

## 1.1 Prions e Doenças Neurodegenerativas

Partículas proteináceas infecciosas, termo utilizado por Stanley Prusiner em 1982 para definir prions (Prusiner, 1988), despertaram o interesse dos cientistas ao perceberem a presença destas em cérebros de animais e seres humanos que apresentavam certos tipos de doenças neurodegenerativas fatais. A comprovação contraditória de sua natureza infecciosa e exclusivamente protéica causou grande movimentação e espanto entre os pesquisadores da área, uma vez que levou ao questionamento e a uma possível reformulação do dogma central da biologia molecular (Watson, et al., 1953) O dogma estabelece que o fluxo de informação para a formação de agentes infecciosos vai do ácido nucléico para a síntese de proteínas. Já a descrição do prion mostra uma molécula protéica, desprovida de ácidos nucléicos, modificando-se em sua estrutura original e induzindo as moléculas sadias em seu redor a fazerem o mesmo, causando doenças com isto. Em um primeiro momento as doenças priônicas precisam envolver um agente etiológico constituído apenas por proteína e que podia direcionar a replicação de outros prions.

Entre as doenças neurodegenerativas que envolvem prions estão as encefalopatias espongiiformes transmissíveis de gado, carneiros, felinos, ungulados e de alguns animais selvagens (Prusiner *et al.*, 1998; Prusiner, 1997) e a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), relacionadas à ingestão de carne bovina infectada por prions; a forma Kuru de doença priônica descrita em humanos, em populações nativas da Papua-Nova Guiné, cuja tradição de ingerir vísceras de seus antepassados mortos era mantida entre uma das tribos (Gajdusek, 1977); além da síndrome de Gertsmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e a Insônia Familiar Fatal, ambas de caráter hereditário (Prusiner, 1997). Estas doenças mostram algumas características macroscópicas em comum, entre as quais a degeneração

espongiforme de neurônios com o aparecimento de um grande número de vacúolos e a gliose - crescimento acentuado dos astrócitos.

Uma atenção especial tem sido direcionada à disseminação da encefalopatia espongiforme bovina no gado europeu. A sua provável transmissão para seres humanos por ingestão de carne e derivados de carne contaminados (Aguzzi, 1996; Butler, 1996) transformou as doenças priônicas em um grande problema econômico e de saúde pública mundial.

A transmissão de “scrapie”- denominação também atribuída ao prion (Prusiner, 1997)- de ovelhas para animais de laboratório permitiu um estudo mais aprofundado do agente infeccioso e dos mecanismos patológicos envolvidos nas encefalopatias espongiformes, uma vez que permitiu uma redução drástica no tempo de incubação da doença -de anos para meses (Prusiner *et al.*, 1998).

O isolamento da partícula infecciosa (prion) aconteceu no começo dos anos 80, quando trabalhos publicados pelo grupo de Stanley Prusiner descreveram experimentos de purificação de partículas infecciosas através da extração de amostras de cérebros de camundongos infectados experimentalmente com prions. Tais experimentos consistiam em extrações com detergentes, proteólise limitada, centrifugação diferencial e sedimentação através de gradiente descontínuo de sacarose. O material obtido mostrou-se extremamente insolúvel. Em microscopia eletrônica de transmissão, a amostra de agente infeccioso purificado apresentou-se em pequenos agregados de estruturas alongadas, com tamanho e formato irregulares. Um material semelhante -sob aspecto bioquímico e microscópico- foi extraído do cérebro de pacientes cujo diagnóstico foi o de portadores de CJD (Prusiner *et al.*, 1982).

Estas partículas infecciosas foram usadas para a produção de anticorpos monoclonais, que reconheceram uma proteína de 33-35 kDa, encontrada em cérebros de animais doentes, bem como em cérebros de animais não infectados. Com a ajuda destes anticorpos uma parte da proteína constituinte do agente infeccioso foi identificada e isolada. A partir do sequenciamento da porção amino terminal desta proteína, peptídeos quimicamente sintetizados foram usados como antígeno na produção de anticorpos policlonais em coelhos. Estes anticorpos reagiram com a mesma proteína de 33-35 kDa, sugerindo assim que a proteína presente nas partículas infecciosas do scrapie era um componente do cérebro de animais normais (Barry *et al.*, 1986).

A proteína constituinte do sistema nervoso central foi chamada de prion celular ou PrPc, enquanto a proteína depositada no cérebro de animais infectados foi denominada prion ou PrPsc. Ao digerir-se proteoliticamente o PrPsc obtém-se uma forma truncada, chamada de PrP 27-30 (Oesch *et al.*, 1985). A proteólise aplicada ao PrPc leva à sua completa digestão.

As propriedades físico-químicas do PrPsc foram estudadas partindo-se da solubilização dos agregados de PrPc 27-30, extraídos de cérebros de animais de laboratório portadores de “scrapie”, sem que o poder de infectividade das partículas fosse reduzido. Métodos físico-químicos que normalmente alteravam ácidos nucleicos, como radiação ultravioleta, ação de nucleases e dietil pirocarbonato não desempenharam qualquer efeito sobre a capacidade infecciosa dos prions. (Prusiner, 1982).

Determinou-se enfim que PrPsc é uma isoforma anormal, modificada pós transducionalmente do PrPc, sendo que ambas são ligadas à membrana celular por uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Oesch *et al.*, 1985; Stahl *et al.*, 1987). A seqüência primária de ambas as proteínas é a mesma, enquanto a sua estrutura secundária

difere acentuadamente. O PrPc é constituído de  $\alpha$ -hélices (42%) enquanto o PrPsc tem muitas regiões contendo folhas  $\beta$ -pregueadas (Pan *et al.*, 1992). Estudos mostraram ainda que as  $\alpha$ -hélices podem ser convertidas em estruturas  $\beta$ -pregueadas (Gasset *et al.*, 1992), e que estas podem induzir mudanças conformacionais em peptídeos com estrutura helicoidal (Nguyen *et al.*, 1995). Ainda foi mostrada a conversão do PrPc em PrPsc *in vitro* (Kocisko *et al.*, 1994), e a proteína resultante desta conversão mostrou-se rica em estruturas  $\beta$ -pregueadas, explicando então a deposição tóxica de agregados insolúveis nos tecidos cerebrais. Acreditou-se por algum tempo que este acúmulo de proteínas insolúveis nas células fosse responsável pelas alterações celulares observadas que culminariam com a neurodegeneração e conseqüente morte celular (Bücler *et al.*, 1993). Porém a causa da morte celular em doenças causadas por prions ainda não foi elucidada. Esta idéia da neurodegeneração causada pelo acúmulo de proteínas insolúveis nas células tem sido desafiada pelo aparecimento das chamadas condições subclínicas, onde animais mostram altos níveis de infectividade por prion sem apresentar a doença clínica. Vários modelos experimentais parecem separar a propagação do prions da sua neurotoxicidade.

A maioria dos agentes terapêuticos tem como alvo a diminuição do acúmulo de PrPsc, porém têm mostrado pouca eficácia em animais infectados com prions. Tais agentes chegam a prolongar o período de incubação, mesmo se administrados antes ou no momento da infecção periférica. Porém não são eficazes em prevenir a neurodegeneração e a morte celular (Aguzzi *et al.*, 2001).

O PrPc é codificado em uma seqüência aberta de leitura, localizada em um único exon tanto em camundongos e ratos como em humanos (Prusiner, 1997). É possível detectar-se mRNA do PrPc no tubo neural de camundongos a partir do décimo terceiro dia

de vida intra-uterina, e a quantidade deste aumenta após o nascimento (Manson *et al.*, 1992). A função da proteína PrPc ainda não está totalmente elucidada.

Uma vez conhecido o gene codificador da proteína PrPc, foram obtidos animais nocaute (PrPc *-/-*) para este gene. Animais nocaute são normalmente utilizados para estudar o produto da transição do gene removido, ou seja, da proteína codificada pelo gene de interesse. Procede-se a deleção do gene codificador da proteína em estudo em células-ovo. A partir daí, avalia-se o que acontece com o fenótipo do animal resultante desta manipulação. Os estudos com os animais nocaute para o gene codificador do prion são controversos. O grupo de Sakagushi (1996) mostrou que estes animais possuem distúrbios motores e diminuição acentuada da camada de células de Purkinje no cerebelo. Collinge e colaboradores (1994) mostraram que os animais possuem resposta eletrofisiológica anormal no hipocampo, ou seja, diminuição da LTP (“long term potentiation”). O grupo de Charles Weissmann (Büeler *et al.*, 1992) mostrou que os animais não possuem alteração significativa. Recentemente foi descrito que animais nocaute são mais sensíveis a drogas indutoras de distúrbios epiléticos (Walz *et al.*, 1999) e que possuem atividade locomotora alterada (Roesler *et al.*, 1999). Entretanto há um consenso entre os grupos que os animais são viáveis e sobrevivem mais de 500 dias (tempo médio de vida apresentado por camundongos).

Apesar de não se saber ao certo se o PrPsc causa ou não neurotoxicidade diretamente, sabe-se que este manifesta toxicidade apenas onde o PrPc também é expresso (Büeler, 1993). Não se observaram efeitos adversos ao infectar um animal nocaute (PrPc *-/-*) com PrPsc. A neurotoxicidade causada pelo prion limitou-se apenas a um tecido neural que expressa PrPc transplantado ao cérebro de um animal nocaute (PrPc *-/-*), enquanto os tecidos adjacentes do animal nocaute (PrPc *-/-*) permaneceram perfeitamente

sadios, apesar do acúmulo e extensiva migração do PrPsc, indicando que o PrPc hospedeiro é necessário para a neurotoxicidade induzida pelo PrPsc (Brandner *et al.*, 1996.).

O estudo das doenças neurodegenerativas torna-se mais instigante a cada nova constatação, seja na sua constituição bioquímica ou na sua função fisiológica. Esta última tem sido analisada em diferentes contextos. O PrPc atua como receptor de laminina (Ln), que vem a ser uma proteína predominantemente encontrada na membrana basal das células e que assume papel na proliferação, diferenciação, migração e morte celular. Parte da neuritogênese induzida pela Ln é mediada pela interação PrPc-Ln. Animais que tiveram o gene do PrPc removido possuem atividade neuritogênica diminuída frente à Ln, quando comparados a animais selvagens (Graner *et al.*, 2000a,b). A laminina é encontrada em grande quantidade no hipocampo, região de papel fundamental para a formação de memória. Considerando-se o papel do PrPc como receptor de laminina como citado acima, foram injetados via intra hipocampal anticorpos anti-PrPc e anti-laminina, que mostraram efeitos amnésicos, utilizando-se o modelo de *step-down avoidance inhibitory task*, (Coitinho et al, 2003)

Para a investigação do direcionamento intracelular de PrPc em células vivas de mamíferos foi gerada uma quimera do PrPc com GFP (proteína fluorescente verde). Esta quimera foi utilizada para investigar o tráfego induzido por íons  $\text{Cu}^{++}$  e constitutivo do PrPc. (Lee *et al.*, 2001). Foi também descrita uma proteína ligante de 66 kDa identificada como STI1 (stress-inductible protein 1). A interação do PrPc com esta proteína está associada a sinais neuroprotetores que resgatam as células da retina da apoptose. Para descrever esta proteína foi empregada a teoria da hidropaticidade complementar (Brentani, 1990), a partir da qual se deduziu um peptídeo. Foram obtidos anticorpos contra estes

peptídeos (Martins *et al.*, 1997) que levaram à obtenção da identidade protéica da molécula ligante de PrPc de 66kDa (Zanata *et al.*, 2002a).

Foi demonstrado também o envolvimento do PrPc no estresse oxidativo, onde o PrPc liga íons  $\text{Cu}^{++}$  à sua região N-terminal. Células deficientes em PrPc têm um conteúdo menor de cobre e possuem atividade do tipo superóxido dismutase diminuída. Tais resultados sugerem que o PrPc é a principal proteína de ligação ao  $\text{Cu}^{++}$  em frações de membrana cerebral e controla a atividade de outras proteínas ligadoras de  $\text{Cu}^{++}$  associadas à membrana (Brown, *et al.*, 1997).

## **1.2 Anticorpos Monoclonais**

Anticorpos gerados através de uma resposta imune natural ou após imunização são constituídos de uma mistura de moléculas que apresentam afinidades e especificidades diferentes. Essa heterogenicidade, em parte, provém da produção de anticorpos que se ligam a diferentes epítomos do antígeno imunizante.

Os soros policlonais contêm anticorpos com várias especificidades, sendo que estas atribuem ao soro utilidade para várias finalidades biológicas. Porém, existem algumas desvantagens justamente relacionadas a esta heterogenicidade da especificidade de anticorpos. Cada lote de soro obtido apresenta diferenças entre os demais, além de apresentar volume variado e limitado. Além do mais, anticorpos purificados por cromatografia de afinidade podem apresentar reações cruzadas.

Células linfóides de animais imunizados, as quais secretam anticorpos, sobrevivem pouco tempo quando cultivadas “*in vitro*”. Por outro lado, linhagens celulares de mieloma normalmente apresentam crescimento permanente em cultivo de células. Estudos sobre

mieloma múltiplo mostram que anticorpos monoclonais, ou seja, com especificidade única, poderiam ser obtidos através de células plasmáticas imortalizadas. Sabe-se que o mieloma múltiplo está associado à presença de gamaglobulinas em grande quantidade, proteína esta conhecida como a proteína do mieloma (Dispenzieri, *et al.*, 2005). Porém a especificidade antigênica da maioria dos anticorpos é desconhecida.

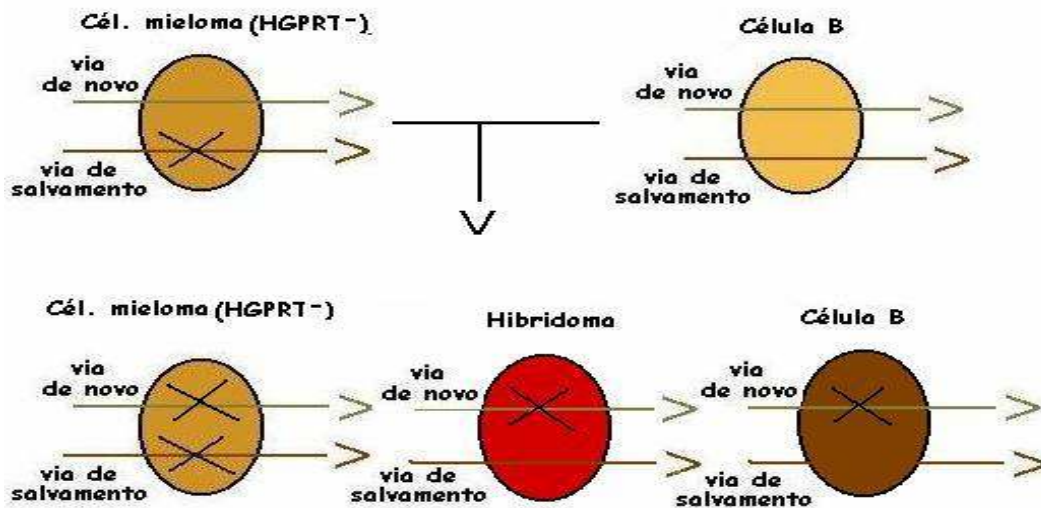
Köhler e Milstein resolveram o problema ao desenvolverem uma técnica de produção de população homogênea de anticorpos com especificidade antigênica conhecida (Köhler & Milstein, 1975). O método consiste em formar híbridos entre linfócitos B e mielomas, através da fusão entre suas membranas celulares desestabilizadas temporariamente por um reagente químico. Quando os dois tipos celulares são fundidos diversos híbridos são desenvolvidos, porém suas propriedades essenciais são mantidas: crescimento em cultivo de células e secreção de anticorpos com especificidade pré-definida (Köhler, 1981; Milstein, 1983, Carneiro & Lopes, 1986.) O agente de fusão utilizado é o polietilenoglicol (PEG), o qual promove instabilidade e aderência das células. (Little *et al.*, 2000).

Os híbridos resultantes da fusão são adaptados e selecionados em cultivo de células. Mesmo nos experimentos mais eficientes de fusão celular apenas 1% das células envolvidas sofrem fusão e apenas 1 em  $10^5$  células formam híbridos viáveis. Isto significa que um grande número de células que não sofreram fusão permanece no meio de cultura celular, e estas devem ser selecionadas das células que sofreram fusão. Com este propósito, as células de mieloma utilizadas no experimento de fusão possuem deficiências genéticas que impedem o seu desenvolvimento quando mantidas sob certas condições.

As células de mieloma utilizadas na fusão são mutantes com deficiência na enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT), que é utilizada para a incorporação



de precursores de DNA. Estes mutantes são selecionados “in vitro” através do tratamento prévio com 8-azaguanina, uma droga anti-metabólica. As células mutantes sobrevivem a 8-azaguanina, visto que não a incorporam devido à deficiência de HGPRT. Porém as mesmas células não sobrevivem em presença de aminopterina, um agonista do ácido fólico que bloqueia a via principal para a síntese de DNA. Assim, após a fusão os mielomas não sobrevivem em meio contendo aminopterina, devido à deficiência em HGPRT. Por outro lado, as células derivadas do baço, que possuem HGPRT são incapazes de sobreviver e multiplicar-se em cultivo de células contendo aminopterina, desde que seja acrescentado a este hipoxantina e timidina (meio HAT). Isto ocorre devido à capacidade de multiplicação proveniente da célula de mieloma e à presença da enzima HGPRT, já que o gene responsável pela codificação da enzima HGPRT é fornecido pela célula derivada do baço, permitindo que as células híbridas sobrevivam em meio HAT. As células de mieloma e



derivadas do baço e não fusionadas morrem, conforme a figura 1.

:

**Figura 1. Seleção de hibridomas viáveis através do tratamento com HAT.** As células de mieloma são mutantes e não expressam a enzima HGPRT da via de salvamento. A adição de um composto que bloqueie a via de novo de síntese de nucleotídeos força as células a usarem a via de salvamento para sobreviver. Sem poder usar a via de salvamento, as células de mieloma não sobrevivem, as células derivadas do baço morrem em alguns dias e apenas os hibridomas sobrevivem.

Assim, Köhler & Milstein (1975) fundiram células de mieloma com linfócitos B de animais imunizados com um antígeno conhecido, usando como agente fundente o vírus Sendai, que expressa proteínas do envelope (proteínas de fusão) fundindo as células em conjunto. Os híbridos foram selecionados em meio contendo HAT. Assim, as células de mieloma que não sofreram fusão morrem na presença da aminopterina contida no HAT e os linfócitos B provenientes de animais imunizados não sobrevivem por mais de 2 semanas por não terem sido imortalizadas através da fusão celular.

A tecnologia de hibridoma foi, por muito tempo, o melhor método para obtenção de anticorpos monoclonais contra determinantes antigênicos conhecidos. Tal método pode ser utilizado para identificar antígenos conhecidos, uma vez que cada hibridoma é específico para um único determinante antigênico (Little *et al.*, 2000).

Anticorpos monoclonais têm sido empregados em diversas áreas, como: identificação de marcadores fenotípicos únicos para tipos celulares individuais; no estudo das doenças autoimunes e imunossupressão ( Steinman *et al.*, 1981; Waldor *et al.*, 1983; Wofsy & Seaman, 1985; Menard *et al.*, 1999); no diagnóstico e terapia de tumores (Carneiro *et al.*, 1987; Gasparini *et al.*, 1988), transplante (Rose *et al.*, 1986; Perkins *et al.*, 1987; Adams *et al.*, 1989; Hall & Woods, 1990; Hoffmann *et al.*, 1991; Wang *et al.* 1996), análise funcional de moléculas da superfície celular pela capacidade dos anticorpos monoclonais de se ligarem a moléculas de superfície celular e estimularem ou inibirem funções celulares, diagnóstico e terapia de doenças infecciosas e imunoterapias (Larrick, 1989; Birtles *et al.*, 1990).

A utilização de células de camundongos para a produção de anticorpos monoclonais traz o maior impedimento às terapias que os utilizam. Os humanos desenvolvem rapidamente uma resposta de anticorpos contra anticorpos de camundongos, o que não

apenas bloqueia a ação dos anticorpos monoclonais derivados de células de camundongos como também conduz a reações alérgicas muito importantes. Outro fator de impedimento está na falta de mielomas humanos adequados para a técnica de fusão. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se um heteromieloma, ou seja, mieloma híbrido de célula de camundongo com célula humana (Little *et al.*, 2000).

O desenvolvimento da tecnologia de anticorpos monoclonais supriu as necessidades de desenvolvimento de sondas para o estudo de estruturas biológicas como proteínas, além de ser importante no estudo das funções destas. Entretanto, muitas moléculas interessantes, como por exemplo proteínas presentes em neurônios, são pouco imunogênicas e os anticorpos monoclonais para algumas dessas proteínas são, usualmente, contra determinantes que não apresentam funções. Esses anticorpos podem ser utilizados para estudos que visam a determinação de estrutura molecular, mas não podem ser usados em estudos funcionais (Riggot & Matthew, 1996). Outros antígenos em potencial estão presentes em quantidades muito pequenas para serem purificados facilmente e para outros antígenos neuronais a obtenção de anticorpos monoclonais tem sido dificultada por serem moléculas para as quais o Sistema Imune está tolerante por mecanismos de supressão ativa (Riggot & Matthew, 1996). Essas dificuldades na geração de anticorpos monoclonais para neurônios levaram ao desenvolvimento de várias estratégias experimentais para sua obtenção, como por exemplo: o acoplamento de proteínas neuronais a carreadores e a utilização de vários tipos de adjuvantes (Riggot & Matthew, 1996); a utilização de anticorpos anti-idiotípicos na imunização (Gaulton *et al.*, 1985); a injeção de antígenos diretamente no baço ou linfonodos dos animais durante a imunização (Kolberg & Blanchard, 1991).

Muitos marcadores de neurônios maduros e tumores de células neuronais estão disponíveis para estudos de imunohistoquímica ou imunocitoquímica em cortes de tecido (Sarnat *et al.*, 1998). Portanto, os estudos sobre o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) estão grandemente baseados no desenvolvimento de sondas moleculares do tipo anticorpos monoclonais para estabelecer-se o padrão de aparecimento e migração das diferentes estruturas neuronais e subtipos de neurônios no cérebro embrionário e neurônios em malformações do SNC (Sarnat *et al.*, 1998).

Na busca das possíveis funções biológicas apresentadas pelo PrPc e a relação destas funções com suas variantes infectantes e causadoras de doenças; o uso de anticorpos monoclonais como ferramenta pode ser de relevada importância.

Considerando as diferentes linhas de pesquisas e as variadas hipóteses quanto à função e atuação do PrPc na célula, este trabalho propôs a produção de anticorpos monoclonais contra o PrPc. Para que este objetivo fosse atingido utilizamos uma estratégia experimental na qual camundongos da linhagem C57/CV129 nocaute para o gene que codifica o PrPc, (Bueller *et al.*, 1993) foram imunizados com PrPc recombinantes (Graner *et al.*, 2000b, Zanata *et al.*, 2002a).

## **Objetivos**

- Produção de anticorpos policlonais anti-PrPc a partir da imunização de animais nocaute para o gene PRPN (PrPc-/-)
- Produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais a partir da fusão de células B de animais hiperimunes e células mielóides imortalizadas.

### **3.1. Animais**

Camundongos nocaute para o gene que codifica o PrPc (PrPc -/-) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Charles Weissmann (Neurogenetics Unit, Hospital College School of Medicine at St. Mary's, London, UK) e fornecidos pelo biotério do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer – São Paulo. Este trabalho utilizou 12 dos 20 camundongos cedidos.

### **3.2 Células de mieloma**

Foram usadas as linhagens de mieloma P3653 (ATCC) e Sp 2/0 (ATCC) sendo a última gentilmente cedida pela Dra. Ana Maria Assis Moura – Instituto Butantan – São Paulo. Tratam-se de linhagens originadas de camundongo Balb/c e que não sobrevivem em meio HAT, uma vez que são deficientes na enzima HGPRT.

### **3.3 Meios de cultura**

As células parentais e os híbridos foram cultivadas em meio RPMI-1640, (sigma Chemical Company ST. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, São Paulo) e acrescido de 10 mM de HEPES (ácido n-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfônico) e 24 mM de bicarbonato de sódio como agentes tamponantes, além de 20 mg/L de gamicina, 2mM de piruvato de sódio, e 2 mM de L-glutamina (meio COMPLETO). Este foi filtrado em membrana Millipore 0,22 µm e estocado a 4°C após teste de esterilidade a 37°C. A viabilidade celular foi verificada com

azul de tripan 0,4% (m/v) periodicamente, para um acompanhamento do crescimento celular.

A seleção e clonagem dos híbridos foram feitas em meios HAT e HT respectivamente. O meio HT é constituído do meio COMPLETO suplementado com 10% de SFB, contendo 100 $\mu$ M de hipoxantina e 10 $\mu$ M de timidina. Ao acrescentar 10,4  $\mu$ M de aminopterina, obtém-se o meio HAT.

### **3.4 Cultivo das linhagens de mieloma**

As linhagens de mieloma Sp2/0 e P3653 foram mantidas em cultura contínua, em meio COMPLETO, em frascos plásticos descartáveis (TPP, Suíça). Os frascos de cultura foram mantidos a 37°C em atmosfera úmida com concentração de CO<sub>2</sub> variando entre 5 e 8%.

O crescimento celular foi acompanhado por observação diária à microscopia de fase em microscópio invertido (Nikon) e de contagem periódica do número de células. A continuidade das culturas foi garantida através de repiques sucessivos na fase de crescimento exponencial, quando atingiam semi-confluência celular.

### **3.5 Estocagem das células**

A estocagem das células de mieloma e das linhagens das células híbridas foi feita em nitrogênio líquido em meio de congelamento (10% DMSO, 40% SFB e 50% RMPI). A recuperação das linhagens congeladas se deu pelo seu descongelamento rápido a 37°C seguido por plaqueamento imediato.

### **3.6 Ensaio de detecção de *Mycoplasma spp***

O ensaio para detecção de contaminação por *Mycoplasma spp* usou o “mycoplasma staining kit” (Sigma Aldrich Company Ltda.). O método consiste na marcação de DNA por fluorocromo, com visualização em microscópio de fluorescência para a confirmação da contaminação.

### **3.7 Proteína recombinante**

A proteína PrPc recombinante utilizada para imunizar os animais, bem como para os ensaios de ELISA, possui cauda de seis histidinas e foi gentilmente cedida pelo Instituto Ludwig de pesquisa sobre o Câncer – São Paulo, aonde foi purificada por cromatografia de afinidade a metal imobilizado, conforme discutido previamente (Zanata *et al.*, 2002a)

### **3.8 Imunizações**

#### **3.8.1 Imunização dos camundongos nocaute via intraperitoneal**

Animais PrPc -/- machos e adultos (4 meses) foram imunizados via intraperitoneal com PrPc recombinante (rPrPc). Os animais receberam 5 µg de rPrPc na forma de emulsão com Adjuvante Completo de Freund inicialmente, e 3 doses subsequentes quinzenais de 5µg com Adjuvante Incompleto de Freund até obtenção de título adequado de anticorpos contra o antígeno (Harlow e Lane, 1988). Para promover a adsorção do antígeno a um sal de alumínio como uma alternativa para a maior exposição deste no organismo, adicionou-se



à emulsão hidróxido de alumínio 20µg de Al(OH) (Lab. Sanval, SP, Brasil) por grama de antígeno, sendo que um miligrama de hidróxido de alumínio adsorve entre 50 a 200 µg de antígeno (Harlow & Lane 1988). Os soros policlonais produzidos por este tipo de imunização foram testados através de ensaio imunoenzimático (Engvall, 1980).

### **3.8.2 Imunização dos camundongos nocaute via coxim-plantar**

A imunização via coxim-plantar foi feita nesta região das patas traseiras dos animais, injetando-se 2,5µg/pata de PrPc recombinante emulsionados em 50µL de solução salina e 50µL de Adjuvante Completo de Freund. A imunização se repetiu a cada 16 dias em um total de três imunizações. O soro policlonal produzido contra a proteína PrPc recombinante foi testado através de ensaio imunoenzimático (ELISA, Engvall, 1980).

### **3.8.3 Imunização dos camundongos nocaute via intravenosa**

A imunização via intravenosa foi feita na cauda dos animais, injetando-se 5µg de PrPc recombinante diluídos em 50µL de solução salina. A imunização acontece entre 3 e 5 dias antes da data estipulada para o experimento de fusão.

### **3.9 Avaliação da resposta humoral dos camundongos nocaute imunizados.**

Os soros dos animais imunizados foram obtidos 8 dias após a última imunização através de sangria pelo plexo orbital ou axilar, utilizando-se pipetas Pasteur. Ensaio

imunoenzimático (ELISA, Engvall, 1980) foi empregado para a avaliação dos níveis de anticorpos dirigidos contra PrPc recombinante presente nos soros destes animais.

Placas de poliestireno com 96 poços e de fundo chato (Nunc Co.) foram sensibilizadas com 0,5µg/100µL/poço de PrPc recombinante em tampão PBS pH 9,0 overnight a 4°C. Após este período os sítios remanescentes do plástico foram bloqueados com 200µL de BSA 1% durante uma hora a 37°C.

Em seguida as placas foram incubadas durante uma hora a 37°C com 100µL/poço dos soros dos animais imunizados dissolvidos em BSA 0,1%, seguido de diluição seriada a partir de 1:100. As placas foram submetidas a três lavagens com PBST (PBS pH 7,4 + 0,05% tween 20) quando então foram adicionadas de 100 µL de anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (GE Biosciences, NJ) diluído a 1:5000 em BSA 0,1% durante 45 minutos a 37°C. As placas foram novamente lavadas com PBST e a reação foi revelada utilizando-se 0,2 mg/mL de OPD (Sigma, Saint Louis, USA) e 2 µL/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) em solução de tampão citrato. A incubação se deu em câmara escura durante 10 minutos e a reação foi bloqueada com a adição de 100 µL de ácido sulfúrico (Merck) 1mol/litro. A absorbância foi obtida a 490 nm em leitor de placas de ELISA (BioRad, Hercules, USA)

### **3.10 Ensaio de seleção de lote de soro fetal bovino**

O ensaio de seleção de lote de soro fetal bovino é feito em placa de 96 poços, empregando-se amostras de cinco lotes de soro fetal bovino diferentes gentilmente cedidos pelo fornecedor. As amostras foram testadas em duas linhagens celulares, Sp2/0 e P3653, em uma concentração inicial de 10<sup>5</sup> cel/mL, sofrendo diluição seriada através das doze

colunas da placa de 96 poços, sendo que o último poço possuía apenas 2 cel/mL. Cultivou-se as células com meio de cultivo sem aditivos contendo 30% de soro fetal bovino. As células foram avaliadas depois de 7, 10 e 14 dias. O lote que permitiu melhor crescimento nos poços onde havia menor densidade celular foi o selecionado para compor os meios de cultivo celular utilizados nos ensaios de fusão e obtenção de hibridomas

### **3.11 Obtenção dos hibridomas**

#### **3.11.1 “Feeder layers” de macrófagos (FLM)**

Macrófagos foram obtidos através de lavagem peritoneal de camundongos BALB/C em condições estéreis, com solução gelada de sacarose 0,34M (Sigma). Todo o procedimento foi efetuado em banho de gelo. A solução contendo macrófagos ressuspensa em meio de cultura COMPLETO, HAT ou HT conforme o caso foi distribuída nos poços de 10 placas de 96 poços. Os FLM foram preparados 2-3 dias antes do experimento de fusão celular. As células foram distribuídas respeitando a proporção de  $2 \times 10^3$  células/ poço para placa de 96 poços.

#### **3.11.2 Primeiro experimento de fusão celular.**

As placas com FLM foram observadas em microscópio invertido para a verificação de ausência/presença de contaminação. Células de mieloma P3653 provenientes de culturas semiconfluentes com viabilidade maior que 95% foram fusionadas com células esplênicas dos animais imunes na presença de PEG. Todo o protocolo de fusão celular foi realizado

em condições estéreis sob o fluxo laminar seguindo o protocolo de St. Groth & Scheidegger (1980).

As células de mieloma foram transferidas dos frascos de cultivo celular descartáveis (TPP, Suíça) para tubo plástico de fundo cônico de 50mL (TPP, Suíça) e mantidas em meio COMPLETO na estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> até que fossem utilizadas.

O camundongo imunizado via intraperitoneal, identificado como o melhor produtor de soro hiperimune ao antígeno específico foi sangrado pelo plexo orbital para a obtenção de seu soro policlonal. Este soro é utilizado como controle positivo durante a fase de varredura (“screening”) dos hibridomas bem como em outros experimentos do laboratório. Após o sangramento o animal foi sacrificado através de deslocamento cervical e imerso em álcool 70%, seguido da abertura asséptica da cavidade peritoneal. Depois de localizado, o baço foi retirado e transferido para placa de Petri contendo 5mL de meio de cultivo R10 sem SFB. O baço foi então esmagado gentilmente em placa de petri estéril com 3 mL do mesmo meio de cultivo, utilizando-se pinças estéreis, para a liberação das células da cápsula do órgão. Depois de centrifugada e sem sobrenadante, este precipitado de células foi ressuspensão e transferido para o tubo de 50mL contendo as células de mieloma. O tubo, contendo a solução de células de mieloma e esplênicas, na proporção de 1:4 (quatro vezes mais células esplênicas do que células de mieloma), foi centrifugado durante 10 minutos. Obteve-se um botão de células no fundo do tubo, que foi seco cuidadosamente por aspiração com pipeta Pasteur.

Após agitação do tubo para desfazer o botão de células formado pela centrifugação adicionou-se 1 mL de solução de PEG (ATCC, Rockville, MD, USA) (2g PEG + 1,8mL RPMI + 0,2 DMSO), previamente ressuspensão e aquecido a 37°C, gota a gota no intervalo de 1 minuto, sob leve agitação manual. Após a adição do PEG a suspensão celular foi

incubada durante 90 segundos em estufa 37°C. A suspensão foi então diluída lentamente com meio RPMI sem SFB, seguindo cuidadosa cronometragem: 1mL em 30 segundos, 3 mL em 30 segundos, 16 mL em 60 segundos. Na seqüência adicionou-se meio RPMI ainda sem SFB, completando o volume para 50mL, deixando a suspensão celular em repouso durante 5 minutos. Em seguida as células foram centrifugadas durante 10 minutos e ressuspensas em 30mL de meio RPMI com SFB e centrifugadas novamente para a retirada de eventuais resíduos de PEG.

Finalmente as células foram ressuspensas em meio RPMI com 20% SFB e HAT no volume de 50 mL para a distribuição em 10 placas de cultura de 96 poços sobre FLM. As células foram mantidas em estufa 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>.

As placas permaneceram na estufa durante 7 dias sem nenhuma movimentação para serem observadas a partir do oitavo dia após a fusão, verificando-se a formação de colônias de híbridos. As placas foram observadas oito, nove e quatorze dias após a data da fusão.

### **3.11.3 Segundo experimento de fusão celular**

O segundo experimento de fusão celular utilizou camundongo imunizado mais jovem (seis meses), e que, além de imunizado através das vias intraperitoneal e intravenosa, sofreu produção de líquido ascítico. Para a produção dos hibridomas foram usadas células de mieloma de linhagem P3653 e Sp 2/0. Foi utilizado um agente de fusão celular PEG (PANREAC) (0,5g PEG, 0,7mL PBS, 50µL DMSO) de outro fornecedor, autoclavado (120°C durante 20 minutos) um dia antes da data do experimento de fusão e mantido em estufa 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%, até ser utilizado no experimento.

O protocolo utilizado essencialmente é o mesmo acima descrito (item 3.10.2) com algumas modificações. Foi montado um aparato diferente para a liberação das células do baço, que consistiu de em um Becker de 50 mL acoplado a uma tela metálica. A sangria para obtenção de soro policlonal foi feita via axilar anestesiando-se o camundongo com éter, seguido de seu sacrifício por deslocamento cervical. Antes de expor o peritônio o líquido ascítico previamente induzido nesta região foi coletado, centrifugado durante dez minutos, o coágulo formado foi retirado e o volume final foi dividido em duas partes de igual volume, sendo que a primeira parte foi mantida a 4°C e a segunda parte foi mantida a -20°C. O peritônio foi então exposto e o baço foi localizado e retirado. O órgão foi colocado em cima da tela metálica e com o auxílio de uma seringa e agulha estéreis foram injetados 5 mL de meio RPMI sem SFB, até que o órgão se apresentasse inchado e menos róseo. O órgão foi então picotado com uma tesoura estéril para ser então macerado com o auxílio de um êmbolo de seringa de vidro também estéril. Meio de cultivo foi constantemente adicionado durante estes procedimentos, de modo que as células do órgão foram liberadas e transferidas para o Becker onde a tela metálica estava apoiada e as frações membranosas do órgão ficaram retidas na superfície da tela metálica em questão. As células foram então contadas e divididas em duas partes iguais. A primeira parte foi transferida para tubo contendo células SP 2/0, enquanto a segunda parte foi transferida para tubo contendo células P3563. As suspensões formadas pelas células Sp2/0 + plasmócitos, bem como P3653 + plasmócitos, ambas na proporção de 1:5 (cinco vezes mais células esplênicas do que células de mieloma) sofreram os mesmos procedimentos de fusão citados no primeiro experimento, porém a taxa de adição do PEG foi feita como segue: 1mL em 60 segundos, 1,25mL em 15 segundos, 2,5mL em 30 segundos e 15,25 mL em 1 minuto. Após terem sido ressuspensas, as células foram centrifugadas e adicionadas de meio PRMI com

1% de SFB e HAT. Permaneceram em estufa em 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> durante uma hora, para então serem plaqueadas nas placas contendo FLM. Neste experimento as células foram observadas um dia após o experimento de fusão, sendo que três dias após esta data o meio de cultivo de células foi trocado, e uma semana após a fusão o meio de cultivo foi substituído por meio R10 adicionado de HT ao invés de HAT. O meio com HT foi trocado mais uma vez quinze dias após a fusão e três semanas após a fusão o meio de cultivo foi substituído por R10 apenas. Os poços da periferia da placa de 96 poços foram desprezados. Completou-se todos os poços desta área com água estéril e posteriormente com NaOH 1M.

#### **3.11.4 Terceiro experimento de fusão celular**

O terceiro experimento de fusão celular utilizou um animal que foi imunizado via intraperitoneal e intravenosa e células de mieloma da linhagem P3653 apenas. Como agente de fusão utilizou-se o PEG da marca ATCC, reconstituído conforme a proporção descrita no item 3.10.2 e autoclavado a 120°C durante 20 minutos um dia antes do experimento de fusão e mantido a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Momentos antes do início do experimento o pH do PEG estava 6,0, e foi ajustado para 7,2 com 22µL de NaOH 0,5M estéril. A proporção de células esplênicas para células de mieloma foi de 1:4, o tempo de adição do PEG foi o mesmo utilizado durante o segundo experimento de fusão. Este experimento preocupou-se em medir as rotações da centrífuga, que foi de 400g durante 10 minutos após a adição do PEG. O meio de cultivo adicionado antes de plaquear o experimento foi o PRMI 5% SFB e HAT. O experimento foi observado no segundo, sétimo, décimo - segundo e décimo - oitavo dias após a fusão.

	<b>Primeiro</b>	<b>Segundo</b>	<b>Terceiro</b>
<b>Células</b>	<b>P3653</b>	<b>P3653/Sp2/0</b>	<b>P3653</b>
<b>Baço</b>	<b>Diminuído e atrifiado</b>	<b>Sadio</b>	<b>Sadio</b>
<b>Extração de células do baço</b>	<b>Placa de Petri</b>	<b>Tela metálica + béquer</b>	<b>Tela metálica + béquer</b>
<b>Proporção células</b>	<b>1:4</b>	<b>1:5</b>	<b>1:5</b>
<b>PEG</b>	<b>ATCC</b>	<b>PANREAC Recém suspenso</b>	<b>ATCC Recém suspenso</b>
<b>Diluição em PEG</b>	<b>1mL 60 seg, 1,25mL 15 seg, 18mL, 90 seg.</b>	<b>1 mL 30 seg, 3 mL 30 seg, 16 mL 60 seg.</b>	<b>1mL 30 seg, 3 mL 30 seg, 16 mL 60 seg.</b>
<b>Repouso</b>	<b>90 seg/ 5 min</b>	<b>60seg/ 1 hora</b>	<b>90 seg/ 1 hora</b>
<b>Centrifugação</b>	<b>10 minutos</b>	<b>10 minutos</b>	<b>400g/10 minutos</b>
<b>Meio de cultivo</b>	<b>HAT + 5% SFB</b>	<b>HAT + 1% SFB</b>	<b>HAT + 5% SFB</b>
<b>Observação do experimento</b>	<b>9, 8 e 14 dias após o experimento</b>	<b>1, 3, 5, 7 12 e 21 dias após o experimento</b>	<b>3, 7, 12 e 18 dias após o experimento</b>
<b>Troca de meio de cultivo</b>	<b>8º dia HAT + 10% SFB</b>	<b>7º dia OPI + 10% SFB</b>	<b>7º dia HT</b>

Figura 2. Tabela de comparação entre os três experimentos realizados.



### 3.12 Produção de líquido ascítico

Para a produção de ascite (Harlow & Lane, 1988) foi injetado no camundongo 500µL de Pristane (Sigma), via intraperitoneal. Dez dias após esta aplicação injetou-se células Sp 2/0 também via intraperitoneal na concentração de  $10^6$  células em 200 µL. Cinco dias após a injeção das células de mieloma já foi possível observar o peritônio do animal crescer desenvolvendo líquido ascítico, sendo que quinze dias após esta injeção coletou-se 10mL de líquido ascítico. O líquido ascítico foi submetido a centrifugação (3000g durante 10 min) intensa durante dez minutos. Durante a centrifugação foi formado um coágulo que foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pinça estéril. O rendimento final de líquido ascítico foi de 7mL. Metade deste volume foi separada e mantida a 4°C e a outra metade foi separada e mantida a -20°C.

Experimentos posteriores utilizaram a célula do sarcoma TG 180, seguindo os mesmos procedimentos descritos acima. Duas semanas após a injeção de  $10^6$  células em 200 µL foi possível observar o desenvolvimento anormal do abdômen do animal, e o rendimento da produção de líquido ascítico foi significativamente maior. Foram coletados 14 mL de líquido ascítico, que também foi centrifugado e dividido em duas alíquotas, uma armazenada a 4°C e outra a -20°C.

### **3.13 Avaliação da resposta à produção de líquido ascítico nos camundongos nocaute.**

O líquido ascítico dos camundongos nocaute foi obtido 15 dias após a injeção de  $10^6$  células da linhagem de mieloma Sp 2/0 ou do Sarcoma 180. O ensaio imunoenzimático (ELISA, Engvall, 1980) foi empregado para a avaliação dos níveis de anticorpos dirigidos contra PrPc recombinante presente no líquido ascítico desses animais. A avaliação da resposta humoral foi feita como descrito no item 3.8. As diluições seriadas do líquido ascítico foram feitas em BSA 0,1% em PBS a partir da diluição 1:50.

### **3.14 SDS-PAGE**

O procedimento eletroforético em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) usou a concentração de acrilamida para o gel de separação de 12%. A acrilamida foi dissolvida em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, contendo 0,4% SDS e agentes catalisadores da polimerização. Para o gel de empilhamento foram usados 4% de acrilamida (Bio rad) em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, contendo 0,4% de SDS (Synth). Em ambos os géis, utilizou-se persulfato de amônio (Bio Rad) e N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina –TEMED (Pharmacia Biotech). A proteína recombinante utilizada neste experimento foi diluída em tampão de amostra redutor na proporção de 5:1, que contém Tris-HCl 62mM, pH 6,8, 0,2% de SDS, glicerol 10% (MERCK), azul de bromofenol 0,005% (Riedel) e  $\beta$ -mercaptoetanol 50mM (Sigma) (agente redutor). A mistura proteína recombinante/ tampão foi fervida durante 5-10 minutos.

A mistura proteína recombinante/tampão foi aplicada no gel acompanhada de marcador de massa molecular (Sigma), contendo tampão de amostra redutor. O marcador de massa

molecular é constituído de anidrase carbônica (29KDa), albumina bovina (66KDa). A separação eletroforética foi realizada em corrente de 15 mA até o momento da entrada das proteínas no gel de separação, em seguida a amperagem aplicada foi de 30 mA, para então ser mantida constante até que a frente de imigração atingisse o ânodo.

### **3.15 Ensaio de “Western Blotting”**

A proteína recombinante foi separada eletroforeticamente em gel de poliacrilamida a 12% contendo SDS (SDS-PAGE), e eletrotransferida em membranas de nitrocelulose (0,45 µm - Schleicher & Schuell, Alemanha) durante 16 horas (*overnight*) sob corrente constante de 25 v, não ultrapassando amperagem de 90 mA. A transferência foi feita no sistema de tanque em tampão de transferência (192 mM de glicina (Merck), 25 mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol). Verificou-se a eficácia da transferência usando-se corante Ponceau (2g/100mL) (Sigma).

As membranas foram então bloqueadas durante 2 horas com TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé) e incubadas com líquido ascítico em três concentrações diferentes. Utilizou-se o líquido ascítico gerado em um mesmo camundongo, porém armazenado sob duas condições diferentes de temperatura (4°C e -20°C). A diluição foi feita em tampão de bloqueio, e as membranas foram incubadas a 4°C durante 16 horas., Após 3 lavagens de 10 minutos com TBST, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Pharmingen), diluído 1:5000 em tampão de bloqueio, por 1 hora à temperatura ambiente. Após uma nova série de lavagens, as membranas foram reveladas com substrato adequado para reação

quimioluminescente (Amersham-Pharmacia). Um filme radiográfico (Kodak) foi exposto a membrana até obtenção do sinal adequado.

#### **4. Resultados**

No ensaio de seleção de lote de soro fetal bovino as placas foram verificadas sete dias após a sua semeadura. Os poços que continham baixo número de células (lado direito da placa) apresentaram um bom crescimento celular em geral, porém a diferença no crescimento entre as células de lotes diferentes foi bem nítido analisando-se a morfologia celular. Entre os lotes de soro fetal bovino utilizados neste ensaio, foi escolhido aquele que permitiu um melhor desenvolvimento das células de mieloma utilizadas. O ensaio deixou evidente também a grande diferença de sensibilidade entre as duas linhagens de células empregadas. A linhagem Sp 2/0 mostrou-se mais sensível ao conteúdo dos meios aos quais estavam expostas. Comparativamente as células Sp2/0 que melhor se desenvolveram não apresentaram morfologia e taxa de crescimento semelhantes às observadas para a linhagem P3653. Uma vez determinado o lote de soro fetal bovino que apresentou o melhor desenvolvimento celular, este foi empregado em todos os experimentos de produção e manutenção de hibridomas.

O primeiro experimento de fusão celular envolveu a preparação de dez placas de 96 poços contendo FLM. O animal nocaute para o gene que codifica a proteína PrPc que foi utilizado para o experimento de fusão apresentou um baço já retraído e aparentemente atrofiado, dispondo de um número pequeno de células quando removido e manipulado. Mesmo assim o experimento foi conduzido plaqueando-se as dez placas de 96 poços, com 100µL da suspensão de fusão em cada poço.

As placas foram verificadas no oitavo dia após o experimento de fusão, quando verificou-se estruturas filamentosas posteriormente identificadas como hifas fúngicas, detectadas em todas as placas. O experimento foi descartado.

Antes de planejar o segundo experimento de fusão, foi percebida uma mudança no aspecto das células P3653 usadas no primeiro experimento de fusão, situação esta que levou a suspeitar de contaminação por *Mycoplasma spp.*

Para a detecção e conseqüente confirmação da contaminação da cultura celular por *Mycoplasma spp* foi usado o ‘mycoplasma stain kit’ (Sigma Aldrich Company Ltd.). A observação pelo microscópio mostrou fluorescências filamentosas e particuladas ao redor do núcleo celular das células de linhagem P3653 suspeitas de carregar contaminação, o que sugere a contaminação das células por *Mycoplasma spp.*

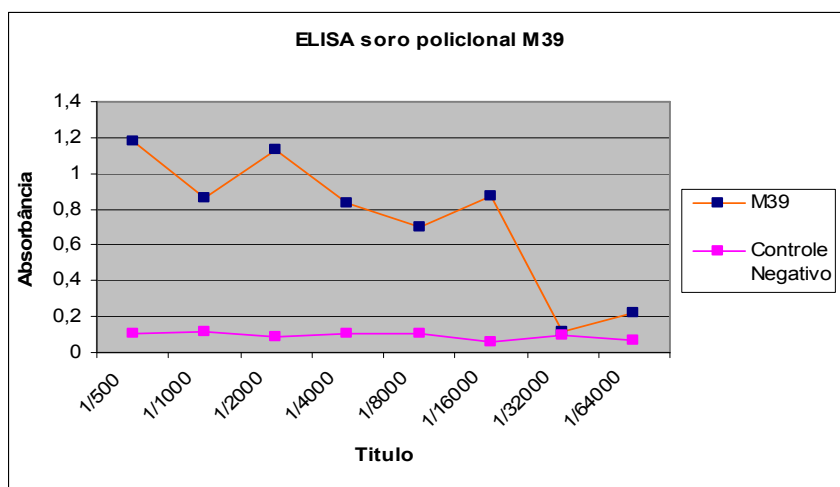
A mesma linhagem celular foi também submetida a teste de *Mycoplasma spp* empregando técnica de PCR com primers específicos para alguns tipos de *Mycoplasma spp* (não mostrado), experimento este que foi realizado em colaboração com o Laboratório de Genômica – Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, confirmando a presença do microrganismo contaminante da linhagem mielóide.

O segundo experimento de fusão empregou camundongos nocaute mais jovens na tentativa de obtenção de baços menos degenerados; bem como células de mieloma das linhagens Sp 2/0 e P3653. Foi utilizado PEG de outra marca ressuspenso pouco tempo antes do experimento de fusão.

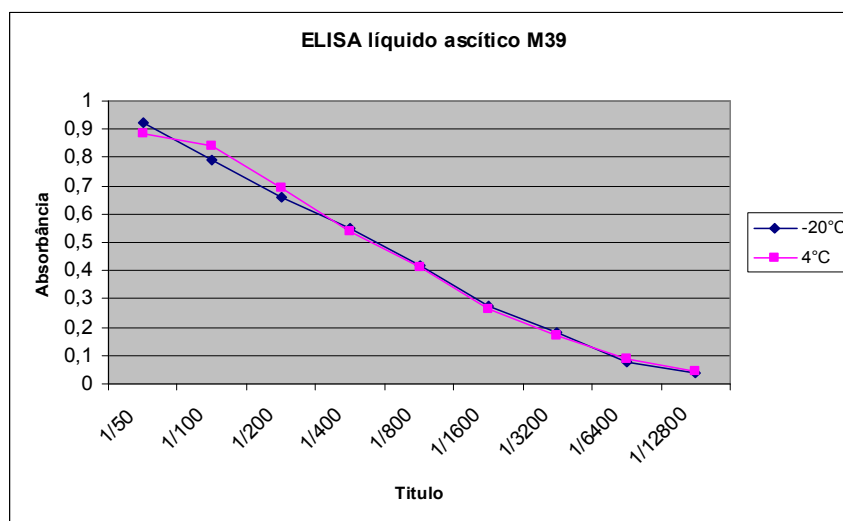
O protocolo para o experimento de fusão permaneceu o mesmo, com exceção de algumas etapas. O baço deste camundongo apresentou aspecto bastante saudável. A

verificação das placas de 96 poços mostrou algumas células vivas, porém ainda sem apresentar divisão celular (clones), tanto nas células originadas de células P3653 quanto nas células originadas de SP2/0. Alguns poços já apresentavam alguma contaminação com o mesmo material filamentosso identificado no experimento anterior, e tiveram seu conteúdo descartado com posterior adição de NaOH 5M. Duas semanas após o experimento as células tiveram seu meio trocado novamente, porém sem a adição de aminopterina. Neste período já não se encontravam mais células vivas como na semana anterior. Três semanas após o experimento de fusão as células tiveram o seu meio de cultivo trocado por meio COMPLETO, período este em que se observou contaminação bacteriana em alguns poços, que também foram esvaziados e preenchidos com NaOH 5M. As células permaneceram uma semana com este meio de cultivo, até que ele foi substituído pelo meio R10 adicionado de OPI (1,5g oxalacetato, 500mg piruvato de sódio e 2000 UI de insulina). A adição destes suplementos não foi eficiente em melhorar a qualidade da cultura, uma vez que não foi mais verificado crescimento e desenvolvimento celular nos poços. As placas foram descartadas seis semanas após o experimento de fusão celular.

O animal utilizado para este experimento foi o de numero 39, cujos soro policlonal e líquido ascítico foram testados através de ensaio de ELISA. O resultado do ensaio é apresentado nas figuras 3 e 4.



**Figura 3. Ensaio imunoenzimático do soro do animal M39 imunizado contra a proteína PrPc recombinante.** Curva típica de titulação do soro de animal nocaute PrPc<sup>-/-</sup> imunizado com rPrPc via intraperitoneal. Neste ensaio o soro do animal bruto é diluído serialmente e reagido com rPrPc imobilizado na placa de poliestireno. Cada ponto representa a média das absorbâncias à 490nm e são referentes ao soro do animal M39 utilizado no segundo experimento de fusão.

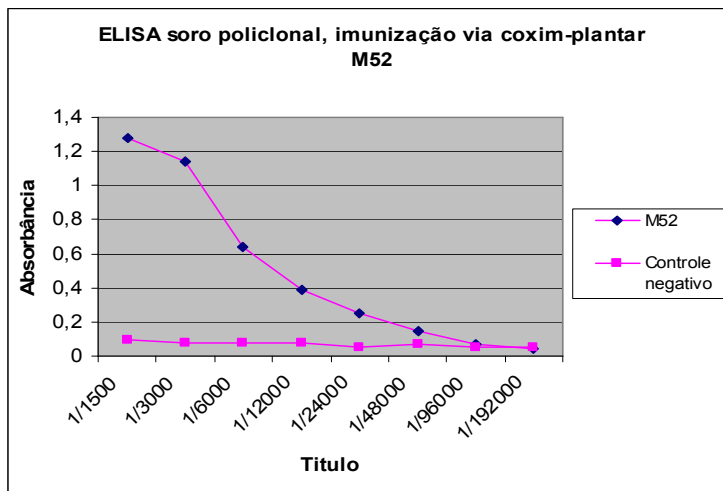


**Figura 4. Ensaio imunoenzimático do líquido ascítico do animal M39 imunizado contra a proteína PrPc recombinante e injetado com  $10^6$  células de linhagem SP 2/0.** Este ensaio avaliou a presença de anticorpos anti-PrPc no líquido ascítico de animais nocaute imunizados com PrPc recombinante e inoculados com  $10^6$  células de linhagem SP2/0. O ensaio também testou a capacidade do anticorpo anti-rPrPc de reconhecer o antígeno após o armazenamento do fluido ascítico sob refrigeração (4°C) e congelamento (-20°C). Pode ser observado que o reconhecimento antígeno-anticorpo não foi alterado após o seu armazenamento sob refrigeração ou congelamento.

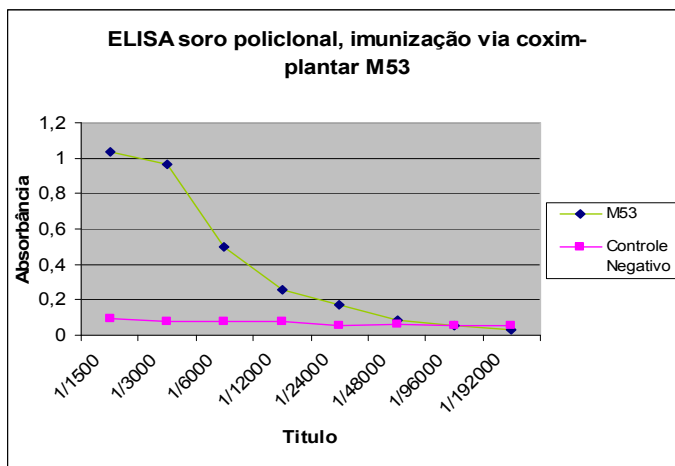


O terceiro experimento de fusão celular utilizou apenas células P3653. Após três dias da fusão o meio de cultivo foi trocado e foram observadas células vivas fusionadas. Após uma semana o meio de cultivo foi substituído por R10 com HT, e a quantidade de células vivas diminuiu bastante, até que no décimo dia não foi possível observar mais células vivas nos poços das placas de cultivo.

Alguns animais foram imunizados via coxim-plantar e os seus soros foram testados por ELISA. Os resultados da imunização pela via coxim-plantar são mostrados nas figuras 5 e 6.

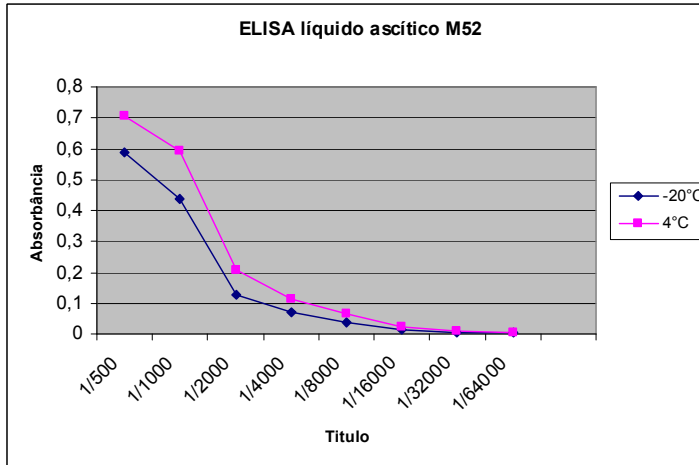


**Figura 5. Ensaio imunoenzimático do soro do animal M52 imunizado contra a proteína PrPc recombinante via coxim-plantar.** Curva típica de titulação do soro de animal nocaute PrPc<sup>-/-</sup> imunizado com rPrPc via coxim-plantar. Neste ensaio o soro do animal bruto é diluído serialmente e reagido com rPrPc imobilizado na placa de poliestireno. Cada ponto representa a média das absorbâncias à 490nm.



**Figura 6. Ensaio imunoenzimático do soro do animal M53 imunizado contra a proteína PrPc recombinante via coxim-plantar.** Curva típica de titulação do soro de animal nocaute PrPc<sup>-/-</sup> imunizado com rPrPc via coxim-plantar. Neste ensaio o soro do animal bruto é diluído serialmente e reagido com rPrPc imobilizado na placa de poliestireno. Cada ponto representa a média das absorbâncias à 490nm.

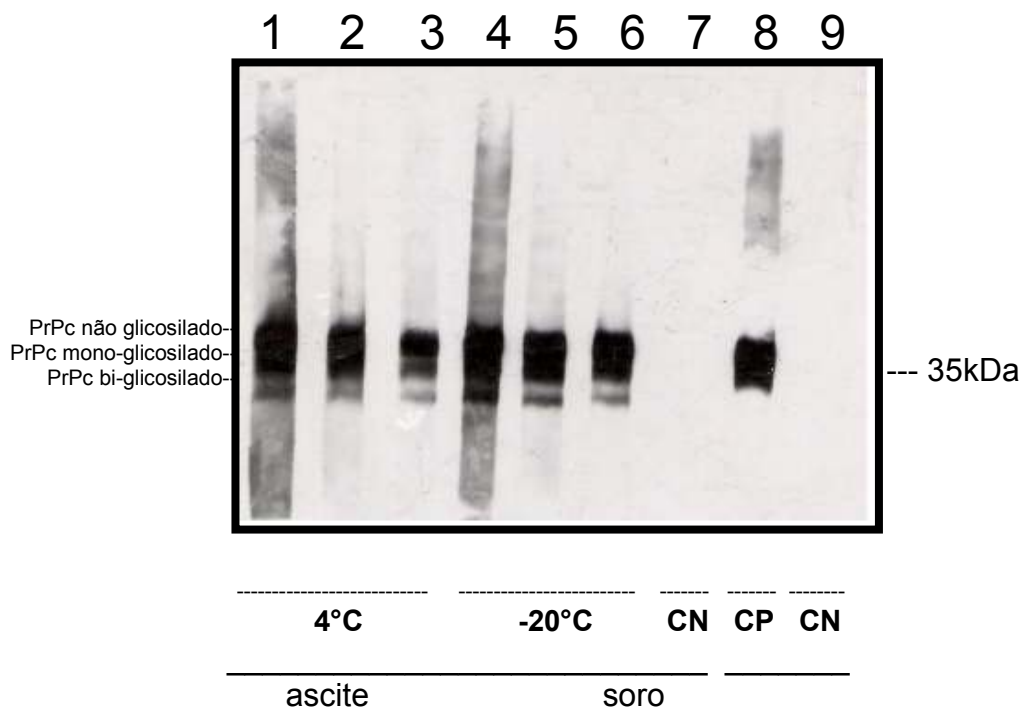
O líquido ascítico produzido por um dos camundongos (M52) inoculado com células do sarcoma 180 foi testado quanto a presença de anticorpos anti-rPrPc através do método de Elisa (figura7).



**Figura 7. Ensaio imunoenzimático do líquido ascítico do animal M52 imunizado contra a proteína PrPc recombinante e injetado com 10<sup>6</sup> células de linhagem sarcoma 180.** Este ensaio avaliou a presença de anticorpos anti-PrPc no líquido ascítico de animais nocaute imunizados com PrPc recombinante e inoculados com 10<sup>6</sup> células do sarcoma 180. O ensaio também testou a capacidade do anticorpo anti-rPrPc de reconhecer o antígeno após o armazenamento do fluido ascítico sob refrigeração (4°C) e congelamento (-20°C). Pode ser observado que o reconhecimento antígeno-anticorpo não foi alterado após o seu armazenamento sob refrigeração ou congelamento.

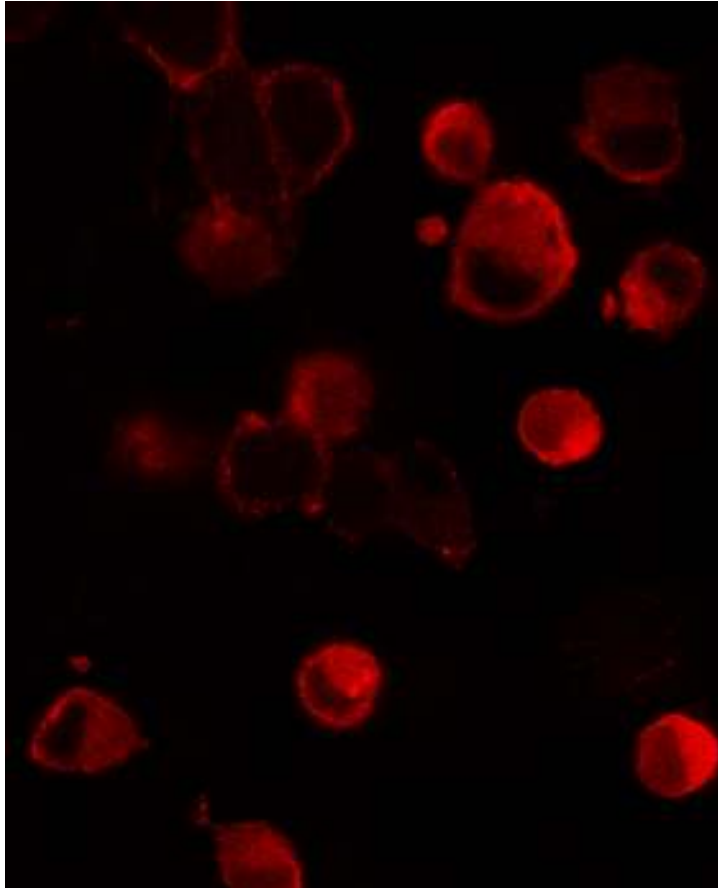
O líquido ascítico foi testado através de ensaio de Western Blotting, que avaliou a capacidade dos anticorpos no reconhecimento do PrPc expresso no sistema nervoso de camundongos. Neste tipo de ensaio o antígeno encontra-se parcialmente desnaturado diferindo assim do ensaio de Elisa, onde os antígenos normalmente encontram-se na forma nativa.

Material mantido sob duas condições de armazenamento (4°C e -20°C) foi testado em três diferentes diluições (figura 8).

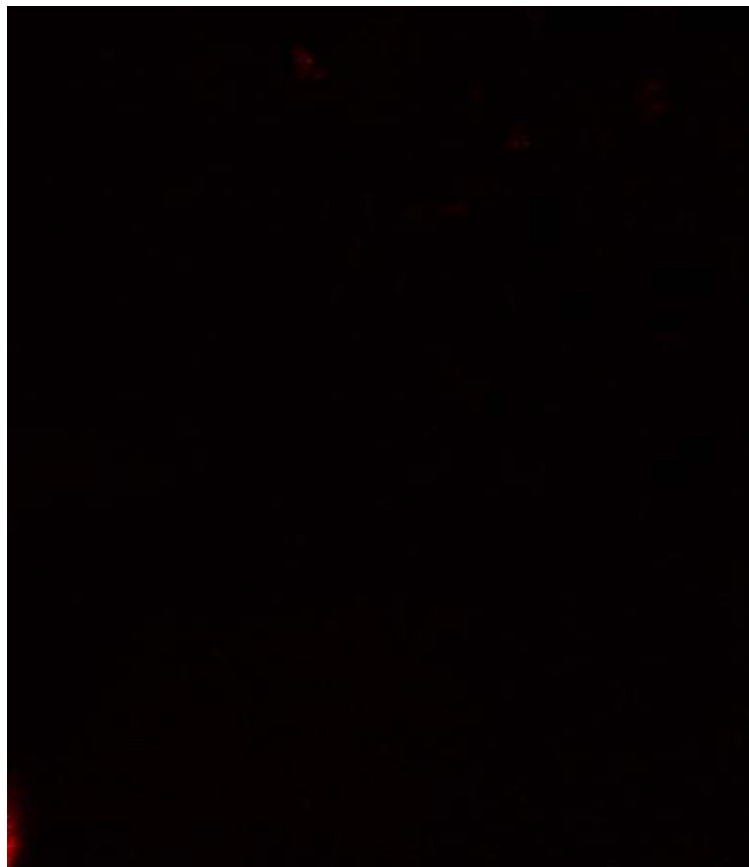


**Figura 8. Soro hiperimune e líquido ascítico contendo anticorpos anti-rPrPc se ligam ao PrPc produzido no SNC de camundongos.** Proteínas da fração de saturação 30% de sulfato de amônio de extrato de cérebro de camundongo ficam resolvidas eletroforéticamente (133µg/linha) em SDS-PAGE 12%, eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida a reação de Western Blotting. Líquido ascítico (nas diluições 1/500 nas colunas 1 e 4, 1/1000 nas colunas 2 e 5 e 1/2000 nas colunas 3 e 6) foi reagido com a membrana. Foi possível observar que os anticorpos presentes no líquido ascítico reconhecem fortemente as três isoformas de PrPc (bi, mono e não glicosilado). A reação possui alta especificidade uma vez que o soro policlonal (coluna 8, diluição 1/5000) reconheceu o mesmo perfil de moléculas e os controles negativos (coluna 7, líquido ascítico não imune, diluição 1/500 e coluna 9, soro não imune de camundongo, diluição 1/5000) não reagem com nenhuma molécula.

Para avaliar a localização celular do PrPc em células isoladas em cultura, bem como a distribuição deste antígeno em diversos tecidos, anticorpos específicos podem ser utilizados. Foram feitos ensaios de imunofluorescência indireta empregando anticorpos anti-rPrPc e células da linhagens de neuroblastoma N2A (figura 9).



**Figura 9. Anticorpos anti-PrPc reconhecem a proteína prion celular na superfície de células N2A.** Células da linhagem de neuroblastoma murino N2A foram cultivadas em câmaras montadas sobre lâminas de vidro (8 câmaras, Labteck, Nunc Co.) durante 2 dias. Após retirada do meio de cultura e fixação do material com solução 4% de paraformaldeído tamponado com fosfato as células foram incubadas com líquido ascítico na diluição 1/200 seguida da incubação com anticorpo secundário anti-Ig de camundongo acoplado a FITC. As lâminas foram montadas e seladas adequadamente e visualizadas sob microscópio confocal. Pode ser observado que o anticorpo reagiu com componentes presentes na membrana plasmática das células e o padrão de marcação puntiforme sugere que o antígeno esteja distribuído de forma irregular sobre a superfície celular. Tal observação é semelhante àquela já descrita na literatura para PrPc (Lee et al, 2001)



**Figura 10. Imunofluorescência indireta – controle negativo.** Células da linhagem de neuroblastoma murino N2A foram cultivadas em câmaras montadas sobre lâminas de vidro (8 câmaras, Labteck, Nunc Co.) durante 2 dias. Após retirada do meio de cultura e fixação do material com solução 4% de paraformaldeído tamponado com fosfato as células foram incubadas com líquido ascítico proveniente de animal não imunizado, na diluição 1/200 seguida da incubação com anticorpo secundário anti-Ig de camundongo acoplado a FITC. As lâminas foram montadas e seladas adequadamente e visualizadas sob microscópio confocal. A ausência de coloração mostra que não houve reação entre o reagente primário e as células em questão.

## 5. Discussão

A produção de anticorpos monoclonais se resume na fusão de células secretoras de anticorpos que não sobrevivem *in vitro* com células de tumor (mieloma), herdando desta sua imortalidade em cultivo. A célula secretora de anticorpos de escolha na maioria das vezes deriva do baço, podendo também vir dos linfonodos de drenagem. No início apenas células oriundas de murinos ou ratos eram empregadas, entretanto com o aumento no tipo de linhagens imortalizadas no mercado pode-se empregar plasmócitos de coelhos, eqüinos e bovinos. O custo mais baixo e a facilidade de manuseio de roedores menores fizeram deles a primeira escolha dos pesquisadores como fonte de linfócitos (Shepherd & Dean, 2000). Todas as linhagens de células de mieloma disponíveis para fusão são originadas de camundongos de linhagem BALB/c. Se o animal doador do baço não tiver origem na linhagem BALB/c, o hibridoma vai crescer apenas em híbridos F1 destes animais. A experiência tem indicado que quanto maior a distância filogenética entre os animais doadores de baço e a célula de mieloma, mais instáveis serão os híbridos resultantes da fusão (Goding, 1980).

Neste trabalho foram utilizados camundongos nocaute para o gene que codifica a proteína PrPc da linhagem CV129/C57. Uma vez que a proteína PrPc foi conservada entre os mamíferos, camundongos BALB/c imunizados com PrPc recombinante apresentariam pouca ou nenhuma resposta imune detectável, sendo que o sistema imunológico do animal reconheceria a proteína como própria e se limitaria a desenvolver resposta apenas aos epítomos não comuns à espécie. Adicionalmente uma provável ausência de resposta poderia ser observada, pois o PrPc recombinante empregado neste trabalho possui seqüência murina. Se houvesse uma possível produção de anticorpos pela cepa BALB-C seria para

epítomos protéicos que normalmente estariam glicosilados, uma vez que o antígeno empregado foi expresso em sistema recombinante de *E. coli*, o qual não produz modificações pós traducionais do tipo glicosilação.

Entre os fatores de decisão para o planejamento do experimento de fusão está a qualidade e força da resposta imune (Harlow & Lane, 1988). A alternativa encontrada para se obter uma resposta imune ideal para a execução do experimento de fusão foi usar animais nocaute, ou seja, que não expressam a proteína PrPc em seu organismo. Assim a proteína PrPc recombinante é reconhecida como não-própria e cada imunização estimula uma grande resposta imune contra a mesma.

A célula de mieloma de escolha inicial foi a célula P3653, derivada da cepa de camundongos BALB/C, deficiente em enzima HGPRT, uma vez que não existe linhagens mielóides da cepa CV129/C57 HGPRT -/-.

A fusão de células de mieloma portadoras da proteína PrPc com linfócitos de animais imunizados tem apresentado sucesso limitado quando se pretende isolar hibridomas que secretem anticorpos contra ela. Alguns trabalhos falharam ao estabelecer hibridomas estáveis, uma vez que as células paravam de secretar os anticorpos ou morriam dentro de um curto espaço de tempo depois de fusões de sucesso (Rubenstein *et al.*, 1999, Williamson *et al.*, 1996)

Uma linhagem de células que expresse baixos níveis da proteína PrPc seria uma ferramenta importante para futuras produções de anticorpos monoclonais contra a proteína PrPc. A análise do nível de expressão de PrPc em duas linhagens de células de mieloma (SP2/0 e P3653) mostraram que as células de linhagem SP2/0 apresentam uma expressão bastante baixa da proteína tanto em níveis de transcrição como em níveis de tradução quando comparadas com as células de linhagem P3653 (Kim *et al.*, 2003). Com isso, após

os primeiros experimentos de fusão mal sucedidos optou-se pela utilização da linhagem SP2/0 no lugar da P3653.

O ensaio para detecção de *Mycoplasma spp* deve fazer parte do planejamento da rotina de cultivo de células em todas as linhagens usadas no laboratório. O grupo de bactérias ao qual pertence é bastante diferente. Por não possuírem parede celular, podem atravessar as membranas de 0,22µm utilizadas para filtrar os meios de cultivo. A contaminação por este agente, considerados por alguns como indesejáveis porém inevitáveis (Coronato et al, 1994), não causa mudança no pH ou turbidez no meio de cultivo, fazendo com que sua infecção seja imperceptível a olho nu (Harlow & Lane, 1988).

O experimento de detecção de *Mycoplasma spp* mostrou resultado positivo para a infecção desta, conforme descrito previamente. O tratamento para este tipo de contaminação consiste no uso de substâncias como tetraciclina, quinolonas, macrolídeos e aminoglicosídeos. Porém qualquer tratamento antibiótico de células contaminadas deve ser cuidadosamente considerado, uma vez que a presença contínua do composto é citotóxica e induz ao aparecimento de formas resistentes de *Mycoplasma spp*.

Experimentos que usem células contaminadas podem trazer resultados não reprodutíveis e não confiáveis, uma vez que o *Mycoplasma spp* tem a capacidade de causar mudanças no metabolismo das células, alterações em seu cariótipo além de retardar seu crescimento em cultura (Harlow & Lane, 1988). A instabilidade causada pelo agente de fusão durante o experimento é o responsável pela característica delicada dos hibridomas a serem formados. Assim, o uso de antibióticos para o tratamento desta infecção foi desconsiderado e as células infectadas foram inutilizadas.

Outro fator de grande influência no sucesso do experimento de fusão é o Soro Fetal Bovino (SFB). Importante constituinte dos meios de cultivo celular, o SFB pode apresentar



constituintes séricos tóxicos responsáveis pela morte celular dos hibridomas formados durante o experimento de fusão, uma vez que estas células ficam expostas a reagentes causadores de instabilidade de membrana celular (Goding, J.M., 1980). Tipicamente, apenas um a cada cinco lotes de soro fetal bovino é bom o suficiente para auxiliar no desenvolvimento de hibridomas. Os constituintes que distinguem bons lotes dos ruins são desconhecidos. (Harlow & Lane, 1988). Além de determinar o lote de SFB a ser utilizado nos experimentos de fusão bem como em todos os experimentos relacionados ao propósito deste trabalho, o ensaio de seleção de lote de soro fetal bovino evidenciou ainda uma taxa de crescimento diferenciada entre as duas linhagens de mieloma empregadas neste trabalho. As células se encontravam dispostas em diluição seriada, sendo que inicialmente os primeiros poços continham maior quantidade de células ( $5 \times 10^5$  células/poço) e os últimos poços continham uma quantidade bem pequena de células (5 a 10 células/poço). Os primeiros poços apresentaram morte celular verificada sete dias após a realização do experimento, entre as duas linhagens de células. Os quatro últimos poços das placas serviram de referência para a avaliação do melhor lote de soro capaz de dar suporte ao crescimento celular em baixa densidade. As células Sp2/0 se mostraram bastante frágeis, apresentando membranas celulares irregulares e bastante granulação em seu citoplasma, seguidas de rápida morte celular. A fragilidade não é uma característica comum a esta linhagem de mieloma, o que leva a acreditar em uma possível contaminação desta linhagem por *Mycoplasma spp.* As células P3653 não apresentavam tanta irregularidade em suas membranas celulares, e no final do ensaio (14 dias após sua execução) apresentaram menor quantidade de células mortas que as células SP2/0. O lote que apresentou menor quantidade de células mortas, ou de células com granulação e membranas irregulares foi o lote de SFB de escolha. Devido à subjetividade da análise qualitativa, duas pessoas fizeram a

observação e avaliação das placas separadamente de forma a produzir os mesmos resultados de forma independente.

Algumas culturas de fibroblastos secretam os fatores necessários ao crescimento do hibridoma em cultivo de baixa densidade (Harlow & Lane, 1988). Recebendo os estímulos apropriados *in vitro*, os macrófagos secretam moléculas efetoras liberadas diretamente no meio de cultivo celular. Estes produtos de secreção altamente potentes podem ativar a função linfocitária (Shepherd & Dean, 2000). As culturas de hibridomas formadas após a fusão e que continham macrófagos ativos se mostraram mais limpas, sem apresentar debris celulares antes da primeira semana e os macrófagos sobreviveram até o final do experimento. Apesar de trazerem benefícios para a produção de hibridomas, o protocolo de produção de camadas de macrófagos (FLM) requer bastante atenção. Uma vez que é produzido de 2-3 dias antes do experimento de fusão, pode ser o foco de muitas contaminações (e.g. fungos e bactérias) enquanto ‘aguarda’ o recebimento dos hibridomas.

O primeiro experimento de fusão deste trabalho tinha como objetivo a familiarização com as técnicas de produção de hibridomas. O baço bastante atrofiado encontrado no animal hiperimune nos foi relacionado à avançada idade do animal utilizado, sendo que depois deste experimento começou-se a imunizar apenas animais adultos-jovens. Para evitar que as células recém fusionadas e conseqüentemente bastante sensíveis sofressem com mudanças bruscas de temperatura e ambiente, as placas foram manipuladas apenas oito dias após o experimento de fusão. Durante esta primeira verificação foi constatado que o meio estava com características bastante diferentes das características normais (mudança de pH e coloração), e que tamanha espera para se trocar o meio de cultivo poderia não ser sadia para as células, acarretando mudanças no protocolo inicial.

Na primeira observação ao microscópio algumas placas apresentaram hifas após uma semana da execução do experimento. É suposto que as placas foram contaminadas com fungo durante o processo de obtenção de FLM. Foram analisadas todas as possíveis fontes de contaminação durante o processo de produção de FLM, acarretando a modificação de algumas etapas do processo de produção deste. Pipetas Pasteur estéreis foram substituídas por seringa (5 ou 10 mL) e agulha estéreis para a introdução da solução gelada de glicose 0,34M (Sigma) no abdômem e extração da mesma contendo os macrófagos, além de se observar com maior atenção alguns passos críticos para possível contaminação desta solução.

Depois do primeiro experimento de fusão, com a detecção de *Mycoplasma spp* na linhagem P3653 de mieloma utilizada, o laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan de São Paulo foi contactado e visitado, sob a supervisão da Profª Drª Irene Fernandes, onde se acompanhou um experimento de fusão em todas as suas etapas. A troca de informações levou este trabalho a experimentar variações no protocolo de fusão, aplicados no segundo experimento de fusão deste trabalho.

O segundo experimento de fusão utilizou duas linhagens diferentes de mieloma, a linhagem P3653 e SP2/0, simultaneamente; ambas testadas e confirmadas livres de *Mycoplasma spp*. Sabendo que a linhagem Sp2/0 é mais sensível às variações do ambiente de cultivo, esta sofreu fusão antes das células P3653, porém em experimentos simultâneos.

O PEG utilizado no primeiro experimento havia sido ressuspenso cerca de seis meses antes do primeiro experimento de fusão. O PEG utilizado neste experimento foi ressuspenso e autoclavado no dia que precedeu o experimento, permanecendo em estufa de 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até sua utilização.

O aparato descrito utilizado para a liberação das células do baço otimizou esta tarefa, verificando-se menos estruturas membranosas do órgão ao centrifugar a contar as células.

O tempo de exposição ao PEG foi o mesmo, porém o tempo destinado à sua diluição diminuiu, uma vez que exposições prolongadas ao PEG não aumentam a eficiência da fusão, podendo diminuí-la (Langone et al, 1986).

Ao contrario do que se observou no primeiro experimento de fusão, neste foram observadas células fusiformes logo após o experimento, e em formato semelhante às células de mieloma e vivas até o décimo dia. Neste período o meio foi trocado duas vezes, apresentando-se com coloração e pH modificados antes da troca, indicando que o meio estava sendo utilizado por células vivas. Porém nenhuma célula foi observada após o décimo dia e o meio de cultivo não mais indicava estar sendo utilizado por células vivas. Adicionou-se OPI, um aditivo que auxilia o crescimento de hibridomas em baixa densidade (Harlow et al, 1988), com o intuito de fornecer mais fatores para as células, porém não foi eficiente em fazer as células sobreviverem.

Percebeu-se que a fusão celular aconteceu, porem as células formadas não conseguiram sobreviver por mais que dez dias.

O terceiro experimento de fusão utilizou PEG de peso molecular conhecido (3000-3700) da marca ATCC, também ressuspense do dia que precedeu o experimento. Ajustar o pH do PEG para 7,0 aumenta a eficiência da fusão. Com isto o pH do PEG ressuspense foi equilibrado para 7,0 com solução de NaOH. A centrifugação após a exposição ao agente de fusão foi controlada para 400g em 15 minutos. Novamente foram observadas células em desenvolvimento até o oitavo dia após a fusão. Depois deste período não se observou nenhuma célula em placa alguma.

O repetido aparecimento de estruturas filamentosas posteriormente identificadas como hifas fúngicas mesmo após a revisão e modificação na técnica de produção de FLM leva a crer que a contaminação fúngica esteja dentro do fluxo laminar.

O PEG funde a membrana citoplasmática de mieloma e/ou linfócitos vizinhos, formando uma única célula com dois ou mais núcleos. Este heterocácion retém estes núcleos até a membrana nuclear se dissolva durante a mitose. Durante a mitose e o episódios seguintes de divisão celular, os cromossomos individuais são segregados em células filhas. Devido ao número anormal de cromossomos, a segregação nem sempre resulta em conjuntos de cromossomos iguais para cada célula filha, e alguns cromossomos podem ser perdidos. Caso um dos cromossomos que carrega uma sequência para uma imunoglobulina rearranjada se perca, a produção de anticorpos cessa (Harlow & Lane, 1988). Alguns pesquisadores falharam em estabelecer hibridomas que secretem anticorpos monoclonais contra a proteína PrPc, quando em suas tentativas de fusão utilizaram linfócitos de animais nocaute imunizados com PrPc recombinante de camundongo e células de mieloma disponíveis comercialmente (Rubenstein *et al.*, 1999; Williamson *et al.*, 1996). Durante esta instabilidade de núcleos e cromossomos nas células, acredita-se que os hibridomas reconhecem o PrPc como proteína própria, uma vez que se trata de uma proteína de superfície de membrana celular inclusive das células de mieloma que fazem parte de sua origem. Por não se permitirem secretar anticorpos contra uma proteína própria da célula a morte celular se verificaria. Mais estudos extensivos sobre a expressão de PrPc em linhagens de células de mieloma deveriam ser feitos para fornecer maior apoio na correlação da presença de PrPc de superfície de membrana com a habilidade de gerar anticorpos monoclonais contra esta proteína (Kim *et al.*, 2003).

O efeito de anticorpos específicos em atividades celulares é exemplificado em estudos onde a presença de anticorpos contra o PrPc inibiu a proliferação ou ativação de linfócitos induzidas por mitose. (Cashman *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2001). Seguindo o mesmo raciocínio, as mesmas células podem estar secretando produtos que provoquem sua morte, através da ligação do anticorpo secretado ao antígeno PrPc de interesse, inviabilizando o desenvolvimento e divisão celular.

Na tentativa de comprovar tal hipótese, foram coletadas alíquotas do conteúdo dos poços onde os hibridomas foram observados, as quais foram testadas para a verificação de presença do anticorpo em questão neste meio. Uma vez executado (não mostrado), tal experimento não mostrou presença significativa de anticorpos nos poços onde os hibridomas foram distribuídos através do método empregado (ELISA). Com isso se percebe que, mesmo sobrevivendo durante dez dias, as células não chegaram a secretar o anticorpo que este trabalho procurou produzir.

De qualquer forma, o efeito da ligação do anticorpo com a superfície da membrana celular onde a proteína se encontra pode não ser crítico para a viabilidade dos hibridomas. Li *et al.* (2001) sugere que a inibição da ativação de linfócitos por anticorpos anti-PrPc específicos é dependente do epítipo onde o anticorpo monoclonal reage. Trabalhos apresentados pelos mesmos autores mostram que a inibição foi mais significativa com anticorpos contra a porção C terminal – onde a proteína se liga à superfície - do que com anticorpos contra a porção N terminal da proteína PrPc.

Na literatura encontrou-se apenas um relato de produção de anticorpos monoclonais contra a proteína PrPc utilizando-se células da linhagem P3653 como parte da origem dos hibridomas (Krasemann *et al.*, 1996). Tal experimento produziu anticorpos contra PrPc de várias espécies, incluindo a murina. Uma das explicações possíveis para este fato é que as

células P3653 utilizadas no experimento podem ter níveis diferentes de PrPc em suas membranas, considerando-se o tempo que a célula permaneceu em cultivo celular. Kim *et al.*, 2003 percebeu em seus experimentos de quantificação de proteína PrPc na superfície da membrana celular que a célula Sp2/0 por eles utilizada apresentava menor quantidade de PrPc quando comparou os resultados obtidos com células P3653 provenientes da ATCC. Atribuiu-se tal achado ao tempo de subcultivo em que a célula permaneceu sendo manipulada.

A literatura também aconselha a escolha de animais de mesma linhagem para a obtenção de anticorpos monoclonais. A experiência indica que quanto maior for a distância filogenética entre o doador do baço/linfonodo e as células de mieloma, mais instável serão os híbridos resultantes do experimento (Goding, 1980). O camundongo nocaute para PrPc utilizado como doador do baço e as células de mieloma utilizadas no experimento não derivam da mesma linhagem, o que pode também justificar a instabilidade dos hibridomas formados.

De acordo com os fatos discutidos acima, o desenvolvimento induzido de mieloma em camundongos nocaute e posterior estabelecimento de cultura primária destas células para a sua utilização em experimentos de fusão celular seria bastante interessante. Além de tratarem-se de células de mesma linhagem, mais propícias a desenvolver resultados positivos e estáveis (St. Groth et al, 1980), tais células poderiam servir como ferramentas para se elucidar a função da proteína PrPc.

Além de utilizar o baço como fonte para as células secretoras de anticorpos, existe a possibilidade de se utilizar também os linfonodos de drenagem. Esta abordagem utiliza a imunização via coxim-plantar, com a mesma quantidade de proteína utilizada na imunização intraperitoneal. A proteína injetada provocará um aumento nos linfonodos

poplíteos, deixando-os visíveis para sua extração. A extração do linfonodo parece bem mais simples, e o órgão não apresenta uma grande interferência de outros tipos celulares encontradas no baço quando este é utilizado.

Camundongos nocaute foram imunizados via coxim-plantar e seus soros foram testados através de ELISA. Os resultados obtidos são semelhantes aos resultados obtidos pela imunização intraperitoneal. Por impedimentos técnicos não foi possível proceder com o experimento de fusão que utiliza do linfonodo para a produção dos hibridomas.

Com o intuito de aumentar o rendimento dos materiais biológicos produzidos pelos animais nocaute, uma vez que são animais raros, decidimos implementar a produção de líquido ascítico. O líquido ascítico é um líquido transudato do plasma que ocupa a cavidade peritoneal, trazendo consigo uma quantidade variada de células, bactérias, proteínas e outras substâncias. Pode ser provocado por irritação do peritônio e normalmente está associado a doenças tumorais. Este fluido contém aproximadamente o mesmo nível de anticorpos específicos que o soro do animal. Sua indução deve coincidir com a presença de altos níveis de produção de anticorpos, e se dá injetando células de mieloma no peritônio do animal dez dias após a injeção intraperitoneal de pristane (ácido 2,6,10,14-tetrametildecanoico) (Harlow et al, 1988).

O experimento de produção de líquido ascítico cumpriu seu objetivo e grandes quantidades de anticorpos policlonais contra a proteína PrPc foram obtidos. Inicialmente o ascite foi induzido com células SP2/0.

Para a obtenção de maior quantidade de líquido ascítico foram injetadas  $10^6$  células de uma outra linhagem celular denominada sarcoma 180, gentilmente cedida pela Dra. Claudia N. Duarte dos Santos, do Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Também após uma semana da injeção de pristane o camundongo M46 foi injetado com  $10^6$  células via



intraperitoneal. Uma semana depois da injeção das células o camundongo apresentava um abdome muito deformado, com grande quantidade de líquido ascítico. Foram extraídos 14 mL de líquido ascítico deste animal. A produção de líquido ascítico mostrou-se bastante favorável para obtenção de grandes quantidades de anticorpos contra a proteína de interesse. Alguns trabalhos mostram que depois de extraídos, dependendo da maneira como são armazenados, os anticorpos podem desnaturar e em pouco tempo não se verifica mais a grande quantidade de anticorpos verificada no início.

Para quantificar a presença de anticorpos anti-PrPc, bem como verificar a eficiência dos diferentes métodos de manutenção dos líquidos, estes foram submetidos a ensaios de ELISA. Os resultados são semelhantes aos resultados obtidos com soro policlonal, não se verificando diferenças entre os métodos de manutenção do líquido.

Foram obtidos soro policlonal e líquido ascítico induzido pelas células do sarcoma TG 180 de um mesmo animal. Tanto o soro policlonal como o líquido ascítico foram testados através de ELISA e Western Blotting, sendo que para o líquido ascítico as duas condições de armazenamento foram avaliadas.

Como pode ser observado, o soro policlonal hiperimune apresentou um título ligeiramente maior que o líquido ascítico. Isso pode ser explicado pelos volumes relativos do fluido biológico que é tipicamente coletado. Enquanto o soro é obtido por sangramento de no máximo 500µL de sangue, o ascite é obtido diretamente de punção da cavidade intraperitoneal, normalmente repleta de fluido ascítico. Assim os anticorpos do soro provavelmente estão maior concentração enquanto que no ascite encontram-se mais diluídos. Além disso o líquido ascítico que permaneceu congelado manteve suas propriedades semelhantes àquelas observadas na amostra armazenada a 4°C.

Este fato é de grande importância uma vez que muitos anticorpos perdem sua atividade após serem congelados ou são co-precipitados com crioproteínas.

O ensaio de Western Blotting apresentou resultados semelhantes aos obtidos por ELISA, ou seja, mostra que tanto o líquido ascítico mantido a 4°C quanto o líquido ascítico mantido a -20°C são fortemente reativos à proteína PrPc. Entretanto no ensaio de Western foi possível mostrar que os anticorpos gerados contra a molécula recombinante reconhecem a proteína prion celular expressa por células do cérebro do camundongo na sua forma desnaturada. Tal fato sugere que os epítomos reconhecidos pelos anticorpos não disponham de modificações pós traducionais importantes, uma vez que o antígeno recombinante é destituído de várias modificações desta natureza (e.g. glicosilação) por ser oriundo de *E. coli*. A capacidade de reconhecimento do PrPc parcialmente desnaturado no ensaio de imunofluorescência mostrou também que os reagentes produzidos também são úteis no estudo da localização sub-celular do PrPc e abre a possibilidade de sua utilização no diagnóstico de ecefalopatas. Neste caso o anticorpo poderia se ligar a estruturas amielóides onde o PrPc se deposita anormalmente na forma de PrPsc.

Há um fator bastante promissor dentro da produção de anticorpos monoclonais, descrito recentemente. Trata-se da utilização de camundongos portadores de ‘células imortais’, ou o immortomouse, que dispensa a necessidade de hibridomas. Células B derivadas de camundongos transgênicos portadores de um antígeno mutante sensível à temperatura advindo do vírus simio 40, sob o controle de um promotor de histocompatibilidade murino, são condicionalmente imortais a temperaturas permissíveis e produzem anticorpos (Pasqualini *et al.*, 2003) A produção de anticorpos monoclonais necessita herdar a imortalidade das células de mieloma, uma vez que não sobrevivem *in*

*vitro* sozinhas. As células do baço destas linhagem de camundongos sobrevivem *in vitro*, porém a 33°C, não havendo a necessidade de se herdar imortalidade de mielomas.

Nesta abordagem, camundongos  $H-2K^b$ -tsA58 (Charles River Breeding Laboratories) foram imunizados com fagos filamentosos fd-tet através das vias intradérmica e subcutânea. Depois de sacrificado, seus baços foram coletados, as células foram liberadas através de pressão gentil nos órgãos e ressuspensas em meio de cultivo de hibridomas, sendo distribuídas para placas de 6, 24 e 96 poços. Nos dois meses subsequentes os poços que possuíam clones foram subclonados, sempre mantendo a cultura de células a 33°C. Os sobrenadantes dos poços foram testados através do ensaio de ELISA e Western Blotting contra fagos filamentosos e sua proteína de capsídeo recombinante pIII. Os resultados obtidos fazem concluir que as células B de camundongos  $H-2K^b$ -tsA58 transgênicos podem dar origem a altos títulos de IgG contra antígenos diversos. Este cultivo celular garante uma fonte confiável e reprodutível de anticorpos monoclonais, eliminando a necessidade de produção de hibridomas. As células deste animal são estáveis por ao menos 7 meses, toleram diluições limitantes e sobrevivem ao congelamento e descongelamento sem a perda ou inativação da produção de anticorpos (Pasqualini *et al.*, 2003).

No caso particular de produção de células secretoras de anticorpos anti-PrPc poderia ser obtido um animal duplo transgênico a partir do cruzamento sucessivo das linhagens  $H-2K^b$ -tsA58 e PrPc-/-CV125/C57.

Apesar de não ter sido possível a obtenção de anticorpos monoclonais, como era a intenção inicial deste trabalho, foi possível aliar a técnica de produção de anticorpos policlonais em animais geneticamente modificados com a produção de líquido ascítico em resposta ao crescimento tumoral.

Estas duas metodologias em associação permitiu que grandes quantidades de um reagente muito precioso e específico fosse produzido em camundongos.

Tal reagente está sendo largamente utilizado pelo grupo de Neurobiologia de prions e pretende-se avaliar a capacidade deste reagente ser empregado como ferramenta associada ao diagnóstico de encefalopatias priônicas.

## 6. Conclusão

- A utilização de animais nocaute para um determinado gene mostra-se como importante ferramenta na produção de anticorpos monoclonais e policlonais, uma vez que apresenta uma resposta imunológica bastante intensa ao antígeno.
- Anticorpos policlonais derivados do soro ou líquido ascítico de camundongos produzidos com antígeno recombinante rPrPc reconhecem o PrPc endógeno expresso no cérebro de camundongos.
- O líquido ascítico contendo os anticorpos policlonais produzidos neste trabalho podem ser armazenados a 4°C ou -20 °C, não causando inativação e/ou precipitação dos anticorpos.
- A produção de líquido ascítico fornece uma quantidade maior de anticorpos, porém bastante diluídos no volume extraído.

## *Referências*

ADAMS, D. H.; HUBSCHER, S. G.; SHAW, J.; ROTHLEIN, S. G.; NEUBERGER, J. M. Intercellular adhesion molecule 1 on live allografts during rejection. **Lancet**, 1:1122-1125, 1989.

AGUZZI, A. Between cows and monkeys. **Nature** v.381, p.734-735, 1996.

AGUZZI, A.; GLATZEL, M.; MONTRASIO, R.; PRINZ, M.; HEPPNER, F. L. **Nature Neuroscience** v.2, p.745-749, 2001.

BARRY, R.A.; OESCH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; GROTH, D.F.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B.; WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell** v.46, p.417-428, 1986.

BIRTLES, R. J.; HARRINSON, T. G.; SAMUEE, D.; TAYLOR, A. G Evaluation of urinary antigen ELISA for diagnosis Legionella pneumophilla serogroup 1 infection. **J. of Clin. Pathology**, 43:685-690, 1990.

BRANDNER, S.; RAEBER, A.; SAILER, A.; BLATTLER, T.; FISCHER, M.; WEISSMANN, C.; AGUZZI, A. **Proc Natl Acad Sci** v.93, p. 13148 – 13151, 1996.

BRETANI, R.R. Biological implications of complementary hydrophathy of aminoacids. **J Theor Biol.** V.135, p.495-499, 1990.

BROWN, D. R.; QIN, K.; HERMS, J. W.; MADLUNG, A.; MANSON, J.; STROME, R.; FRASER, P. E.; KRUCK, T.; VON BOHLEN, A. **Nature** v. 390, p. 684-687, 1997.

BÜELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, R. A.; AUTENRIED, P.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Mice devoided of PrP are resistant to scrapie **Cell** v.73, p.1339-47, 1993.

BÜELER H.; FISCHER M.; LANG Y.; BLUETHMANN H.; LIPP H.P.; DEARMOND S.J.; PRUSINER S.B.; AGUET M.; WEISSMANN C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** v.356, p.577-582,. 1992.

BUTLER, D. BSE Maternal transmission results may be released soon. **Nature** v.38, p.724, 1996.

CARNEIRO, C.R.; LOPES, J.D. Surface antigen detected by a S. Mansoni monoclonal antibody in worm extracts and kidney deposits of infected mice hamsters. **Infect. Immun** v.52, p. 230-235, 1986

CARNEIRO, C.R.; LOPES, J.D.; BRENTANI, M. M. Carcinoembryonic antigen (CEA): production of immunoprecipitating monoclonal antibodies and development of na enzyme immunoessay **Hybridoma** v. 6(6), p.689-692, 1987

CARNEIRO, C.R.W. Hybridoma Technology in XIV UICC Training course in Cancer Research – Ludwig Institute od Cancer Research, Sao Paulo, 1984.

CHIARINI, L.B.; FREITAS, A.R.O.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals, **EMBO Journal**, v.21, p. 3317-3326, 2002.

COITINHO, A.S.; ROESLER, R.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R.; IZQUIERDO, I. Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. **Neuroreport**. V.14 p.1375-1379.2003

CORONATO, S.; VULLO, D.; COTO, C.E. A simple method to eliminate mycoplasma from cell cultures. **J Virological Methods** v. 46, p. 85-94, 1994.

DISPENZIERI A. ; KYLE R. A. Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy **Best Pract Res Clin Haematol.** V.18:553-68, 2005.

GAJDUSEK, D.C. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. **Science.** v.197, p.943-960, 1977.

GASPARINI, M.; RIPAMONTI, M.; SEREGNI, E.; REGALIA, E. BURAGGI, G. L. Tumor imagino f colo-rectal carcinoma with anti-CEA monoclonal antibody Int.J. Cancer Suppl v. 2, p. 81-84, 1988

GASSET, M.; BALDWIN, M.A.; LLOYD, D.H.; GABRIEL, J.M.; HOLTZMAN, F.C.; COHEN, F.; FLETTERICK, R.; PRUSINER, S.B. Predicted alfa-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. **Proc Natl Acad Sci USA.**v.89, p.10940-10944, 1992.

GAULTON, G. N.; CO, M. S.; ROYER H. D.; GREENE, M.I. Anti-idiotypic antibodies as probes of cell surface receptors. **Mol. Cell. Biochem.**, 65:5-21, 1985.

GODING, J.M. Antibody production by hibridomas (review article) **J. Immunol. Meth.** V.39, p. 258-308, 1980

GRANER E.; MERCADANTE, A. F.; ZANATA, S. M.; FORLENZA, O. V.; CABRAL, A. L. B.; VEIGA, S. S.; JULIANO, M. A.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINETTI, A.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R; BRENTANI, R. R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain. Res. Mol. Brain. Res.** v.76, p. 85-92, 2000a.



GRANER, E.; MERCADANTE, A. F.; ZANATA, S. M.; MARTINS, V. R.; JAY, D. G.; BRENTANI, R. R. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Lett** v.482, p. 257-60, 2000b.

HALL, P. A.; WOODS, A. L. Immunohistological markers of cell proliferation. **Cell and Tissue Kinetics**, 23:531-549, 1990.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies, a laboratory annual, **CSH Press**, 1988.

HOFFMANN, K.; WONIGEIT, K.; STEINHOFF, G.; BEHREND, M.; HERZBECK, H.; FLAD, H. D.; PILCHAYR, R. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in rejection human liver allografts. **Transplantation Proc.**, 23:1421-1423, 1991.

KOLBERG, J.; BLANCHARD D. A mouse monoclonal antibody against glycophorin produced by in vitro stimulation with human red cell membranes. **Immunol. Lett.**, 30:87-91, 1991.

KIM, J.; KUIZON, S.; RUBENSTEIN, R. Comparison of PrP transcription and translation in two murine myeloma cell lines. **J Neuroimmunology** v.140 p. 137-142, 2003

KOCISKO D.A.; COME, J.H.; PRIOLA, S.A.; CHESEBRO, B.; RAYMOND, G.J.; LANSBURY, P.T.; CAUGHEY, B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. **Nature**. v.370, p.471-474, 1994

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

KÖHLER, G. The techniques of hibridoma production **Immunol. Meth** v.2, p.285-298, 1981

LANE, R. D.; CRISSMAN, R. S.; GINN, S. **Methods in Enzymology** v.121 p.183-191, 1986

LARRIC, J. W. Potential of monoclonal antibodies as pharmacological agents. **Pharmacological Reviews**, 41:539-557, 1989.

LEE K.S.; MAGALHAES A.C.; ZANATA S.M.; BRENTANI R.R.; MARTINS V.R.; PRADO M.A. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **J Neurochem**; v.79, p.79-87, 2001.

LANGONE, J. J.; VUNAKIS, H. V.; High efficiency fusion procedure for producing monoclonal antibodies against weak immunogens. **Methods in Enzymology**, 121:183-192, 1986.

LEHNINGHER, A. L. Princípios de Bioquímica. 1ª edição. São Paulo: Sarvier, 1993.

LITTLE, M.; KIPRIYANOV, S. M.; LE GALL, F.; MOLDENHAUER, G. Of Mice and men: hibridoma and recombinant antibodies. **Immunol Today** v.8, p.364-370, 2000

MANSON, J.; WEST, J.D.; THOMSON, V.; MCBRIDE, P.; KAUFMAN, M.H.; HOPE, J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? **Development** v.115, p. 117-122, 1992.

MARTINS, V.R.; GRANER, E.; GARCIA-ABREU, J.; SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; NETO, V.M.; BRENTANI,

R.R. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor **Nature Med.** v.3, p.1376-1382, 1997.

MENARD, V.; JACOBS, H.; JUN, H. S.; YONN, J. D.; KIM, S. W. Anti-GAD monoclonal antibody delays the onset of diabetes mellitus in NOD mice. **Pharm Res.** V.16(7), p. 1059-1066, 1999

NGUYEN, J.; BALDWIN, M.A.; COHEN, F.E.; PRUSINER, S.B. Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformation transitions. **Biochemistry.** v.34, p.4186-92, 1995.

OESCH, B.; WESTAWAY, D.; WÄLCHLI, M. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell.** v.40, p.735-746, 1985.

PAN, K.M.; STAHL, N.; PRUSINER, S.B. Purification and properties of cellular prion protein from Syrian hamster brain. **Protein Sci.** v.1, p. 1343-52, 1992.

PERKINS, J. D.; WEISNER, R. H.; BANKS, P. M.; LA RUSSO, N. F.; LUDWIG, J. K.; KROM, R. A. F Immunohistologic labeling as an indicator of liver allograft rejection. **Transplantation**, 43:105-108, 1987.

PRUSINER, S.; B. Prions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.95, p.13363-13383, 1997.

PRUSINER, S.B.; BOLTON, D.C.; GROTH, D.F.; BOWMAN, K.A.; COCHRAN, S.P.; MCKINLEY, M.P. Further purification and characterization of scrapie prions. **Biochemistry.** v.21, p. 6942-6950, 1982.

PRUSINER, S.B.; SCOTT, M.R.; DEARMOND, S.J.; COHEN, F.E. Prion protein biology. **Cell** v.93, p.337-348, 1998.

RIGGOTT, M. J.; MATTHEW, W. D. Generating monoclonal antibodies to neuronal antigens. **J. Neurosci. Meth**, 68: 235-245, 1996.

ROSE, M. L.; CALES, M. I.; GRIFFIN, R. J.; POMERANCE, A.; YACOUB, M. H. Expression of class I and II major histocompatibility antigens in normal and transplanted human heart. **Transplantation** 41:776-780, 1986.

RUBENSTEIN, R., KASCZAK, R. J., PAPINI, M., KASCZAK, R., CARP, R. I., LaFAUCI, G., MELOEN, R., LANGEVELD, J. Immune surveillance and antigen conformation determines humoral response to the prion protein immunogen. **J. Neurovirol.** V. 4, 401-413, 1999.

SARNAT, H. B.; NOCHLIN, D.; BORN, D. E. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human CNS. **J. Neurosci.**, 21(20): 8091-8107, 1998.

SHEPHERD, P.; DEAN, C. **Monoclonal Antibodies** Oxford University Press 2000

STEINMAN, H. L.; ROSENBAUM, J. T.; SRIRAM, S.; McDEVITT, H. O. *In vivo* protective effects of antibodies to immune response gene products: prevention of experimental allergic encephalitis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.78, p.7111-7114, 1981

StGROTH, S.F.; SCHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies: strategies and tactics. (Review Article) **J Immunol Meth** v.35, p.13763-13767, 1992.

WALDOR, M.; SRIRAM, S., McDEVITT, H. O., STEINMAN, H. L. *In vivo* therapy with monoclonal anti-IA antibody suppresses immune responses to acetylcholine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.80, p. 2713-2717, 1983

WALZ, R.; AMARAL, O.B.; ROCKENBACH, I.C.; ROESLER, R.; IZQUIERDO, I.; CAVALHEIRO, E.A.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia** v.40, p.1679-82, 1999.

WANG, M.; QU, X.; STEPKOWSKI, S. M.; CHOU, T. C.; KAHAN, B. D. Beneficial effect of graft perfusion with anti-T cell receptor monoclonal antibodies on survival of small bowel allografts in rat recipients treated with brequinar alone or in combination with cyclosporine and sirolimus. **Transplantation**, 61:458-464, 1996.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. The structure of DNA **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** v.18:123-31. 1953

WOFSY, D.; SEAMAN, W. E. Successful treatment of autoimmunity in ZB/NZW mice with monoclonal antibody to L3T4. **J. of Exp. Med.** V. 161, p.378, 1985

ZANATA S.M.; HOVATTA I.; ROHM B.; PUSCHEL A.W. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A induced cytoskeletal collapse. **J Neurosci** v.22, p.471-477, 2002b.

ZANATA S.M.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; HAJJ, G.; FREITAS, A.R.O.; CHIARINI, L.B.; CABRAL, A.L.B.; NOMIZO, R.; LEE, K.S.; JULIANO, M.A.; JACHIERI, S.G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R. The stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. **EMBO Journal**, v.21, p.3307-3316, 2002a.