

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FRAGMENTOS F(ab')₂
OBTIDOS A PARTIR DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS
ANTI-PBP2a DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À
METICILINA (MRSA)

ANNA ERIKA VIEIRA DE ARAÚJO

RIO DE JANEIRO
2013



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ANNA ERIKA VIEIRA DE ARAÚJO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FRAGMENTOS $F(ab')_2$
OBTIDOS A PARTIR DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS
ANTI-PBP2a DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À
METICILINA (MRSA)**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia em Imunobiológicos como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Tecnologia de
Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO
2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / ICICT / FIOCRUZ – RJ

A663 Araújo, Anna Erika Vieira de

Obtenção e caracterização de fragmentos F(ab')₂ obtidos a partir de anticorpos monoclonais murinos anti-PBP2a de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) / Anna Erika Vieira de Araújo. – Rio de Janeiro, 2013.

xv, 70 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2013.

Bibliografia: f. 61-69

1. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. 2. Anticorpo monoclonal. 3. Fragmentos de anticorpos. 4. Resistência a antimicrobianos. 5. Papaína. 6. Pepsina. I. Título.

CDD 614.5797

Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) em colaboração com o Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz, sob a orientação do Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna e do Prof. Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa.



INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ANNA ERIKA VIEIRA DE ARAÚJO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FRAGMENTOS F(ab')₂
OBTIDOS A PARTIR DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS
ANTI-PBP2a DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À
METICILINA (MRSA)**

ORIENTADORES: Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna
Prof. Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa

Dissertação defendida em 29 de maio de 2013

Examinadores:

Prof. Dr. José Godinho da Silva Júnior
Bio-Manguinhos/Fiocruz /Presidente

Prof. Dr. João Alberto Osso Júnior
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo (USP)

Rio de Janeiro

2013

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me apoiou e me deu forças para superar as adversidades e ao meu namorado Carlos Patusco pela paciência, carinho e atenção. E a todos aqueles que foram essenciais na construção e elaboração do mesmo.

AGRADECIMENTOS

À Fiocruz e a Bio-Manguinhos pela oportunidade e apoio financeiro, que contribuíram para a conclusão do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos (MPTI).

Aos funcionários e ao corpo docente do MPTI.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna, pelo exemplo de dedicação e por ter dado a oportunidade e o apoio para a conclusão de mais uma etapa na minha vida; e Prof. Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa, pela atenção e disponibilidade em ajudar-me sempre quando foi preciso.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), que me acolheu e possibilitou a realização de toda a parte experimental. Em especial, os amigos Natália Plínio, Renata Fajardo, Aline Almeida, Eneida Santos, Eliane Baroni, Maria da Glória Martins, Luis Vidal, Haroldo Cid, Carlos Viana e Lucas Almeida.

Aos funcionários do Laboratório de Anticorpos Monoclonais (LATAM), do Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) e Laboratório de Experimentação animal (LAEAN), pela colaboração.

Aos colegas do mestrado pela força dada nos momentos difíceis. Em especial, Wellington Seguins, Michel Gomes, Lívia Rubatino, Arthur Corrêa, Aline Guimarães, Ana Paula Leal, Vanessa Pacheco, Diana Praia e Poliana Schettini.

Aos meus pais, Fernando Antonio e Carmem Lúcia, que sempre me apoiaram e deram força para eu seguir batalhando por meus sonhos. E aos meus irmãos, Andréa Emília e Johann Wagner, os meus melhores amigos, para mim é impossível imaginar um mundo sem eles.

Aos meus grandes amigos, que considero como irmãos. Em especial, Allan Nogueira, Guilherme Carneiro e meu namorado Carlos Patusco, que têm sido essenciais na minha adaptação ao Rio de Janeiro e nessa jornada que se inicia.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais retorna ao seu tamanho original”

Albert Einstein

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA)	2
1.1.1 Antibióticos β -lactâmicos.....	4
1.1.2 Mecanismos de resistência à β -lactâmicos.....	6
1.1.3 Diagnóstico laboratorial de infecções por MRSA	10
1.1.4 Tratamento.....	11
1.1.4.1 Terapia antimicrobiana	11
1.1.4.2 Imunoterapias	12
1.2 Anticorpos – características gerais	14
1.2.1 Anticorpos monoclonais	14
1.2.2 Estrutura de um anticorpo.....	19
1.2.3 Obtenção de fragmentos de anticorpos	20
1.3 JUSTIFICATIVA	24
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 METODOLOGIA	26
3.1 Obtenção e purificação do anticorpo monoclonal	26
3.2 Análise das frações obtidas por purificação e digestão enzimática	27
3.2.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
3.2.2 Quantificação das amostras obtidas	27
3.3 Digestões enzimáticas	27
3.3.1 Digestão enzimática com pepsina.....	27
3.3.2 Digestão enzimática com papaína	28

3.4	Purificação das amostras digeridas	28
3.4.1	Cromatografia por afinidade – MabSelect SuRe (GE)	28
3.5	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	29
3.6	<i>Immunoblotting</i>	30
3.7	Ensaio de proteção <i>in vitro</i>	31
3.7.1	Análise Estatística	31
3.8	Ensaio de farmacocinética para determinação da meia-vida plasmática .	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Avaliação da homogeneidade do anticorpo monoclonal purificado	33
4.2	Digestão enzimática com pepsina	34
4.2.1	Determinação da relação enzima/substrato para a pepsina	34
4.2.2	Digestão enzimática - Pepsina	36
4.2.2.1	Purificação das amostras digeridas com pepsina por cromatografia de afinidade e ultrafiltração	36
4.3	Hidrólise enzimática com a papaína	38
4.3.1	Otimização das condições de hidrólise enzimática com a papaína	38
4.3.2	Digestão enzimática – papaína	41
4.3.2.1	Purificação das amostras digeridas com papaína por cromatografia de afinidade e ultrafiltração	42
4.4	Ensaio imunoenzimático indireto	44
4.5	<i>Immunoblotting</i>	44
4.6	Ensaio de Neutralização Bacteriana	45
4.7	Ensaio de Avaliação de Farmacocinética	48
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asn²⁹⁷ – Asparagina na posição 297

°C – Grau Celsius (unidade de temperatura)

CA-MRSA – *community acquired* MRSA (infecções de MRSA associadas à comunidade)

ccRA/ccRB ou ccRC – *cassette chromossome recombinase*

CDR – região determinante de complementariedade (*complementary determing region*).

C_H – domínio constante da cadeia pesada de anticorpo

CIM – Concentração inibitória mínima

C_L – domínio constante da cadeia leve de anticorpo

ClfA – *clumping factor A*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standard Institutes*

D.O. – Densidade óptica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

Fab' – *fragment antibody binding* (fragmento de ligação do anticorpo)

Fc – fragmento cristalizável

FIP – Federation Internationale du Pharmaceutiques (Federação Internacional dos Farmacêuticos)

GE – General Electric

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HACA – *human anti-chimeric antibody*

HAMA – *human anti-mouse antibody*

HA-MRSA – *hospital acquired* MRSA (infecções de MRSA associada aos cuidados de saúde)

HCl – Ácido clorídrico

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Ig – Imunoglobulinas

IgA – Imunoglobulina A.

IgD – Imunoglobulina D.

IgE – Imunoglobulina E.

IgG – Imunoglobulina G.

IgM – Imunoglobulina M.

LTA – Ácido lipoteicóico

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MSSA – *S. aureus* sensível à meticilina

NaOH – Hidróxido de sódio

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBP – *penicilin-binding protein* (proteína de ligação à penicilina)

PBS - *Phosphate Buffer Saline* (Solução tampão fosfato de sódio)

PBS-Tween – Solução tampão fosfato de sódio com Tween 20

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotações por minuto

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. epidermitis – *Staphylococcus epidermitis*

S. sciuri – *Staphylococcus sciuri*

SCC*mec* – *staphylococcal cassette chromossome mec*

SDS – *Sodium dodecyl sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)

TMB – Tetrametilbenzidina

TRIS – Trishidroximetilaminometano

TRIS-HCL - Cloridrato de trihidroxiaminometano

USP – U.S. Pharmacopoeia (Farmacopéia americana)

UTI – Unidade de terapia intensiva

v/v – volume a volume

V_H – domínio variável da cadeia pesada de anticorpo

VISA – *Vancomycin intermediate S. aureus* (*S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina)

V_L – domínio variável da cadeia leve de anticorpo

VRSA – *Vancomycin resistant S. aureus* (*S. aureus* resistente à vancomicina)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Alguns exemplos de anticorpos monoclonais usados na terapêutica (adaptado de Bourel & Theillaud, 2006 e Zhiqiang, 2009).....	18
Tabela 4.1: Composição das amostras para a determinação da relação enzima/substrato adequada para digestão do anticorpo IgG1 com pepsina.....	34
Tabela 4.2: Quantificação da amostra obtida após purificação de digestão por pepsina.....	38
Tabela 4.3: Composição das amostras para a determinação da relação enzima/substrato adequada para digestão do anticorpo IgG1 com papaína.....	38
Tabela 4.4: Quantificação da amostra obtida após purificação de digestão por papaína.....	43
Tabela 4.5. Quantificação das concentrações bacterianas para cada ensaio, de acordo com o tempo (2 ou 4 horas).....	48
Tabela 4.6: Média da quantificação das concentrações de anticorpo (Mab) e F(ab') ₂ por ELISA em 1 µL de soro no intervalo de 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Colônias de <i>Staphylococcus aureus</i>	1
Figura 1.2: Prevalência mundial de MRSA (Grundmann et al. 2006).....	3
Figura 1.3 Distribuição mundial das cepas de MRSA associadas à comunidade (CA-MRSA) determinadas pela técnica de sequenciamento por multilocus sequence typing (MLST). (DeLeo et al. 2010).....	4
Figura 1.4: Representação esquemática do cross-link entre duas cadeias peptídicas para a formação do peptidoglicano em <i>S. aureus</i> (adaptado de Stapleton & Taylor, 2002).....	5
Figura 1.5: Classes de antibióticos β -lactâmicos. (adaptado de Palzkill, 2013).....	6
Figura 1.6: Estrutura da PBP2a de <i>S. aureus</i> . (adaptado de Lim & Strynadka, 2002).....	8
Figura 1.7: Representação esquemática das regiões codificadoras dos genes mecA-mecR-mecI. As setas indicam as respectivas direções de transcrição do gene mecA e mecR1-mecI (Stapleton & Taylor, 2002).....	9
Figura 1.8: Esquema de humanização de anticorpos. Em branco, as sequências murinas; em cinza, as sequências humanas (adaptado de Desgranges, 2004).....	16
Figura 1.9: Representação esquemática de uma molécula de anticorpo do tipo IgG com seu sítio de glicosilação em Asn ²⁹⁷ (adaptado de Desgranges, 2004 e Albert et al. 2008)	20
Figura 1.10: Curvas de estabilidade e atividade da pepsina de acordo com a variação do pH (adaptado de Piper & Fenton, 1965).....	22
Figura 1.11: Esquema de digestão enzimática mostrando a ação das enzimas papaína e pepsina na produção de fragmentos de anticorpos.....	24
Figura 4.1: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras e redutoras de amostra de anticorpo monoclonal purificado (5 μ g).....	33
Figura 4.2: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com pepsina.....	35

Figura 4.3: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com pepsina na proporção de 1:5 (p/p).....	36
Figura 4.4: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente ao isolamento dos fragmentos F(ab') ₂ utilizando a resina de proteína A MabSelectSuRe (GE).....	37
Figura 4.5: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à fração cromatográfica do fragmento F(ab') ₂ após diálise e ultrafiltração.....	37
Figura 4.6: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com papaína.....	39
Figura 4.7: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com papaína em diferentes tempos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos na ausência de PMSF.....	40
Figura 4.8: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com papaína em diferentes tempos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos na presença de PMSF 1mM.....	40
Figura 4.9: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com papaína na proporção de 1:10 (p/p) com 30 minutos de incubação na presença de PMSF 1mM.....	41
Figura 4.10: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à purificação dos fragmentos F(ab') ₂ após digestão com papaína utilizando a resina de proteína A MabSelectSuRe (GE).....	42
Figura 4.11: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à purificação dos fragmentos F(ab') ₂ obtidos por digestão com papaína após diálise e ultrafiltração.....	43
Figura 4.12: Densidades ópticas apresentadas em ensaio de ELISA comparativo entre o anticorpo completo e os fragmentos F(ab') ₂ obtidos por digestão enzimática com papaína e pepsina.....	44
Figura 4.13: <i>Western Blot</i> qualitativo realizado com o anticorpo inteiro, fragmento F(ab') ₂ obtido por digestão com pepsina e fragmento F(ab') ₂ obtido por digestão com papaína.....	45
Figura 4.14: Variação da concentração bacteriana após 2 horas de incubação dos anticorpos e fragmentos com a bactéria.....	46
Figura 4.15: Variação da concentração bacteriana após 4 horas de incubação dos anticorpos e fragmentos com a bactéria.....	46
Figura 4.16: Representação dos resultados de inibição do crescimento bacteriano <i>in vitro</i> após 4 horas de incubação (diluição 1:10 ²).....	47
Figura 4.17: Concentração plasmática do anticorpo murino anti-PBP2a em função do tempo com 250 µL/dose durante o período de 25 dias.....	48
Figura 4.18: Perfis de concentração plasmática em escala logarítmica em função do tempo após administração intraperitoneal do fragmento F(ab') ₂ obtido por digestão enzimática com a pepsina e do anticorpo (Mab) (250 µg/dose).....	49

RESUMO

As infecções causadas por MRSA são um problema de saúde mundial, especialmente devido à dificuldade de tratamento, alto grau de virulência e elevada morbidade associada. As cepas de MRSA caracterizam-se por possuir uma proteína de baixíssima afinidade por β -lactâmicos, a PBP2a. Por ser uma bactéria multirresistente, diversas alternativas de tratamento têm sido pesquisadas, como coquetéis de antimicrobianos e imunoterapias, porém até agora nenhuma obteve sucesso. Desta vez, tendo em vista a PBP2a como um alvo em potencial, encontra-se em desenvolvimento um anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA. Fragmentos de anticorpos, contendo apenas as duas porções Fab', são amplamente descritos na literatura como ferramentas imunoquímicas, reagentes de diagnóstico e terapêutica, graças à sua rápida farmacocinética e baixa imunogenicidade. Os fragmentos F(ab')₂' foram obtidos por digestão enzimática com papaína e pepsina e purificados através de cromatografia de afinidade utilizando resinas de Proteína A, como a MabSelectSure (GE) e concentradas por unidades filtrantes Amicon® MWCO 50 kDa. Suas afinidades pela PBP2a foram testadas através de um ensaio ELISA do tipo indireto e um *Western Blot*. Através de um ensaio de neutralização bacteriana, verificou-se a atividade neutralizante dos fragmentos após a digestão. Foi feito também um ensaio de farmacocinética com camundongos. Os resultados indicaram que foi possível a obtenção e o isolamento de fragmentos F(ab')₂ por digestão com papaína e pepsina, sendo que a pepsina apresentou melhor produção de F(ab')₂ com melhor rendimento. O ELISA e o *Blot* demonstraram que os F(ab')₂ não perderam afinidade pela PBP2a, mesmo após o processo de digestão enzimática, assim como não perderam sua capacidade neutralizante, obtendo resultados próximos aos apresentados pelo anticorpo não digerido. E como esperado, nos ensaios de farmacocinética o F(ab')₂ apresentou eliminação mais rápida (entre 12 e 18 horas) se comparado à IgG (aproximadamente 9 dias).

ABSTRACT

Infections caused by MRSA are a worldwide health problem, especially due to the difficulty of treatment, high degree of virulence and high associated morbidity. MRSA strains are characterized by having a protein with very low affinity for β -lactams, the PBP2a. As a multiresistant bacteria, various alternatives for treatment have been researched, such as cocktails of antibiotics and immunotherapies, but so far none has succeeded. This time, looking up to PBP2a as a potential target, it is in development a monoclonal antibody anti-MRSA PBP2a. Antibody fragments containing only the two Fab' portions, are widely described in the literature as immunochemical tools, reagents for diagnostics and therapeutics, especially due to its low immunogenicity and rapid pharmacokinetics. The F(ab')₂ fragments were obtained by enzymatic digestion with papain and pepsin and purified by affinity chromatography using Protein A resins such as MabSelectSure (GE) and concentrated by Amicon[®] filtration units MWCO 50 kDa. Their affinity for PBP2a was tested with an ELISA-type indirect and a *Western Blot* essay. Through a bacterial neutralization assay, it was evaluated the neutralizing activity of the fragments after digestion. It was also done pharmacokinetics test in mice. The results indicated that it was possible to obtain the isolation of F(ab')₂ fragments by digestion with pepsin and papain, and pepsin showed improved production of F(ab')₂ with better performance. ELISA and *Blot* demonstrated that F(ab')₂ affinity for PBP2a was not lost even after the enzymatic digestion process, nor was lost its neutralizing capacity, obtaining results similar to those presented by the undigested antibody. As expected, in the pharmacokinetics tests, F(ab')₂ has presented a faster elimination (between 12 and 18 hours) if compared to IgG (approximately 9 days).

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é um dos principais patógenos oportunistas, colonizando cerca de 25% da população aparentemente saudável (Tattevin, 2011); e é responsável por ocasionar uma série de doenças, podendo até levar à morte. (Lu et al. 2011).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* se apresentam como cocos Gram-positivos imóveis com diâmetro variando entre 0,5 a 1,5 μ m, não formadores de esporos, podendo aparecer de forma isolada, em pares, cadeias curtas ou em cachos (Figura 1.1). Podem ser formadoras de colônias pigmentadas, geralmente não capsuladas, sendo catalase positivas e coagulase positivas (para as espécies de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi coagulans* e algumas cepas de *Staphylococcus hyicus*) ou negativas (Holt et al. 1994). Também podem apresentar β -hemólise (hemólise parcial) em Agar Sangue, dependendo da espécie (Koneman et al. 2001).

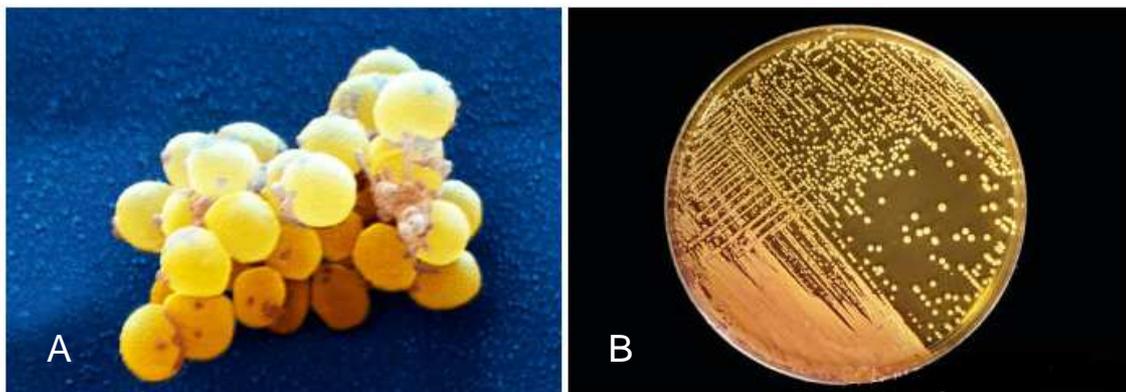


Figura 1.1: Colônias de *Staphylococcus aureus*. A: colônias em formato de cachos por microscopia eletrônica de varredura. B: colônias em placa de agar, de coloração amarelodourada característica. (adaptado de: <http://www.sciencephoto.com/media/297098/view>, acesso em 23/03/2012).

Apresentam-se como organismos comensais para humanos e animais. A espécie *S. aureus* pode ser comumente encontrada nas superfícies externas da pele e trato respiratório superior, principalmente nas fossas nasais. Por ser um patógeno oportunista, é capaz de causar desde infecções cutâneas localizadas, como

furúnculos e abscessos, até infecções mais graves como a síndrome do choque tóxico, que pode levar a septicemia e, conseqüentemente, à morte; permanecendo atualmente como um patógeno de risco à saúde humana.

A frequência de infecções comunitárias e hospitalares causadas por *S. aureus* tem aumentado constantemente. O tratamento para essas infecções tem se tornado mais difícil devido ao surgimento de cepas resistentes a múltiplas drogas, como as cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Lowy, 1998).

1.1 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Antes do advento dos antibióticos, as infecções invasivas por *S. aureus* eram frequentemente fatais, com mortalidade na ordem de 80%. A descoberta da penicilina em 1928 teve um efeito espetacular sobre o prognóstico dessas infecções, porém, em 1944 as primeiras cepas resistentes à penicilina já seriam descritas (Lowy, 2003).

Em 1946, nos Estados Unidos, cerca de 5% dos estafilococos isolados de pacientes ou portadores eram resistentes à penicilina, aumentando em 1949 para 29%, novamente em 1950 para 50% e 80% em 1959. No Brasil, até o início dos anos 2000, mais de 80% dos estafilococos isolados de pacientes hospitalizados e, aproximadamente, 70% dos isolados de pacientes da comunidade apresentavam resistências aos antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina, de forma geral. Isolados correspondentes a cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) apresentam frequência de até 60% e são frequentemente ligados ao aparecimento de um clone epidêmico brasileiro (Tavares, 2000; Rossi, 2011).

A meticilina, um antibiótico β -lactâmico diferente da penicilina, foi criado como alternativa ao tratamento às cepas penicilina-resistente, mas da mesma forma que aconteceu com a penicilina, em 1961 foram observadas as primeiras cepas de MRSA (Chambers, 2001). Atualmente, ao menos 40% das cepas de *S. aureus* são resistentes à meticilina, estando presentes em todo o mundo (Figura 1.2) (Durai et al. 2010).

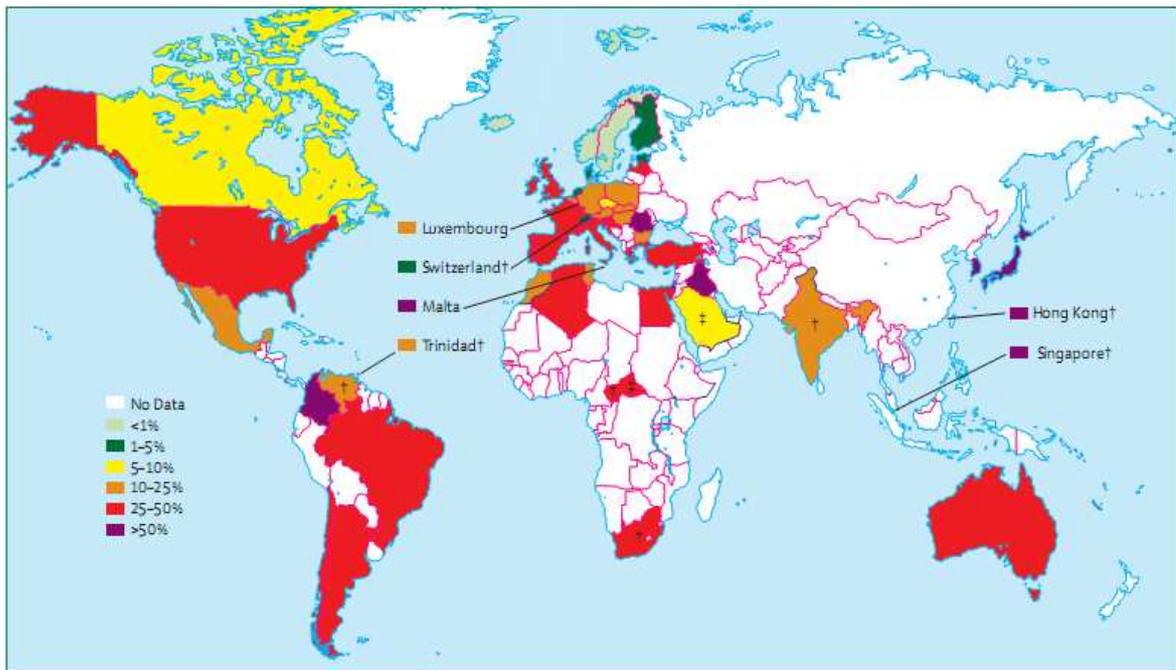


Figura 1.2: Prevalência mundial de MRSA (Grundmann et al. 2006).

Desde sua descoberta, as cepas MRSA sempre foram consideradas como patógenos nosocomiais, de prevalência hospitalar ou associada aos cuidados de saúde (HA-MRSA – *hospital acquired MRSA*). Esse conceito mudou nos últimos quinze anos, e as infecções associadas à comunidade (CA-MRSA – *community acquired MRSA*) agora são prevalentes e bastante difundidas mundialmente (DeLeo et al. 2010). Contrariamente às infecções HA-MRSA, onde existe presença de um fator de risco ou doença predisponente, as infecções CA-MRSA podem ocorrer em indivíduos saudáveis. Isto sugere que essas cepas bacterianas apresentam maior virulência que as tradicionais cepas HA-MRSA, podendo também disseminar entre vários países (Figura 1.3) (Herold et al. 1998; Vandenesch et al. 2003; Tristan et al. 2007).

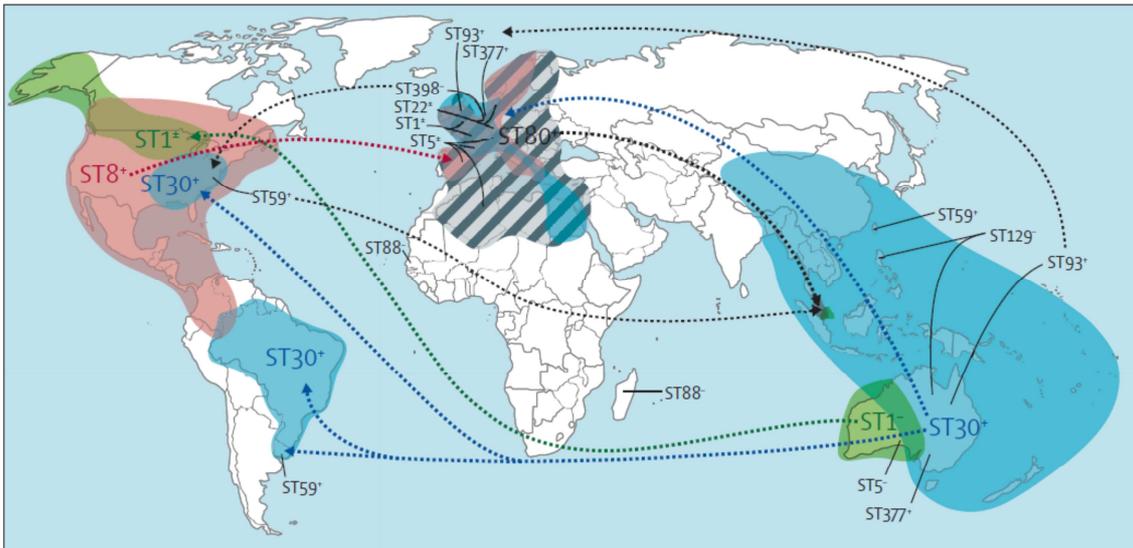


Figura 1.3 Distribuição mundial das cepas de MRSA associadas à comunidade (CA-MRSA) determinadas pela técnica de sequenciamento por *multilocus sequence typing* (MLST). As linhas pontilhadas indicam possível rota de disseminação das cepas CA-MRSA. Estimativa das áreas de infecção com suas principais cepas relatadas, ST1: verde, ST8: vermelho, ST30: azul, ST80: cinza rasurado; +: cepas positivas para o fator de virulência leucocidina Panton Valentine. (DeLeo et al. 2010)

Contrariamente à resistência à penicilina, o impacto da resistência a meticilina é maior, pois o antibiótico de referência para o tratamento das infecções causadas por MRSA, a vancomicina, não apresenta a rapidez bactericida e a plasticidade dos β -lactâmicos. Além disso, já foram descritas cepas de MRSA com reduzida sensibilidade à vancomicina (VISA – *Vancomycin intermediate S. aureus*) (Tattevin, 2011) e cepas completamente resistentes à vancomicina (VRSA – *Vancomycin resistant S. aureus*) (Bartley, 2002).

1.1.1 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos estão entre os agentes antimicrobianos mais utilizados. Têm como principal aspecto positivo o fato de apresentarem um amplo espectro de ação, tanto para bactérias Gram positivas como Gram negativas (Livermore et al., 2012).

Esses antimicrobianos agem através da inibição de um conjunto de enzimas denominadas transpeptidases (também chamadas de *penicilin binding protein* – PBPs) que são essenciais na síntese da camada de peptidoglicano da parede celular das bactérias (Sauvage et al. 2008). Essas enzimas interagem com os

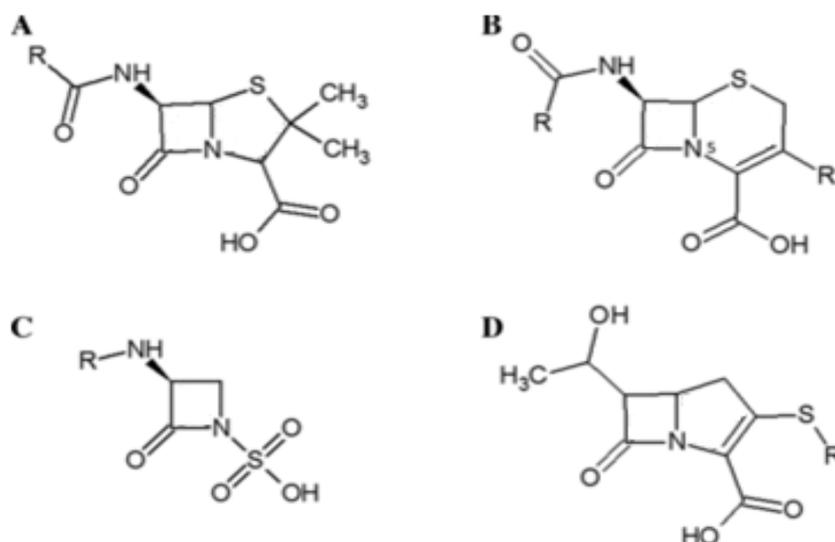


Figura 1.5: Classes de antibióticos β -lactâmicos. (A) Estrutura central da penicilina. (B) Estrutura central das cefalosporinas. (C) Estrutura central dos monobactâmicos. (D) Estrutura central dos carbapenems. (adaptado de Palzkill, 2013)

As penicilinas e cefalosporinas apresentam, respectivamente, o anel β -lactâmico ligado a anéis de 5 (penta) ou 6 (hexa) ligantes, contendo um grupo carboxil no carbono 3 ou 4. Contrariamente, os monobactâmicos não apresentam outro anel ligado ao β -lactâmico, mas uma molécula de ácido sulfônico. Os carbapenems consistem de um anel β -lactâmico ligado a um anel de 5 ligantes, como as penicilinas, porém com um carbono no lugar do enxofre na posição 1 e uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 (Palzkill, 2013).

Uma característica interessante dos carbapenems é a resistência à inativação pelas β -lactamases. Entretanto, nos últimos anos o surgimento de carbapenemases e metalo- β -lactamases têm mudado o cenário, tornando-se fonte de resistência bacteriana (Papp-Wallace et al. 2011).

1.1.2 Mecanismos de resistência à β -lactâmicos

As β -lactamases são enzimas capazes de catalisar a reação de hidrólise ao quebrar a ligação amida do anel β -lactâmico, levando à formação de derivados inativos. Essas enzimas constituem uma causa frequente de resistência dentre as bactérias Gram positivas e negativas. Genes codificadores de β -lactamases podem

ser encontrados em cromossomos ou plasmídeos, dando o indício de transmissão horizontal (Warnes et al. 2012). A produção dessas enzimas é basicamente feita através da expressão do gene *blaZ*, presente em um plasmídeo, regulado pelas ORFs (*open reading frames*) *blaI* e *blaR1* (Hackbarth & Chambers, 1993).

Atualmente estão descritas centenas de enzimas, sendo classificadas em 4 classes: A, B, C e D (Ambler et al. 1991). A classe B é considerada peculiar, pois requer a presença de zinco para exercer sua atividade, sendo assim chamadas de metalo- β -lactamases.

A resistência de *S. aureus* à meticilina se deve principalmente pela presença do gene *mecA*, responsável pelo controle da síntese da proteína de ligação à penicilina, *penicilin-binding protein* PBP2a, resultando na resistência ao conjunto de antibióticos β -lactâmicos disponíveis no mercado atualmente (Tennover, 2006).

A PBP2a é uma transpeptidase de aproximadamente 78kDa que está associada à formação da parede celular de peptidoglicano e que tem pouca afinidade pelos β -lactâmicos, permitindo a continuação da síntese de parede celular, mesmo quando as 4 PBPs clássicas (1, 2, 3 e 4) são inativadas pelos antibióticos β -lactâmicos (Tattevin, 2011).

Essa enzima é composta principalmente por uma região de ancoramento transmembranar que é responsável pela ligação à membrana citoplasmática, um domínio não-ligante à penicilina de função desconhecida, e um domínio transpeptidase, onde se encontra o seu centro ativo em Ser 403 (Figura 1.6), sendo classificado por Goffin e Ghuysen como uma PBP multimodular de classe B (Lim & Strynadka, 2002).

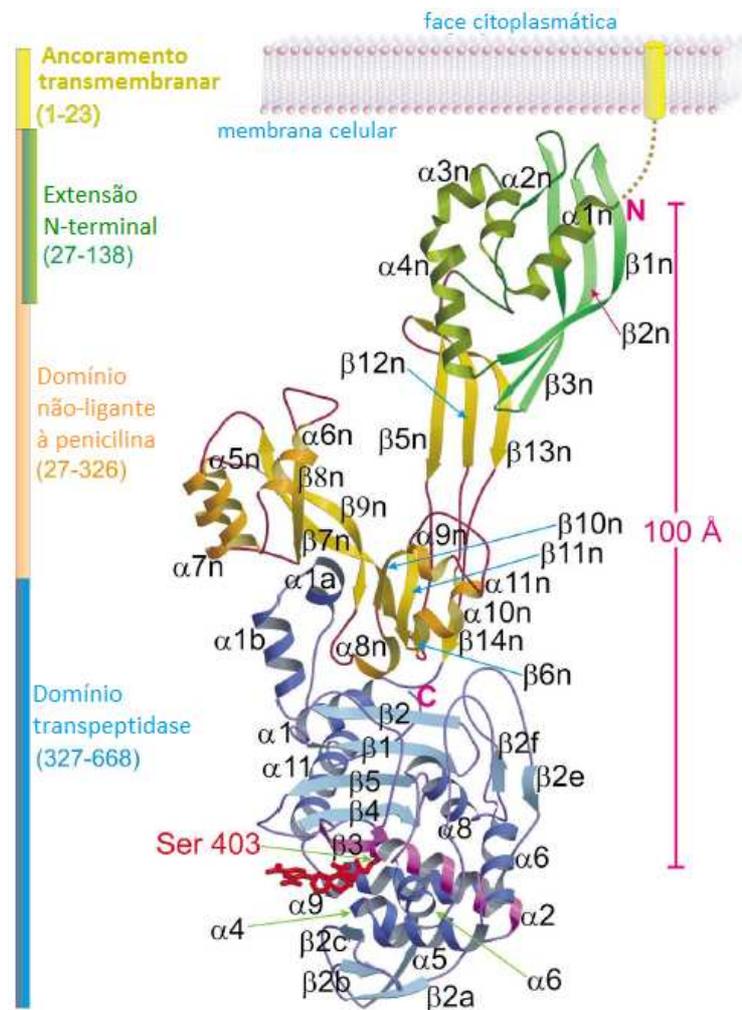


Figura 1.6: Estrutura da PBP2a de *S. aureus*. Demonstração linear à esquerda (com a indicação dos resíduos de aminoácidos correspondentes em parênteses) e em fitas à direita. Em laranja encontra-se a porção N-terminal do domínio não-ligante à penicilina, em azul o domínio transpeptidase, com seu sítio ativo em vermelho (Ser 403) (adaptado de Lim & Strynadka, 2002).

A regulação do gene *mecA* acontece através da ação do repressor *mecI* e de *mecR1*, um transdutor de detecção do sinal de β -lactâmicos, que estão localizados na região transmembrana da bactéria (Figura 1.7). Na ausência do antibiótico β -lactâmico, *mecI* reprime a transcrição de *mecA* e *mecR1-mecI*. Na presença do β -lactâmico, *mecR1* é clivado automaticamente, e seu domínio metalo-protease, localizado na região citoplasmática de *mecR1*, se torna ativo. Esta metalo-protease ativa *mecI*, que por sua vez está ligado à região operadora de *mecA*, permitindo sua transcrição e, conseqüentemente, a produção de PBP2a (Zapun et al. 2008; Deurenberg et al. 2008).

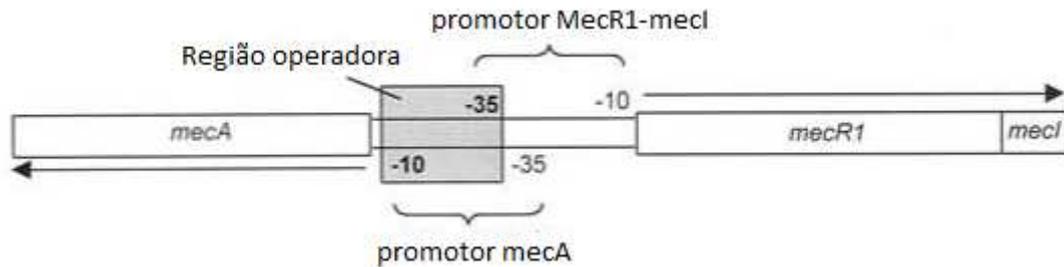


Figura 1.7: Representação esquemática das regiões codificadoras dos genes *mecA*-*mecR*-*mecI*. As setas indicam as respectivas direções de transcrição do gene *mecA* e *mecR1*-*mecI* (adaptado de Stapleton & Taylor, 2002).

O gene *mecA* faz parte de uma ilha genômica de resistência, denominada *staphylococcal cassette chromosome mec*, ou apenas *SCCmec*. Este elemento genômico móvel está delimitado, nas duas extremidades, pelos genes intitulados *cassette chromosome recombinase* (*ccRA/ccRB* ou *ccRC*), que permitem a transmissão horizontal do *SCCmec* entre as espécies de estafilococos (Tattevin, 2011). Em bactérias, transposons possuem a habilidade de mudar o DNA cromossomal para plasmidial, permitindo a transferência e adição permanente de genes, como os de resistência à antibióticos (Stapleton & Taylor, 2002).

Atualmente, são reconhecidos sete tipos principais de *SCCmec* (de I a VII). Os *SCCmec* tipo I, IV, V, VI e VII conferem apenas resistência aos antibióticos β -lactâmicos, enquanto que os tipos II e III determinam resistência à múltiplas classes de antibióticos, que ocorre devido à presença de genes adicionais de resistência integrados ao *SCCmec*, como plasmídeos (Deurenberg et al. 2008).

Nas cepas nosocomiais (HA-MRSA) de MRSA os tipos de *SCCmec* II e III são mais recorrentes. O desenvolvimento dessas cepas tem ocorrido, em geral, por resposta à pressão de seleção causada pelo uso de antibióticos. Já a maioria das infecções comunitárias (CA-MRSA) tem sido causada pelo tipo IV de *SCCmec* e, conseqüentemente, relatam menor resistência aos antibióticos do que os HA-MRSA. A determinação do tipo de *SCCmec* tem ajudado a determinar se o MRSA é proveniente de infecções comunitárias ou nosocomiais (John & Schreiber, 2006).

Embora a origem do *SCCmec* continue desconhecida, o cassete pode ser originado de outra espécie de estafilococo que não a *S. aureus*. Acredita-se que *Staphylococcus sciuri* abrigou o ancestral da PBP2a, visto que uma PBP encontrada em *S. sciuri* apresentou 87,7% de semelhança com a sequência de aminoácidos da PBP2a (Deurenberg et al. 2007). Todas as cepas desta espécie já foram sensíveis à

meticilina, mas provavelmente se tornaram resistentes devido a um aumento na taxa de transcrição do gene homólogo ao *mecA* quando na presença de metilina. Diante disso, uma cepa de *S. aureus* sensível à metilina (MSSA) tornou-se resistente através da introdução do gene homólogo, sendo assim classificado como MRSA (Wu et al. 2001).

1.1.3 Diagnóstico laboratorial de infecções por MRSA

O diagnóstico de MRSA pode ser feito por vários testes, como culturas de placas *in vitro*, culturas em meios de cultura líquidos especiais, reações em cadeia da polimerase (PCR) e atualmente por testes rápidos. Os testes consideram como padrão ouro detectar a presença do gene *mecA* (Durai et al. 2010; Mimica & Mendes, 2007), embora nem sempre a presença do gene significa que haverá a produção da proteína funcional (PBP2a).

O método convencional, através do isolamento bacteriano a partir de culturas de material biológico em placas, possibilitando a identificação da bactéria e a realização do antibiograma, é o teste mais utilizado na rotina laboratorial. A cefoxitina, uma cefalosporina pertencente à classe dos β -lactâmicos, é o antibiótico recomendado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institutes) para o antibiograma, devido a sua maior estabilidade (CLSI, 2011).

Os meios de cultura líquidos acrescidos de antimicrobianos (β -lactâmicos) podem rapidamente identificar a presença de MRSA, mas nem sempre são muito sensíveis. São geralmente utilizados quando as amostras provêm de pacientes que se encontram em UTI e que precisam de uma rápida administração de antibióticos (Durai et al. 2010).

A heterorresistência, onde várias populações de bactérias sensíveis ou resistentes a diferentes antibióticos podem ser encontradas na mesma amostra, pode prejudicar o diagnóstico de cepas MRSA (Rinder et al., 2001). Desta forma, foram incluídas modificações nos métodos mais usados para aumentar a expressão da resistência à metilina. Tais modificações incluem: incubação a 33-35°C ao invés de 37°C, incubação por 24 horas ao invés de 16-18 horas e adição de cloreto de sódio ao meio da cultura (Mimica & Mendes, 2007).

O método de PCR é o mais rápido para detectar MRSA, porém pode apresentar falhas e apresenta alto custo, já que requer equipamentos e pessoal

habilitado para a utilização dos mesmos. Culturas devem ser feitas principalmente quando a propagação da bactéria pode ser letal, como por exemplo, em pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) (Van Hal *et al*, 2007).

Além desses métodos, foi lançado o teste rápido para detecção de PBP2a por *lateral flow*. Esse teste se apresenta como um simples ensaio de aglutinação com partículas de látex sensibilizadas com um anticorpo monoclonal específico para PBP2a. A aglutinação é visível quando as partículas entram em contato com um extrato celular de cepas MRSA (Udo *et al*. 2000).

1.1.4 Tratamento

As infecções por MRSA podem ser tratadas pelo uso de antibióticos, terapias tópicas e não medicamentosas (Durai *et al*. 2010). Atualmente, em virtude da ausência de novos antibióticos eficazes no tratamento de cepas multirresistentes, alternativas ao tratamento por antimicrobianos têm sido pesquisadas, como as imunoterapias ou radioimunoterapias, através de vacinas e anticorpos monoclonais, bem como a fagoterapia.

1.1.4.1 Terapia antimicrobiana

A escolha do antibiótico a ser usado depende da gravidade e área de infecção, já que a eficácia aos medicamentos varia de acordo com o grau e se é de origem comunitária (CA-MRSA) ou nosocomial (HA-MRSA).

Os medicamentos comumente usados para tratar as infecções causadas por MRSA incluem daptomicina, aminoglicosídeos, teicoplanina, linezolida, tigeciclina, cotrimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprim) e vancomicina (Durai *et al*. 2010). Geralmente, as infecções de CA-MRSA são susceptíveis ao tratamento com antibióticos não β -lactâmicos, como clindamicina, cotrimoxazol e doxiciclina, já que essas cepas sofrem menor pressão de seleção que as hospitalares. Para as infecções severas HA-MRSA, o antibiótico de primeira escolha é a vancomicina, sendo a linezolida de segunda escolha (John & Schreiber, 2006)

O tratamento por vancomicina requer altos níveis de medicamento e não penetra bem nos tecidos moles, sendo inferior ao tratamento dos MSSA com β -lactâmicos, que por sua vez possuem grande penetrabilidade e eficácia. A

vancomicina também não é capaz de erradicar os MRSA que podem estar dentro dos leucócitos e assim como a linezolida, deve ser associada à rifampicina a fim de melhorar seu espectro de ação (John & Schreiber, 2006).

A resistência de MRSA a antibióticos como eritromicina, ciprofloxacina, mupirocina e ácido fusídico tem aumentado nos últimos anos, assim como o relato de cepas de MRSA tolerantes à vancomicina (MIC elevada), que não respondem bem ao tratamento (VISA), e cepas totalmente resistentes à vancomicina (VRSA) (Tenover, 2006).

Acredita-se que essa resistência de alto nível à vancomicina tenha ocorrido devido à expressão de *vanA*, um gene que causa o mesmo tipo de resistência em algumas espécies de enterococos, provavelmente obtido através de transmissão horizontal pela conjugação do DNA plasmidial de cepas de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina e *S. aureus* resistente à meticilina. A expressão desse gene está associada a alterações do sítio de ligação à vancomicina na parede celular bacteriana (Tenover, 2006).

A vancomicina interfere na síntese de parede celular da bactéria ao se ligar aos resíduos terminais D-alanina-D-alanina na cadeia crescente de peptidoglicano. A expressão do gene *vanA* é capaz de modificar o dipeptídeo terminal de D-alanina-D-alanina para D-alanina-D-lactato (Figura 1.4, tópico 1.1.1). Assim, a afinidade da vancomicina pelo novo terminal é 1000 vezes menor que o anterior, diminuindo assim sua eficácia e dificultando o tratamento (Périchon & Courvalin, 2009).

1.1.4.2 Imunoterapias

Devido às atuais dificuldades de tratamento com os antimicrobianos convencionais e ao aumento potencial da resistência do MRSA, como a tolerância à vancomicina e a identificação de cepas completamente resistentes à vancomicina (VRSA) (Tattevin, 2011), a busca por alternativas tem sido incentivada para o tratamento das infecções causadas por MRSA, como o uso de imunoterapia ativa (vacinas) e passiva (administração de anticorpos).

Uma vacina ideal contra *S. aureus* teria como objetivo atuar contra os diversos fatores de virulência que a bactéria apresenta, já que a patogênese dos estafilococos é multifatorial. Antes de tudo, um antígeno para ser considerado ideal deve ser expresso em todos os isolados clínicos (como em amostras obtidas de

pacientes), acessível ao sistema imune, imunogênico em sua forma purificada e não tóxico.

Considerando esses fatores, algumas empresas estão tentando criar estratégias de imunização ativa e passiva, porém até agora nenhuma delas obteve sucesso nos ensaios clínicos. Dentre as vacinas, podem ser citadas a Staphvax® (*Nabi Biopharmaceuticals*), que utiliza os polissacarídeos capsulares (CP5 e CP8) de *S. aureus* conjugados à exoproteína A (ETA) de *Pseudomonas aeruginosa*, e a V710® (*Merck*), que tem como antígeno a proteína *IsdB* presente na parede bacteriana de diversas linhagens de *S. aureus* (Garcia-Lara & Foster, 2009).

Dentre as estratégias de imunização passiva, pode-se citar o Altastaph® (*Nabi Biopharmaceuticals*), uma preparação de soros hiperimunes que tem como alvo CP5 e CP8; o Pagibaximab® (*Biosynexus*), um anticorpo monoclonal quimérico com alvo para o ácido lipoteicóico (LTA) de *S. epidermitis*, e o Aurograb® (*Novartis*), que consiste em um fragmento de anticorpo da região variável contra o epítipo de umas das proteínas ABC transportadoras do *S. aureus*, a GrfA. Ainda há o Veronate® e o Aurexis® (*Inhibitex*) que possuem como alvo o *clumping factor A* (ClfA), uma proteína de adesão ancorada à parede celular do *S. aureus* envolvida na ligação com o fibrinogênio (Garcia-Lara & Foster, 2009). Entretanto, é importante ressaltar que estes produtos não foram aprovados para os ensaios clínicos de fase III em humanos.

Uma vacina pode oferecer um estímulo ao organismo para combater o patógeno infectante. Entretanto, por ser uma bactéria comensal, a maioria dos indivíduos infectados ou susceptíveis a uma infecção por *S. aureus* já estão com o sistema imunológico comprometido, sendo, provavelmente incapazes em gerar uma resposta imunológica eficaz. Existe pouca evidência de que a imunidade após infecção exista, apoiando a observação de que a recuperação da infecção por *S. aureus* não tende a conferir imunidade contra infecções subsequentes (Schaffer & Lee, 2009).

Para planejar a criação de uma vacina, é essencial considerar o grupo alvo e suas limitações imunológicas, como acontece no caso dos pacientes infectados por *S. aureus*, sendo talvez mais indicada para a prevenção da colonização nasal, um fator preponderante para a disseminação do patógeno (Werthein et al. 2005). O uso de anticorpos monoclonais terapêuticos seria uma boa alternativa para o tratamento de pacientes infectados.

Em 2003, Senna et al. estabeleceram um modelo murino para vacina de DNA que foi capaz de produzir resposta imune ao MRSA. Contrariamente a outros trabalhos semelhantes, o alvo foi a PBP2a. Como essa enzima está localizada no lado externo da membrana plasmática, pensou-se que a mesma poderia estar acessível aos anticorpos presentes no soro.

Para este modelo foi utilizado como antígeno um fragmento interno da PBP2a contendo 249 pares de base (pb), incluindo o domínio serino-protease (STQK) que é caracterizado como sítio ativo. Através dessa vacina de DNA, foi possível induzir produção de anticorpos específicos e proteção efetiva contra MRSA. Esses resultados demonstram que anticorpos direcionados contra a PBP2a podem ser ferramentas eficazes no tratamento de infecções causadas por cepas MRSA.

Considerando todas essas informações e atento a este problema mundial de saúde pública, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos – Fiocruz/RJ) através de sua Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), está desenvolvendo um anticorpo monoclonal anti-PBP2a com indicação para o tratamento de infecções causadas por MRSA. Esta invenção está depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sob o número WO/2011/0117791, podendo ter aplicação para uso terapêutico e imunodiagnóstico.

1.2 Anticorpos – características gerais

Os anticorpos são glicoproteínas, podendo também ser chamados de imunoglobulinas (Ig), produzidos por linfócitos B, encontrados no sangue ou fluidos do corpo e destinados a intervirem nos processos de defesa imunitária dos organismos superiores. São capazes de reconhecer o antígeno com alto grau de especificidade e afinidade. Os anticorpos ainda podem exercer diversas funções efetoras, como a neutralização de antígenos, ativação do sistema complemento e promoção da destruição de micro-organismos dependentes de leucócitos (Abbas et al. 2008).

1.2.1 Anticorpos monoclonais

Há quase um século, os anticorpos eram vistos como “balas mágicas” por terem um alvo específico, agindo no local da doença. Podem ser usados como agentes terapêuticos para inibir um alvo envolvido na progressão da doença ou por

causar citotoxicidade às células alvo, mediados por moduladores da resposta imune. Alternativamente, por técnicas modernas de biologia molecular, os anticorpos podem agir como carreadores para levar alvos citotóxicos e agentes de imagem, como radioisótopos, toxinas e drogas ao sítio infectado (Jain et al. 2007).

Nos anos 50, Burnet e Jerne propuseram a teoria da seleção clonal, onde cada linfócito possui apenas um tipo de receptor capaz de reconhecer apenas um antígeno, se diferenciando então em plasmócitos capazes de produzir uma única espécie molecular de anticorpos. Sendo assim, foi possível concluir que a resposta imune adaptativa aos estímulos dos antígenos do ambiente se efetua através da seleção e expansão clonal desses tipos celulares capazes de reconhecer determinados antígenos (Desgranges, 2004).

A prova formal dessa teoria foi estabelecida por Köhler e Milstein em 1975, através de outra descoberta feita por Barski et al. em 1960 que mostrou que células híbridas poderiam formar clones estáveis a partir de diferentes linhagens parentais. Com essa teoria em mente, ao fundir linfócitos B provenientes do baço de camundongos com células de mieloma murino (tumores de linfócito B, pois têm a capacidade de se multiplicar indefinidamente) que não secretam anticorpos, Köhler e Milstein (1975) obtiveram uma linhagem celular híbrida denominada de hibridomas. Essas células reúnem características das duas células de origem, pois são capazes de crescer em cultura por longos períodos de tempo e secretar anticorpos. Para a seleção de uma única célula clonal que tenha uma melhor resposta ao antígeno de interesse, esses hibridomas são submetidos a um processo de diluição limitante. Cada população oriunda de uma única célula (clone) é capaz de produzir o mesmo tipo de anticorpo, portanto os anticorpos produzidos por esta população são chamados anticorpos monoclonais (Tamashiro et al. 2008; Bourel & Theillaud, 2006).

Desde o desenvolvimento da tecnologia de hibridomas, os anticorpos monoclonais adquiriram grande importância e versatilidade de uso. São considerados ferramentas altamente específicas, essenciais para detecção e caracterização de estrutura e função de proteínas, assim como investigações em biologia molecular, tornando-se componentes chaves de vários testes de imunodiagnóstico clínico (Nelson et al. 2000; Bruce et al. 2002).

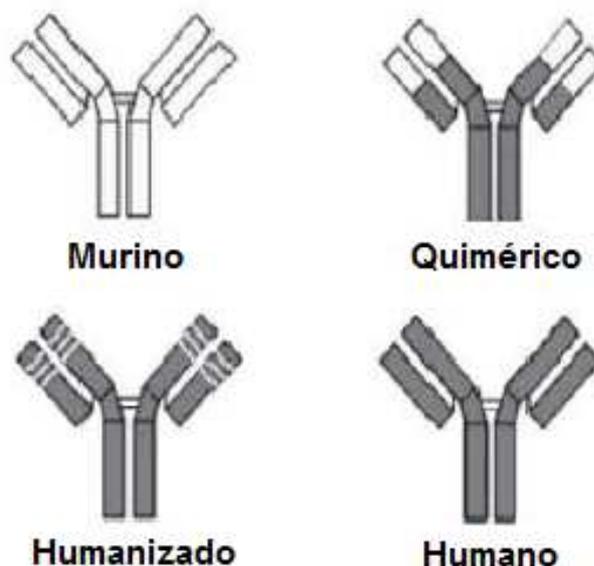


Figura 1.8: Esquema de humanização de anticorpos. Em branco, as sequências murinas; em cinza, as sequências humanas (adaptado de Desgranges, 2004).

A descoberta dos anticorpos monoclonais e a possibilidade de fabricá-los desencadearam expectativas para sua aplicação em imunoterapia passiva. Porém, ainda que tenham ocorridos avanços consideráveis na área de pesquisa e diagnóstico, existem desafios a serem superados, como a obtenção de anticorpos monoclonais de alta afinidade contra alvos específicos e a diminuição de rejeição dos anticorpos murinos utilizados em humanos, conhecida como resposta HAMA (*human anti-mouse antibody*). Esse tipo de resposta ocorre devido ao fato de anticorpos murinos serem reconhecidos como antígenos pelo sistema imunológico humano e, portanto, serem rapidamente eliminados do organismo, diminuindo a eficácia do tratamento. Essa rejeição obriga a aumentar a dose do anticorpo, o que pode aumentar o risco de efeitos colaterais e reações adversas no paciente. Desta forma, são poucos os anticorpos de origem murina disponíveis no mercado, sendo estes especialmente direcionados para tratamentos de curta duração (Bourel & Theillaud, 2006).

Com a existência da resposta HAMA, foram realizadas diversas tentativas para aumentar a eficácia dos anticorpos monoclonais em imunoterapia passiva. O desenvolvimento do anticorpo monoclonal quimérico, onde somente o domínio C-terminal constante ou porção Fc (fragmento cristalizável – *fragment crystallizable*), que é espécie-específica, é trocado quimicamente por uma porção Fc humana, com o objetivo de diminuir as reações adversas e aumentar a meia-vida no organismo

humano (Boulianne et al. 1984). A especificidade contra o antígeno nos anticorpos quiméricos é a mesma do anticorpo murino inicial, enquanto que as funções imunológicas são determinadas exclusivamente pela porção Fc humana, gerando, portanto uma menor resposta HAMA. Porém, os anticorpos quiméricos ainda apresentam uma resposta imune conhecida como HACA (*human anti-chimeric antibody*). No entanto, em proporções menores quando comparados ao anticorpo murino, o que resulta em um maior uso na terapêutica (Steinitz, 2009).

Outra tentativa de minimizar as reações adversas e efeitos colaterais dos anticorpos monoclonais terapêuticos murinos ou quiméricos consiste em criar anticorpos monoclonais humanizados ou totalmente humanos. Estes anticorpos podem ser desenvolvidos através de técnicas moleculares com o objetivo de eliminar as porções do anticorpo murino que não estão envolvidas na ligação com o antígeno e substituí-las por sequências humanas correspondentes. As regiões determinantes de complementariedade (CDR – *complementarity determining regions*), localizadas na região variável das cadeias leve e pesada do anticorpo (cada domínio variável possui três regiões CDR), desempenham um papel proeminente na ligação específica entre o antígeno e o anticorpo (Steinitz, 2009). Os fragmentos de DNA que correspondem às CDR são inseridos na estrutura da imunoglobulina humana por métodos de biologia molecular (Jones et al. 1986). Desta forma, a especificidade do anticorpo murino produzido pelo hibridoma é conservada, mas preservando 90% das propriedades do anticorpo humano, reduzindo sua imunogenicidade (Carter, 2006) (Figura 1.8).

A tecnologia do DNA recombinante permitiu a expressão de fragmentos de anticorpos em bactérias, construção de bibliotecas de expressão em fagos (*phage display*), estratégias de quimerização e humanização e o uso de animais transgênicos como estratégias para a obtenção de anticorpos monoclonais com aplicação em diagnóstico ou imunoterapia passiva em humanos (Siegel, 2002; Desgranges, 2004).

Seguindo outra tendência, há a produção de anticorpos através de camundongos transgênicos, como o *xenomouse*. Em um desses casos, o camundongo foi geneticamente modificado para produzir o Panitumumab (*Abgenix/Amgen*), um anticorpo monoclonal humano contra EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico - *epithelial growth factor receptor*). Após a imunização desses animais, é selecionado um clone específico de células B que possui a

capacidade de produzir anticorpos contra esse fator de crescimento. Essa linhagem é então imortalizada em células CHO (*Chinese hamster ovary*), e assim serão utilizadas para a fabricação em larga escala do anticorpo monoclonal humano (Jakobovits *et. al.*, 2007).

A Tabela 1.1 mostra alguns exemplos de anticorpos monoclonais utilizados no tratamento de diversas doenças, sendo eles murinos, humanizados, quiméricos ou humanos.

Tabela 1.1: Alguns exemplos de anticorpos monoclonais usados na terapêutica (adaptado de Bourel & Theillaud, 2006 e Zhiqiang, 2009)

Anticorpo	Origem	Alvo molecular	Indicação
OKT3	Murino	CD3	Transplantes
Panorex	Murino	EpCAM	Oncologia
Reopro	Quimérico (Fab')	gpIIb/IIIa	Doenças cardiovasculares
Rituxan	Quimérico	CD20	Oncologia
Simulect	Quimérico	CD25	Transplantes
Remicade	Quimérico	TNF α	Inflamação
Zenapax	Humanizado	CD-25	Transplantes
Herceptine	Humanizado	HER2/Neu	Oncologia
Mylotarg	Humanizado	CD33	Oncologia
Synagis	Humanizado	VRS	Doenças infecciosas
CAMPATH	Humanizado	CD52	Oncologia
Zevalin	Murino (marcado com $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}$)	CD20	Oncologia/Radioimunoterapia
Humira	Humanizado	TNF α	Artrite Reumatoide
Xolair	Humanizado	IgE	Asma alérgica
Bexxar	Murino (marcado com ^{131}I)	CD20	Oncologia/Radioimunoterapia

Erbitux (IMC-C225)	Quimérico	EGF-R	Oncologia
Avastin	Humanizado	VEGF	Oncologia
Hu-Max CD4	Humano	CD4	Oncologia
Tysabri	Humanizado	VLA4	Esclerose múltipla
Actemra	Humanizado	IL-6R	Inflamação e desordens autoimunes
Lucentis	Fragmento humanizado	VEGF	Oftalmologia
Vectibix	Humano	EGFR	Oncologia
Cimzia	Fragmento peguilado	TNF- α	Artrite Reumatoide
Soliris	Humanizado	C5a	Hematologia
Simponi	Humano	TNF- α	Artrite Reumatoide

1.2.2 Estrutura de um anticorpo

Uma molécula de anticorpo possui uma estrutura básica simétrica composta de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas, cujas extremidades N-terminais variam de um anticorpo para outro. Cada cadeia leve tem aproximadamente 24kDa, enquanto que cada cadeia pesada possui de 55 a 70kDa. Ambas estão ligadas entre si por pontes dissulfeto, assim como as cadeias pesadas entre si. Cada combinação de uma cadeia pesada com uma leve é capaz de se ligar a um antígeno particular (Abbas et al. 2008).

As imunoglobulinas humanas são divididas em cinco classes ou isotipos, dependendo da composição dos aminoácidos de suas cadeias pesadas, α (alfa), δ (delta), ϵ (épsilon), γ (gama) e μ (mi) para as IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Há dois tipos de cadeias leves, κ (kappa) e λ (lambda), que são comuns a todas as cinco classes de imunoglobulinas. A IgG ainda pode ser dividida em 4 sub-classes, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, no caso das IgGs humanas, e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, para as IgGs murinas (Janeway et al. 2002; Desgranges, 2004).

Cada imunoglobulina possui uma porção constante (Fc) que se liga às moléculas efetoras do hospedeiro e um domínio variável que é capaz de reconhecer o antígeno alvo (Fab' – *fragment antibody binding*). As cadeias leves possuem um domínio variável (V_L) e um domínio constante (C_L), enquanto as cadeias pesadas têm um domínio variável (V_H) e três (no caso das cadeias dos tipos α, δ e γ) ou quatro (para as cadeias dos tipos ε e μ) domínios constantes (C_H), conforme o isotipo. Cada domínio variável possui três regiões ditas como hipervariáveis ou CDRs que são capazes de reconhecer o antígeno de forma específica e que estão dispostas na região N-terminal dos anticorpos. As IgG ainda possuem um sítio de glicosilação no resíduo Asn²⁹⁷ localizado em cada domínio CH₂ da Fc que é essencial para a estabilização dos domínios CH₂ e para a ativação das funções efetoras, como a ligação ao receptor Fcγ e a ativação do sistema complemento (Figura 1.9) (Abbas et al. 2008; Desgranges, 2004; Zhiqiang, 2009).

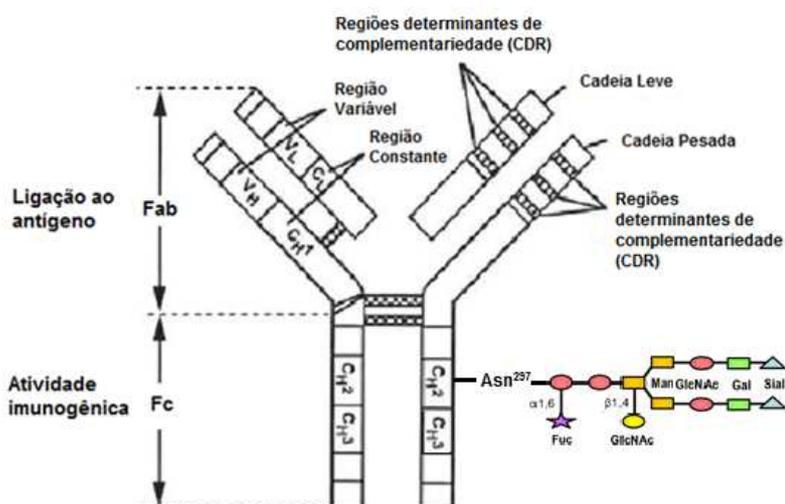


Figura 1.9: Representação esquemática de uma molécula de anticorpo do tipo IgG com seu sítio de glicosilação em Asn²⁹⁷ (adaptado de Desgranges, 2004 e Albert et al. 2008)

1.2.3 Obtenção de fragmentos de anticorpos

Fragmentos de anticorpos monoclonais IgG, como Fab' e F(ab')₂, e ainda os scFv, são amplamente usados como ferramentas imunológicas e reagentes para diagnóstico e terapêutica. Isto ocorre principalmente devido a sua farmacocinética ser mais rápida, graças ao seu menor tamanho e à ausência da porção Fc, evitando a ligação com os receptores FcRN presentes nas hemácias e garantindo uma rápida depuração renal. Outro fator preponderante é a sua baixa imunogenicidade, já que as interações não-específicas associadas com a porção glicosilada Fc são

eliminadas, pois não a possuem, de forma contrária como acontece nas IgG intactas (Coleman & Mahler, 2003).

As formas de utilização terapêutica mais comuns desses fragmentos Fab' e F(ab')₂ consistem na fabricação de antídotos para diversos venenos, como os presentes em soros fabricados pelos institutos Butantan e Vital Brasil, no tratamento de overdose de drogas (digoxina) e de intoxicação por toxinas bacterianas (difteria, tétano e botulismo), e como alternativa de tratamento para trombose e tumores (Jones & Landon, 2002; Persson, 2001; Cohen et al. 2000).

Adicionalmente ao uso terapêutico, fragmentos de anticorpos podem ser usados para auxiliar na determinação de estrutura proteica por técnicas de co-cristalografia (Coleman & Mahler, 2003). Além disso, fragmentos marcados radioativamente têm sido usados extensivamente como reagentes de diagnóstico *in vivo*, como por exemplo, no diagnóstico por imagem de tumores colorretais por tomografia computadorizada (Heskamp et al. 2012; Moffatt et al. 1999).

Para a marcação com isótopos radioativos, a redução da meia-vida terminal ajuda a reduzir a exposição ao radionuclídeo, melhorando a segurança e, especialmente, aprimorando a taxa de localização alvo/não alvo. Isto ajuda a melhorar a imagem radiológica, diminuindo o *background* e aumentando a definição da imagem, principalmente para os fragmentos do tipo F(ab')₂ quando comparados com os do tipo Fab' e o anticorpo inteiro (IgG) (Heskamp et al. 2012).

Muitos sistemas de ensaio *in vitro* com base imunológica, tais como biossensores, também preferem o uso de fragmentos ao invés do anticorpo completo (Cornell et al. 1997)

Originalmente, a digestão de anticorpos por enzimas proteolíticas tinha como objetivo elucidar a estrutura das imunoglobulinas. Diferentes estruturas podem ser obtidas através da fragmentação de diferentes classes de anticorpos com diferentes enzimas, ou pelo uso da mesma enzima com diferentes condições de digestão (Andrew, 2002).

Papaína e pepsina, duas proteases não específicas, podem clivar os anticorpos monoclonais preferencialmente na região da dobradiça, e deste modo têm sido usadas tradicionalmente na preparação de fragmentos F(ab')₂ bivalentes ou fragmentos Fab' univalentes (Adamczyk et al, 2000).

A pepsina (massa molecular de 36 kDa, aproximadamente) é a principal enzima proteolítica presente no suco gástrico dos vertebrados. Sua forma precursora inativa, o pepsinogênio (massa molecular 41,4 kDa, aproximadamente), é

produzida pela mucosa gástrica estomacal, sendo convertido para pepsina através da liberação de ácido gástrico, que diminui o pH do meio, com o objetivo de facilitar a quebra de quaisquer polipeptídeos presentes. (Fruton, 2002).

O pepsinogênio ainda possui 44 aminoácidos em sua cadeia N-terminal adicionais aos 327 da pepsina, que são liberados durante a conversão para pepsina. Essa enzima pertence à classe das aspartil-proteases, sendo basicamente uma proteína monomérica, com dois domínios e predominância de folhas- β -pregueadas. Para a enzima ser ativada, um dos dois resíduos de aspartato no sítio catalítico tem de ser protonado, e o outro desprotonado, o que ocorre em pH entre 1 e 5, já que em pH maiores que 7 a pepsina é desnaturada irreversivelmente (Figura 1.10). O alto número de resíduos ácidos explica a estabilidade da pepsina a pH extremamente baixo, pois cargas positivas em meios ácidos tendem a diminuir a estabilidade das estruturas poliméricas (James & Sielecki, 1986).

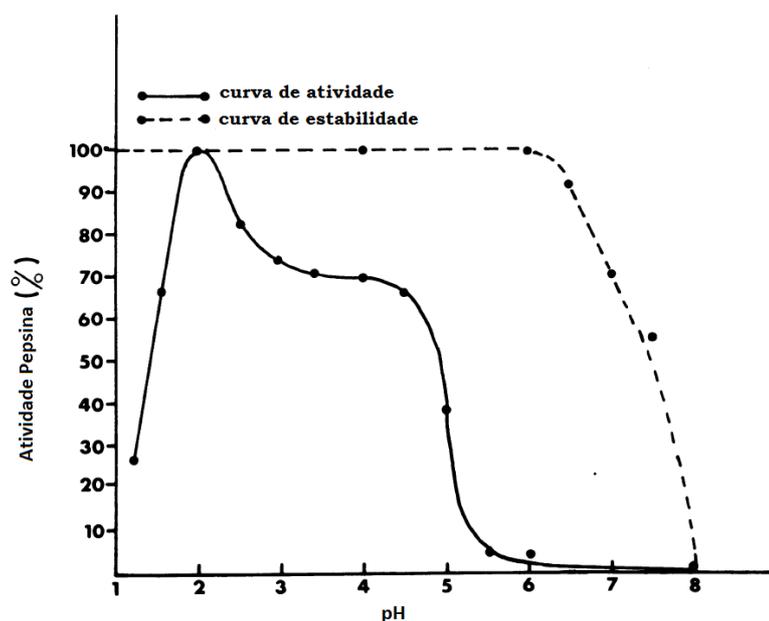


Figura 1.10: Curvas de estabilidade e atividade da pepsina de acordo com a variação do pH (adaptado de Piper & Fenton, 1965).

A fragmentação de anticorpos pela pepsina para a produção de $F(ab')_2$ já está bem elucidada. Essa enzima é capaz de clivar o anticorpo em sua porção C-terminal, logo acima da região da dobradiça, não permitindo, portanto, a separação dos fragmentos Fab' , mas apenas do fragmento Fc que logo é degradado. Como é necessária a utilização de baixo pH para que ocorra a digestão, pode ocorrer redução de atividade do anticorpo monoclonal digerido. Porém, esse processo pode ser otimizado ao controlar a quantidade de enzima e, principalmente, o tempo de exposição do anticorpo ao pH baixo (Morais & Massaldi, 2005).

A papaína, outra enzima utilizada para a obtenção de fragmentos de anticorpos Fab' e F(ab')₂, por ser capaz de clivar a molécula de anticorpo na lateral N-terminal, é uma hidrolase que apresenta estabilidade e atividade dentro de uma ampla variedade de condições, sendo estável até diante de altas temperaturas (Cohen et al. 1986). É caracterizada como sendo um polipeptídeo de cadeia única com três pontes dissulfeto e um grupo sulfidril necessário para a atividade da enzima. Sua massa molecular é de aproximadamente 23kDa.

Quando as moléculas de IgG são incubadas com papaína na presença de um agente redutor para uma das pontes dissulfeto presentes na região da dobradiça, há a separação do anticorpo em fragmentos Fab' ou F(ab')₂ (Figura 1.11).

A taxa de digestão enzimática e o tipo de fragmento obtido podem variar de acordo com a subclasse de anticorpo escolhida. O uso de pepsina, por exemplo, nem sempre gera fragmentos F(ab')₂ de anticorpos monoclonais murinos. Os isotipos IgG2a e IgG2b requerem altas proporções entre enzima e anticorpo e são bem mais susceptíveis a digestão que a IgG1, já que esta subclasse carece de um resíduo de aminoácido que contribui para uma região de dobradiça mais restrita e resistente à ação da enzima (Mariani et al. 1991). A IgG1 também apresenta maior resistência à ação da papaína, sendo clivada em dois passos, primeiramente em F(ab')₂ e depois em Fab', sem a necessidade de pré-ativação com cisteína (Figura 1.11) (Adamczyk et al. 2000).

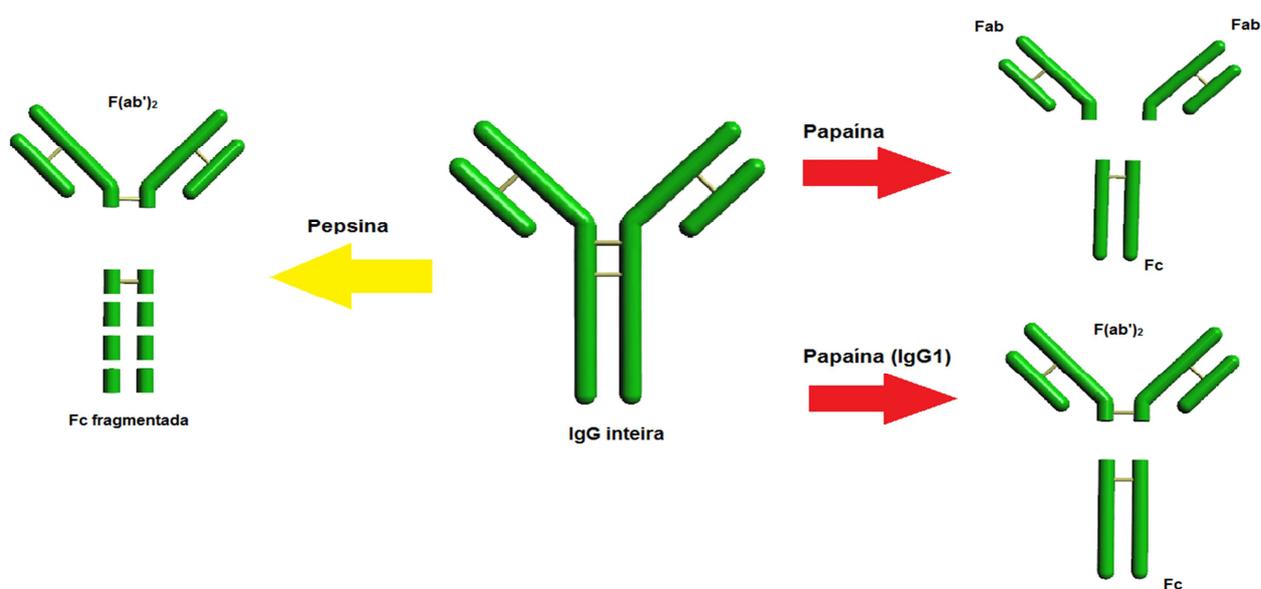


Figura 1.11: Esquema de digestão enzimática mostrando a ação das enzimas papaína e pepsina na produção de fragmentos de anticorpos.

1.3 JUSTIFICATIVA

Com a aplicação de técnicas de biologia molecular, tem sido possível alterar características como tamanho, farmacocinética, imunogenicidade, especificidade, afinidade de ligação e funções efetoras dos anticorpos (Jain et al. 2007). Porém, mesmo com o avanço biotecnológico, a utilização de métodos enzimáticos confere maior simplicidade em escala de laboratório.

Dado ao seu menor tamanho, o fragmento de anticorpo $F(ab')_2$ possuem melhor penetrabilidade em focos infecciosos e a falta da porção Fc confere uma farmacocinética diferenciada (Heskamp et al. 2012). Esses fragmentos possuem grande aplicabilidade na área de radioimunodiagnóstico (RID).

Atualmente, há uma colaboração entre Bio-Manguinhos e o IPEN/CNEN/SP (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear) para marcação do anticorpo anti-PBP2a de MRSA com ^{99m}Tc , a fim de criar uma nova ferramenta para diagnóstico *in situ* de infecções causadas por MRSA. Considerando as características descritas e a aplicabilidade na terapêutica, os fragmentos podem ser considerados como uma alternativa no tratamento de infecções por MRSA.

A caracterização do fragmento $F(ab')_2$ do anticorpo monoclonal murino anti-PBP2a de MRSA, bem como a avaliação de suas propriedades farmacocinéticas e de proteção *in vitro* são de grande importância, pois os resultados podem servir de base ao que será aplicado posteriormente para a obtenção de fragmento $F(ab')_2$ do anticorpo monoclonal anti-PBP2a humanizado, destinando-se ao imunodiagnóstico em pacientes infectados com MRSA e, em alguns casos, ao tratamento de infecções.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente projeto consiste na obtenção e caracterização de fragmentos $F(ab')_2$ do anticorpo monoclonal murino anti-PBP2a, por digestão enzimática.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimização da digestão enzimática com as enzimas pepsina e papaína;
- Isolamento da fração $F(ab')_2$, por cromatografia de imunoafinidade e ultrafiltração;
- Comparação da imunoreatividade da fração $F(ab')_2$ obtida por clivagem enzimática com pepsina e papaína por imunoenensaio enzimático (ELISA) em relação ao anticorpo íntegro;
- Realização de estudos *in vitro* para a avaliação da proteção conferida pelo fragmento $F(ab')_2$
- Realização de ensaios de farmacocinética para caracterizar a meia-vida plasmática dos fragmentos de anticorpo murino.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção e purificação do anticorpo monoclonal

O anticorpo monoclonal anti-PBP2a, presente no fluido ascítico de cultura de células do hibridoma 77 clone 38 (90/DA5/CB5/AA3), foi obtido em colaboração com o LATAM (Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais – Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Com o objetivo de isolar a fração rica em IgG das demais proteínas presentes no fluido ascítico, a mesma foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos, filtrada por membranas de 0,22 μ m (Milipore®) e então submetida à cromatografia de afinidade por proteína A, através da coluna HiTrap MabSelect SuRe (*GE Healthcare*) (5 mL). A estação de trabalho cromatográfica utilizada foi para CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) do tipo AKTA *Purifier* 10® (*GE Healthcare*). A cromatografia por afinidade foi realizada utilizando-se um gradiente em degraus (*stepwise*), com um fluxo de eluição de 5 mL/min. Como eluentes, foram utilizadas as soluções tampão fosfato de sódio 20 mM com cloreto de sódio 0,15M, pH 8,0 (eluyente A) e citrato de sódio 100mM, pH 3,2 (eluyente B). Para cada mililitro da fração de IgG recolhida nesta etapa, foram adicionados 150 μ L da solução tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 a fim de elevar o pH da solução para, aproximadamente, 7,0.

As frações obtidas foram dialisadas em solução tampão fosfato-salina (cloreto de sódio 1,37M, fosfato de sódio 100mM, cloreto de potássio 27mM, fosfato de potássio 20mM pH 7,4) e concentradas em unidades filtrantes Amicon® Ultra-15 10K (Millipore™).

3.2 Análise das frações obtidas por purificação e digestão enzimática

3.2.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A homogeneidade das frações obtidas pela purificação e do processo de digestão enzimática foram verificadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). Esta foi realizada em cuba vertical MiniProtean III (Bio-Rad), segundo Laemmli (1970), sendo a incubação das amostras feita na ausência de agente redutor (β -mercaptoetanol).

Uma amostra das frações obtidas foram dissolvidas em solução de tampão de amostra contendo SDS 10%, glicerol 25% (v/v), Tris-HCl 0,5M pH 6.8 e azul de bromofenol 0,5% (m/v). Para a estimativa do peso molecular das proteínas foi utilizado o padrão de proteínas coradas com pesos moleculares conhecidos (miosina 201.000; β -galactosidase 114.500; albumina de soro bovino 75.200; ovalbumina 49.000; anidrase carbônica 34.800; inibidor de tripsina 27.000; lisozima 17.000; aprotinina 6.200). A eletroforese foi realizada durante 90 minutos a 120 volts e as bandas proteicas foram reveladas com a solução corante *Coomassie brilliant blue R 250* (0,2 g %) em água: metanol: ácido acético (30:8:62, v/v/v). Posteriormente, o gel foi descorado com uma solução de metanol: ácido acético: água (30:8:62), v/v/v) (Silva Jr. 2001).

3.2.2 Quantificação das amostras obtidas

As frações obtidas após os processos de purificação foram quantificadas por espectrofotometria através análise de absorbância a 280nm utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (ThermoScientific™) e levando em consideração o coeficiente de extinção molar da imunoglobulina G (1,400) (Andrew & Titus, 2000).

3.3 Digestões enzimáticas

3.3.1 Digestão enzimática com pepsina

Para a digestão com a pepsina (Merck®, EC. 3.4.23.1, 10 FIP – U/mg), o protocolo foi adaptado de Kittipongwarakarn et al. (2011), onde a pepsina (10 mg/mL) foi adicionada à solução de anticorpos monoclonais nas proporções de

enzima/anticorpo (peso/peso) 1:10, 1:5, 1:2 e 1:1. O pH da solução foi ajustado para 3.20 pela adição de HCl 0,4N e a solução foi mantida em banho de água a 37°C durante 30 minutos. Passado este tempo, a digestão foi interrompida reajustando-se o pH da solução para 7.0 através da adição de NaOH 0,4N.

As frações obtidas pela digestão enzimática com a pepsina foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 10%).

3.3.2 Digestão enzimática com papaína

O protocolo da digestão enzimática foi adaptado de Adamczyk *et al* (2000). A enzima papaína (Merck®, EC. 3.4.22.2, 30000 USP – U/mg) em solução (10 mg/mL) foi adicionada a suspensão de anticorpos monoclonais nas proporções de 1:50; 1:33; 1:20 e 1:10 (papaína/anticorpo, peso/peso). Após a adição de papaína, a solução foi colocada em banho de água (37°C) durante 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas, a fim de estimar o melhor tempo de digestão. Também foi testado se a adição de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), um inibidor de proteases que age causando a sulfonilação dos resíduos de serina, poderia controlar melhor a digestão enzimática pela papaína.

Após a digestão, as frações de anticorpos digeridos foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 10%).

3.4 Purificação das amostras digeridas

3.4.1 Cromatografia por afinidade – MabSelect SuRe (GE)

Com o objetivo de eliminar porções de Fc ou anticorpos inteiros não digeridos, foi realizada uma primeira etapa de purificação por cromatografia de afinidade com a resina MabSelect SuRe (GE *Healthcare*). Esta é uma resina que possui como matriz a agarose e que tem como ligante a proteína A, caracterizada esta por possuir afinidade pela porção Fc da IgG.

A purificação foi feita manualmente. A coluna foi empacotada com 500µL de resina, já que 1mL da mesma é capaz de se ligar até a 30 mg/mL de IgG1; equilibrada com 5 volumes de coluna com solução tampão de ligação (fosfato de Sódio 20mM, cloreto de sódio 0,15M, pH 8.2). As amostras provenientes das digestões enzimáticas então foram aplicadas à coluna e foram recolhidas inicialmente as frações que não foram capazes de se ligar à coluna. A coluna foi

lavada com 15 volumes de coluna de solução tampão de ligação e eluída com de 5 a 10 volumes de coluna de solução tampão de eluição (citrato de sódio 0,1M pH 3.0), a fim de garantir remoção total da IgG. As frações eluídas tiveram o pH ajustado a 7.0 com adição de solução tampão TRIS-HCl 1M pH 9.0. A resina ainda foi lavada com 5 volumes de coluna de solução tampão de regeneração e, posteriormente, guardada em solução de etanol a 20%.

As amostras recolhidas foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida e quantificadas por análise de absorvância a 280nm (conforme demonstrado no item 3.2.2). Após a análise, a amostra que não se ligou à resina foi dialisada em PBS e filtrada através de unidades filtrantes de centrifugação Amicon – ultra 15 com corte de 50 kDa (Milipore®) a fim de retirar o excesso de enzima utilizada.

3.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Com o objetivo de avaliar a afinidade dos fragmentos de anticorpos à PBP2a, foi realizado um ensaio de ELISA do tipo indireto.

Para este ensaio, foram utilizadas microplacas de 96 poços (Maxisorb™) onde foram adicionadas 0,25 µg/poço de proteína recombinante purificada PBP2a diluída em solução tampão carbonato 0,05M pH 9.0. A microplaca então foi submetida à incubação a 4°C *overnight* para que houvesse adsorção do antígeno. Após esta etapa, foram efetuadas 3 lavagens com solução de PBS-*Tween* (solução tampão fosfato de sódio 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05% pH 7,2).

Em seguida, foi realizado o bloqueio com a adição de 200µL/poço de PBS-*milk* 5% (solução tampão fosfato de sódio 10mM, NaCl 150mM, leite desnatado 5%, pH 7.4). Esta reação foi incubada a 37°C durante 2 horas.

Decorrido o tempo, a microplaca foi novamente lavada 3 vezes com PBS-*Tween*, o anticorpo monoclonal anti-PBP2a (IgG) e os fragmentos F(ab)₂ obtidos por digestão pela pepsina e papaína foram diluídos em PBS-*milk* 5% e adicionados nas quantidades de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 ng/poço.

A reação foi novamente incubada a 37°C por 1 hora e 30 minutos e após 3 lavagens com PBS-*Tween* foi adicionado 100µL/poço da Imunoglobulina anti-*mouse kappa* conjugada HRP® (SouthernBiotech®), diluída 1:10000 (v/v) em PBS-*milk* 5%. Após a incubação de 90 minutos a 37°C foram realizadas 3 lavagens com PBS-*Tween* e o cromógeno TMB (Tetrametilbenzidina 1%, Bio-Rad®) foi adicionado

(100µL/poço) e incubado por 10-15 minutos, até que se verificasse a presença de cor na reação.

A reação foi então interrompida com a adição de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N e as densidades ópticas foram determinadas a 450nm em leitor de microplaca do tipo SUNRISE™ (Tecan®).

A avaliação da ligação do fragmento ao antígeno foi estimada através da diferença das densidades ópticas observadas entre o controle positivo (amostra somente com o anticorpo inteiro) e das amostras incubadas com os fragmentos.

3.6 Immunoblotting

Por ser um ensaio mais específico que o ELISA, foi utilizada a técnica de *Western Blot* para confirmar a ligação do fragmento F(ab')₂ ao fragmento recombinante da proteína PBP2a de MRSA.

O antígeno (PBP2a recombinante, massa molecular estimada em aproximadamente 8.000 Da) contendo cerca de 20µg de proteína, foi submetido à eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida a 15% (similar a item 3.2.1) e posterior transferência a 60V por 60 minutos para membranas de nitrocelulose de tamanho 8 x 6,5 cm com poro de 0,22 µm (Bio-Rad *Laboratories Inc.*), através de um sistema de transferência vertical (Bio-Rad *Laboratories Inc.*), segundo Towbin et al. (1979).

Após a transferência, cada raia da membrana contendo a proteína foi separada em canaletas e bloqueadas com solução TBS (Tris-HCl 25mM pH 8.0; NaCl 0,15mM) contendo leite em pó desnatado 10% e albumina bovina 1% (BSA), sob agitação à temperatura ambiente durante 3 horas. Cada membrana foi submetida a agitação constante durante 18 horas (*overnight*) com 100µg do anticorpo não digerido e dos fragmentos digeridos com pepsina e papaína, diluídos em solução TBS contendo leite desnatado 1%. As lavagens foram feitas com solução de Tween 20 (0,05%) em TBS após cada etapa de incubação.

Em seguida, as membranas foram tratadas com o conjugado anti-*mouse kappa* marcado com peroxidase (SouthernBiotech®) na diluição de 1:6000 (v/v) em solução TBS contendo leite desnatado 1% por 3 horas.

As bandas foram reveladas com a adição do reagente de cor *Horseradish Peroxidase color development reagent DAB* (3,3'-diaminobenzidina) (Bio-Rad *Laboratories Inc.*) complementado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30% até a

identificação visual das bandas. A reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.7 Ensaio de proteção *in vitro*

O objetivo deste ensaio foi avaliar a atividade neutralizante dos anticorpos em um sistema fechado (bactéria e anticorpo juntos em um meio de cultivo).

Foi incubado a 37°C e 200 rpm um inóculo bacteriano padrão (cepa MRSA clone epidêmico brasileiro), em meio líquido (caldo LB com adição de oxacilina 20µg/mL) durante 18 horas (Teixeira *et al*, 1995). Após o crescimento do mesmo, foram realizadas sete diluições seriadas (1:10, v:v). As diluições 1:10⁶ e 1:10⁷ foram semeadas por esgotamento com alça de Drigalski em placas LB ágar, a fim de quantificar o inóculo bacteriano.

Em 4 tubos (Falcon, 50 mL) diferentes foram acrescentados 5mL de meio líquido (caldo LB com adição de oxacilina 20µg/mL) e 10µL da diluição 1:10³, correspondendo a aproximadamente 10³ UFC, conforme quantificação bacteriana após 24 horas de incubação.

Para cada tubo foram adicionados 250µg de anticorpo anti-PBP2a inteiro (tubo A), 250µg de fragmentos F(ab')₂ obtidos por digestão com a pepsina (tubo B), 250µg de fragmentos F(ab')₂ obtidos por digestão com a papaína (tubo C), ou PBS estéril como controle negativo (tubo D). Os tubos foram deixados em agitação constante (100 rpm) a 37°C por 4 horas, sendo recolhidas alíquotas (100µL) após 2 e 4 horas de incubação. Dessas amostras foram feitas 3 diluições seriadas (1:10, v/v), onde as diluições 1:10, 1:10² e 1:10³, foram semeadas em LB ágar e incubadas a 37°C por 18 horas para determinar a quantidade de bactérias que cresceram na presença e ausência do anticorpo e fragmentos.

3.7.1 Análise Estatística

A partir das quantificações das placas foi calculada a média e a significância dos dados foi feita por teste t de *Student*, sendo considerado significativo quando o valor de *p* for menor que 0,05.

3.8 Ensaios de farmacocinética para determinação da meia-vida plasmática

O experimento foi composto por 8 animais (camundongos BALB/c) divididos em dois grupos principais (A e B), dependendo do tipo de anticorpo aplicado, e em mais dois grupos secundários (A1, A2, B1 e B2), de acordo com o ciclo de horas.

O grupo A foi composto por 4 animais inoculados com o anticorpo monoclonal (IgG) e o grupo B por 4 animais inoculados com os fragmentos $F(ab')_2$ obtidos por digestão do anticorpo com a pepsina. Os grupos A1 e B1, com 2 animais cada, foram usados para avaliar a distribuição dos anticorpos e dos fragmentos nas primeiras 12 horas e A2 e B2, também com 2 animais cada, foram usados para o período posterior a 12 horas, de modo a ter pontos de coleta a cada 6 horas.

Os animais dos grupos A1 e B1 foram inoculados (250 μ g) via intraperitoneal às 7 horas da manhã (com coleta de sangue pré-imune) e a partir daí foi coletado sangue dos animais (via retro orbital) a cada 6 horas, ou seja, às 13 horas e às 19 horas.

Para os animais dos grupos A2 e B2, que também foram inoculados com 250 μ g de anticorpo monoclonal ou fragmento $F(ab')_2$ (via intraperitoneal) às 19 horas, as coletas foram realizadas a cada 6 horas a partir das 13 horas do dia seguinte até às 19 horas a fim de avaliar a biodistribuição de anticorpos e fragmentos durante 24 horas.

Ainda foram coletadas amostras de sangue correspondentes a 36 e 48 horas de tratamento para os grupos A2 e B2, e de 48 horas para os grupos A1 e B1, de forma a aumentar o período de biodistribuição a ser avaliado.

A partir do sangue coletado foi realizado o ensaio de ELISA semiquantitativo a partir do soro dos animais, para que pudesse ser avaliada a biodistribuição dos anticorpos nos animais em diferentes momentos (tempos).

Este experimento foi aprovado pela comissão de ética no uso dos animais, de acordo com o registro CEUA nº LW-71/12, e realizado pelo Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) da Fiocruz. (Anexo 1).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da homogeneidade do anticorpo monoclonal purificado

De acordo com experimentos de caracterização feitos anteriormente em PAGE gradiente nativo (5-15%), o anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA apresenta peso molecular de aproximadamente 162.000 (Chagas, 2011).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) realizada a partir da amostra do anticorpo monoclonal purificado a partir de fluido ascítico, apresentou uma única banda eletroforética, na ausência do redutor β -mercaptoetanol, entre as bandas de 201 e 114 KDa (Figura 4.1, seta vermelha) e na presença de agente redutor, duas bandas características de IgG referentes às cadeias pesada e leve, com pesos moleculares de aproximadamente 50 e 30 kDa, respectivamente.

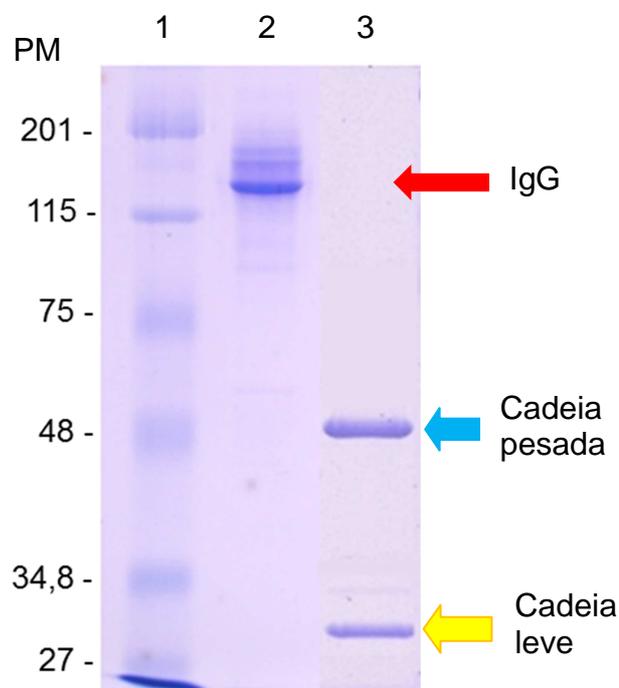


Figura 4.1: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras e redutoras de amostra de anticorpo monoclonal purificado (5 μ g). Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained[®] Broad Range (201.000 a 6.200) (Bio-Rad *Laboratories Inc.*). Raia 2: Anticorpo anti-PBP2a purificado em condições não redutoras (5 μ g). Raia 3: Anticorpo anti-PBP2a purificado em condições redutoras (com β -mercaptoetanol)

Foram detectadas seis bandas eletroforéticas relacionadas às oito proteínas descritas no padrão de proteínas de peso molecular Prestained® Broad Range (Bio-Rad *Laboratories Inc.*). A aprotinina e a lisozima, que apresentariam pesos moleculares de 6.200 e 17.000, respectivamente, não foram observadas.

Na quantificação dos anticorpos foi possível verificar que a purificação desse lote de fluido ascítico obteve 7,5 mL de solução de anticorpo em tampão PBS com uma concentração de 2,2 mg/mL.

4.2 Digestão enzimática com pepsina

4.2.1 Determinação da relação enzima/substrato para a pepsina

Para determinar a quantidade de pepsina capaz de produzir os fragmentos F(ab')₂ foram utilizadas as proporções enzima/anticorpo (p/p) de 1:10, 1:5, 1:2, 1:1 (µg/µg) (Tabela 4.1). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 10% não redutor (Figura 4.2).

Tabela 4.1: Composição das amostras para a determinação da relação enzima/substrato adequada para digestão do anticorpo IgG1 com pepsina.

Solução Pepsina	Solução Anticorpo	Relação Pepsina/Anticorpo
10mg/mL	1 mg/mL	(p/p)
1 µL (= 10 µg)	100 µL (= 100 µg)	1/10
2 µL (= 20 µg)	100 µL (= 100 µg)	1/5
5 µL (= 50 µg)	100 µL (= 100 µg)	1/2
10 µL (= 100 µg)	100 µL (= 100 µg)	1/1

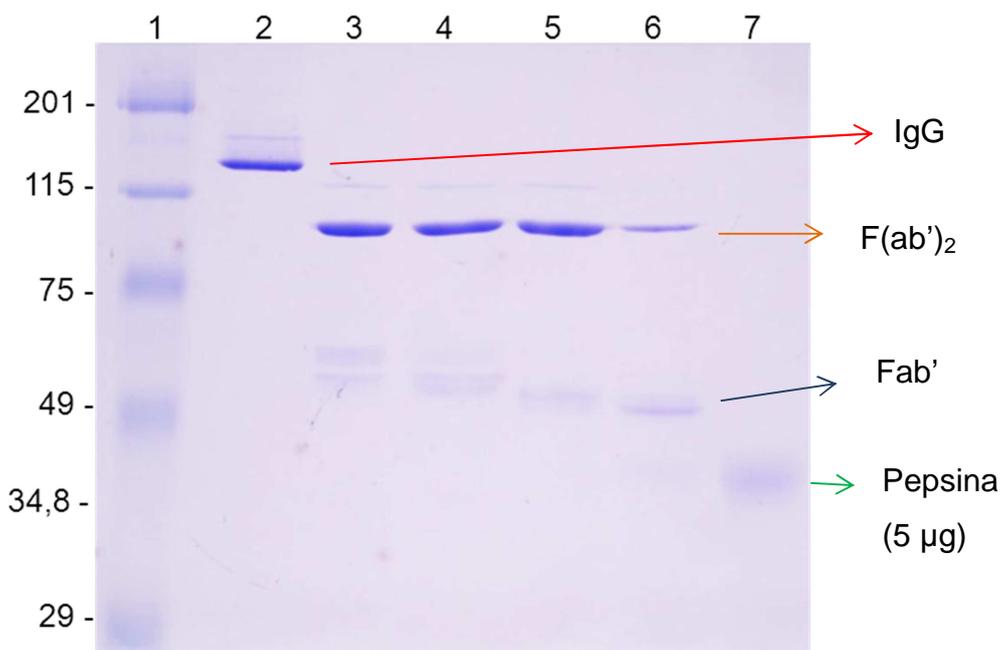


Figura 4.2: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com pepsina. Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained[®] Broad Range (Bio-Rad). Raia 2: Anticorpo monoclonal purificado (2 µg). Raia 3: Anticorpo digerido com pepsina na proporção de 1:10. Raia 4: Anticorpo digerido com pepsina na proporção de 1:5. Raia 5: Anticorpo digerido com pepsina na proporção de 1:2. Raia 6: Anticorpo digerido com pepsina na proporção de 1:1. Raia 7: Pepsina 1 mg/mL (5 µg).

Pela análise do gel foi possível verificar uma banda de aproximadamente 100 kDa (entre 114 e 75 KDa) já a partir da proporção de 1:10, correspondente ao fragmento F(ab')₂ obtido na digestão enzimática com a pepsina. Também foi observado a formação de bandas na região próxima a 50 KDa, especialmente na raia 6, onde há maior proporção de enzima/anticorpo. Tais bandas podem ser correspondentes à formação de fragmentos do tipo Fab'.

Ainda foram observadas bandas na altura relacionada à IgG não digerida, não digerida pela enzima (raias 3 a 5). Apenas na raia 7, que corresponde à proporção de 1:1, não é observada a formação dessa banda, mas pode ser justificado pela quantidade insuficiente de proteína aplicada no gel.

A banda referente à pepsina (raia 7) está presente no gel na altura de aproximadamente 35 kDa. Tal banda pode ser verificada também, mas de forma menos intensa, na raia 6.

4.2.2 Digestão enzimática - Pepsina

Após a determinação da relação enzima/substrato adequada para gerar fragmentos do tipo $F(ab')_2$, 3 mg do anticorpo monoclonal anti-PBP2a foram digeridos com pepsina na proporção de 1:5 (p/p) ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) (Figura 4.3).

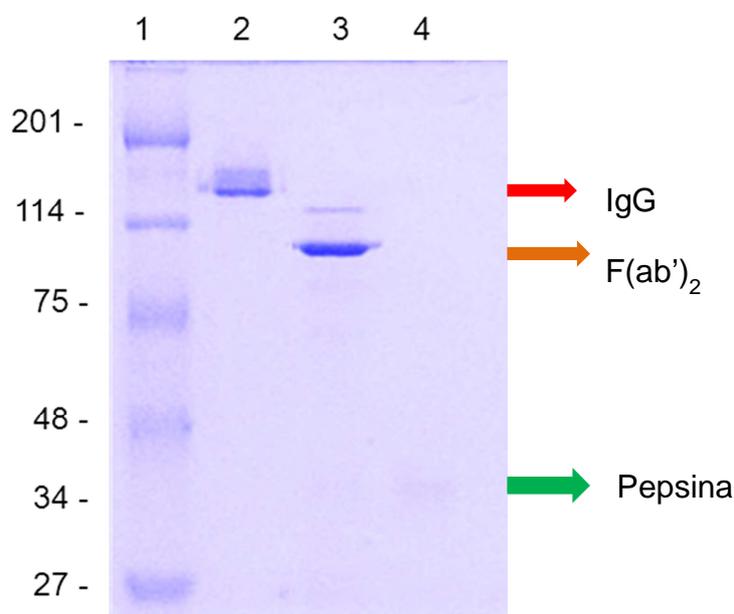


Figura 4.3: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com pepsina na proporção de 1:5 (p/p). Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained® Broad Range (Bio-Rad). Raia 2: Anticorpo monoclonal purificado (2 μg). Raia 3: Anticorpo digerido com pepsina na proporção de 1:5. Raia 4: Pepsina 1 mg/mL (2 μg).

A proporção de 1:5 (p/p) foi suficiente para digerir o anticorpo e formar o fragmento $F(ab')_2$, não sendo capaz de digerir o anticorpo de forma completa, deixando traços de IgG. Não foram observados fragmentos de massa correspondente ao fragmento Fab' (50 kDa).

4.2.2.1 Purificação das amostras digeridas com pepsina por cromatografia de afinidade e ultrafiltração

A fim de retirar os traços de IgG presentes na fração digerida por pepsina, recorreu-se ao uso de cromatografia de afinidade em proteína A com a resina MabSelectSuRe (GE) na tentativa de obter uma solução mais homogênea composta pelo fragmento $F(ab')_2$ (Figura 4.4).

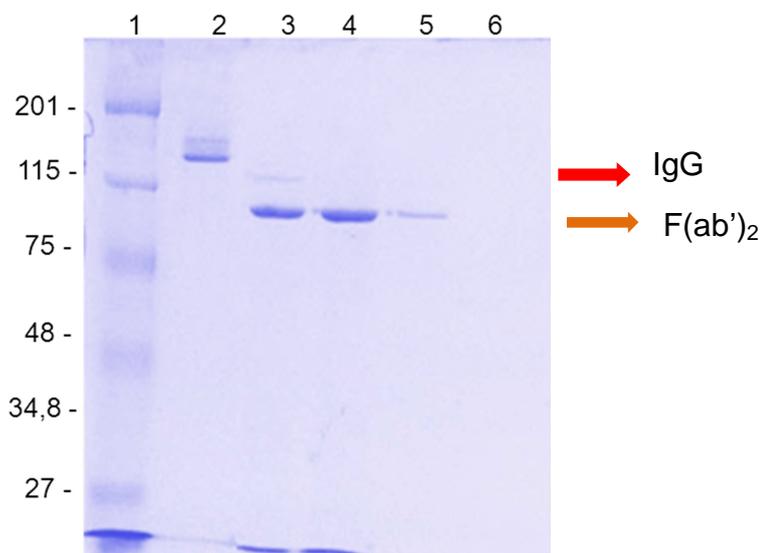


Figura 4.4: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente ao isolamento dos fragmentos $F(ab')_2$ utilizando a resina de proteína A MabSelectSuRe (GE). Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained[®] Broad Range (Bio-Rad). Raia 2: Anticorpo monoclonal 2 μ g. Raia 3: Anticorpo digerido com pepsina. Raia 4: Fração não ligada à resina. Raia 5: Fração correspondente à etapa de lavagem. Raia 6: Fração eluída da resina.

Através do SDS-PAGE foi possível observar que na fração não ligada à resina (Raia 4) houve o isolamento dos fragmentos $F(ab')_2$. Também foi verificada a presença de fragmento $F(ab')_2$ na fração correspondente à etapa de lavagem da resina (Raia 5), indicando que os mesmos não se ligaram à coluna.

As frações cromatográficas que apresentaram o fragmento $F(ab')_2$ foram dialisadas, concentradas em membranas de ultrafiltração Amicon 50 MWCO e analisadas por SDS-PAGE 10% (Figura 4.5).

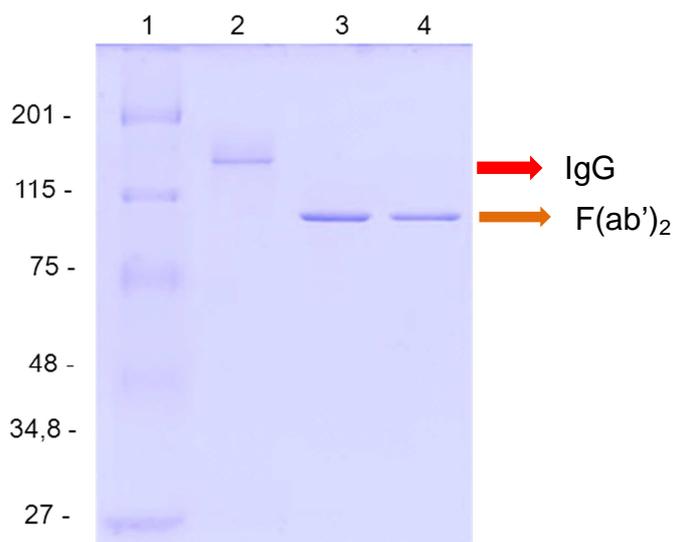


Figura 4.5: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à fração cromatográfica do fragmento $F(ab')_2$ após diálise e ultrafiltração. Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained[®] Broad Range (Bio-Rad). Raia 2: Anticorpo monoclonal 2 μ g. Raia 3: Anticorpo digerido com pepsina após passagem pela MabSelectSuRe. Raia 4: Anticorpo digerido com pepsina após diálise e ultrafiltração.

As etapas de diálise e concentração por ultrafiltração indicaram apenas uma banda visível na região abaixo de 115 kDa (Raia 4, Figura 4.5), que deve ser correspondente ao fragmento F(ab')₂.

A quantificação proteica feita a partir da leitura da fração F(ab')₂ obtida por digestão enzimática da absorbância a 280nm permitiu estimar-se um rendimento de aproximadamente 74% em relação à amostra de anticorpo inicial (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Quantificação da amostra obtida após purificação de digestão por pepsina.

Quantidade inicial de anticorpo IgG	Quantidade final de F(ab') ₂
3 mg	2,23 mg
Rendimento aproximado	74%

4.3 Hidrólise enzimática com a papaína

4.3.1 Otimização das condições de hidrólise enzimática com a papaína

Para determinar a melhor relação enzima/substrato para a papaína, foram testadas as proporções de 1:50, 1:33, 1:20, 1:10 (p/p) (µg/µg) (Tabela 4.3) a 37°C por 2 horas. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE em condições não redutoras (Figura 4.6).

Tabela 4.3: Composição das amostras para a determinação da relação enzima/substrato adequada para digestão do anticorpo IgG1 com papaína.

Solução Papaína 10mg/mL	Solução Anticorpo 1 mg/mL	Relação Papaína/Anticorpo (p/p)
1 µL (= 10 µg)	500 µL (= 500 µg)	1/50
1,5 µL (= 15 µg)	500 µL (= 500 µg)	1/33
2,5 µL (= 25 µg)	500 µL (= 500 µg)	1/20
5 µL (= 50 µg)	500 µL (= 500 µg)	1/10

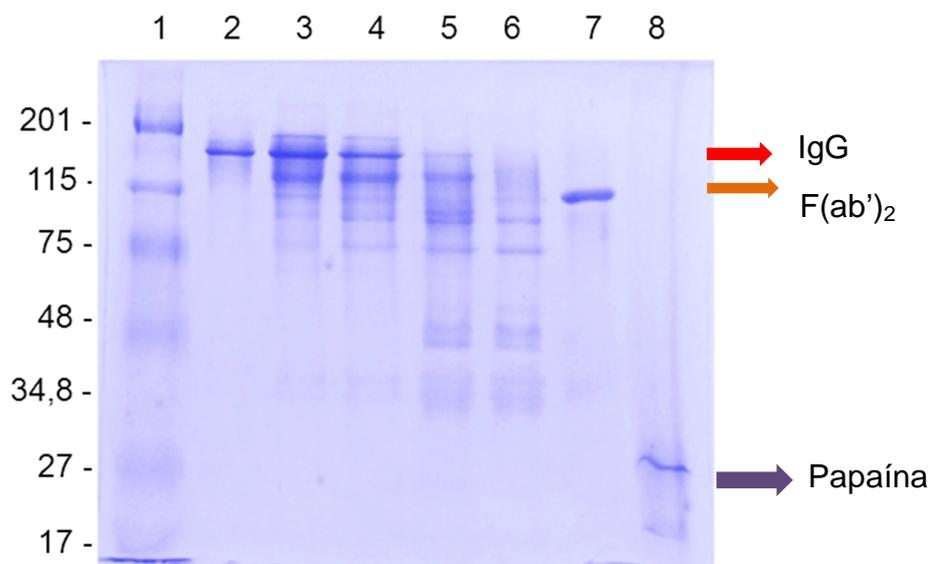


Figura 4.6: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com papaína. Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained[®] Broad Range (Bio-Rad). Raia 2: Anticorpo monoclonal purificado (2 µg). Raia 3: Anticorpo digerido com papaína na proporção de 1:50 (p/p). Raia 4: Anticorpo digerido com papaína na proporção de 1:33 (p/p). Raia 5: Anticorpo digerido com papaína na proporção de 1:20 (p/p). Raia 6: Anticorpo digerido com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 7: Fragmento F(ab')₂ isolado após hidrólise com a pepsina (3 µg). Raia 8: Papaína 1 mg/mL (5 µg).

Através da análise da figura acima, foi possível perceber na digestão com a papaína a presença de outras bandas além da referente ao fragmento F(ab')₂. Somente na proporção de 1:10 verifica-se a total digestão do anticorpo. Também foram visualizadas bandas na região próxima a 48 KDa, que podem ser relacionados com a formação de Fab', especialmente nas proporções de 1:20 e 1:10 (Raias 5 e 6, Figura 4.6).

Bandas referentes à papaína foram observadas abaixo da região referente a 27 kDa.

A partir dessas observações, foi testado se a ação de um inibidor de proteases como o PMSF, poderia controlar melhor a digestão com a papaína. Também foi testado se diferentes tempos de digestão (15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos) a 37°C poderiam melhorar a digestão, gerando mais fragmentos F(ab')₂. Por ter digerido o anticorpo de forma completa, a proporção de 1:10 foi utilizada para comparação diante da ausência ou presença de PMSF (Figuras 4.7 e 4.8).

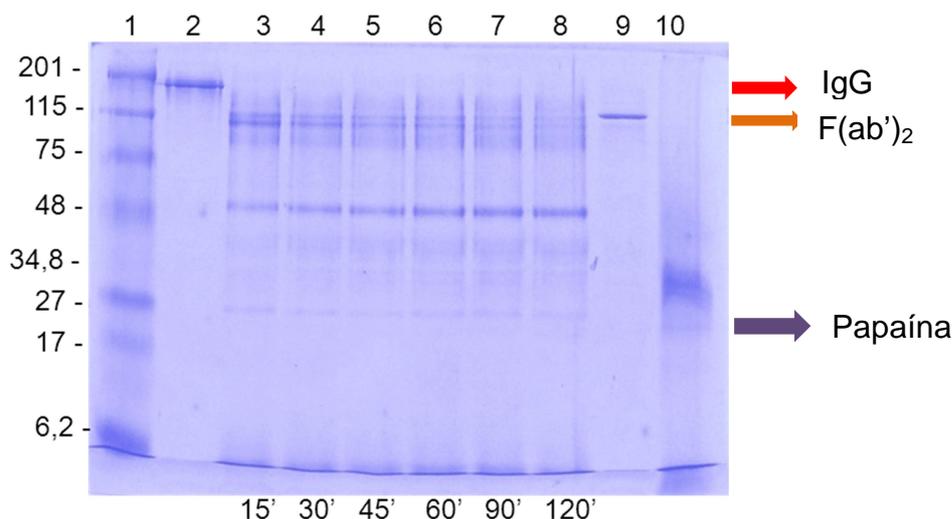


Figura 4.7: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com papaína em diferentes tempos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos na ausência de PMSF. Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained® Broad Range (Bio-Rad). Raia 2: Anticorpo monoclonal purificado (2 µg). Raia 3: Anticorpo digerido por 15 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 4: Anticorpo digerido por 30 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 5: Anticorpo digerido por 45 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 6: Anticorpo digerido por 60 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 7: Anticorpo digerido por 90 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 8: Anticorpo digerido por 120 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 9: Fragmento F(ab')₂ isolado com pepsina (1,5 µg). Raia 10: Papaína 1 mg/mL (5 µg).

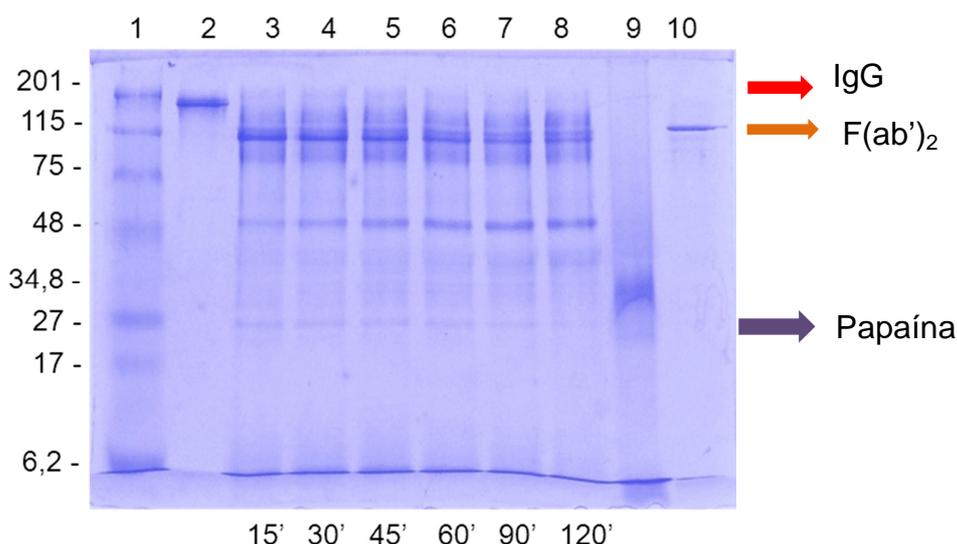


Figura 4.8: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com papaína em diferentes tempos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos na presença de PMSF 1mM. Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained® Broad Range (Bio-Rad). Raia 2: Anticorpo monoclonal purificado (2 µg). Raia 3: Anticorpo digerido por 15 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 4: Anticorpo digerido por 30 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 5: Anticorpo digerido por 45 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 6: Anticorpo digerido por 60 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 7: Anticorpo digerido por 90 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 8: Anticorpo digerido por 120 minutos com papaína na proporção de 1:10 (p/p). Raia 9: Papaína 1 mg/mL (5 µg). Raia 10: Fragmento F(ab')₂ isolado com pepsina (1,5 µg).

Foi possível observar que com a adição de um inibidor de proteases, houve uma maior intensidade nas bandas correspondentes à formação de $F(ab')_2$. Não houve alteração significativa da digestão com o aumento do tempo, sendo que 15 minutos já foi suficiente para que houvesse a formação do fragmento $F(ab')_2$ com menor formação de fragmento Fab' .

4.3.2 Digestão enzimática – papaína

Com o estabelecimento da proporção de enzima/substrato, tempo de digestão e uso de inibidores de proteases, foi realizada a digestão de 3 mg de anticorpo para a obtenção de fragmentos $F(ab')_2$ pela papaína (Figura 4.9).

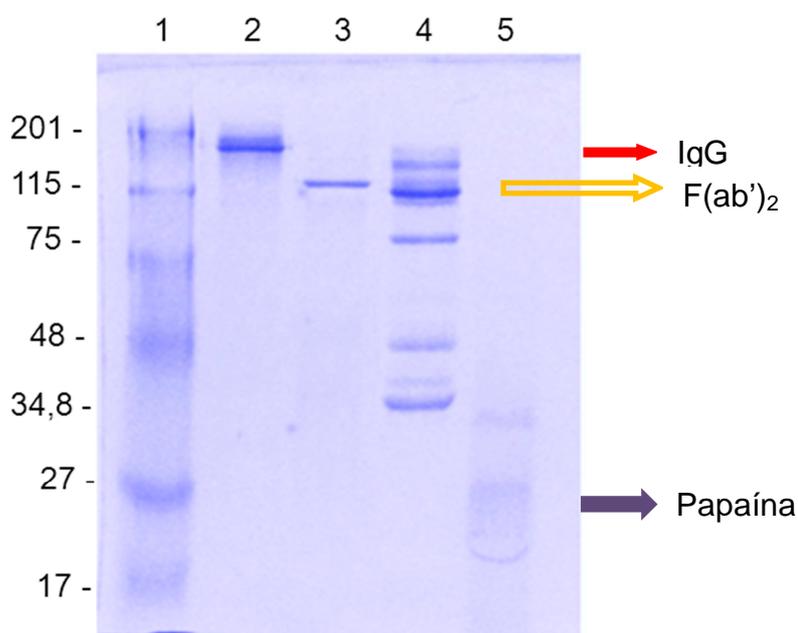


Figura 4.9: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à digestão enzimática do anticorpo com papaína na proporção de 1:10 (p/p) com 30 minutos de incubação na presença de PMSF 1mM. Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained® Broad Range (Bio-Rad). Raia 2: Anticorpo monoclonal purificado (2 μ g). Raia 3: Fragmento $F(ab')_2$ isolado por digestão com pepsina (1,5 μ g). Raia 4: Digestão de anticorpo com papaína 1:10 (p/p). Raia 5: Papaína 1mg/mL (2 μ g)

Foi possível observar a formação do fragmento $F(ab')_2$, bem como outros fragmentos resultantes da digestão do anticorpo pela papaína, entre eles fragmentos de aproximadamente 50 kDa, indicativos de fragmento Fab' .

4.3.2.1 Purificação das amostras digeridas com papaína por cromatografia de afinidade e ultrafiltração

Para tentar isolar o fragmento $F(ab')_2$ seguiu-se o protocolo adotado previamente para a pepsina (item 4.2.2.1), passando o produto da digestão pela resina de proteína A. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 4.10.

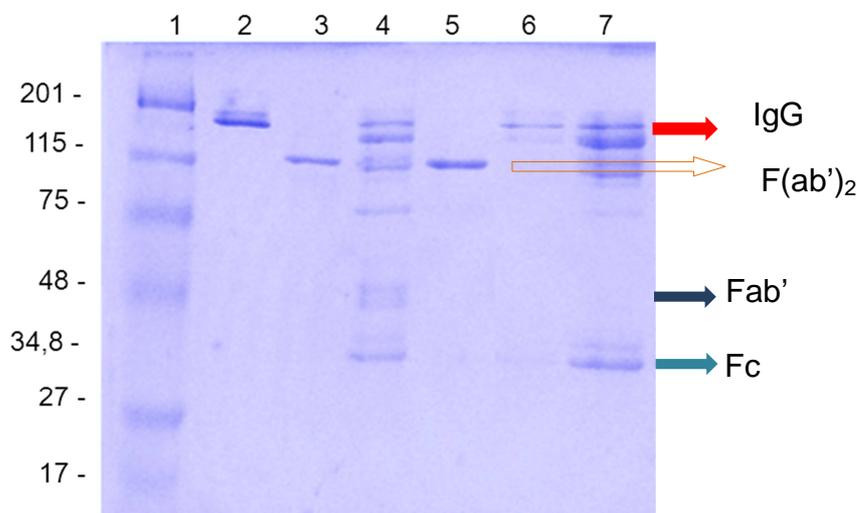


Figura 4.10: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à purificação dos fragmentos $F(ab')_2$ após digestão com papaína utilizando a resina de proteína A MabSelectSuRe (GE). Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained[®] Broad Range (Bio-Rad). Raia 2: Anticorpo monoclonal 2 μ g. Raia 3: Fragmento $F(ab')_2$ isolado por digestão com pepsina (1,5 μ g). Raia 4: Anticorpo digerido com papaína 1:10 (p/p). Raia 5: Fração não ligada à resina. Raia 6: Primeira fração eluída da resina. Raia 7: Segunda fração eluída da resina.

Na análise por SDS-PAGE da figura acima, verifica-se que a fração que não se ligou à resina apresentou o fragmento $F(ab')_2$, e nas frações eluídas observou-se diversas bandas que estavam presentes na digestão, causadas pela hidrólise do anticorpo pela papaína.

Após a cromatografia, foi realizada a diálise e a amostra proveniente da fração não ligada à resina foi submetida a unidades de ultrafiltração (Amicon[®] MWCO 50.000) para que o fragmento $F(ab')_2$ pudesse ser isolado (Figura 4.11).

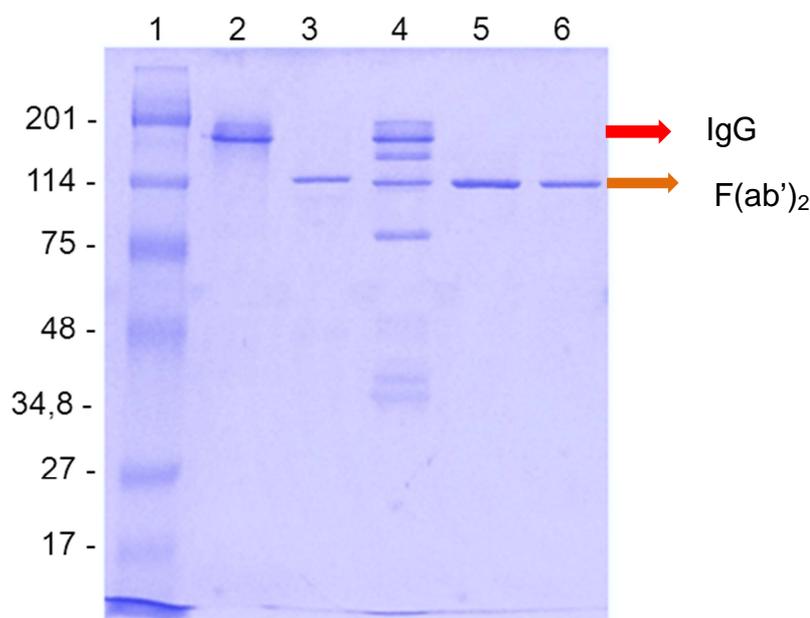


Figura 4.11: SDS-PAGE 10% em condições não redutoras referente à purificação dos fragmentos $F(ab')_2$ obtidos por digestão com papaína após diálise e ultrafiltração. Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained[®] Broad Range (Bio-Rad). Raia 2: Anticorpo monoclonal (2 μ g). Raia 3: Fragmento $F(ab')_2$ isolado por digestão com pepsina (1,5 μ g). Raia 4: Anticorpo digerido com papaína. Raia 5: Fração não ligada à resina MabSelectSure. Raia 6: Fragmento $F(ab')_2$ obtido por digestão com papaína após diálise e ultrafiltração.

Foi observado que após a ultrafiltração na análise do SDS-PAGE corado com *Coomassie Brilliant Blue*, observa-se apenas uma banda visível na região próxima a 115 kDa (Figura 4.11, raia 6), semelhante à obtida pela digestão com a pepsina que é correspondente ao fragmento $F(ab')_2$.

A quantificação por absorvância a 280nm da fração contendo o fragmento $F(ab')_2$ obtido através da digestão por papaína apontou um rendimento de aproximadamente 56,7% em relação à amostra de anticorpo inicial, menor que o apresentado pela digestão com pepsina (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Rendimento da fração $F(ab')_2$ após purificação da digestão de IgG1 por papaína.

Quantidade inicial de anticorpo IgG	Quantidade final de $F(ab')_2$
3 mg	1,7 mg
Rendimento aproximado	56,7%

4.4 Ensaio imunoenzimático indireto

O ensaio imunoenzimático indireto comparativo entre o fragmento $F(ab')_2$ e o anticorpo íntegro demonstrou que mesmo após o processo de digestão enzimática, as frações contendo fragmentos $F(ab')_2$ obtidos pela digestão com pepsina e papaína apresentaram afinidade pela PBP2a, exibindo valores de densidade óptica superiores aos apresentados pelo anticorpo não digerido (Figura 4.11). Ensaio posteriores demonstraram a mesma reação.

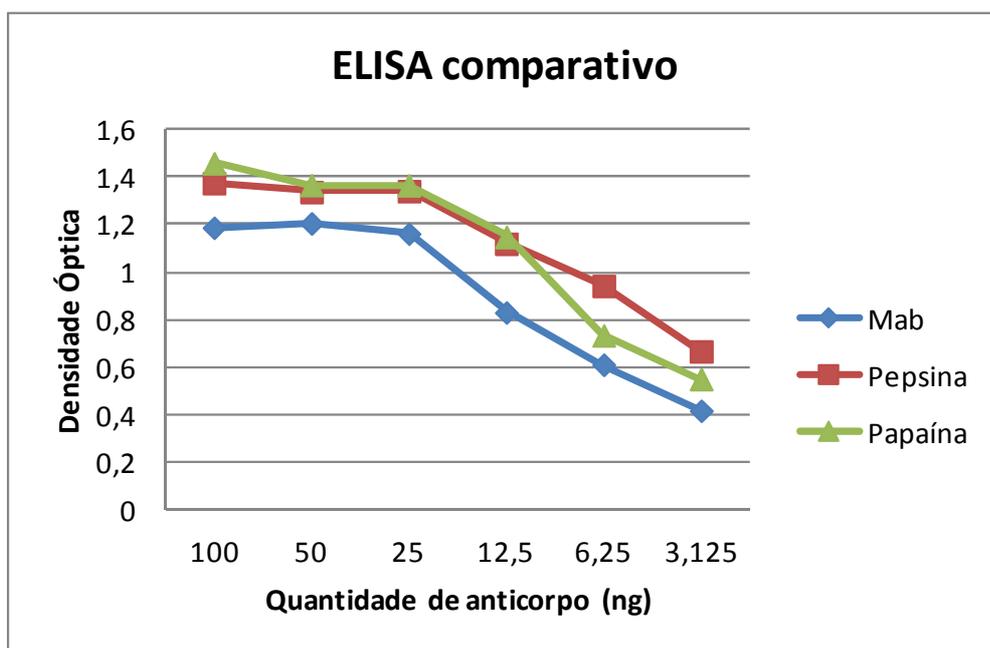


Figura 4.12. Densidades ópticas observadas no ensaio de ELISA: comparativo entre o anticorpo íntegro e fragmentos $F(ab')_2$ obtidos por digestão enzimática com papaína e pepsina, nas quantidades de anticorpo e fragmentos correspondentes a 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 ng/poço. A densidade óptica do branco de reação foi descontada dos valores que estão representados na curva.

4.5 Immunoblotting

Para avaliar melhor a especificidade dos fragmentos $F(ab')_2$ à PBP2a, foi realizado um ensaio do tipo *Western Blot*, já que o ELISA é um ensaio mais sensível enquanto o *Blot* é mais específico.

Segundo o item 3.6 da metodologia, a PBP2a foi transferida para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com o anticorpo inteiro (A) e os fragmentos $F(ab')_2$ obtidos por digestão com pepsina (B) e papaína (C).

A PBP2a foi identificada através da banda de 7.600 do marcador de peso molecular *Kaleidoscope* (Bio-Rad Laboratories Inc.), correspondente à aprotinina, já que o fragmento recombinante apresenta peso molecular na faixa de 8.000 (Figura 4.11, ver seta).

A revelação do *Blotting* por DAB demonstrou que tanto o anticorpo não digerido como os fragmentos obtidos com ambas as enzimas apresentaram o mesmo perfil de detecção de bandas (Figura 4.12). Sugerindo que a especificidade dos fragmentos à PBP2a foi mantida mesmo após os processos de digestões enzimáticas.

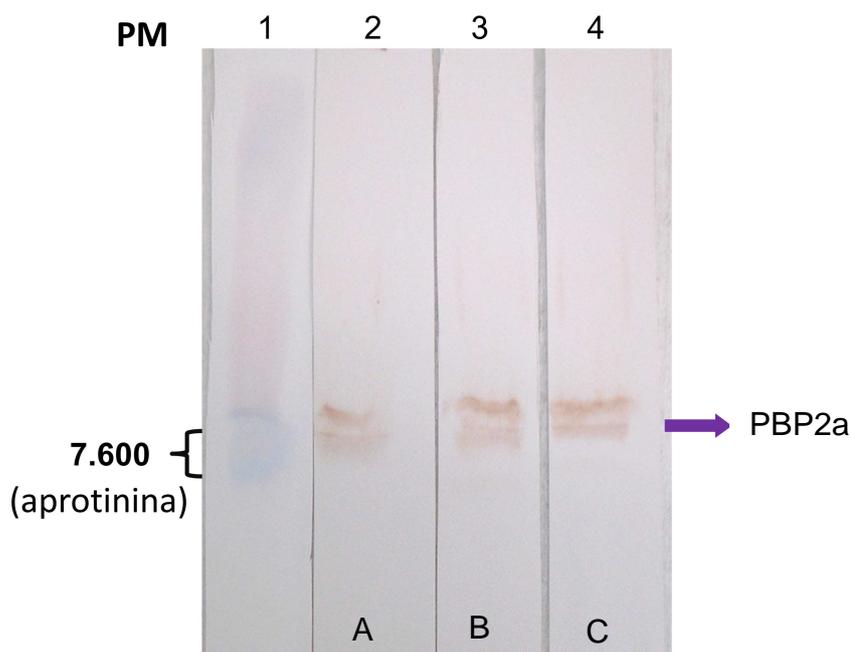


Figura 4.13. *Western Blot* realizado com o anticorpo íntegro (A; raia 2), fragmento $F(ab')_2$ obtido por digestão com pepsina (B; raia 3) e fragmento $F(ab')_2$ obtido por digestão com papaína (C; raia 4). A raia 1 se refere ao padrão de peso molecular *Kaleidoscope* (Bio-Rad).

4.6 Ensaio de Neutralização Bacteriana

Este ensaio foi realizado com o objetivo de analisar a atividade neutralizante contra cepas CEB de *Staphylococcus aureus* das frações contendo fragmentos $F(ab')_2$ obtidos por digestão enzimática com papaína e pepsina, tendo como referência a atividade neutralizante do anticorpo íntegro e a existência de um controle negativo (inóculo bacteriano + PBS estéril).

Através de contagem em placas, foi quantificado um inóculo bacteriano de aproximadamente $0,8 \times 10^8$ bactérias/mL. Portanto, em $10 \mu\text{L}$ da diluição $1:10^3$, foi dado um inóculo de $0,8 \times 10^3$.

Após 2 horas de incubação do anticorpo íntegro e dos fragmentos $F(ab')_2$ com a bactéria, não foi verificada redução significativa do crescimento bacteriano em relação ao controle (Figura 4.13).

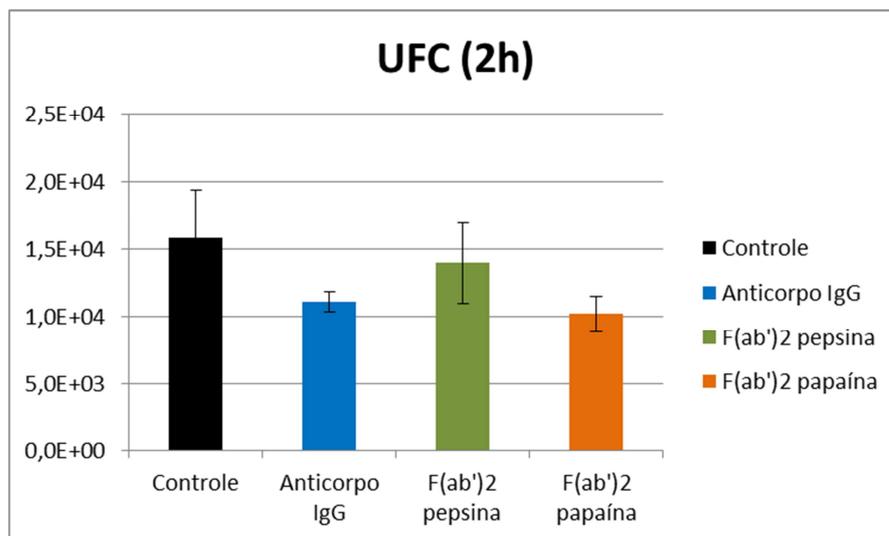


Figura 4.14: Variação da concentração bacteriana após 2 horas de incubação dos anticorpos e fragmentos com a bactéria. Média + EPM de 3 experimentos.

Porém, após 4 horas de incubação, os ensaios realizados com o anticorpo íntegro e os fragmentos $F(ab')_2$ demonstraram redução significativa em relação ao controle (Figura 4.14). Não foi observada significância entre o grupo do anticorpo e o dos fragmentos (pepsina e papaína).

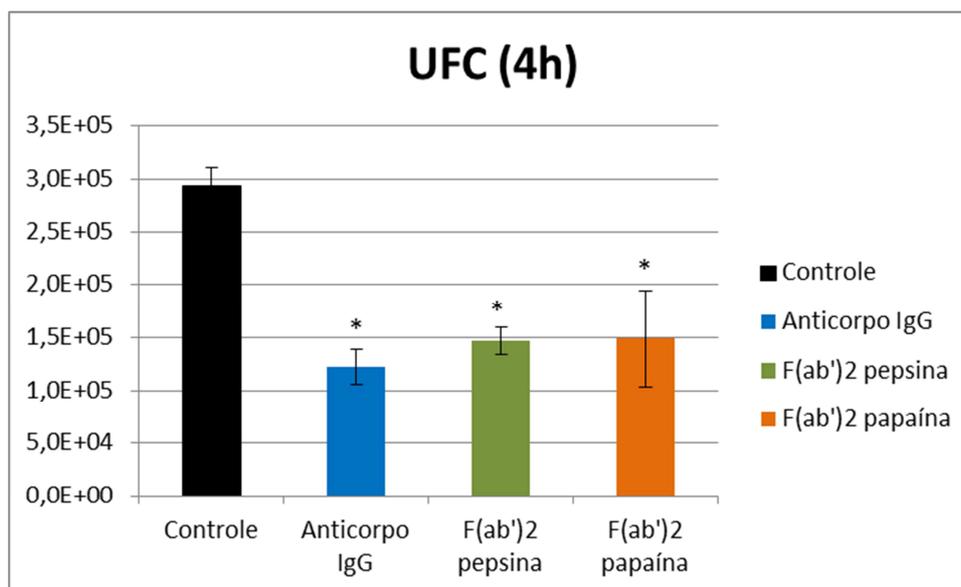


Figura 4.15: Variação da concentração bacteriana após 4 horas de incubação dos anticorpos e fragmentos com a bactéria. Média + EPM de 3 experimentos. * $p < 0,05$ vs. Controle. Teste t de Student não pareado.

As placas referentes ao tubo controle apresentaram visivelmente maior quantidade de colônias que as placas dos tubos referentes ao anticorpo e fragmentos $F(ab')_2$ obtidos pela pepsina e papaína (Figura 4.15).

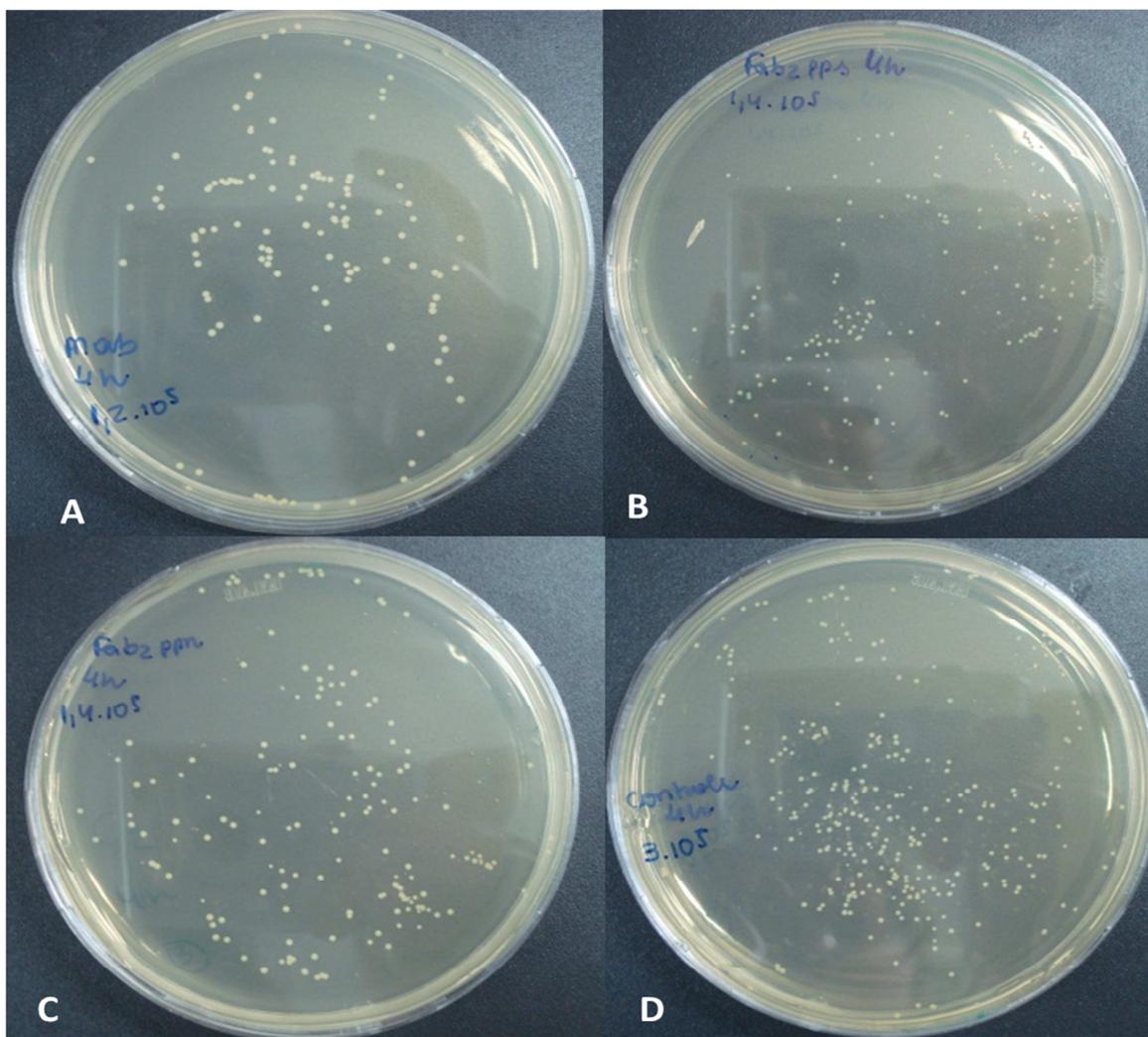


Figura 4.16: Representação dos resultados de inibição do crescimento bacteriano *in vitro* após 4 horas de incubação (diluição $1:10^2$). A: Anticorpo IgG ($1,2 \times 10^5$ UFC/mL), B: $F(ab')_2$ obtido com pepsina ($1,4 \times 10^5$ UFC/mL), C: $F(ab')_2$ obtido com papaína ($1,4 \times 10^5$ UFC/mL), D: Controle negativo (3×10^5 UFC/mL).

Com 4 horas, em relação ao controle, o anticorpo não digerido foi o que proporcionou maior redução (58%), enquanto o fragmento $F(ab')_2$ obtido por digestão com pepsina apresentou redução de 50% e o $F(ab')_2$ obtido por digestão com papaína, 50% (Tabela 4.5). Deve-se ressaltar que por se tratar de contagem de unidades formadoras de colônias em placas, todos os valores são aproximados.

Tabela 4.5. Quantificação das concentrações bacterianas para cada ensaio, de acordo com o tempo (2 ou 4 horas).

Concentração bacteriana (UFC/mL)*				
Tempo (horas)	Controle	Anticorpo IgG	F(ab') ₂ pepsina	F(ab') ₂ papaína
2	1,6x10 ⁴	1,1x10 ⁴	1,4x10 ⁴	1,0x10 ⁴
4	2,9x10 ⁵	1,2x10 ⁵	1,5x10 ⁵	1,5x10 ⁵
Redução de UFC/mL em relação ao controle após 4 horas (%)		58%	50%	50%

*Média da concentração bacteriana (UFC/mL).

4.7 Ensaio de Avaliação de Farmacocinética

Ensaio prévios demonstraram que o anticorpo monoclonal anti-PBP2a possui uma meia-vida de aproximadamente 18 dias (para 500 µg/dose). Para a metade de anticorpo aplicado (250 µg/dose), a meia-vida reduz para a metade, sendo assim em torno de 9 dias (Figura 4.16). Esse ensaio foi feito com camundongos Swiss, realizando coletas de sangue diárias por 25 dias, e a quantificação dos anticorpos foi feita por ELISA, utilizando 0,5 µL de soro.

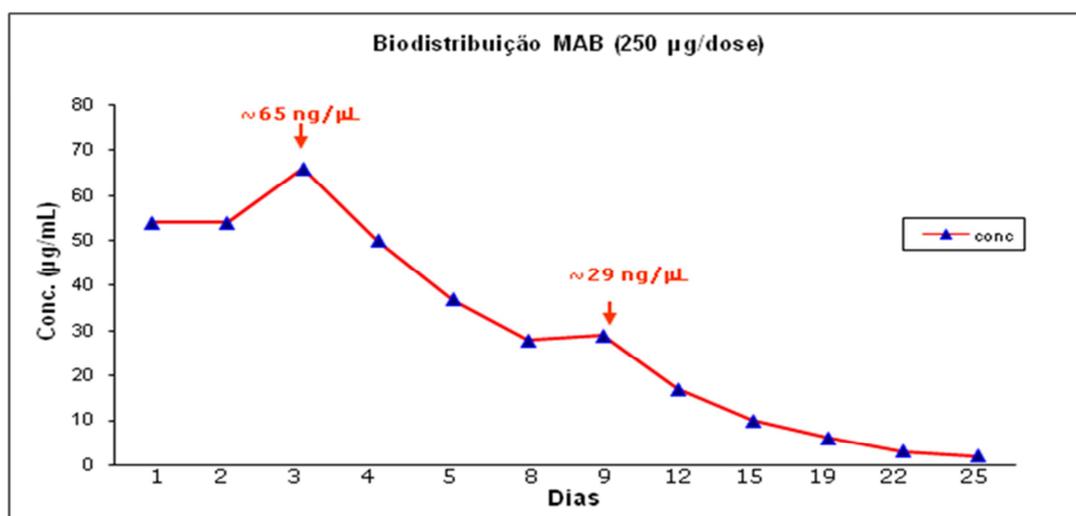


Figura 4.17: Concentração plasmática do anticorpo murino anti-PBP2a em função do tempo com 250 µg/dose durante o período de 25 dias.

A partir desses resultados, decidiu-se repetir esse ensaio com o fragmento $F(ab')_2$, de forma a avaliar sua biodistribuição que teoricamente seria mais curta, já que o fragmento não possui a porção F_c , principal responsável por aumentar a meia-vida do anticorpo.

Para tal, foram colhidos sangue de camundongos Balb/C (8 no total) inoculados intraperitonealmente com 250 μg do anticorpo e 250 μg do $F(ab')_2$ nos tempos de 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas. Destas amostras de sangue foi recolhido o soro, que foi submetido a ensaios de ELISA (1 μL) para quantificação do anticorpo e dos fragmentos.

Os resultados obtidos demonstraram um decaimento mais rápido do fragmento $F(ab')_2$ em relação ao anticorpo IgG (Figura 4.17).

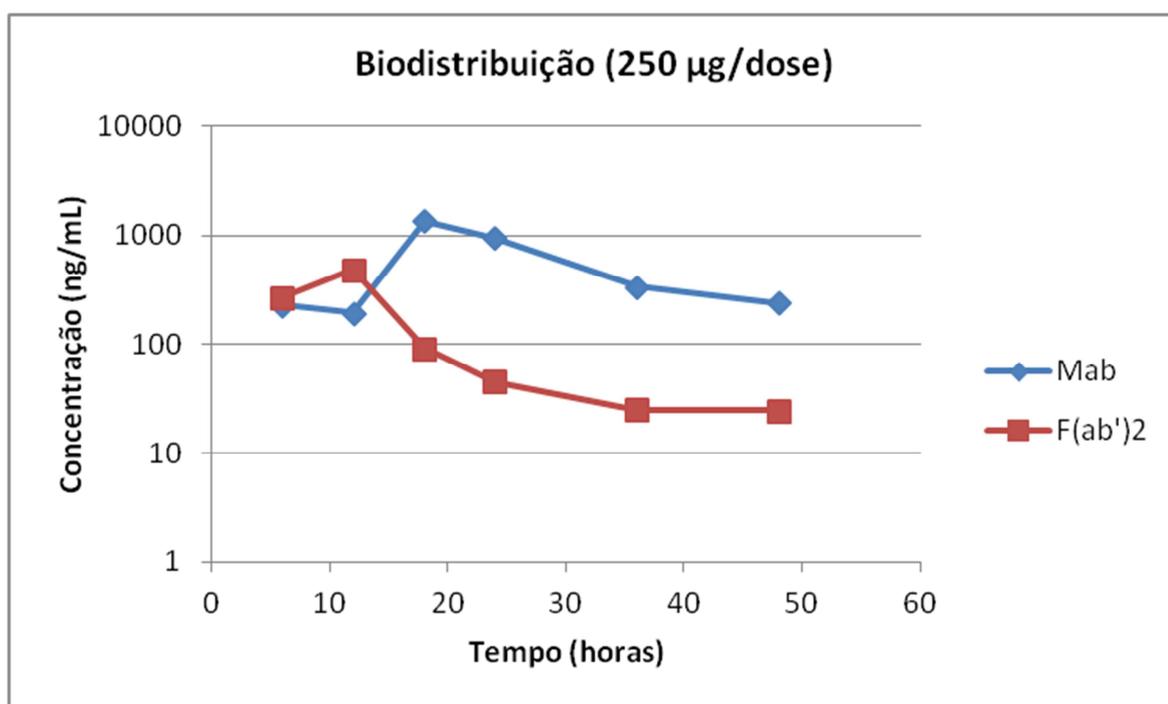


Figura 4.18: Perfis de concentração plasmática em escala logarítmica em função do tempo após administração intraperitoneal do fragmento $F(ab')_2$ obtido por digestão enzimática com a pepsina e do anticorpo (Mab) (250 $\mu\text{g}/\text{dose}$).

Com a quantificação dos anticorpos íntegros e fragmentos $F(ab')_2$ por ELISA, verifica-se que as concentrações de anticorpo (Mab) não variam como as de $F(ab')_2$, com um pico em 18 horas apresentando uma certa linearidade a partir das 36 horas, enquanto que a de $F(ab')_2$ cai bruscamente (Figura 4.17).

A partir dos valores de concentração apresentados na tabela 4.6, observa-se que a concentração de fragmento $F(ab')_2$ apresentou um pico em 12 horas e após o mesmo houve uma queda brusca na concentração. Portanto, sua meia-vida deve estar entre 12 e 18 horas. Nas 48 horas analisadas não foi observada a total

eliminação do fragmento, mas apresentou níveis mínimos a partir de 36 horas, já que a quantificação do soro dos animais pré-imunizados mostrou valores em média de 17,4 ng/mL.

Mesmo após 48 horas a concentração de IgG se apresentou cerca de 10 vezes maior que a de F(ab')₂, confirmando um *clearance* (eliminação) bem mais rápida do fragmento em relação à da IgG (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Média da quantificação das concentrações de anticorpo (Mab) e F(ab')₂ por ELISA em 1 µL de soro no intervalo de 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas.

Tempo (horas)	6	12	18	24	36	48
Concentração Mab (ng/mL)	230,1	193	1365,35	947,1	338,9	241,2
Concentração F(ab')₂ (ng/mL)	270	489,35	92,1	45,55	24,95	24,85

5 DISCUSSÃO

A bactéria *S. aureus* é um potencial agente patogênico responsável por causar diversas doenças, como desde uma simples infecção de pele até infecções pós-operatórias ou pneumonia necrotizante. Essa bactéria tem a capacidade de se adaptar rapidamente à pressão de seleção exercida pelos antibióticos, o que resultou no aparecimento e na disseminação dos *S. aureus* resistentes à meticilina, ou simplesmente MRSA (Deuremberg et al. 2006).

O desenvolvimento de resistência a antimicrobianos tem como principal consequência a dificuldade no tratamento de infecções causadas por esse patógeno. Cepas de MRSA são encontradas de forma endêmica em vários hospitais pelo mundo e atualmente, o aparecimento de cepas comunitárias tem sido relatado, tornando-se uma ameaça à população no geral (Lu et al. 2011). Portanto, o surgimento de novas alternativas de tratamento e diagnóstico a essas infecções são essenciais.

Diante desse cenário e tomando a PBP2a de *S. aureus* como alvo, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos vem desenvolvendo um anticorpo monoclonal anti-PBP2a destinado ao tratamento e prevenção de infecções causadas por MRSA. Este projeto já levou à produção de um anticorpo murino do tipo IgG1 anti-PBP2a e encontra-se em processo de humanização.

Fragmentos de anticorpos IgG, como F(ab')₂ e Fab', têm sido um assunto de interesse e estudos devido à capacidade de direcionar pequenas moléculas a alvos importantes, sendo boas alternativas para o tratamento e, especialmente, como ferramentas de diagnóstico, especialmente por radiomarcagem. Seu menor tamanho confere uma maior penetrabilidade e a falta da porção Fc da IgG proporcionam a estas moléculas uma farmacocinética diferenciada, mais rápida, e diminui a capacidade de gerar efeitos colaterais (Zhiqiang, 2009).

Heskamp et al. (2012) demonstrou que fragmentos bivalentes F(ab')₂ radiomarcados com ¹¹¹In, quando comparados à IgG igualmente marcada com o citado radionuclídeo, melhoraram a resolução da imagem tomográfica feitas em SPECT/CT, apresentando direcionamento ao alvo melhor e mais rápido, maior

acúmulo no tumor e um índice de depuração mais rápido. Entretanto, ao reduzir o $F(ab')_2$ para Fab' sua afinidade pelo alvo foi extremamente reduzida, resultando em uma perda de especificidade, provavelmente devido a menor avidéz do fragmento Fab' em relação a $F(ab')_2$ e IgG. Portanto, este artigo demonstra que para uma estratégia de radiomarcção o fragmento mais indicado deve ser o $F(ab')_2$.

A produção de fragmentos de imunoglobulinas por proteólise (com a utilização de enzimas como a papaína, pepsina e ficina) já está bem estabelecida. Mesmo com estratégias de produção por tecnologia recombinante, a digestão enzimática, especialmente para obtenção de fragmentos do tipo Fab' e $F(ab)_2$, ainda é bastante utilizada. Porém, a digestão de IgG depende da subclasse do anticorpo, exigindo diferentes condições experimentais para cada um deles (Parham, 1986). Cada anticorpo dentro de uma subclasse também pode variar em sua susceptibilidade à digestão, diminuindo a reprodutibilidade dos resultados (Rea & Ultee, 1993).

Para maximizar os rendimentos na digestão enzimática, é necessária a realização de experimentos em escala laboratorial, para otimizar as condições de digestão. Desta forma, após a confirmação da homogeneidade do anticorpo (Figura 4.1), utilizou-se as enzimas pepsina e papaína para a obtenção de fragmentos do tipo $F(ab')_2$ de anticorpos murinos do tipo IgG1 (Zhiqiang, 2009).

Kittipongwarakarn et al. (2011) conseguiu obter fragmentos $F(ab')_2$ através de digestão com pepsina. Tendo esse protocolo como referência testou-se diferentes proporções de enzima/anticorpo por 30 minutos a pH 3,0 (Tabela 4.1). A partir da proporção de 1:10 (p/p) já foi possível observar a formação de fragmentos $F(ab')_2$ (bandas entre 115 e 75 KDa) (Figura 4.2). Também foi observado juntamente com a formação dos $F(ab')_2$, bandas na região de aproximadamente 50 KDa, especialmente quando é feito o uso de proporções mais altas da relação enzima/anticorpo. Tais bandas podem ser referentes à produção simultânea de Fab', conforme relatado por Kurkela et al. (1988).

Como os anticorpos do tipo IgG1 geralmente se apresentam como mais resistentes à digestão enzimática, escolheu-se uma maior relação enzima/substrato para garantir o máximo rendimento para obtenção de $F(ab')_2$ (Wilson et al. 2002). Portanto, a proporção de 1:5 (p/p) foi a utilizada para digestão enzimática (Figura 4.3). A digestão de 3 mg de anticorpo nessa proporção não foi capaz de digerir totalmente o anticorpo e além da banda referente aos fragmentos $F(ab')_2$ é possível observar o aparecimento de pequenas bandas na região acima e abaixo de 75 KDa, igualmente relatadas por Wilson et al. (2002) como produtos de digestão. Também

se observa uma banda próxima à região de 35 KDa, relativa à apresentada pela pepsina.

Após submeter as frações digeridas ao processo de purificação por proteína A (Figura 4.4), não foi mais observada a banda referente à IgG na fração que não se ligou à resina. A mesma não foi notada nem mesmo na fração eluída onde deveria estar. Provavelmente, a quantidade de proteína aplicada no gel foi insuficiente e talvez um método de coloração e fixação mais sensível pudesse ser capaz de detectá-la.

Anteriormente, após recolher os anticorpos não digeridos com uma resina de proteína A, tinha-se por objetivo purificar os fragmentos $F(ab')_2$ através de uma resina de afinidade denominada Kappa Select (*GE Healthcare*). Essa resina teria afinidade pela região *kappa* da cadeia leve do anticorpo monoclonal. Porém, após testar várias condições diferentes e obter diversos resultados negativos entrou-se em contato com o fabricante da coluna (Dados não apresentados nesta dissertação). Após o compartilhamento dos resultados e discussões com o setor técnico da *GE Healthcare*, os mesmos informaram que esta resina não possuía afinidade com anticorpos murinos e, portanto, não poderia ser utilizada nesse protocolo. Com essa informação optamos por uma estratégia de ultrafiltração para a separação dos produtos de digestão.

Ao submeter a amostra contendo os fragmentos $F(ab')_2$ à diálise e ultrafiltração com o sistema Amicon MWCO 50.000 não foram observadas bandas além da referente ao $F(ab')_2$ (Figura 4.5). Essa unidade de ultrafiltração possui corte em 50 KDa, concentrando apenas proteínas com massa molecular superior a esse valor. Com a aplicação deste procedimento verificou-se o isolamento do fragmento $F(ab')_2$ (Figura 4.5, Raia 4).

A partir de 3 mg de anticorpo foi possível obter 2,23 mg de $F(ab')_2$. Ou seja, essa digestão enzimática pela pepsina apresentou um rendimento de aproximadamente 74%, que é considerado significativo quando comparado a outros trabalhos relatados na literatura (Kurkela et al. 1988).

Mesmo com o rendimento aceitável apresentado pela pepsina, se fez importante testar a obtenção de $F(ab')_2$ com a papaína. Como a pepsina possui maior atividade enzimática a pH baixo (ver figura 1.10), este fato poderia gerar fragmentos com baixa especificidade ao alvo já que proteínas tendem a possuir sensibilidade a grandes variações de pH (Boguslawski et al. 1989).

Para a digestão com papaína, utilizou-se como base o protocolo de Adamczyk et al. (2000) adaptado para as devidas condições experimentais. Neste protocolo não há a adição de papaína pré-ativada com solução de cisteína para a produção de $F(ab')_2$. Foram testadas proporções de enzima/anticorpo que variaram entre 1:50 (p/p) a 1:10 (p/p) (Tabela 4.3). Na figura 4.6 verifica-se que após 2 horas de digestão enzimática que a partir da proporção de 1:50 (p/p) foi possível visualizar a banda de aproximadamente 100 kDa referente à formação de $F(ab')_2$, mas nas proporções mais baixas observa-se ainda uma grande quantidade de anticorpo ainda não completamente digerido. Somente na proporção de 1:10 (p/p) foi possível obter a digestão completa do anticorpo, com formação mais nítida de $F(ab')_2$. Nessa digestão ainda se verificou a formação de bandas de aproximadamente 50 kDa, especialmente nas proporções de 1:20 (p/p) e 1:10 (p/p) (Raias 5 e 6, Figura 4.6), que se relacionam com a formação de Fab' , já que essa enzima tende a digerir o anticorpo na região da dobradiça. Nessa mesma figura também se observou a presença de várias bandas referentes a produtos de digestão, formadas especialmente pela reação entre o anticorpo e a enzima.

Como a papaína se caracteriza por ser uma enzima do tipo tiol-protease, existe a possibilidade de a mesma reagir com os grupos sulfidril presentes na molécula de anticorpo, levando à formação de pontes dissulfeto entre a enzima e os fragmentos formados, o que ocasionaria contaminação (Boguslawski et al. 1989). Assim, para ajudar a reduzir a formação de Fab' e controlar melhor a digestão, diminuindo a contaminação pela papaína, optou-se por testar um inibidor de proteases com a redução do tempo de digestão. Para diminuir a contaminação por serino-proteases foi utilizado o PMSF. Através do comparativo entre as figuras 4.7 e 4.8 foi possível observar-se que o inibidor de proteases controlou melhor a digestão, possibilitando uma maior formação de $F(ab')_2$.

Na figura 4.7, na ausência do PMSF, verificou-se uma formação maior de Fab' na raia 8 que na raia 3, correspondentes a 120 e 15 minutos de incubação, respectivamente. Percebe-se que é importante controlar também o tempo de digestão.

Com o protocolo estabelecido, digeriu-se 3 mg de anticorpo com papaína por 30 minutos na proporção de 1:10 e com a adição de PMSF 1mM (Figura 4.9). Verificou-se a formação de bandas referentes ao $F(ab')_2$ (Raia 4, Figura 4.9) e repetiu-se o mesmo protocolo adotado para o isolamento dos fragmentos $F(ab')_2$ pela pepsina.

Na passagem das frações digeridas pela coluna de proteína A, observou-se que a fração não ligada à resina reteve o fragmento $F(ab')_2$ enquanto que, provavelmente, porções Fc e anticorpos não digeridos foram eluídos na resina (Figura 4.10). Após diálise e ultrafiltração verificou-se o isolamento do fragmento $F(ab')_2$ através do aparecimento de uma única banda de aproximadamente 100kDa (raia 6, figura 4.11).

O rendimento aproximado da digestão com a papaína foi de aproximadamente 56,7%, inferior ao apresentado pela pepsina, mas a formação de produtos de digestão contribuiu para esse resultado.

Os processos de digestão enzimática podem prejudicar a atividade do anticorpo monoclonal, e conseqüentemente, dos fragmentos. Valendo não só para a pepsina com seu pH ácido, mas até mesmo a digestão pela papaína pode resultar em um aumento significativo na degradação da integridade molecular do anticorpo (Boguslawski et al. 1989; Kurkela et al. 1988). Desta forma, após o isolamento dos fragmentos $F(ab')_2$ obtidos por digestão com pepsina e papaína, foram realizados testes para avaliar sua atividade e afinidade pela PBP2a em relação ao anticorpo não digerido.

No ensaio imunoenzimático do tipo indireto (ELISA) (Figura 4.12) foi observado que os fragmentos $F(ab')_2$ obtidos com pepsina ou com papaína apresentaram valores de densidade óptica superiores aos apresentados pelo anticorpo não digerido. Como a molécula do $F(ab')_2$ apresenta um menor tamanho que a da IgG, para a mesma quantidade de anticorpo e fragmento $F(ab')_2$, haverá mais determinantes livres (porção da molécula do anticorpo capaz de se ligar ao antígeno) na fração contendo o fragmento $F(ab')_2$ que na da IgG íntegra. Pelo mesmo motivo, estericamente falando, há uma facilidade na ligação do anticorpo conjugado com peroxidase à cadeia leve do fragmento $F(ab')_2$. Desta forma, mais moléculas de $F(ab')_2$ são capazes de se ligar ao antígeno e mais anticorpo conjugado liga-se ao fragmento $F(ab')_2$, gerando uma maior leitura de densidade óptica em relação ao anticorpo não digerido. Esse ensaio demonstrou que os fragmentos não perderam a afinidade à PBP2a, mesmo após o processo de digestão enzimática.

Como o ensaio de ELISA apresenta uma maior sensibilidade, estando sujeito a variações conforme as condições experimentais, foi realizado um ensaio de *Western Blot* já que este tende a apresentar maior especificidade (Kurien et al. 2011). O propósito deste ensaio foi o mesmo do ELISA, avaliar a afinidade dos

fragmentos pela PBP2a. Na figura 4.13, a aprotinina utilizada como padrão de peso molecular (7.600) apresentou uma série de bandas fracas, enquanto que a PBP2a, que tem um peso molecular estimado em 8.000, apresentou uma duplicidade de bandas nesta mesma região, dada sua microheterogeneidade glicídica. Deste modo, verificou-se que os fragmentos $F(ab')_2$ obtidos por digestão com pepsina ou papaína apresentaram o mesmo perfil de bandas que o exibido pelo anticorpo não digerido, corroborando para a hipótese de que os fragmentos $F(ab')_2$ obtidos pelos dois diferentes processos de digestão enzimática ainda possuem afinidade pela proteína alvo, a PBP2a.

Após os ensaios imunoenzimáticos e de *Immunoblotting* foi realizado um ensaio *in vitro* de neutralização bacteriana. Neste ensaio foi observado que o fragmento $F(ab')_2$ apresentou novamente um perfil (atividade neutralizante) semelhante ao da IgG íntegra. Nenhuma das amostras testadas, tal como a IgG íntegra ou as frações contendo os fragmentos $F(ab')_2$ digeridos com pepsina ou papaína, apresentou com 2 horas de incubação reduções significativas em relação ao controle (Figura 4.14). Porém, com 4 horas de incubação, tanto o anticorpo não digerido como os fragmentos apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) (Figura 4.15). Em relação ao crescimento observado no controle, o anticorpo não digerido foi capaz de neutralizar mais bactérias (58%), do que os fragmentos $F(ab')_2$ obtidos pela pepsina ou papaína, os quais apresentaram resultados de redução idênticos (50%). Estes ensaios deverão ser posteriormente repetidos, pois eram esperados níveis de proteção ligeiramente superiores para os fragmentos $F(ab)_2$ em relação ao anticorpo monoclonal íntegro, novamente em virtude da presença de maior quantidade de determinantes livres presentes nas frações $F(ab)_2$ do que na fração do anticorpo não digerido (IgG).

Resultados de proteção *in vitro* não apresentados nesta dissertação demonstraram atividades neutralizantes superiores aos obtidos nestes estudos. Tal diferença deve-se provavelmente ao fato de terem sido obtidos anticorpos monoclonais em outras condições de cultivo (células de hibridoma de baixa passagem, crescimento em meio DMEM F12 c/10% de soro, cultivo estático em frascos T75).

Para aplicação terapêutica, é de grande importância o estudo da farmacocinética e biodistribuição dos anticorpos monoclonais. O grau de ligação para o antígeno alvo *in vivo* não depende somente de características como afinidade e avidéz que podem ser medidas *in vitro*, mas também de vários outros fatores como

a acessibilidade ao antígeno, a concentração e o tempo de exposição do anticorpo ao antígeno alvo (Zhiqiang, 2009). A maioria das IgGs possuem uma meia-vida de aproximadamente 18 a 21 dias, dependendo da classe de IgG. Este fato ocorre devido à ligação da região Fc do anticorpo ao receptor FcRn presente no organismo. Como os fragmentos $F(ab')_2$ não possuem região Fc, eles são eliminados mais rapidamente. Essa meia vida mais longa das IgG é ideal para algumas aplicações, como a administração profilática e para conferir proteção contra infecções sistêmicas. Entretanto, para outras estratégias, como radiomarcagem, uma meia-vida mais longa pode resultar em toxicidade. Além disso, devido a melhor penetração dos fragmentos em relação aos anticorpos na forma IgG, o tratamento de focos infecciosos provavelmente proporcionaria melhores resultados de neutralização e proteção empregando fragmentos do anticorpo.

Para estimar a biodistribuição dos fragmentos em modelo murino (Balb/C) comparou-se com os resultados apresentados pelo anticorpo não digerido. Como esperado, em 48 horas de experimento, os fragmentos $F(ab')_2$ apresentaram uma meia-vida plasmática menor, com depuração mais rápida quando comparados ao anticorpo não digerido (Figura 4.18).

Nos modelos animais, a depuração de anticorpo segue basicamente duas etapas. A primeira, denominada fase alfa, acontece quando o anticorpo está sendo distribuído pelo organismo, até atingir o equilíbrio. A partir de então começa a fase de depuração ou *clearance* (fase beta), na qual o anticorpo é metabolizado e excluído (Zhiqiang, 2009).

É possível visualizar essas fases na figura 4.18. Nas primeiras 12 horas, o anticorpo íntegro apresentou valores lineares até às 18 horas, onde demonstrou um pico em sua concentração (1365,35 ng/mL, Tabela 4.6) para depois diminuir lentamente nas horas seguintes. Já a concentração de $F(ab')_2$ apresentou um pequeno pico já em 12 horas, denotando uma distribuição mais rápida que a da IgG íntegra, para depois cair bruscamente em 18 horas até atingir níveis basais em 36 e 48 horas (Tabela 4.6). Após 48 horas, a concentração de anticorpo não digerido se apresentou como 10 vezes maior que a de $F(ab')_2$. Tais resultados coincidem com os da literatura, segundo apontam estudos de farmacocinética realizados por Heskamp et al (2012) e Bazin-Redureau et al. (1997), que comparou parâmetros de farmacocinética entre anticorpos IgG1, $F(ab')_2$ e Fab' de ratos. Nesse estudo o fragmento $F(ab')_2$ teve uma meia-vida de eliminação de aproximadamente 17 horas,

que é perfeitamente compatível com os resultados aqui obtidos, já que a meia-vida de eliminação do $F(ab')_2$ anti-PBP2a deve estar entre 12 e 18 horas.

Para uma melhor avaliação dos estudos de biodistribuição do anticorpo e $F(ab')_2$ murino, o ensaio deve ser repetido com uma maior duração de tempo e nas primeiras 48 horas com coletas em intervalos menores, a fim de verificar total eliminação do anticorpo e do $F(ab')_2$ e, também, utilizando animais de outra espécie além da murina, para avaliar o comportamento do fragmento $F(ab')$ e da IgG em outra espécie.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível obter-se o fragmento $F(ab')_2$ por digestão com papaína e pepsina e o isolamento dos mesmos através de cromatografia de afinidade e ultrafiltração, sendo que a pepsina apresentou melhor rendimento na produção de $F(ab')_2$. Foi realizada uma padronização das condições de digestão, possibilitando um maior controle sobre a digestão enzimática, melhorando o rendimento final, bem como uma redução da formação de produtos de degradação.

- Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA e *Western Blot*) demonstraram que os $F(ab)_2'$ apresentaram afinidade pela PBP2a, ou seja, o processo de digestão enzimática não afetou esse parâmetro.

- Os fragmentos $F(ab')_2$ obtidos por digestão com papaína e pepsina apresentaram capacidade neutralizante *in vitro* contra cepa CEB de MRSA, exibindo resultados semelhantes aos apresentados pelo anticorpo não digerido.

- No estudo de farmacocinética, o fragmento $F(ab')_2$ apresentou uma eliminação mais rápida, com meia-vida entre 12 e 18 horas, quando comparado à meia-vida apresentada pela mesma dose de IgG que, nas condições avaliadas, foi de aproximadamente 9 dias.

- Esses resultados apontam que pode ser possível a utilização de fragmentos $F(ab')_2$ de anticorpos anti-PBP2a para radio-marcação e imunodiagnóstico, como também para tratamento de infecções causadas por MRSA, já que o fragmento não demonstrou ter perdido sua funcionalidade durante o processo de digestão. Com o estabelecimento da padronização dos protocolos de digestão e purificação, esse processo poderá ser aplicado futuramente para o anticorpo humanizado.

Levando em consideração os resultados e conclusões obtidos no presente trabalho, temos como perspectivas futuras:

- ✓ Utilização do fragmento $F(ab')_2$ para estudos de radioimunodiagnóstico de MRSA em modelo murino – colaboração com IPEN, marcação com ^{99m}Tc .
- ✓ Realização de ensaios de proteção *in vivo* de animais infectados com MRSA e tratados com o fragmento $F(ab')_2$
- ✓ Otimizar a digestão enzimática do anticorpo monoclonal anti-PBP2a a partir de sobrenadantes (hibridoma e cultivo celular de anticorpos humanizados/célula NSO ou CHO).
- ✓ Ter como base os resultados obtidos com o fragmento $F(ab')_2$ murino para estudos com o anticorpo humanizado.
- ✓ Avaliação da viabilidade técnica de obtenção de $F(ab')_2$ em plataformas bacterianas (produção de fragmentos $F(ab')_2$ em plataforma recombinante), avaliando a melhor relação custo X benefício entre os dois processos (digestão enzimática versus fragmentos recombinantes obtidos em plataforma bacteriana).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil; 2008.

Adamczyk M, Gebler JC, Wu J. **Papain digestion of different mouse IgG subclasses as studied by electrospray mass spectrometry**. Journal of immunological methods. 2000; 237(1): 95–104.

Albert H, Collin M, Dudziak D, Ravetch JV, Nimmerjahn F. **In vivo enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner**. PNAS. 2008; 105(39): 15005–15009.

Ambler RP, Coulson AF, Frère J-M, Ghuysen J-M, Joris B, Forsman M, et al. **A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases**. Biochemical Journal. 1991;276(Pt 1):269.

Andrew SM & Titus JA. **Current Protocols in Cell Biology**. Suplemento 5 (16); Ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2000.

Andrew SM. **Enzymatic digestion of monoclonal antibodies**. The Protein Protocols Handbook. 2002; 1047–52.

Barski G, Sorieul S, Cornefert F. **Production of cells of a “ hybrid” nature in culturs in vitro of 2 cellular strains in combination**. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l’Academie des sciences. 1960; 251: 1825.

Bartley J. **First case of VRSA identified in Michigan**. Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America. 2002;23(8): 480.

Batra R, Eziefula AC, Wyncoll D, Edgeworth J. **Throat and rectal swabs may have an important role in MRSA screening of critically ill patients**. Intensive care medicine. 2008; 34(9): 1703–6.

Boguslawski SJ, Ledden DJ, Fredrickson RA. **Improved procedure for preparation of F(ab')₂ fragments of mouse IgGs by papain digestion.** Journal of immunological methods. 1989;120(1):51–6.

Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. **Production of functional chimaeric mouse/human antibody.** Nature. 1984; 312(12): 643-6.

Bourel D, Teillaud JL. **Anticorps monoclonaux: tours et détours technologiques pour de nouveaux espoirs thérapeutiques.** Comptes Rendus Biologies. 2006; 329(4): 217–27.

Bruce MP, Boyd V, Duch C, White JR. **Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies—alternatives to ascites production in mice.** Journal of immunological methods. 2002; 264(1): 59–68.

Buynak JD. **Cutting and stitching: the cross-linking of peptidoglycan in the assembly of the bacterial cell wall.** ACS chemical biology. 2007;2(9):602–5

Carter PJ. **Potent antibody therapeutics by design.** Nature Reviews Immunology. 2006; 6(5) :343–57.

Chagas, M. C. B. **Desenvolvimento de kit diagnóstico rápido para detecção de resistência à metilina em cepas de estafilococos.** 2011. 66 f. Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011.

Chambers HF. **The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerging infectious diseases.** 2001; 7(2): 178.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** Twenty-first informational supplement, document M100-S21. Wayne, PA, USA: CLSI, 2011

Cohen LW, Coghlan VM, Dihel LC. **Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA.** Gene. 1986; 48(2): 219–27.

Cohen SA, Trikha M, Mascelli MA. **Potential future clinical applications for the GPIIb/IIIa antagonist, abciximab in thrombosis, vascular and oncological indications.** Pathology & Oncology Research. 2000; 6(3): 163–74.

Coleman L, Mahler SM. **Purification of Fab' fragments from a monoclonal antibody papain digest by Gradiflow electrophoresis.** Protein expression and purification. 2003; 32(2): 246–51.

Cornell BA, Braach-Maksvytis V, King L, Osman P, Raguse B, Wieczorek L. **A biosensor that uses ion-channel switches.** Nature. 1997; 387(6633): 580–3.

DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** The Lancet. 2010; 375(9725): 1557–68.

Desgranges C. **Anticorps monoclonaux et thérapeutique.** Pathologie Biologie. 2004; 52(6): 351–64.

Deurenberg R, Vink C, Kalenic S, Friedrich A, Bruggeman C, Stobberingh E. **The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Clinical microbiology and infection. 2007; 13(3): 222–35.

Deurenberg RH, Stobberingh EE. **The evolution of *Staphylococcus aureus*.** Infection, genetics and evolution. 2008; 8(6): 747–63.

Durai R, Ng PCH, Hoque H. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update.** AORN. 2010; 91(5): 599–609.

Fruton JS. **A history of pepsin and related enzymes.** The Quarterly review of biology. 2002; 77(2): 127–47.

García-Lara J, Foster SJ. **Anti-*Staphylococcus aureus* immunotherapy: current status and prospects.** Current Opinion in Pharmacology. 2009; 9(5): 552–7.

Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. **Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat.** The Lancet. 2006;368(9538):874–85.

Hackbarth CJ, Chambers HF. **blaI and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 1993;37(5):1144–9.

Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk.** JAMA: the journal of the American Medical Association. 1998; 279(8): 593–8.

Heskamp S, van Laarhoven HW, Molkenboer-Kueneen JD, Bouwman WH, van der Graaf WT, Oyen WJ, et al. **Optimization of IGF-1R SPECT/CT Imaging Using ¹¹¹In-Labeled F(ab')₂ and Fab' Fragments of the Monoclonal Antibody R1507.** *Molecular Pharmaceutics*. 2012;9(8):2314–21.

Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. **Gram-positive cocci. Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology.** 9th ed. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins. 1994; 544–51.

Jain M, Kamal N, Batra SK. **Engineering antibodies for clinical applications. Trends in biotechnology.** 2007; 25(7): 307–16.

Jakobovits A, Amado RG, Yang X, Roskos L, Schwab G. **From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice.** *Nature biotechnology*. 2007;25(10):1134–43.

James MNG, Sielecki AR. **Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution.** *Nature*. 1986; 319: 33-8.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. **Immunobiology: the immune system in health and disease.** *Current Biology*. 2001.

John CC, Schreiber JR. **Therapies and Vaccines for Emerging Bacterial Infections: Learning from Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Pediatric Clinics of North America*. 2006; 53(4): 699–713.

Jones R, Landon J. **A protocol for “enhanced pepsin digestion”: a step by step method for obtaining pure antibody fragments in high yield from serum.** *Journal of immunological methods*. 2003; 275(1): 239–50.

Kittipongwarakarn S, Hawe A, Tantipolphan R, Limsuwun K, Khomvilai S, Puttipatkhachorn S, et al. **New method to produce equine antirabies immunoglobulin F(ab')₂ fragments from crude plasma in high quality and yield.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011; 78(2): 189–95.

Köhler G, Milstein C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature*. 1975; 256(5517): 495–7.

Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn Jr., W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5ª MEDSI, Rio de Janeiro, RJ, 2001, p. 551-588.

Kurien BT, Dorri Y, Dillon S, Dsouza A, Scofield RH. **An overview of Western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry**. *Methods Mol. Biol.* 2011;717:55–67.

Laemmli UK. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4**. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.

Lee W, McDonough MA, Kotra LP, Li Z-H, Silvaggi NR, Takeda Y, et al. **A 1.2-Å snapshot of the final step of bacterial cell wall biosynthesis**. *PNAS*. 2001;98(4):1427–31.

Lim D, Strynadka NC. **Structural basis for the β lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2002;9(11):870–6.

Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho P-L, Keness Y, Doi Y, et al. **Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly?** *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(7):1569–77.

Lowy FD. **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus***. *Journal of Clinical Investigation*. 2003; 111(9): 1265–74.

Lowy FD. ***Staphylococcus aureus* infections**. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339(8): 520–32.

Lu SY, Chang FY, Cheng CC, Lee KD, Huang YC. **Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization among Adult Patients Visiting Emergency Department in a Medical Center in Taiwan**. *PloS one*. 2011; 6(6): 1-6.

Mariani M, Camagna M, Tarditi L, Seccamani E. **A new enzymatic method to obtain high-yield F (ab) 2 suitable for clinical use from mouse IgG1**. *Molecular immunology*. 1991; 28(1-2): 69–77.

Mimica MJ, Mendes CMF. **Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus***. *J Bras Patol Med Lab*. 2007; 43(6): 399–406.

Moffat FL, Gulec SA, Serafini AN, Sfakianakis GN, Pop R, Robinson DS, et al. **A thousand points of light or just dim bulbs? Radiolabeled antibodies and colorectal cancer imaging.** *Cancer investigation*. 1999; 17(5): 322–34.

Morais V, Massaldi H. **Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins.** *Toxicon*. 2005; 46(8): 876–82.

Nelson P, Reynolds G, Waldron E, Ward E, Giannopoulos K, Murray P. **Demystified Monoclonal Antibodies.** *Molecular pathology*. 2000; 53(3): 111–7.

Palzkill T. **Metallo- β -lactamase structure and function.** *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1277(1):91–104.

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. **Carbapenems: past, present, and future.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(11):4943–60.

Parham P, Androlewicz MJ, Brodsky FM, Holmes NJ, Ways JP. **Monoclonal antibodies: purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens.** *Journal of immunological methods*. 1982;53(2):133.

Parham P. **Preparation and purification of active fragments from mouse monoclonal antibodies.** *Handbook of experimental immunology*. 1986;1:14–1.

Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. 2009; 53(11): 4580–7.

Persson H. **Envenoming by European vipers. Antivenom treatment-influence on morbidity.** *Przeglad Lekarski*. 2001; 58(4): 223–5.

Piper DW, Fenton BH. **pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance.** *Gut*. 1965;6(5):506–8.

Ratti R, Sousa C. **Staphylococcus aureus metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais.** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2009; 30(2): 1–8.

Rea DW, Ultee ME. **A novel method for controlling the pepsin digestion of antibodies.** *Journal of immunological methods*. 1993;157(1):165–73.

Rinder H, Mieskes KT, Loscher T. **Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis***. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2001;5(4):339–45.

Rossi, F. **The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil**. Clin Infect Dis. 2011; 52 (9): 1138-1143.

Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. **The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis**. FEMS microbiology reviews. 2008;32(2):234–58.

Schaffer AC, Lee JC. **Staphylococcal vaccines and immunotherapies**. Infectious disease clinics of North America. 2009; 23(1): 153–71.

Science Photo Library [online]. Disponível em <http://www.sciencephoto.com/media/297098/view> Acesso em 23/03/2012.

Shi Q, Meroueh SO, Fisher JF, Mobashery S. **A computational evaluation of the mechanism of penicillin-binding protein-catalyzed cross-linking of the bacterial cell wall**. Journal of the American Chemical Society. 2011;133(14):5274–83.

Siegel D. **Recombinant monoclonal antibody technology**. Transfusion clinique et biologique. 2002; 9(1): 15–22.

Silva Jr. JG. **Eletroforese de proteínas: Guia teórico e prático**. Rio de Janeiro: Interciência; 2001.

Stapleton P, Taylor P. **Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus***. Sci Prog. 2002;85(Pt 1):57–72.

Steinitz M. **Three decades of human monoclonal antibodies: past, present and future developments**. Human antibodies. 2009; 18(1): 1–10.

Tamashiro DAA, Alarcón VB, Marikawa Y. **Ectopic expression of mouse Sry interferes with Wnt/ β -catenin signaling in mouse embryonal carcinoma cell lines**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2008; 1780(12): 1395–402.

Tattevin P. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections**. Médecine et maladies infectieuses. 2011; 41(4): 167.

Tavares W. **Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos.** Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33(3): 281–301.

Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AM, De LEncastre H, Tomasz A. **Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil.** J Clin Microbiol. 1995; 33:2400-4.

Tenover FC. **Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria.** The American journal of medicine. 2006; 119(6): S3–S10.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. setembro de 1979;76(9):4350–4.

Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, et al. **Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006.** Emerging infectious diseases. 2007; 13(4): 594.

Udo EE, Mokadas EM, Al-Haddad A, Mathew B, Jacob LE, Sanyal SC. **Rapid detection of methicillin resistance in *staphylococci* using a slide latex agglutination kit.** International journal of antimicrobial agents. 2000;15(1):19–24.

Van Hal S, Stark D, Lockwood B, Marriott D, Harkness J. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and GenoType MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect, and CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs.** Journal of clinical microbiology. 2007; 45(8): 2486–90.

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence.** Emerging infectious diseases. 2003; 9(8): 978.

Warnes SL, Highmore CJ, Keevil CW. **Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes on Abiotic Touch Surfaces: Implications for Public Health.** mBio. 2012;3(6):e00489-12.

Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. **The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections.** The Lancet infectious diseases. 2005;5(12):751–62.

Wilson DS, Wu J, Peluso P, Nock S. **Improved method for pepsinolysis of mouse**

IgG1 molecules to F(ab')₂ fragments. Journal of immunological methods. 2002;260(1):29–36.

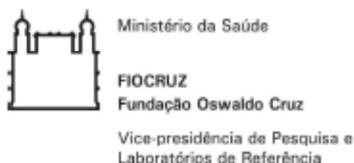
Wu SW, De Lencastre H, Tomasz A. **Recruitment of the mecA Gene Homologue of *Staphylococcus sciuri* into a Resistance Determinant and Expression of the Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus*.** Journal of bacteriology. 2001; 183(8): 2417–24.

Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. **Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance.** FEMS Microbiology Reviews. 2008;32(2):361–85.

Zhiqiang An. **Therapeutic monoclonal antibodies: from bench to clinic.** Wiley; 2009.

ANEXOS

Anexo 1: Documento de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais para experimentação animal em modelo murino.



LICENÇA

LW-71/12

Certificamos que o protocolo (P-34/11-5), intitulado "Desenvolvimento de anticorpos monoclonais murinos anti-MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a metilicina)", sob a responsabilidade de Nadia Maria Batoreu, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 16/04/2016 e inclui o uso total de :

Mus musculus
- 40 Fêmeas de BALB/c An, Idade: 8 Semana(s).

Rio de Janeiro, 16 de abril de 2012

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA