO DHFR-/- (2H1mG3), pois o crescimento dessas células foi semelhante ao crescimento das demais células transfectadas com 2H1. Dessa forma, a diluição limitante foi feita adicionando 10.000 células/mL em 5mL. Deste foi retirado 500 µL e diluído em 4,5 mL e assim sucessivamente por quatro vezes, até a diluição ter 0,5 células/poço. Essas células foram plaqueadas em sete placas de 96 poços. Após 2 semanas foram observadas em microscópio invertido (Carl Zeiss) os poços que haviam crescimento celular. Posteriormente, cada poço

contendo células foram passadas para placa de 24, resultando em um total de 60 clones. Estas foram contadas e colocadas na confluência de  $1 \times 10^5$ /mL e após 4 dias foram coletadas os sobrenadantes e feita sua quantificação por ensaio de ELISA indireto. A análise e leitura dos dados foi realizada conforme descrito no ensaio de quantificação de anticorpos por ELISA indireto descrito abaixo.

### **5.9 TRANSFEÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS HEK 293F.**

Foi realizado transfeção de células HEK 293F (Rim embrionário humano) em suspensão utilizando meio livre de SFB. Para este ensaio foi adicionado  $2 \times 10^6$ /mL de células em meio F17 (*Free style/ Gibco®*) em garrafas pra cultivo de células em suspensão. Em seguida, a tranfeção foi realizada com plasmídeos codificando cadeia pesada e cadeia leve dos anticorpos com dois reagentes de transfeção Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) e OptPRO (*Gibco*) na proporção DNA (ng): reagente ( $\mu$ L) 1:1. Para a transfeção transiente foi incubada por 7 dias em estufa de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> sob agitação. Diariamente foram analisadas sua viabilidade e densidade e ainda coletado sobrenadante para realizar a quantificação de anticorpos por ELISA. A análise e leitura dos dados foi realizada conforme descrito no ensaio de quantificação de anticorpos por ELISA indireto descrito abaixo.

### **5.10 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR ELISA**

Amostras obtidas antes, durante e após a concentração tiveram sua quantificação testada por ELISA indireto. Placas de poliestireno de 96 poços foram revestidas com GXM na concentração de 10  $\mu$ g/mL em PBS 1X durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com BSA 1% por 1 h à temperatura de 37 °C e lavadas três vezes com tween-20 a 0.05% em PBS. À placa com GXM foram adicionadas amostras sem diluir e diluídas com seus meios de cultivo respectivos, assim como o padrão (mAb 18B7 IgG1) diluído em série 1:2 e (mAb 3E5 IgG3) com faixa de diluição entre 10  $\mu$ g a 0.0152  $\mu$ g, variando o experimento. Após as placas serem incubadas e lavadas novamente com Tween-20, o anticorpo secundário

de cabra anti-IgG1 e anti-IgG3 de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (1:1000 em BSA 1%) foi adicionado e incubado por 1 hora. A placa foi lavada novamente e incubada por 5 a 30 min com o substrato pNPP (fosfato de p-nitrofenilo).

A leitura dos dados foi feita por espectrofotometria utilizando o programa *SOFTMAX (Molecular devices)* e sua leitura feita em 405 nm. A análise dos dados foi feita no *Graph Pad 7.1*.

### **5.11 CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES 2H1**

Os anticorpos foram concentrados com um Kit Amicon® Ultra Centrifugal Filters (*Life Science Research*) e membrana de 30K (*Sartorius Stedim/ Biotech*). Esse sistema foi conectado a uma bomba de nitrogênio e submetido a 40psi de pressão. Após a concentração esses anticorpos foram filtrados, coletadas amostras para ensaios de quantificação e mantidos em geladeira a 8 °C. As amostras 2H1-CH1F1, 2H1-CH1F2 e 2H1mG3 foram ainda concentradas por ultrafiltração utilizando o sistema Vivaspin® (*GE Healthcare Life Sciences*), pois a quantidade obtida de anticorpo para essas amostras foram menores do que a esperada.

### **5.12 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE LIGAÇÃO IGG-CÁPSULA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA**

Para realizar o ensaio de imunofluorescência foi feito um inóculo de fungo H99 de *C. neoformans* durante a noite. Posteriormente as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X para a contagem e resuspensão em concentração final de  $1 \times 10^7$  a  $2 \times 10^7$ /mL. Estes foram incubados com os anticorpos primários (amostras teste) em concentrações de 1 a 10 µg/mL por 1h a 37°C sob agitação e depois de lavadas três vezes com PBS 1X. Em seguida foram incubados com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a *Alexa Fluor*® 488 (*ThermoFisher Scientific*), a 1 µg/mL por 1 h a 37°C. As células foram lavadas novamente com PBS 1X por três vezes. Além do secundário IgG, foram utilizados anticorpos secundários anti-IgM conjugados a *Alexa Fluor*® 488 (*ThermoFisher Scientific*) para detecção de anticorpos primários 12A1 e 13F1, utilizados como controles do experimento. As células foram

imobilizadas em lâmina e lamínulas com meio de montagem *ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Mountant* (ThermoFisher). As amostras foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Observer Z1 na objetiva de 63X (NA 1,4), câmera *Axio Cam MRc* com CCD resfriado e estágio motorizado para coleta de séries de imagens ao longo do eixo Z. As séries de imagens resultantes foram processadas por meio de algoritmo de deconvolução iterativo com o programa *Zeiss ZEN PRO 2*. Para edição de imagens foram utilizados os programas *Photoshop CS6* e *Illustrator CS6* (Adobe). Nenhuma alteração não-linear foi feita às imagens.

### 5.13 ENSAIO DE FAGOCITOSE COM CÉLULAS J774

Esse experimento foi realizado para determinar se os macrófagos da linhagem J774.1, (ATCC<sup>®</sup> TIB-67<sup>™</sup>) originados de sarcoma de célula reticular de tecido peritoneal de camundongos BALB/C, foram capazes de fagocitar *C. neoformans* por opsonização com os mAbs recombinantes 2H1 produzidos. O ensaio de fagocitose foi realizado em placas de 96 poços, na densidade  $1 \times 10^5$  por poço. A condição de cultivo e incubação das células foi com DMEM 1X (*Gibco*) suplementado com SFB 10%, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Células sem anticorpos de bloqueio foram mantidas como controle negativo do experimento. Foram também adicionadas as opsoninas 2H1 IgG1 e 2H1 IgG3 na quantidade de 10 µg/mL. Foram ressuspensos os fungos de sorotipos A (H99) com relação ao macrófago nas proporções de *C. neoformans* 1:10 por 2 h. Células contendo nenhum anticorpo foram mantidas para controle negativo.

Ao final do experimento as células foram fixadas e coradas com Kit de instant Prov (coloração panótica/ *New prov<sup>®</sup>*). Ao final as amostras foram lavadas com PBS1X por duas vezes e mantidas nessa solução até o dia seguinte. As células foram analisadas em microscópio invertido Zeiss Axio Observer Z1, sendo contadas, no mínimo, 100 células/poço. A porcentagem de fagocitose foi calculada com o número de macrófagos contendo um ou mais *C. neoformans*, dividido pelo total de macrófagos contados. Os testes de fagocitose foram avaliados usando o teste de comparações múltiplas de análise de variância (ANOVA) *Newman-Keuls Multiple Comparison Test* pelo programa *Graphpad Prism 7* (*GraphPad Software*).

## 5.14 ANÁLISE DE DADOS

Resultados tiveram suas análises feitas estatisticamente utilizando programa *GraphPad Prism 7, GraphPad Software*. Os testes utilizados foram realizados por *one-way ANOVA* para comparação de médias. O valor de significância estatística foi adotada com valor de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , NS (Não Significativo).

## 6. RESULTADOS

Este trabalho consistiu na investigação do efeito da região constante sobre a região variável de anticorpos IgG de diferentes isotipos. Nesse intuito, foi levantada a hipótese de que CH1 e/ou dobradiças, por serem as regiões mais próximas da região variável pesada, poderiam ser as porções responsáveis pela alteração do padrão de ligação à GXM. Baseado nisso, foi realizado anteriormente um estudo da estrutura primária e secundária dessas regiões, por nosso grupo de pesquisa, para que fosse possível produzir anticorpos com trocas de fragmentos entre CH1 e dobradiça de IgG3 pra IgG1.

### 6.1 TRANSFORMAÇÃO E PURIFICAÇÃO

As clonagens das regiões variáveis VH e VL do gene 2H1 e 3E5 em vetores pFUSE-CHIG-mG1, pFUSE-CHIG-mG3, pFUSE-CLIG-mK (*Invivogen*) foram realizadas em trabalho anterior de estudante de mestrado em colaboração com o grupo do professor André Nicola(DF, 2016).

A quantificação resultante dos vetores do 2H1 e 3E5 obteve uma média entre 50 e 500 ng/ $\mu$ L (*Nanodrop*). A análise de eletroforese em gel de agarose 1% , (fig. 9 e 10), evidenciou os plasmídeos nos tamanhos esperados de 4863 pb (2H1 CH1F1), 4863 pb (2H1 CH1F2), 4863 pb (2H1 CH1F3), 4860 pb (2H1mG1), 4869 pb (2H1mG3), 4863 bp (2H1 IgG1 com D de IgG3), 4854 bp (2H1 IgG3 com D de IgG1), 4863 pb (3E5 CH1F1), 4863 pb (3E5 CH1F2), 4863 pb (3E5 CH1F3), 4854 pb (3E5 IgG3 com D de IgG1), 4863 (3E5 IgG1 com D de IgG3), 4860 pb (3E5mG1), 4869 pb (3E5mG3), 4222 pb (2H1 VL+ pFUSE2-CLIg-mK) e 4167 pb (3E5 VL pFUSE2-CLIg-mk).

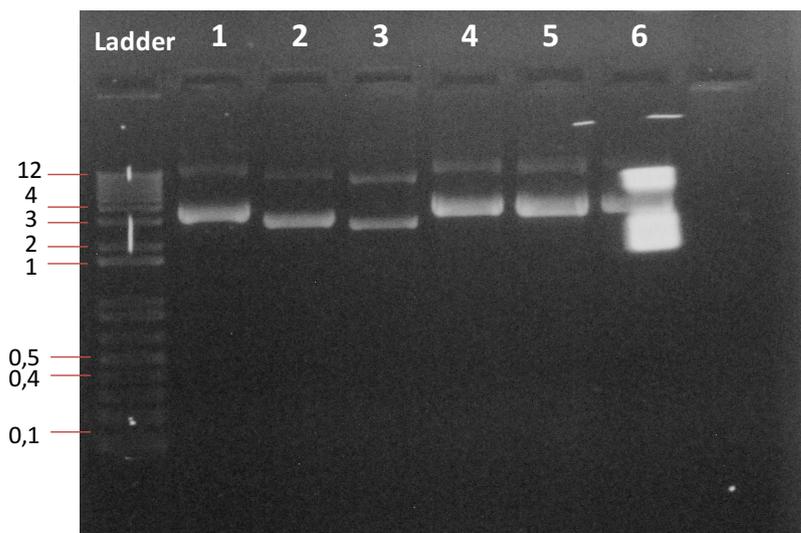


Figura 9-Análise de DNA dos vetores 2H1 por gel de agarose 1%.

Produto de ligação, transformação e minipreparação dos construtos 2H1 VH + pFUSE-CHIG-CH1F3 (poço 1), 2H1 VL+ pFUSE2-CLlg-mK (poço 2), 2H1 VH + pFUSE-CHIG-mG1 (poço 3), 2H1 VH + pFUSE-CHIG-CH1F1 (poço 4), 2H1 VH + pFUSE-CHIG-CH1F2 (poço 5) e 2H1 VH + pFUSE-CHIG-mG3 (poço 6). O marcador utilizado foi 1 kb plus DNA ladder (*Invitrogen*).

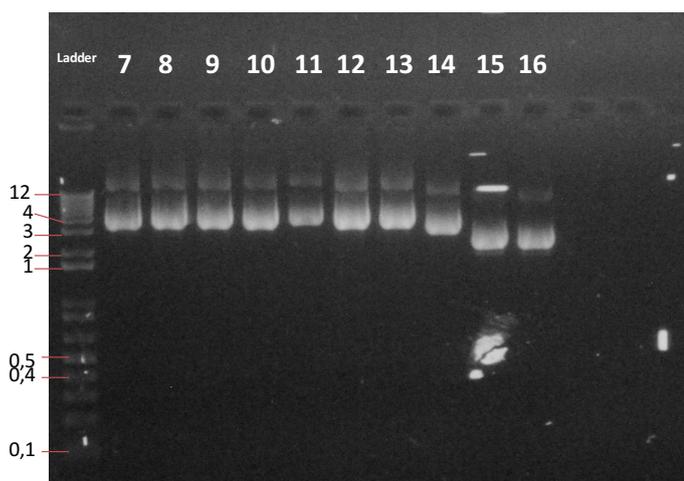


Figura 10-Análise de DNA de vetores 3E5 por gel de agarose 1%.

Produto de ligação, transformação e minipreparação dos construtos 3E5 VH + pFUSE-CHIG-CH1F2 (poço 7), 3E5 VH + pFUSE-CHIG-H de 2H1mG3 (poço 8), 3E5 VH + pFUSE-CHIG-CH1F3 (poço 9), 3E5 VH + pFUSE-CHIG- 2H1mG1 (poço 10), 3E5 VH + pFUSE-CHIG-H de mG1 (poço 11) e 3E5 VH + pFUSE-CHIG-CH1F1 (poço 12), 3E5 VH + pFUSE-CHIG-mG3 (poço 13), 3E5 VL pFUSE2-CLlg-mk (poço 14), 3E5 VH PUC57 (poço15) e 3E5 VL PUC 57 (poço 16). O marcador utilizado foi 1 kb plus DNA ladder (*Invitrogen*).

## 6.2 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS CHO DHFR-/- A BLASTICIDINA E ZEOCINA

O ensaio de sobrevivência das células CHO DHFR-/- à Blastidina e Zeocina foi realizado para verificar qual concentração era a mais adequada e eficiente para seleção de células CHO DHFR-/. Para isso, foi realizado um ensaio de MTT utilizando concentrações de 60 $\mu$ g/mL até 0,47  $\mu$ g/mL de Blastidina e de 50 $\mu$ g/mL até 4000 $\mu$ g/mL de Zeocina, para observar a sensibilidade destas células na presença desses antibióticos. Como podemos observar na (fig. 11), todas as concentrações de blastidina, exceto 0,46875 $\mu$ g/ml e 0,9375 $\mu$ g/ml diminuem a viabilidade das células CHO DHFR-/-, sendo a de 15  $\mu$ g/ml a menor concentração que se equipara ao controle positivo de morte (DMSO), indicando que nessa concentração as células não transfectadas são mais sensíveis à seleção positiva. Dessa forma, para seleção desses vetores utilizamos 20 $\mu$ g/mL, pois esta concentração poderia garantir uma seleção eficaz.

Já no ensaio com Zeocina podemos observar (fig.12) que valores acima de 62,5 $\mu$ g/mL se mostraram eficazes na seleção de CHO DHFR-/. Dessa forma, a quantidade mínima ideal para sua utilização é de 250 $\mu$ g/mL, pois esta é a menor concentração que se equipara ao controle positivo de morte (DMSO). A partir desse resultado utilizamos essa concentração.

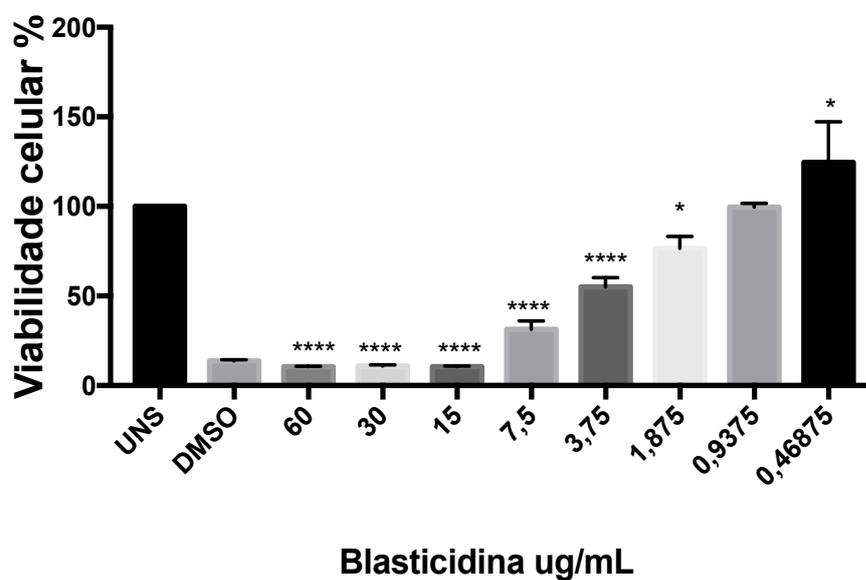


Figura 11-Ensaio de sobrevivência das células CHO DHFR-/- à Blastocidina.

Viabilidade celular de CHO DHFR-/- na presença de diferentes concentrações de Blastocidina por MTT. Sensibilidade analisada pelas médias dos percentuais de células vivas em relação as células não estimuladas com blastocidina (consideradas 100% vivas). UNS (Não estimulado) DMSO (dimentilsulfóxido- Controle positivo). Cada barra representa a média do percentual de células vivas  $\pm$  DP (n=3) e \* $p < 0,05$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  de significância. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, 540nm, e análise dos gráficos no Excel e Graph Pad Prisma (Anova).

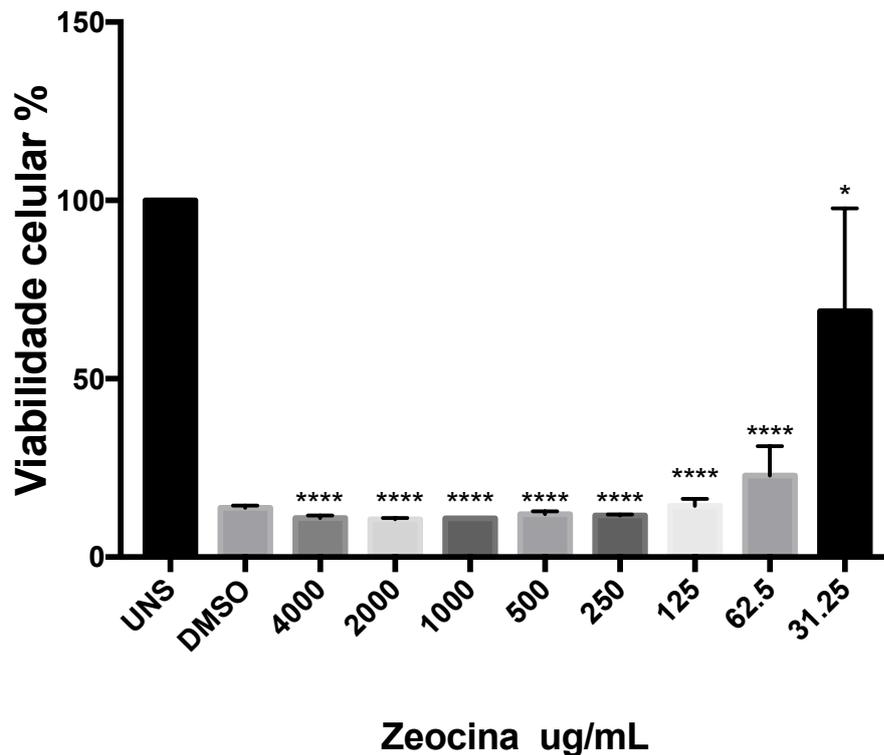


Figura 12- Ensaio de sobrevivência das células CHO DHFR-/- à Zeocina.

Viabilidade celular de CHO DHFR-/- na presença de diferentes concentrações de zeocina por MTT. Sensibilidade analisada pelas médias dos percentuais de células vivas em relação as células não estimuladas com zeocina (consideradas 100% vivas). UNS (Controle negativo) DMSO (dimentilsulfoxido- Controle positivo). Cada barra representa a média do percentual de células vivas  $\pm$  DP (n=3) e \* $p < 0,05$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  de significância. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, 540nm, e análise dos gráficos no Excel e Graph Pad Prisma (Anova).

### 6.3 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS CHO DHFR-/- COM HT (HIPOXANTINA/TIMIDINA)

O ensaio de sobrevivência das células CHO DHFR-/- com HT foi realizado para observar se na ausência de HT as células de fato sofreriam alguma resistência. Dessa forma, foi feito um teste de MTT para observar a viabilidade dessas células na presença de HT e na ausência deste. Podemos observar no gráfico que a ausência de HT diminuiu o crescimento celular de forma significativa (fig. 13), apesar de algumas células sobreviverem, indicando que a ausência de HT causa uma sensibilidade parcial nas células CHO DHFR-/-.

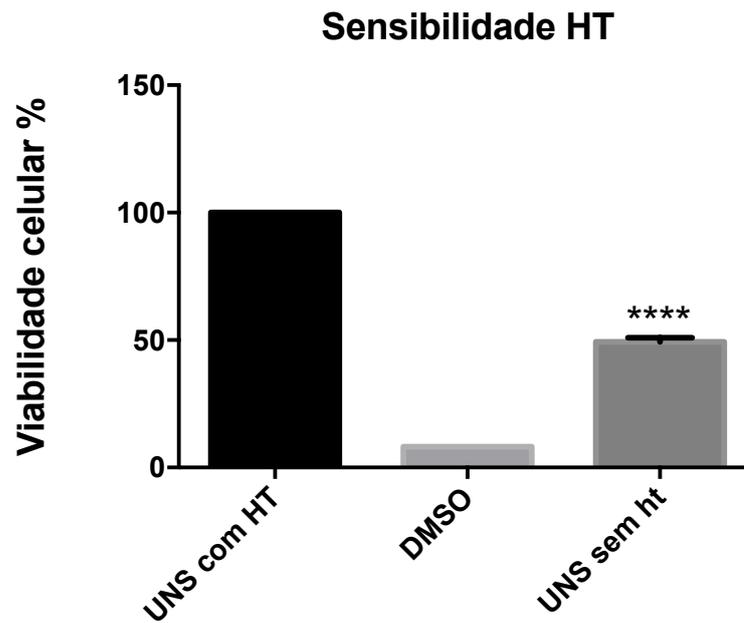


Figura 13- Ensaio de sobrevivência das células CHO DHFR-/- na presença e ausência de HT.

Viabilidade celular de CHO DHFR-/- na presença e ausência de HT por MTT. Sensibilidade analisada pelas médias dos percentuais de células vivas em relação as células estimuladas com HT (consideradas 100% vivas). HT (Hipoxantina e Timidina) DMSO (dimentilsulfoxido). Os valores foram comparativos de UNS sem hT com UNS com HT. Cada barra representa a média do percentual de células vivas  $\pm$  DP (n=3) e \*\*\*\*p < 0.0001 de significância. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, 540nm, e análise dos gráficos no *Excel* e *Graph Pad Prisma* (Anova).

#### 6.4 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA AO METOTREXATO DAS CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS

O ensaio de sobrevivência ao MTX foi realizado para observar se na presença as células transfectadas de fato sofreriam alguma resistência. A condição escolhida foi a da CHO DHFR -/- transfectada com 3E5 IgG3 com D de IgG1, selecionadas com Blastocidina, pois o crescimento dessa era semelhante ao das transfectadas com 2H1. Para este ensaio foram testadas concentrações de 10 nM até 1mM. Podemos observar (fig. 14), que a menor concentração em que a seleção por MTX foi significativa e não apresentou desvio padrão alto entre as análises foi a de 10 uM. A partir desse resultado, essa concentração passou a ser adotada para seleção e amplificação do sistema DHFR.

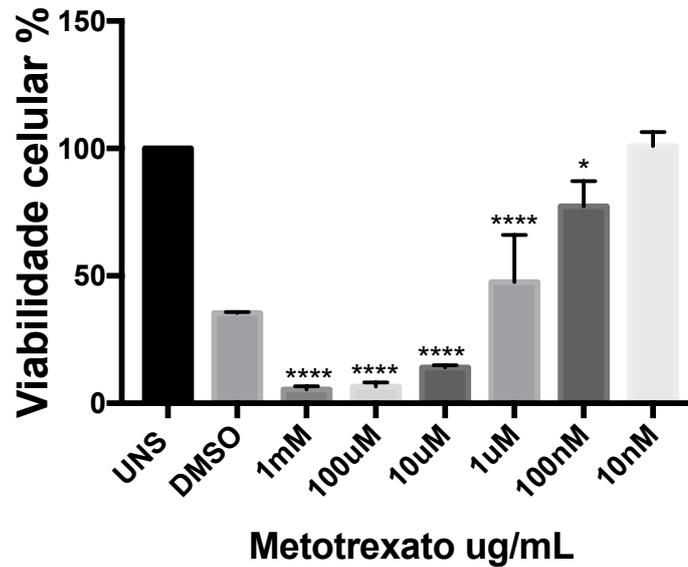


Figura 14-Ensaio de sobrevivência ao MTX com células transfectadas com 3E5 IgG3 com D de IgG1.

Viabilidade celular de 3E5 IgG3 com D de IgG1 na presença de diferentes concentrações de MTX por mTT. Sensibilidade analisada pelas médias dos percentuais de células vivas em relação as células não estimuladas com metotrexato (consideradas 100% vivas). UNS (Não estimulada) DMSO (dimentilsulfoxido- Controle positivo). Cada barra representa a média do percentual de células vivas  $\pm$  DP (n=3) e \*\*\*\*  $p < 0.0001$  de significância. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, 540nm, e análise dos gráficos no *Excel* e *Graph Pad Prisma* (Anova).

## 6.5 AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DOS ANTICORPOS 2H1 E 3E5

As produções dos anticorpos foram realizadas a partir da transfecção de células CHO DHFR<sup>-/-</sup>, e tendo sobrenadantes coletados antes da seleção com os antibióticos e metotrexato (as células foram cultivadas nessas circunstâncias por 3 dias). O sobrenadante colhido em *pool* foi proveniente do cultivo dos clones produtores dos sete anticorpos. Os anticorpos foram produzidos a partir da transfecção dos vetores recombinantes sendo eles: 2H1-CH1F1, 2H1-CH1F2, 2H1-CH1F3, 2H1-IgG3 com D de IgG1, 2H1-IgG1 com D de IgG3, 2H1mG1, 2h1mG3.

Os ensaios de quantificação realizados por ELISA (BARRETTE; URBONAS; SILBART, 2006) com os sobrenadantes obtidos mostraram que a produtividade de anticorpos variaram. Os clones inicialmente produziram uma quantidade de anticorpos de  $\sim 0,2\mu\text{g/mL}$  a  $4\mu\text{g/mL}$  (fig. 15). Após 3 dias de transfecção a produção foi mantida nesses valores. Contudo, após 15 dias de cultivo a produção diminuiu, variando de

~0,2 a 0,4 $\mu$ g/mL. Após a seleção (Blasticidina a 20 $\mu$ g/mL e MTX a 10 $\mu$ M) das células transfectadas foi observado um aumento, variando de ~0,5 $\mu$ g/mL a 1 $\mu$ g/mL, da produção de anticorpos para alguns transfectados (2H1 CH1F2, 2H1 CH1F3 e 2H1mG3). Já para os outros transfectados (2H1 CH1F1, 2H1 IgG3 com D de IgG1, 2H1 IgG1 com D de IgG3, 2H1 mG1) a produção foi mantida. Após a amplificação por MTX (~3 semanas), as células foram cultivadas (~8 dias) e apresentaram uma produtividade maior (~ 1,5 $\mu$ g/mL a 15 $\mu$ g/mL) de acordo com o aumento de dias de cultivo. Contudo, esse perfil não foi observado em todos os sobrenadantes coletados e quantificados durante a expansão clonal. Por fim, foi feito um escalonamento dessas transfecções cultivando 20 placas de cada anticorpo, gerando ao final de 300mL a 600mL de sobrenadante.

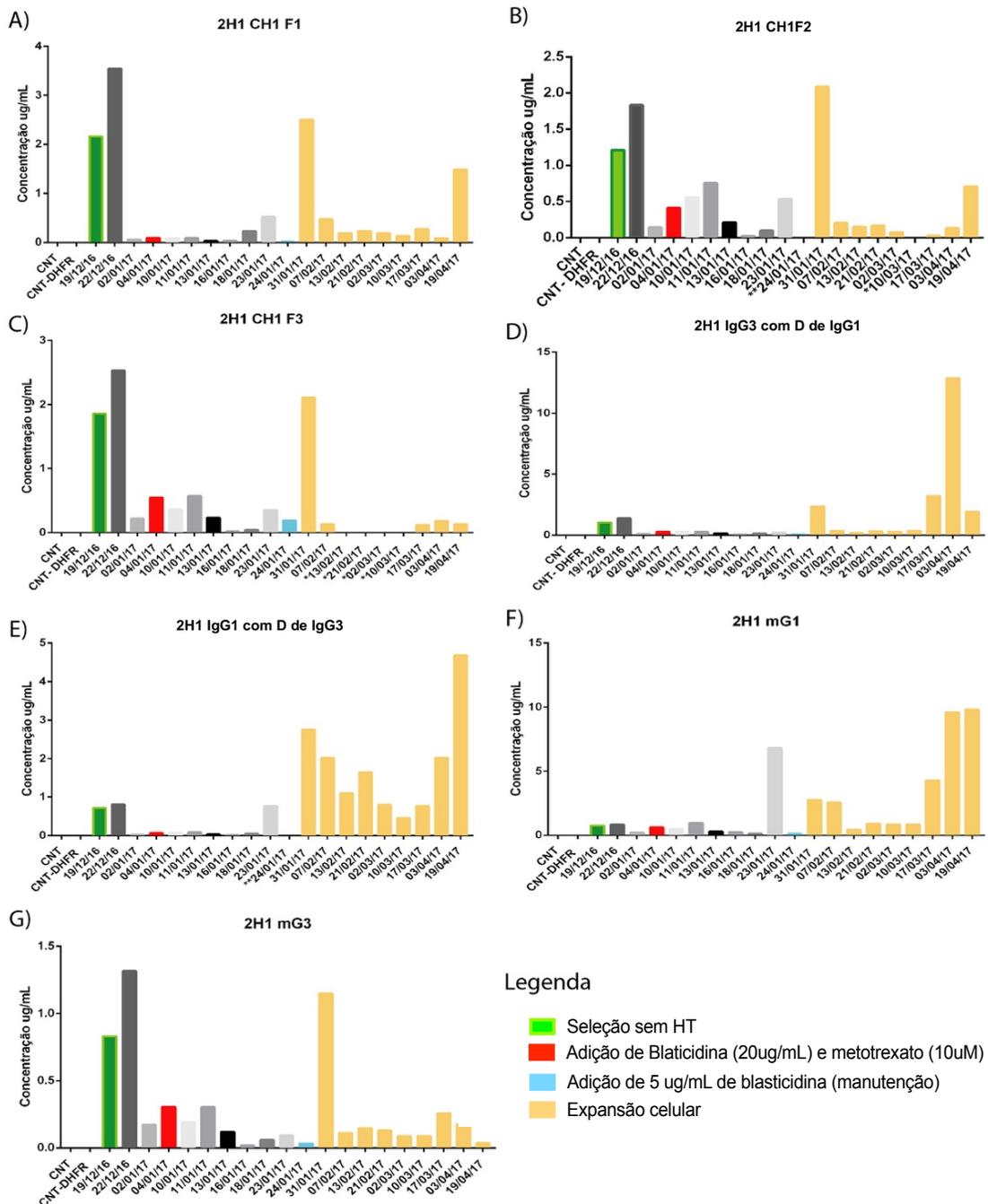


Figura 15-Ensaio de quantificação de anticorpos 2H1 por ELISA.

Quantificação de sobrenadantes dos transfectados 2H1 por Elisa-GXM. A) 2H1 CH1 F1, B) 2H1 CH1 F2, C) 2H1 CH1 F3, D) 2H1 IgG3 com D de IgG1, E) 2H1 IgG1 com D de IgG3, F) 2H1mG1 e G) 2H1mG3. CNT (células não transfectadas), CNT-DHFR (células transfectadas apenas com DHFR). As barras representam a média da quantidade de anticorpos produzidos em  $\mu\text{g/mL}$ . As datas se referem aos dias nos quais os sobrenadantes foram coletados. Leitura feita em 405nm em espectrofotômetro. Experimento realizados com um N=2. Análise dos dados feito no *Softmax* e gráficos feitos no programa estatístico *Graphpad Prisma 7*.

A transfecção de vetores 3E5 para a produção dos sete vetores, 3E5-CH1F1, 3E5-CH1F2, 3E5-CH1F3, 3E5-IgG3 com D de IgG1, 3E5-IgG1 com D IgG3, 3E5mG1

e 3E5mG3, foi realizada, contudo, foram obtidos apenas resultados iniciais. Essa transfecção de anticorpos foi feita da mesma forma descrita na transfecção dos vetores 2H1, exceto que foram testadas as condições de DHFR na proporção de 1:100 e também 1:1000 (DHFR: DNA total). A proporção 1:1000 foi testada para avaliar se uma quantidade menor do vetor DHFR afetaria a produtividade dos anticorpos. Os gráficos mostram (fig. 16) que a produção desses anticorpos variou de  $\sim 0,06\mu\text{g/mL}$  a  $2\mu\text{g/mL}$ , na condição de 1:100, ao passo que na condição 1:1000, variaram de  $\sim 0,05\mu\text{g/mL}$  a  $1,5\mu\text{g/mL}$ . Após a adição de Blasticidina e retirada de HT, a produção desses anticorpos variou de  $\sim 0,01\mu\text{g/mL}$  a  $1\mu\text{g/mL}$ , na condição de 1:100, ao passo que na condição 1:1000, variou de  $\sim 0,02\mu\text{g/mL}$  a  $0,06\mu\text{g/mL}$ . Pelo fato de o ensaio de imunofluorescência necessitar da produção de grandes quantidades de anticorpos e ainda do processo de concentração, esse trabalho permanece em desenvolvimento.

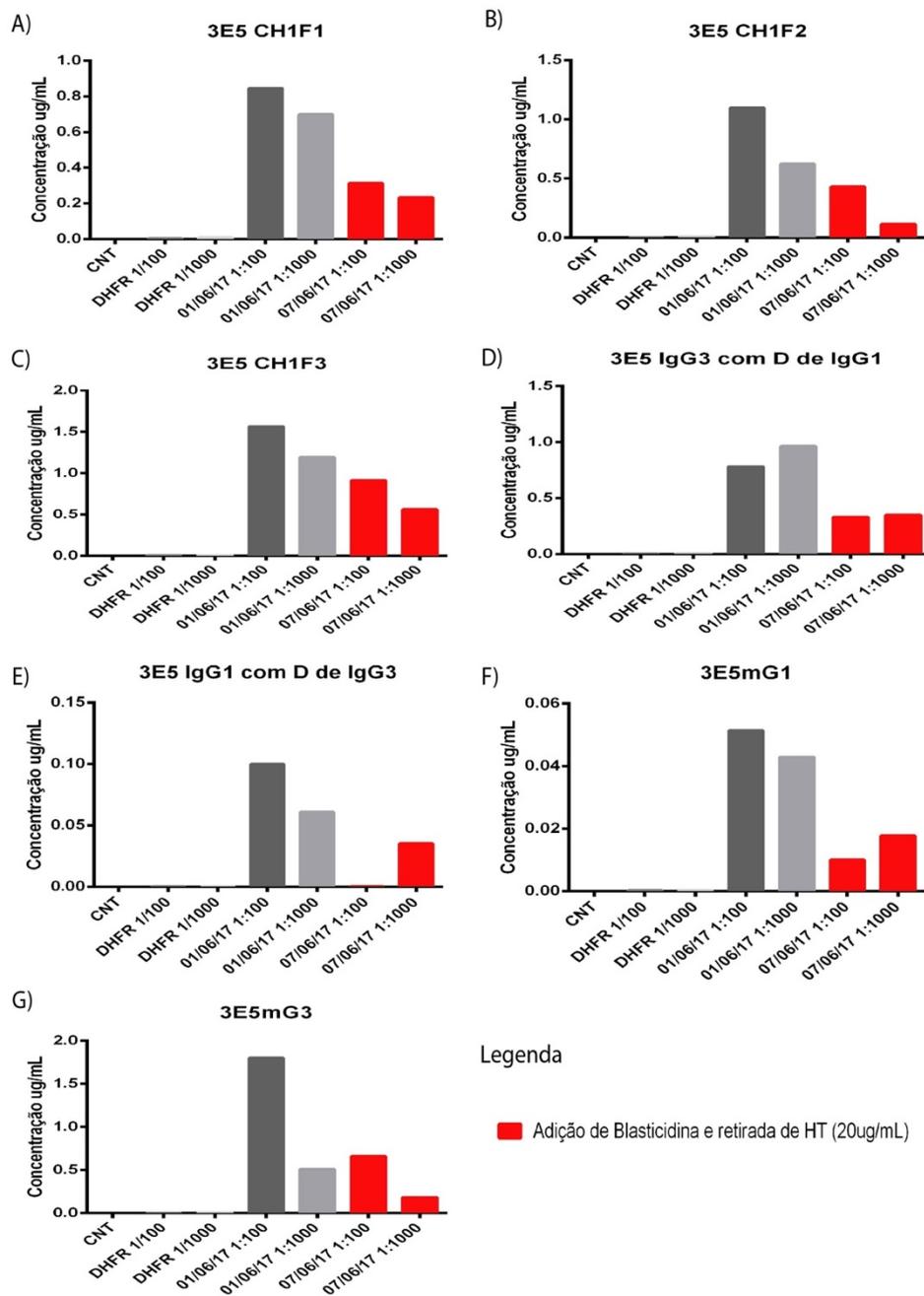


Figura 16-Ensaio de quantificação de anticorpos 3E5 por ELISA.

Quantificação de sobrenadantes de transfectados 3E5 por Elisa-GXM. A) 3E5 CH1F1, B) 3E5 CH1F2, C) 3E5 CH1F3, D) 3E5 IgG3 com D de IgG1, E) 3E5 IgG1 com D de IgG3, F) 3E5mG1 e G) 3E5mG3 CNT (células não transfectadas), CNT-DHFR (células transfectadas apenas com DHFR). As barras representam a média da quantidade de anticorpos produzidos em  $\mu\text{g/mL}$ . As datas se referem aos dias nos quais os sobrenadantes foram coletados. Leitura feita em 405nm em espectrofotômetro. Experimento realizados com um N=2. Análise dos dados feito no *Softmax* e gráficos feitos no programa estatístico *Graphpad Prisma 7*.

## 6.6 AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DOS ANTICORPOS 2H1 POR CÉLULAS HEK 293F

Concomitante a transfecção com as células CHO DHFR<sup>-/-</sup> foi realizada a transfecção com células HEK 293F. Essas células foram escolhidas por já serem células utilizadas para produção transiente de anticorpos em escala industrial (DE LOS MILAGROS BASSANI MOLINAS et al., 2014) e terem a característica de se adaptarem a um meio em suspensão e livre de SFB. A transfecção dessas células com os vetores recombinantes 2H1, resultou na produção dos seguintes anticorpos: 2H1-CH1F1, 2H1-CH1F2, 2H1-CH1F3, 2H1-IgG3 com D de IGG1, 2H1-IgG1 com D de IGG3, 2H1mG1 e 2H1 mG3. O sobrenadante referente a cada anticorpo foi coletado e apresentou concentração que variou de  $\sim 0,2 \mu\text{g/mL}$  a  $0,4 \mu\text{g/mL}$  (fig. 17). Os transfectados 2H1 mG1 e 2H1 mG3 tiveram sua viabilidade diminuída em 2 dias e, provavelmente por isso, apresentaram quantificação abaixo da curva de detecção. Dessa forma, não foi possível gerar o gráfico de produção desses anticorpos. Como a produtividade das demais transfecções foi mais baixa que a produtividade das células CHO DHFR<sup>-/-</sup>, nós optamos por descontinuar com o uso dessa linhagem celular.

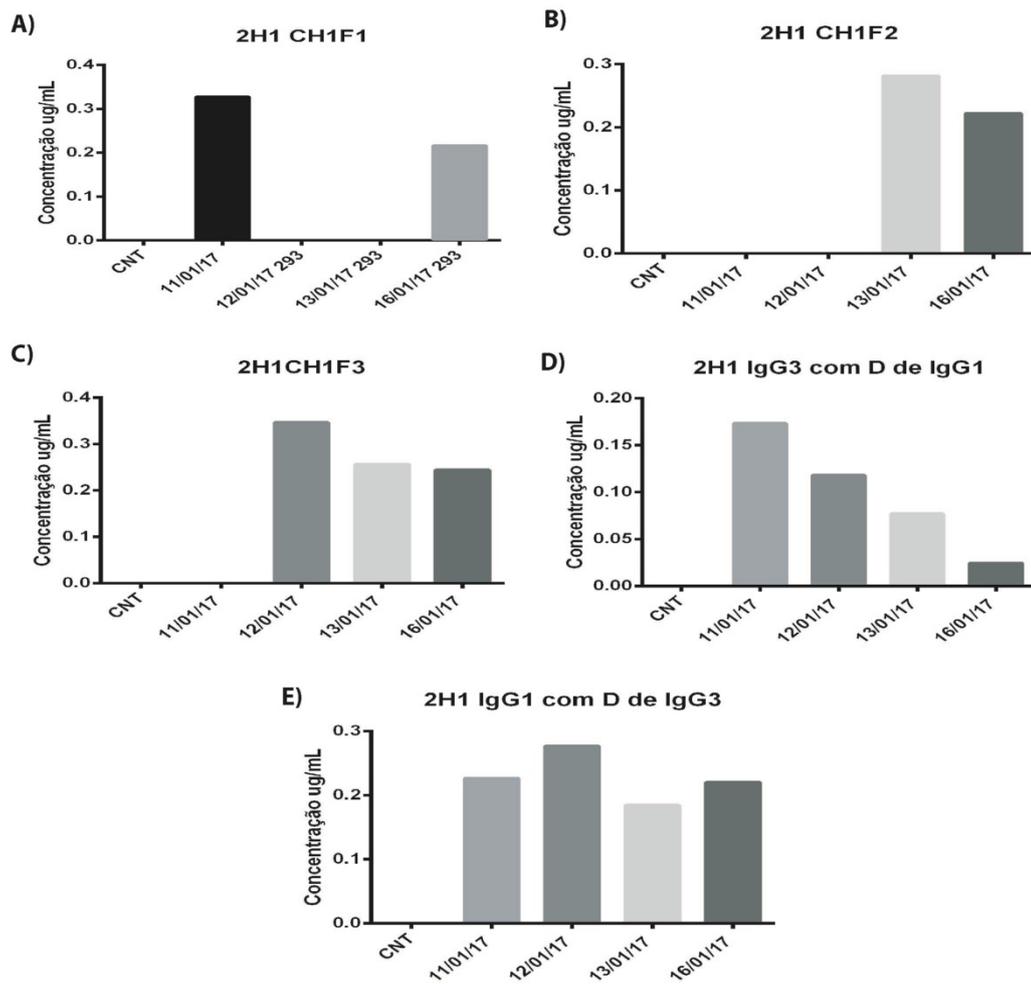


Figura 17-Transfecção de células HEK293F com vetores 2H1.

Quantificação de sobrenadantes de clones 3E5 por Elisa-GXM. A) 2H1 CH1F1, B) 2H1 CH1F2, C) 2H1F3 CH1F3, D) 2H1 IgG3 com D de IgG1, E) 2H1 IgG1 com D de IgG3. CNT (células não transfectadas). As barras representam a média da quantidade de anticorpos produzidos em  $\mu\text{g/mL}$ . As datas se referem aos dias nos quais os sobrenadantes foram coletados. Leitura feita em 405nm em espectrofotômetro. Experimento realizados com um N=2. Análise dos dados feito no *Softmax* e gráficos feitos no programa estatístico *Graphpad Prisma 7*.

## 6.7 ENSAIO DE DILUIÇÃO LIMITANTE

O ensaio de diluição limitante foi realizado no intuito de isolar as células mais produtivas de anticorpos, das células menos ou não produtivas, e a partir daí escalonar sua produção e tentativamente obter uma expressão estável. Devido o anticorpo 2H1mG3 ser necessário para vários experimentos do grupo e, ainda, devido a limitação em produzi-lo em altas concentrações em ensaios em *pool*, o vetor que já se apresentava transfectado em CHO DHFR<sup>-/-</sup> foi o escolhido para ser produzido em

pelo método de diluição limitante. Dessa forma, foram obtidos 60 clones e os mesmos tiveram seus sobrenadantes quantificados por ELISA indireto. A quantificação foi feita em sobrenadantes não diluídos, diluídos 1/10 e 1/100. Os gráficos mostram que a produção desses clones foi de no máximo  $\sim 0,4 \mu\text{g/mL}$ , ou seja, menor que a produção pelo *pool* de células (fig.18). Dessa maneira, o cultivo dos clones foi descontinuado.



Figura 18-Diluição limitante do anticorpo 2H1mG3.

Quantificação de sobrenadantes de clones de diluição limitante de 2H1mG3 por Elisa-GXM. Os números indicam cada clone. As barras indicam a quantidade de anticorpo produzida em  $\mu\text{g/mL}$ . Experimento realizado N=1. Leitura feita em 405nm em espectrofotômetro. Análise dos dados feito no *Softmax* e gráficos feitos no programa estatístico *Graphpad Prisma 7*.

## 6.8 QUANTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS 2H1 CONCENTRADOS

Essa etapa foi realizada para obter a quantidade máxima de anticorpo no menor volume de sobrenadante possível, uma vez que era necessário realizar os ensaios de imunofluorescência e fagocitose a pelo menos  $10 \mu\text{g/mL}$  para cada condição. Apesar das amostras conterem SFB em seu sobrenadante, o que impossibilitou a sua purificação, quantificação por métodos espectrofotométricos e avaliação por Eletroforese em gel de poliácridamida com SDS (SDS-PAGE), as concentrações dos anticorpos realizadas no sistema *Amicon® Stirred Cells (Millipore)* foram consideradas satisfatórias para a maioria dos anticorpos. Os anticorpos apresentaram concentração final variável ( $\sim 2,5 \mu\text{g/mL}$  a  $65 \mu\text{g/mL}$ ) após o procedimento (fig.19 e tabela 2), e sua

quantificação foi baseada na diluição 1/100, uma vez que as diluições menores apresentaram valores de densidade óptica saturados. Como foi considerada a possibilidade de perda dos anticorpos pelo método, a quantificação da amostra não concentrada e do fluido também foi avaliada para cada anticorpo. A perda pelo sistema de concentração foi considerada insignificante.

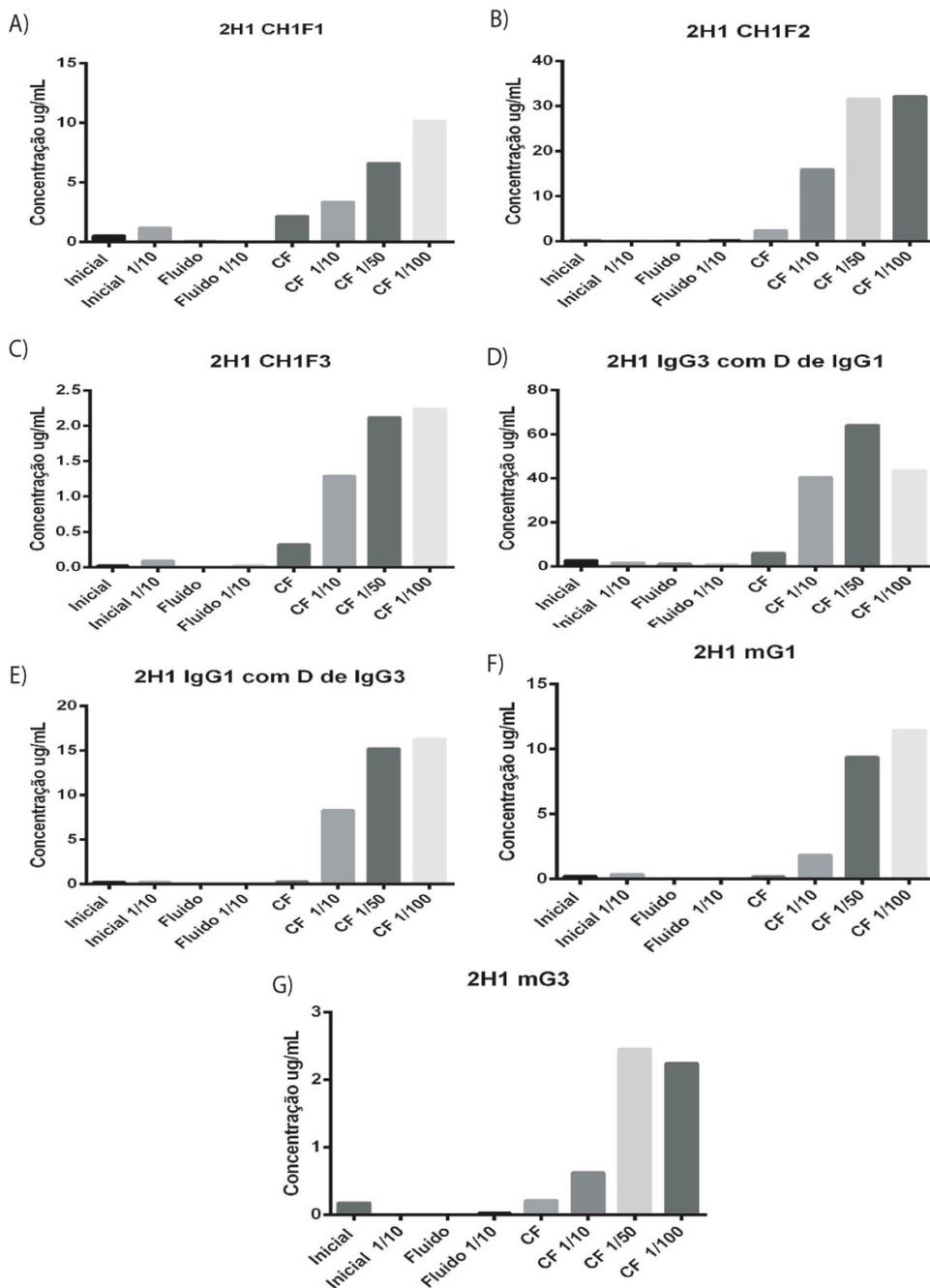


Figura 19-Quantificação de anticorpos concentrados mensuradas por ELISA.

Quantificação de sobrenadantes de concentrados 2H1 por Elisa-GXM. A) 2H1 CH1F1, B) 2H1 CH1F2, C) 2H1 CH1F3, D) 2H1 IgG3 com D de IgG1, E) 2H1 IgG1 com D de IgG3, F) 2H1mG1 e G) 2H1mG3. Inicial (sobrenadante antes da concentração), Fluido (amostra descartada após concentração), CF (Concentrado Filtrado), CF 1/10 (Concentrado Filtrado diluído 10 vezes), CF 1/50 (Concentrado Filtrado diluído 50 vezes) e CF 1/100 (Concentrado Filtrado diluído 100 vezes). As barras representam a média da quantidade de anticorpos produzida. Experimento realizado com N=2. Leitura feita em 405nm em espectrofotômetro. Análise dos dados feito no *Softmax* e gráficos feitos no programa estatístico *Graphpad Prisma Anova*.

Nome	Concentração (µg/mL)
2H1 CH1 F1	10,15
2H1 CH1 F2	32,15
2H1 CH1 F3	2,64
2H1 IgG3 com D de IgG1	64,11
2H1 IgG1 com D de IgG3	16,31
2H1 IgG1	11,43
2H1 IgG3	2,45

Tabela 2-Quantificação de anticorpos concentrados 2H1 por ELISA-GXM.

## 6.9 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

O ensaio de imunofluorescência foi realizado para avaliar a ligação dos sete anticorpos 2H1 à GXM de *C. neoformans* (H99) e, mais especificamente, para avaliar qual a região (CH1 ou dobradiça) dos anticorpos IgG1 e IgG3 era responsável por alterar o padrão de ligação ao antígeno. Os resultados mostraram que 2H1CH1F1, 2H1CH1F2, 2H1CH1F3, 2H1mG3 parecem apresentar padrões puntiformes de ligação, se comparados aos seus respectivos controles (2H1 IgG3, 3E5 IgG3 e 13F1), como era esperado para anticorpos IgG3 não híbridos (fig. 20 e tabela 2). Já os anticorpos 2H1 IgG3 com D de IgG1, 2H1 IgG1 com D de IgG3 e 2H1 mG1 parecem apresentar padrão de ligação anular, se comparados aos seus respectivos controles (2H1 IgG1, 3E52a e 12A1), como era esperado para anticorpos IgG1 não híbridos (figura 18 e tabela 3). A prova de conceito desse experimento era que se a região CH1 e de dobradiça fossem importantes em influenciar a ligação ao antígeno, ao trocar essas regiões de IgG3 pelas regiões de IgG1, o anticorpo que antes era apenas IgG3 (e apresentava padrão de ligação puntiforme) seria capaz de assumir o padrão de ligação anular de IgG1. É provável que essa troca de padrão de ligação tenha acontecido com o 2H1 IgG3 com D de IgG1. O mesmo canal de fluorescência e tempo de exposição usado para captar as imagens das amostras e controles positivos, foram também usados para os controles negativos (anticorpos secundários incubados com o fungo e do fungo não incubado com anticorpo) e ambos os controles validaram o ensaio.

CONTROLES EXPERIMENTAIS		ANTICORPOS	
Nome	Padrão IFI	Nome	Padrão IFI
2H1 IgG3	Puntiforme	2H1 CH1 F1	Puntiforme
2H1 IgG1	Anular	2H1 CH1 F2	Puntiforme
3E5 IgG3	Puntiforme	2H1 CH1 F3	Puntiforme
3E5 2a	Anular	2H1 IgG3 com D de IgG1	Anular
13F1 (IgM)	Puntiforme	2H1 IgG1 com D de IgG3	Anular
12A1 (IgM)	Anular	2H1 IgG1	Anular
		2H1 IgG3	Puntiforme

Tabela 3-Descrição do padrão de ligação observados em ensaio de IFI.

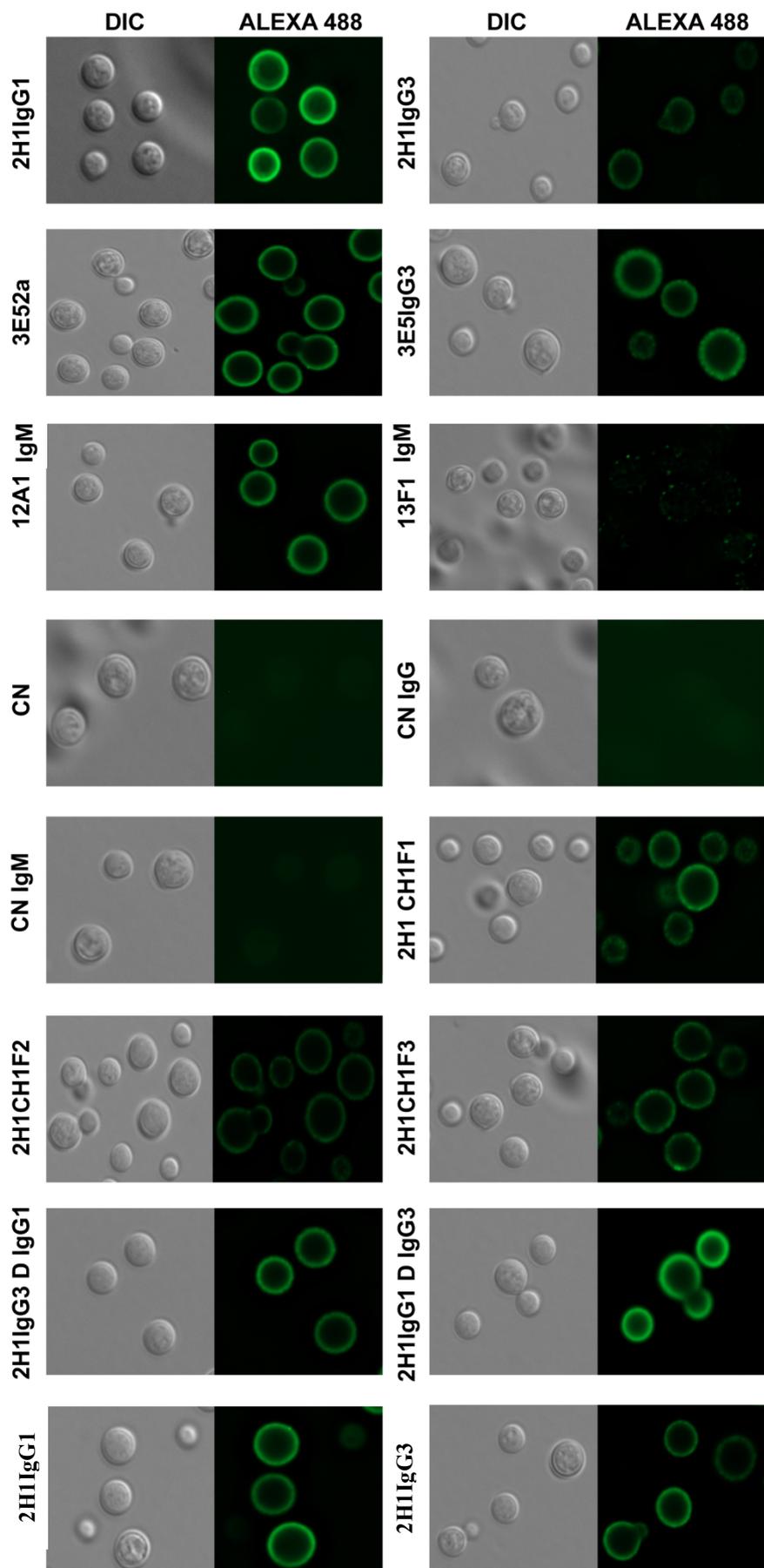


Figura 20-Ensaio de IFI com anticorpos 2H1.

Imagens de microscopia de epifluorescência obtidas pelo Zeiss Axio Observer Z1 nas objetivas de 63X (NA 1,4). Avaliação do padrão de ligação dos anticorpos à cápsula de *C. neoformans* H99 (sorotipo A). As figuras foram obtidas analisando o campo claro por DIC e IFI. O teste foi realizado para avaliar o padrão de ligação dos anticorpos recombinantes 2H1 CH1F1, 2H1CH1F2, 2H1CH1F3, 2H1 IgG3 com D de IgG1, 2H1 IgG1 com D de IgG3, 2H1mG1 e 2H1mg3 e os mesmos foram validado pelo controle positivo de padrão de ligação anular (2H1 IgG1, 3E52a e 12A1) e puntiforme (2H1 IgG3, 3E5IgG3 e 13F1) e controle negativo de ligação à GXM (CN-Control negativo, CN-IgM Controle Negativo IgM e CN-IgM- Controle negativo IgG). Foi realizada deconvolução para evidenciar melhor a diferença entre o padrão de ligação das amostras testadas. As condições de transfecção dos clones foram descritas anteriormente. A concentração utilizada de cada anticorpo variou de 2,5 µg/mL a 10 µg/mL. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG murina conjugada a *Alexa Fluor*<sup>®</sup> 488 (*ThermoFisher Scientific*).

## 6.10 ENSAIO DE FAGOCITOSE COM ANTICORPOS 2H1

Para confirmar se os anticorpos 2H1 produzidos eram funcionais, ou seja, se os mesmos eram capazes de se ligar ao antígeno e ao receptor celular e mediar resposta celular, foi avaliada a porcentagem de fagocitose de *C. neoformans* (opsonizados com os anticorpos 2H1) por macrófagos. O ensaio foi realizado com os anticorpos 2H1 CH1F1, 2H1CH1F2, 2H1 IgG3 com D de IgG1, 2H1 IgG1 com D de IgG3 e 2H1 mG1. Já os anticorpos 2H1 CH1F3 e 2H1 mG3, não apresentaram quantidade suficiente para serem incluídos no ensaio. Os resultados encontrados mostraram que 2H1 CH1F1, 2H1 CHF2 não induziram fagocitose significativa (~10% e 17%, respectivamente). Ao passo que 2H1 IgG3 com D de IgG1, 2H1 IgG1 com D de IgG3 e 2H1mG1 induziram porcentagem de fagocitose significativa (~40%, 40% e 80%, respectivamente) (fig. 21 e figura 22). Foram utilizados 2H1 IgG1, 2H1 IgG3, 3E52a, 3E5 IgG3 e células não estimuladas (não incubadas com anticorpo) como controle para o experimento. O ensaio foi realizado em duplicata e foram utilizados 10µg/mL de anticorpos para opsonização.

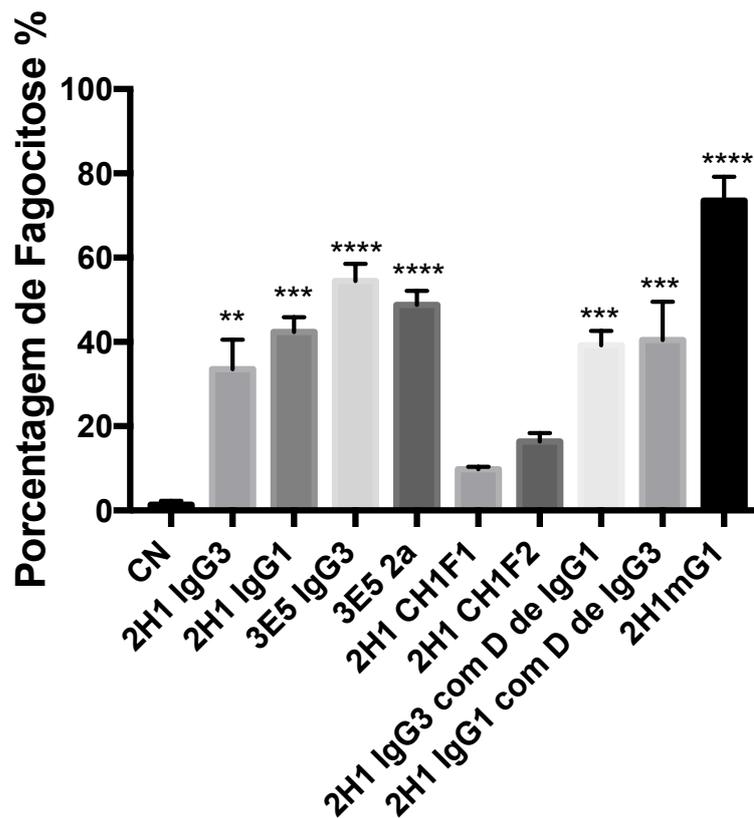


Figura 21-Porcentagem de fagocitose de *C. Neoformans* opsonizado com anticorpos 2H1.

Ensaio de fagocitose observado por microscópio. Para o cálculo foram escolhidos três campos diferentes de cada imagem, contando 100 células J774. O ensaio foi realizado em duplicata (N2). O número de células com *C. neoformans* H99 (sorotipo A) internalizados foi dividido pelo número total de macrófagos (100) para obter a porcentagem. Cada barra representa a média do percentual de células com fungos fagocitados  $\pm$  DP (n=2) e\*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 e \*\*\*\* p < 0.0001 de significância. Análise dos gráficos no *Graph Pad Prima* (anova).

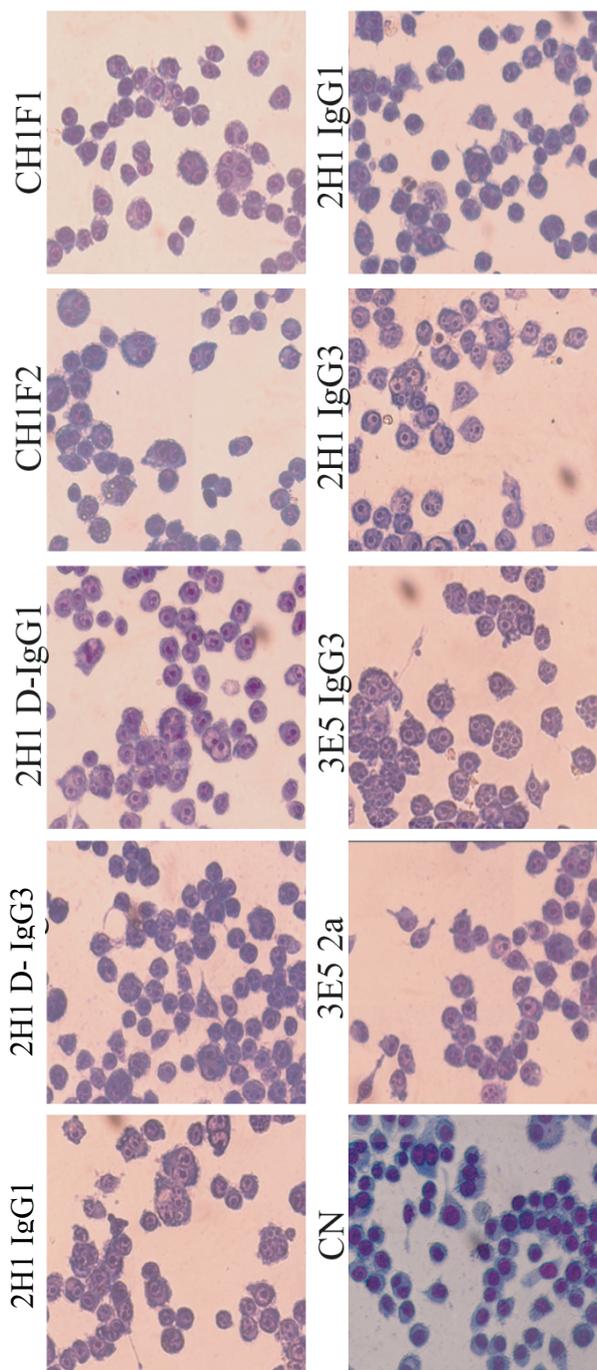


Figura 22-Imagem de microscopia fagocitose de *C. neoformans* opsonizados por anticorpos 2H1.

Imagens de microscopia representativas do cálculo de porcentagem de fagocitose de *C. neoformans* em ensaio com anticorpos 2H1 e controles. CN (controle negativo).

## 7. DISCUSSÃO

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo, que é realizado em conjunto com o grupo do Dr. Arturo Casadevall, nos Estados Unidos. Esse grupo estuda há mais de duas décadas as interações de novos mAbs com a cápsula de *Cryptococcus neoformans*, visando a obtenção de terapias mais eficazes contra o fungo. Nesse intuito, diversos estudos foram realizados, mostrando de forma concisa que mAbs de região variável idêntica e isotipos diferentes apresentam mudanças na especificidade de ligação a GXM, e esse dado é correlacionado a uma resposta protetora ou agravante de doença em camundongos (MUKHERJEE et al., 1995; YUAN et al., 1995) (DROMER et al., 1987) (MUKHERJEE et al., 1994b).

Trabalhando nessa linha de pesquisa e visando consolidar essas investigações, estudos foram realizados por integrantes do nosso grupo de pesquisa. Eles produziram anticorpos com o mesmo gene variável do hibroma 2H1 e de diferentes isotipos (IgG1 e IgG3) e demonstraram por ensaios de imunofluorescência diferenças no padrão de ligação dos anticorpos à GXM, observando padrões puntiformes (IgG3) e anulares (IgG1) (DF, 2016). Contudo, as regiões responsáveis por essas diferenças ainda não estão bem esclarecidas.

A fim de entender quais mecanismos moleculares são responsáveis pela diferença na ligação do anticorpo ao antígeno, foram produzidos mAbs 2H1 IgG3 com trocas do domínio CH1 e da região de dobradiça para sequências de 2H1 IgG1 que denominamos de “Anticorpos Híbridos”. Nossa hipótese se baseia no fato de que regiões constantes podem estar interferindo na região variável, de forma a alterar sua especificidade. Para isso, esse projeto se fundamenta no entendimento de que a provável porção responsável por essa alteração nesse padrão de ligação seria CH1 e/ou dobradiça, já que estas são as regiões mais próximas à região variável, podendo assim transferir novas alterações para essa porção (JANDA et al., 2012).

A produção dos anticorpos 2H1 IgG1 e IgG3 híbridos foi realizada por sistema de expressão transiente (KUNERT; REINHART, 2016) (BIRCH; RACHER, 2006) e estável (LI et al., 2010) (CHUSAINOW et al., 2009). Os plasmídeos contendo o DNA de interesse podem ser inseridos nas células por diversas formas, podendo estes se manter dentro da célula por alguns dias (transiente) ou permanecer integrado ao genoma da célula, se replicando de forma continuada junto com a replicação do

genoma celular original (estável) (FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013) (KIM; EBERWINE, 2010) (GOPALT, 1985). A produção transiente pode gerar grandes quantidades de anticorpos de forma rápida. Por outro lado, a produção estável, apesar de depender de maior gasto de tempo (VORONINA et al., 2016) e materiais para que se consiga uma quantidade maior de anticorpos, apresenta benefícios como manter uma produção a longo prazo de forma eficiente (TO et al., 1995). Para a produção dos anticorpos desse projeto foi utilizado o sistema de expressão transiente e tentativamente o de expressão estável, o que justifica a obtenção de uma produtividade variável e relativamente baixa em culturas mantidas a longo prazo. Para que uma expressão estável seja obtida, um dos primeiros passos é fazer a Diluição Limitante para isolar os clones mais produtores, dos poucos ou não produtores. Isso foi realizado utilizando a transfecção do vetor contendo a sequência de 2H1 mG3, mas nenhum clone com produtividade considerável foi obtido. Essa baixa produtividade pode ser justificada pelo fato do experimento ter sido realizado após as células terem sido adaptadas ao processo de seleção. Dessa forma, considerando a dificuldade de obtenção de clones isolados, o tempo hábil para realizar o projeto e que a produtividade por expressão transiente se mostrou suficiente para realizar os ensaios propostos, este tipo de expressão foi aderido (SPADIUT et al., 2014).

Apesar de ter sido testada a produção dos anticorpos em células de Rim de Embrião Humano (HEK 293F/ ATCC® CRL-1573™), as células que apresentaram maior eficiência na produção dos anticorpos híbridos foram as células de Ovário de Hamster Chinês Dihidrofolato negativas (CHO DHFR-/-). A linhagem HEK 293F foi escolhida por ser uma célula amplamente utilizada para expressão de proteínas recombinantes, de fácil manutenção e produção (THOMAS; SMART, 2005), além disso cresce em suspensão, em meio livre de soro fetal bovino podendo assim facilitar a maior produção e purificação de anticorpos. Contudo, a transfecção realizada nestas resultou em uma pequena produtividade de anticorpos (DALTON; BARTON, 2014), que costuma ser de centenas de miligramas, podendo ser justificada pelo fato de se tratar de uma expressão transiente ou por baixa eficiência na transfecção (GEISSE; VOEDISCH, 2012) (TOWNSEND-NICHOLSON, 1997) (KING, 1998).

As células CHO DHFR-/- foram escolhidas por serem utilizadas com frequência para produzir eficientemente anticorpos monoclonais, por possuírem alta eficiência de clonagem e produção de anticorpos e proliferação em grande escala de cultura (CHEN et al., 2012) (BAI et al., 2003) (FAN et al., 2012). Os níveis de produção de anticorpos

podem variar de 20 a 110 pg/célula/dia e são alcançados quando as células são cultivadas em biorreatores ou fermentadores para obtenção de alta densidade celular (REFF, 1993; TRILL; SHATZMAN; GANGULY, 1995; WOOD et al., 1990) (AKIYOSHI et al., 2005). O sistema de expressão estável por célula CHO é comumente usado pelas indústrias sendo modulado pelo gene DHFR. Esse gene codifica para a enzima diidrofolato redutase, que é responsável por catalisar a conversão de diidrofolato em tetraidrofolato, precursores das purinas, pirimidinas e glicina. O vetor contendo o gene DHFR é transfectado, juntamente com o vetor que codifica para o gene do anticorpo, em células CHO nocauteadas para DHFR, sendo estes integrados de forma aleatória. Este sistema de seleção negativa é utilizado com objetivo de selecionar apenas as células que tenham o gene DHFR integrado em seu genoma, e que, portanto, produzam a enzima DHFR, sendo capazes de sobreviver em meio ausente dos intermediários metabólicos (hipoxantina e timidina). Além disso, é utilizado um inibidor da enzima DHFR, o Metotrexato (MTX), que força a amplificação do gene DHFR e de forma conjunta os genes dos vetores de interesse (WANG et al., 2002). Com essa amplificação gênica é possível aumentar a produtividade de anticorpos nas células (KINGSTON et al., 2002) (ZHOU et al., 2010).

Como não havia protocolos predefinidos para o uso das células CHO DHFR<sup>-/-</sup> e para a produção de anticorpos nesse tipo celular, diversas condições para esse sistema tiveram de ser estabelecidas. Inicialmente, foi testado MTX na concentração de 10 nM a 1mM, contudo, somente a partir da concentração a 10 µM foi possível observar efeito significativo na seleção de DHFR, de acordo com o ensaio realizado de MTT. Por esse motivo, optamos por utilizar a concentração de 10µM no sistema DHFR. Porém, ensaios que confirmem a correlação entre a concentração de MTX ideal e o aumento da produtividade de anticorpos estão sendo realizados.

O ensaio de sensibilidade a ausência de HT evidenciou uma diminuição significativa na viabilidade celular, se comparado ao controle de células na presença de HT (controle considerado com 100% de viabilidade celular). Isso demonstra, que as células se apresentaram sensíveis a essa seleção negativa. Portanto, é provável que o alto crescimento celular inesperado, observado no início da seleção por HT, não tenha ocorrido por resistência celular. O que pode justificar esse crescimento é a eficiência da transfecção, uma vez que a eficiência da transfecção dos vetores 2H1 tenha se mostrado maior que a de 3E5.

Apesar das células CHO DHFR -/- após selecionadas ficarem confluentes rapidamente, a transfecção realizada não indicou uma produção tão acentuada como indicado pela literatura, que mostra uma produção de dezenas de miligramas (LUCAS et al., 1996) (WURM, 2004). Isso pode ser justificado pelo fato de estarmos trabalhando com um *pool* de células que é formado durante o processo de produção. Populações policlonais costumam gerar uma boa produtividade quando é utilizado um sistema de seleção eficiente. Contudo, quando se trabalha com *pool* de células policlonais essa produção tende a diminuir com o tempo (LAI; YANG; NG, 2013). Alguns anticorpos também, principalmente IgG3, não apresentaram boa produtividade. Uma possível explicação para isso é o fato de anticorpos IgG3 se apresentarem como crioglobulinas, sendo difíceis de recuperar e ainda de quantificar. Além disso, anticorpos IgG3 de camundongos apresentam uma propriedade de se agregar, formando pequenos complexos (GAVIN et al., 1998) (ABDELMOULA et al., 1989).

Um outro problema também enfrentado com as células CHO DHFR-/- foi a não adaptação dessas células no meio sem SFB o que dificultou a purificação e o processo de concentração (KUNERT; VORAUER-UHL, 2012).

Ainda, as células CHO foram selecionadas positivamente para os vetores de cadeia leve que continham o gene de resistência à Blastidina e aos vetores de cadeia pesada que continham o gene de resistência à Zeocina. No entanto, devido a dificuldades de custeio, a seleção foi iniciada com os dois antibióticos e posteriormente mantida apenas com Blastidina. Foi optado por manutenção com Blastidina uma vez que a concentração necessária para seleção celular (a 20 µg/mL) foi bem menor do que a de Zeocina (62.5 µg/mL).

Para investigar se o aumento da diluição do vetor DHFR pode estar relacionada a diferença na quantidade de produção de anticorpos, foi testada uma transfecção de 3E5 usando duas diluições dos vetores DHFR, sendo elas 1:100 e 1:1000. Esta hipótese se baseia no fato de que muito vetor DHFR dentro da célula pode acabar causando silenciamento de gene e mutações cromossômicas, pois como a incorporação do plasmídeo exógeno no genoma ocorre de forma aleatória, este pode potencialmente interromper importantes sequências endógenas ou interferir na transcrição de regiões silenciosas levando a imprevisíveis fenótipos e baixo rendimento de produção (BARRON; PISKAREVA; MUNIYAPPA, 2007; SUTTER et al., 2003). O trabalho com tais anticorpos ainda permanece em desenvolvimento.

Estudos levantam a hipótese que alteração nas regiões CH1 e região de dobradiça (JANDA et al., 2012) de anticorpos monoclonais podem ocasionar uma mudança de afinidade e especificidade ao antígeno (TUDOR et al., 2012) (PRITSCH et al., 1996) (ADACHI et al., 2003) (CRESPILLO et al., 2014). Na tentativa de compreender se essas regiões são responsáveis por alterar a ligação ao antígeno, foram realizadas trocas das regiões CH1 e dobradiças de genes que codificam o anticorpo 2H1 IgG3 para genes que codificam o anticorpo 2H1 IgG1. A transfecção desses vetores resultou na produção de sete anticorpos que apresentaram diferentes padrões de ligação ao antígeno por imunofluorescência. O esperado era que se uma das cinco trocas (2H1CH1F1, 2H1CH1F2, 2H1CH1F3, 2H1 IgG3 com D de IgG1, 2H1 IgG1 com D de IgG3) fosse responsável por alterar a ligação do anticorpo ao antígeno, que o padrão de fluorescência seria trocado de puntiforme para anular (no caso de 2H1CH1F1, 2H1CH1F2, 2H1CH1F3, 2H1 IgG3 com D de IgG1) e de anular para puntiforme (2H1 IgG1 com D de IgG3). Tendo em vista essa interpretação, o único anticorpo híbrido que pareceu trocar de padrão de imunofluorescência, foi o 2H1 IgG3 com D de IgG1. Apesar do anticorpo não ter apresentado um padrão não muito bem definido, ele mais se assemelha ao padrão anular observado pelos controles positivos (2H1 IgG1 e 12A1). Ainda a imagem antes de ter sido deconvoluída, apresentou padrão anular bem definido, como era apresentado na literatura, onde as imagens não foram processadas. Para discutir a obtenção desse padrão indefinido, torna-se válido ressaltar que os anticorpos 2H1 foram quantificados com base na curva padrão de IgG3 gerada por 3E5 e de IgG1 gerada por 18B7, respectivamente (CASADEVALL et al., 1998). Neste caso, apesar de estar quantificando anticorpos pelo reconhecimento em comum ao GXM, há diferença de afinidade entre 2H1 e os padrões 3E5 e 18B7. Ainda, se o objetivo é avaliar a alteração do padrão de ligação dos anticorpos 2H1 ao GXM, quando uma região é trocada de um anticorpo para outro é provável que haja mudança na especificidade e/ou afinidade. Para isso, o ideal para quantificar os anticorpos híbridos seria utilizar ELISA de captura e anticorpos padrão comerciais IgG1 e IgG3. Portanto, é provável que a dobradiça do anticorpo IgG1 seja uma das responsáveis por alterar esses padrões de ligações e possivelmente a resposta protetora no hospedeiro. O fato da D de IgG3 não alterar o padrão de ligação do anticorpo IgG1 indica que não é apenas a D a responsável por essa alteração de padrão, tendo que ser investigado mais regiões do anticorpo em associação ou em separado para concluir tal afirmação. Essas informações corroboram com estudos

mostrando que a D de anticorpos com mesmo isotipo altera a função do anticorpo e possivelmente seu padrão de ligação a antígenos (JANDA et al., 2016) (DESJARLAIS; LAZAR, 2011; TORRES; CASADEVALL, 2008) (MORITZ; STRACKE, 2017) (MORITZ; STRACKE, 2017). Vale reforçar que essa é a hipótese do grupo e que esses dados apenas serão esclarecidos após a quantificação pela forma mencionada.

O ensaio de fagocitose revelou funcionalidade dos anticorpos 2H1CH1F1, 2H1CH1F2, 2H1 IgG3 com D de IgG1, 2H1 IgG1 com D de IgG3 e 2H1mG1, como esperado. No entanto, vale ressaltar que o 2H1CH1F1 e 2H1CH1F2 apresentaram baixa porcentagem de fagocitose, com valores bem próximos a condição sem anticorpo (macrófagos incubados com fungo não opsonizados por anticorpos). Enquanto, 2H1 IgG3 com D de IgG1 apresentou porcentagem de fagocitose semelhante à do anticorpo 2H1 IgG1 com D de IgG3 que é IgG1, corroborando com estudos da literatura que mostram que a relação de fagocitose  $IgG2b > IgG1 > IgG3$  (YUAN et al., 1998). É possível que esses resultados tenham sido reflexos da alteração das regiões CH1 e de dobradiça. Estudos já demonstraram também que anticorpos de mesmos isotipos IgG1 e IgG3 podem interagir com receptores diferentes em células fagocíticas (SAYLOR; DADACHOVA; CASADEVALL, 2010). Uma outra possível explicação para essas alterações no padrão de fagocitose são modificações pós-traducionais que parecem ter função importante na efetividade dos anticorpos. Uma das possíveis causas que levam a essa alteração é a glicosilação diferencial que podem ocorrer nesses mAbs produzidos. As variações pós-traducionais dos anticorpos podem alterar sua interação com cada receptor (ZHENG; BANTOG; BAYER, 2011).

## 8. CONCLUSÃO

Podemos observar que apesar da indústria de biofarmacêutica ter diversos mAbs em desenvolvimento, poucos deles de fato estão disponíveis para serem utilizados no mercado para o tratamento da criptococose. Nós mostramos nesse trabalho a produção de quatorze anticorpos monoclonais recombinantes, 2H1 e 3E5, por meio do uso de células CHO DHFR<sup>-/-</sup>, quantificando por meio de ELISA indireto.

O ensaio de imunofluorescência demonstrou que a possível região que pode atuar, mas não somente, na mudança do padrão de ligação à GXM da cápsula de *C. Neoformans* é a dobradiça do anticorpo 2H1 IgG1. Este parece apresentar um padrão de ligação anular a GMX. Isso reafirma a informação de que de fato a região constante dos anticorpos é capaz de alterar a região variável. Contudo, para confirmar tal informação, mais experimento tanto *in vitro* como *in vivo* devem ser realizados. Da mesma maneira, o ensaio de fagocitose demonstrou que as D dos anticorpos 2H1 IgG1 com D de IgG3 e 2H1 IgG3 com D de IgG1 apresentaram uma maior opsonização de *C. neorformans* e sua fagocitose por células J774.1 (macrófagos), se comparada aos demais anticorpos testados.

Esses achados fornecem mais ferramentas para o incremento de terapias mais eficazes e eficientes para a criptococose além de colaborar com estudos de anticorpos recombinantes em desenvolvimento.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASSI, M.; BOULWARE, D. R.; RHEIN, J. Cryptococcal Meningitis: Diagnosis and Management Update. **Current tropical medicine reports**, v. 2, n. 2, p. 90–99, 1 jun. 2015.
- ABDELMOULA, M. et al. IgG3 is the major source of cryoglobulins in mice. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 2, 1989.
- ADACHI, M. et al. Interaction between the antigen and antibody is controlled by the constant domains: normal mode dynamics of the HEL-HyHEL-10 complex. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 12, n. 10, p. 2125–31, out. 2003.
- AKIYOSHI, D. E. et al. Characterization of a human monoclonal antibody against Shiga toxin 2 expressed in Chinese hamster ovary cells. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 4054–61, jul. 2005.
- ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 55–58, maio 2015.
- BAI, Y. et al. Significantly improvement of antibody expression level in CHO cells through downregulation of the DHFR gene in expression vector. **Chinese journal of cellular and molecular immunology**, v. 19, n. 1, p. 62–4, 67, jan. 2003.
- BARRETTE, R. W.; URBONAS, J.; SILBART, L. K. Quantifying Specific Antibody Concentrations by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Slope Correction. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 7, p. 802–805, 2006.
- BARRON, N.; PISKAREVA, O.; MUNIYAPPA, M. Targeted genetic modification of cell lines for recombinant protein production. **Cytotechnology**, 2007.
- BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, v. 72, p. 99–118, 2004.
- BIRCH, J. R.; RACHER, A. J. Antibody production B. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 671–685, 2006.
- Blasticidin | Selection Antibiotic | InvivoGen**. Disponível em: <<http://www.invivogen.com/blastocidin>>. Acesso em: 14 ago. 2017.
- BORGES, A. S. et al. Histoplasmoses em pacientes imunodeprimidos: Estudo de 18 casos observados em Uberlândia, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 2, p. 119–124, 1997.
- BOULWARE, D. R. **Cryptococcus: from human pathogen to model yeast**. [s.l.: s.n.]. v. 11
- BOWEN, A. et al. A Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan Manifests Hydrolytic Activity for Both Peptides and Polysaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 2, p. 417–434, 2017.
- BRAJTBURG, J. et al. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, n. 2, p. 183–8, fev. 1990.
- BRITO C, MARQUEZ S, S. F. Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém,

- Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan Amaz Saude**, v. 3, n. 2, p. 59–65, 2012.
- CASADEVALL, A. et al. Characterization of a Muring Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide That Is a Candidate for Human Therapeutic Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1437–46, 1998.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.-A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. **Cell host & microbe**, v. 11, n. 5, p. 447–56, 17 maio 2012.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Insights into mechanisms of antibody-mediated immunity from studies with *Cryptococcus neoformans*. **Current molecular medicine**, v. 5, n. 4, p. 421–33, 2005.
- CHARLES A JANEWAY, J. et al. **The structure of a typical antibody molecule**. [s.l.] Garland Science, 2001.
- CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 507–544, 2006.
- CHAYAKULKEEREE, M.; WANGCHINDA, P. Clinical characteristics and outcomes of patients with cryptococcal meningoencephalitis in a resource-limited setting. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 97 Suppl 3, p. S26-34, mar. 2014.
- CHEN, F. et al. Insight into the roles of hypoxanthine and thymidine on cultivating antibody-producing CHO cells: cell growth, antibody production and long-term stability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 169–178, 30 jan. 2012.
- CHERNIAK, R. et al. Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. **Molecular Immunology**, v. 17, n. 8, p. 1025–1032, 1980.
- CHERNIAK, R.; SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1507–1512, 1994.
- CHUNG, J. Special issue on therapeutic antibodies and biopharmaceuticals. **Experimental & molecular medicine**, v. 49, n. 3, p. e304, 24 mar. 2017.
- CHUSAINOW, J. et al. A Study of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines : What Makes a Stable High Producer ? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 4, p. 1182–1196, 2009.
- CIÊNCIAS, D.; PAULO, S. Avaliação do sistema complemento e produção de anticorpos de pacientes HIV negativos com neurocriptococose. 2011.
- CLEARE, W.; BRANDT, M. E.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibody 13F1 produces annular immunofluorescence patterns on *Cryptococcus neoformans* serotype AD isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 3080, 1999.
- CLEARE, W.; CASADEVALL, A. The different binding patterns of two immunoglobulin M monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* serotype A and D strains correlate with serotype classification and differences in functional assays. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 2, p. 125–129, 1998.
- COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: The old, the new and the promising. **Cellular Microbiology**, 2016.
- CORDERO, R. J. B. et al. Antibody binding to *Cryptococcus neoformans* impairs budding by altering capsular mechanical properties. **Journal of immunology**, v. 190, n. 1, p. 317–23, 2013.

- CRESPILLO, S. et al. Thermodynamic analysis of the binding of 2F5 (Fab and immunoglobulin G forms) to its gp41 epitope reveals a strong influence of the immunoglobulin Fc region on affinity. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 2, p. 594–9, 10 jan. 2014.
- DALTON, A. C.; BARTON, W. A. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 23, n. 5, p. 517–25, maio 2014.
- DAM, T. K. et al. Isothermal titration calorimetry reveals differential binding thermodynamics of variable region-identical antibodies differing in constant region for a univalent ligand. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 46, p. 31366–70, 14 nov. 2008.
- DE LOS MILAGROS BASSANI MOLINAS, M. et al. Optimizing the transient transfection process of HEK-293 suspension cells for protein production by nucleotide ratio monitoring. **Cytotechnology**, v. 66, n. 3, p. 493–514, maio 2014.
- DESJARLAIS, J. R.; LAZAR, G. A. Modulation of antibody effector function. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 9, p. 1278–1285, maio 2011.
- DF, B. **Anticorpos IgG murinos de diferentes isotipos e região variável idêntica se ligam de forma diferente à cápsula de cryptococcus neoformans e a receptores Fc-Gama.** [s.l.] Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, 2016.
- DIAMOND, B.; YELTON, D. E. A new Fc receptor on mouse macrophages binding IgG3. **The Journal of experimental medicine**, v. 153, n. 3, p. 514–9, 1981.
- DIMITROV, D. S. Therapeutic Proteins. In: **Methods in molecular biology**. [s.l.: s.n.]. v. 899p. 1–26.
- DISEASE, C.; ADULTS, H.; DECEMBER, C. Rapid Advice Diagnosis , Prevention and Management. **WHO**, n. December, 2011.
- DROMER, F. et al. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-Cryptococcus neoformans monoclonal antibody. **Infection and immunity**, v. 55, n. 3, p. 749–52, mar. 1987.
- DROMER, F. O. et al. Serotyping of Cryptococcus neoformans by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 2, p. 359–63, 1993.
- ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. **mAbs**, v. 7, n. 1, p. 9–14, 2015.
- EISENMAN, H. C. et al. Cryptococcus neoformans laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 3954–62, dez. 2007.
- ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural Habitat of Cryptococcus neoformans var . gattii. **Flora**, v. 28, n. 7, p. 1642–1644, 1990.
- ERYILMAZ, E. et al. Global structures of IgG isotypes expressing identical variable regions. **Molecular immunology**, v. 56, n. 4, p. 588–98, dez. 2013.
- FAN, L. et al. Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1007–1015, abr. 2012.

- FERNÁNDEZ-CRUZ, E.; ALECSANDRU, D.; RAMÓN, S. S. Mechanisms of action of immune globulin. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, p. 1–2, 2009.
- FLORIN, L. et al. Supplementation of serum free media with HT is not sufficient to restore growth properties of DHFR<sup>-/-</sup> cells in fed-batch processes – Implications for designing novel CHO-based expression platforms. **Journal of Biotechnology**, v. 152, n. 4, p. 189–193, 10 abr. 2011.
- FRANCO-PAREDES, C. et al. Cryptococcal meningoencephalitis in HIV/AIDS: when to start antiretroviral therapy? **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 9, 2017.
- FRENZEL, A.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. Expression of recombinant antibodies. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. July, p. 1–20, 2013.
- FRIDMAN, W. H. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 5, n. 12, p. 2684–90, set. 1991.
- GAO, L.-W. et al. Clinical characteristics of disseminated cryptococcosis in previously healthy children in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 359, 22 dez. 2017.
- GAVIN, A. L. et al. Identification of the mouse IgG3 receptor: implications for antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity. **Journal of immunology**, v. 160, n. 1, p. 20–3, 1 jan. 1998.
- GEISSE, S.; VOEDISCH, B. Transient Expression Technologies: Past, Present, and Future. In: **Methods in molecular biology**. [s.l: s.n.]. p. 203–219.
- GEORGE, I. et al. Epidemiology of Cryptococcosis and Cryptococcal Meningitis in a large retrospective cohort of patients following Solid Organ Transplantation. **Open Forum Infectious Diseases**, 2017.
- GHETIE, V.; WARD, E. S. Transcytosis and Catabolism of Antibody. **Immunologic Research**, v. 25, n. 2, p. 097–114, 2002.
- GOPALT, T. V. Gene Transfer Method for Transient Gene Expression , Stable Transformation , and Cotransformation of Suspension Cell Cultures. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 5, p. 1188–1190, 1985.
- GRIJPSTRA, J. et al. Production of extracellular polysaccharides by CAP mutants of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 8, p. 1164–1173, 2009.
- GULLO, F. P. et al. Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1377–1391, 2013.
- HAMILTON, A. J.; GOODLEY, J. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Current topics in medical mycology**, v. 7, n. 1, p. 19–42, dez. 1996.
- HARRISON, T. S. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. **Journal of Infection**, v. 41, n. 1, p. 12–17, 2000.
- HEISS, C. et al. Unusual galactofuranose modification of a capsule polysaccharide in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 16, p. 10994–1003, 19 abr. 2013.
- HOSPENTHAL, D. R.; BENNETT, J. E. Flucytosine monotherapy for cryptococcosis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases**

**Society of America**, v. 27, n. 2, p. 260–4, ago. 1998.

IGARASHI, T. et al. Structure of a mouse immunoglobulin G that lacks the entire CH1 domain: protein sequencing and small-angle X-ray scattering studies. **Biochemistry**, v. 29, n. 24, p. 5727–5733, 1990.

IKEDA, R. et al. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 22–29, 1982.

ISHII, M.; MATSUMOTO, Y.; SEKIMIZU, K. Usefulness of silkworm as a host animal for understanding pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 10, n. 1, p. 9–13, 2016.

JACKSON, A.; VAN DER HORST, C. New Insights in the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Cryptococcal Meningitis. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 9, n. 3, p. 267–277, 5 set. 2012.

JANDA, A. et al. Variable region identical immunoglobulins differing in isotype express different paratopes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 42, p. 35409–35417, 2012.

JANDA, A. et al. Variable region identical IgA and IgE to *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide manifest specificity differences. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 19, p. 12090–12100, 2015.

JANDA, A. et al. Ig constant region effects on variable region structure and function. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–10, 2016.

JARVIS, J. N.; HARRISON, T. S. Pulmonary cryptococcosis. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v. 29, n. 2, p. 141–50, abr. 2008.

KATO, K. et al. Carbon-13 NMR study of switch variant anti-dansyl antibodies: antigen binding and domain-domain interactions. **Biochemistry**, v. 30, n. 26, p. 6604–10, 2 jul. 1991.

KIM, T. K.; EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection : the present and the future. **Anal Bioanal Chem**, p. 3173–3178, 2010.

KING, D. J. **Applications and engineering of monoclonal antibodies**. [s.l.] Taylor & Francis, 1998.

KINGSTON, R. E. et al. Amplification Using CHO Cell Expression Vectors. In: **Current Protocols in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. Chapter 16p. Unit 16.23.

KOZEL, T. R.; BAUMAN, S. K. CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. **Expert opinion on medical diagnostics**, v. 6, n. 3, p. 245–51, maio 2012.

KUNERT, R.; REINHART, D. Advances in recombinant antibody manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 3451–3461, 2016.

KUNERT, R.; VORAUER-UHL, K. Strategies for Efficient Transfection of CHO-Cells with Plasmid DNA. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]. v. 801p. 213–226.

KUNKA, M. E. et al. Flucytosine Pharmacokinetics in a Critically Ill Patient Receiving Continuous Renal Replacement Therapy. **Case reports in critical care**, v. 2015, p. 927496, 2015.

LA HOZ, R. M.; PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections: Changing epidemiology and

implications for therapy. **Drugs**, v. 73, n. 6, p. 495–504, 2013.

LAI, T.; YANG, Y.; NG, S. K. Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 5, p. 579–603, 26 abr. 2013.

LARSEN, R. A. et al. Amphotericin B and fluconazole, a potent combination therapy for cryptococcal meningitis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 985–91, mar. 2004.

LARSEN, R. A. et al. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 952–8, mar. 2005.

LEOPOLD WAGER, C. M.; WORMLEY, F. L.; JR. Is Development of a Vaccine against *Cryptococcus neoformans* Feasible? **PLoS pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004843, jun. 2015.

LI, F. et al. Cell culture processes for monoclonal antibody production. **mAbs**, v. 2, n. 5, p. 466–477, 2010.

LOBO, P. I.; PATEL, H. C. Murine monoclonal IgG antibodies: differences in their IgG isotypes can affect the antibody effector activity when using human cells. **Immunology and cell biology**, v. 75, n. 3, p. 267–274, 1997.

LUCAS, B. K. et al. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. **Nucleic acids research**, v. 24, n. 9, p. 1774–9, 1 maio 1996.

MARTIN, N. H. The immunoglobulins: A review. **J. clin. Path**, v. 22, p. 117–131, 1969.

MARTIN, R. M.; BRADY, J. L.; LEW, A. M. The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. **Journal of immunological methods**, v. 212, n. 2, p. 187–92, 15 mar. 1998.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 5, p. 552–80, 2010.

MIMURA, Y. et al. Contrasting glycosylation profiles between Fab and Fc of a human IgG protein studied by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 326, n. 1–2, p. 116–126, 30 set. 2007.

MOEN, M. D.; LYSENG-WILLIAMSON, K. A.; SCOTT, L. J. Liposomal Amphotericin B. **Drugs**, v. 69, n. 3, p. 361–392, 2009.

MORITZ, B.; STRACKE, J. O. Assessment of disulfide and hinge modifications in monoclonal antibodies. **Electrophoresis**, v. 38, n. 6, p. 769–785, mar. 2017.

MUKHERJEE, J. et al. Therapeutic Efficacy of Monoclonal Antibodies to *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan Alone and in Combination with Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 3, p. 580–7, 1994a.

MUKHERJEE, J. et al. Protective and Nonprotective Monoclonal Antibodies to *Cryptococcus neoformans* originating from one B cell. **The Journal of experimental**

**medicine**, v. 181, n. 1, p. 405–9, 1995.

MUKHERJEE, J.; CASADEVALL, A.; SCHARFF, M. D. Molecular characterization of the humoral responses to *Cryptococcus neoformans* infection and glucuronoxylomannan-tetanus toxoid conjugate immunization. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 4, p. 1105–16, 1 abr. 1993.

MUKHERJEE, J.; SCHARFF, M. D.; CASADEVALL, A. Variable efficacy of passive antibody administration against diverse *Cryptococcus neoformans* strains. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3353–3359, 1995.

MUKHERJEE, J.; SCHARFF, M. D.; CASADEVALL, A. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 60, n. 11, p. 4534–4541, 1992.

MUKHERJEE, J.; SCHARFF, M. D.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* infection can elicit protective antibodies in mice. **Canadian journal of microbiology**, v. 40, n. 10, p. 888–92, 1994.

MUKHERJEE, S. et al. Monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide modify the course of intravenous infection in mice. v. 62, n. 3, p. 1079–1088, 1994b.

MUKHERJEE, S.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. J774 murine macrophage-like cell interactions with *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of opsonins. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 5, p. 1222–31, maio 1996.

MÜLLER, M. et al. Incidence and Lethality of Immune Reconstitution Disease in HIV-Infected Patients Starting Antiretroviral Therapy: Systematic Review and Meta-Analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 251–61, abr. 2010.

NETO, L. **Aspectos Clínicos , Epidemiológicos E Laboratoriais Da Criptococose**. [s.l: s.n.].

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. Genetic Diversity of the *Cryptococcus* Species Complex Suggests that *Cryptococcus gattii* Deserves to Have Varieties. 2009.

NICOLA, A. M.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D. L. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 4, p. 313–7, ago. 2008.

NUSSBAUM, G. et al. Epitope location in the *Cryptococcus neoformans* capsule is a determinant of antibody efficacy. **The Journal of experimental medicine**, v. 185, n. 4, p. 685–694, 1997.

PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 61–79, 2013.

PAULA, R. Avaliação da criptococose experimental sistêmica em camundongos com BALB/C terapêutica com anfotericina B. 2007.

PEDROSO, R. D. S. Caracterização molecular , virulência e suscetibilidade ao fluconazol de espécies ambientais de *Cryptococcus* , antes e após inoculação em modelo murino Caracterização molecular , virulência e suscetibilidade ao fluconazol de espécies ambientais de *Cryptoc.* **Usp**, p. 44p., 2008.

PETRUSHINA, I. et al. Importance of IgG2c isotype in the immune response to beta-amyloid in amyloid precursor protein/transgenic mice. **Neuroscience letters**, v. 338, n. 1, p. 5–8, 20 fev. 2003.

- PIRES, J.; GUIMARÃES, M. C.; MOYA, M. J. Hipogamaglobulinemia como fator de risco para infecção por *Cryptococcus neoformans*: a propósito de dois casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 6, p. 603–608, 2000.
- PIROFSKI, L. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans*: paradigm for the role of antibody immunity against fungi? **Zentralblatt fur Bakteriologie international journal of medical microbiology**, v. 284, n. 4, p. 475–495, 1996.
- POSCH, W. et al. Promising immunotherapy against fungal diseases. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2017.
- PRITSCH, O. et al. Can immunoglobulin C(H)1 constant region domain modulate antigen binding affinity of antibodies? **The Journal of clinical investigation**, v. 98, n. 10, p. 2235–43, 15 nov. 1996.
- QUAST, I.; PESCHKE, B.; LÜNEMANN, J. D. Regulation of antibody effector functions through IgG Fc N-glycosylation. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 74, n. 5, p. 837–847, mar. 2017.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: An updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 17, p. 1–9, 2017.
- REFF, M. E. High-level production of recombinant immunoglobulins in mammalian cells. **Current opinion in biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 573–6, out. 1993.
- REICHERT, J. M. Antibodies to watch in 2017. **mAbs**, v. 9, n. 2, p. 167–181, 2017.
- SANUZI, C.; MEDEIROS, Q. D. E. *Criptococose experimental e efeito de drogas*. 2010.
- SAYLOR, C. A.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Murine IgG1 and IgG3 isotype switch variants promote phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* through different receptors. **Journal of immunology**, v. 184, n. 1, p. 336–43, 1 jan. 2010.
- SAYLOR, C.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. **Vaccine**, v. 27 Suppl 6, p. G38-46, 30 dez. 2009.
- SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S41-52, fev. 2010.
- SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 302, 8 out. 2013.
- SLOAN, D. J.; DEDICOAT, M. J.; LALLOO, D. G. Treatment of Cryptococcal Meningitis in Resource Limited Settings Disease Burden in Resource Limited Settings. **Europe PMC Funders Group**, v. 22, n. 5, p. 455–463, 2014.
- SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: Epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 169–182, 2014.
- SOARES, E. A. Mortalidade por criptococose no Brasil (2000 a 2012). **Fiocruz**, 2015.
- SPADIUT, O. et al. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 54–60, jan. 2014.
- STAMM, A. M. et al. Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with

cryptococcal meningitis. **The American journal of medicine**, v. 83, n. 2, p. 236–42, ago. 1987.

STONE, N. R. H. et al. Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions. **Drugs**, v. 76, n. 4, p. 485–500, 27 mar. 2016.

SUTTER, N. B. et al. Chromatin insulation by a transcriptional activator. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 3, p. 1105–10, 4 fev. 2003.

THOMAS, P.; SMART, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 51, n. 3, p. 187–200, maio 2005.

TO, P. et al. Production and quality control of points to consider in manufacture. 1995.

TORRES, M. et al. Variable-Region-Identical Antibodies Differing in Isotype Demonstrate Differences in Fine Specificity and Idiotype. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 4, p. 2132–2142, 2005.

TORRES, M. et al. The Immunoglobulin Heavy Chain Constant Region Affects Kinetic and Thermodynamic Parameters of Antibody Variable Region Interactions with Antigen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13917–13927, 4 maio 2007.

TORRES, M.; CASADEVALL, A. The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 2, p. 91–97, fev. 2008.

TOWNSEND-NICHOLSON, A. Approaches to the Stable Transfection of G Protein-Coupled Receptors. In: **Receptor Signal Transduction Protocols**. New Jersey: Humana Press, 1997. p. 45–54.

TRILL, J. J.; SHATZMAN, A. R.; GANGULY, S. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. **Current opinion in biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 553–60, out. 1995.

TUDOR, D. et al. Isotype modulates epitope specificity, affinity, and antiviral activities of anti-HIV-1 human broadly neutralizing 2F5 antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12680–5, 31 jul. 2012.

UNICEF. Promovendo a Utilização Racional de Medicamentos e a Administração Correta de Casos nos Serviços Básicos de Saúde. v. 16, 1998.

VELAGAPUDI, R. et al. Spores as Infectious Propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4345–4355, 1 out. 2009.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171–9, ago. 2000.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–17, 2014.

VORONINA, E. V et al. Design of a stable cell line producing a recombinant monoclonal anti - TNF $\alpha$  antibody based on a CHO cell line. **SpringerPlus**, 2016.

WANG, Z. et al. Dual gene amplification and selection system with dihydrofolate

reductase and glutamine synthetase genes effectively increase the foreign gene expression. **Chinese journal of experimental and clinical virology**, v. 16, n. 1, p. 59–61, mar. 2002.

WHO | Rapid advice: Diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. **WHO**, 2015.

WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature reviews. Neurology**, 2016.

WOOD, C. R. et al. High level synthesis of immunoglobulins in Chinese hamster ovary cells. **Journal of immunology**, v. 145, n. 9, p. 3011–6, 1 nov. 1990.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1393–1398, 4 nov. 2004.

YOUNG, A. C. . et al. The three-dimensional structures of a polysaccharide binding antibody to *Cryptococcus neoformans* and its complex with a peptide from a phage display library: implications for the identification of peptide mimotopes. **Journal of Molecular Biology**, v. 274, n. 4, p. 622–634, 1997.

YUAN, R. et al. Isotype switching from IgG3 to IgG1 converts a nonprotective murine antibody to *Cryptococcus neoformans* into a protective antibody. **Journal of immunology**, v. 154, n. 4, p. 1810–1816, 1995.

YUAN, R. R. et al. Isotype switching increases efficacy of antibody protection against *Cryptococcus neoformans* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1057–1062, 1998.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Applied Microbiology**, v. 2164, n. 9, p. 1–64, 2010.

**Zeocin™ | Selection Antibiotic | InvivoGen.** Disponível em: <<http://www.invivogen.com/zeocin>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

ZHANG, Z.; GOLDSCHMIDT, T.; SALTER, H. Possible allelic structure of IgG2a and IgG2c in mice. **Molecular Immunology**, v. 50, n. 3, p. 169–171, mar. 2012.

ZHENG, K.; BANTOG, C.; BAYER, R. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. **mAbs**, v. 3, n. 6, p. 568–76, 2011.

ZHOU, H. et al. Generation of stable cell lines by site-specific integration of transgenes into engineered Chinese hamster ovary strains using an FLP-FRT system. **Journal of Biotechnology**, v. 147, n. 2, p. 122–129, 17 maio 2010.