

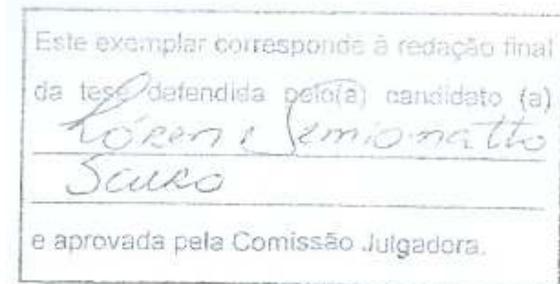
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



**Lóren Semionatto Scuro**

**“OBTENÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE HIBRIDOMAS  
PRODUTORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-IL6  
HUMANA”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular na área de  
Imunologia.



**Orientadora: Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro**

Campinas

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**Scu74o** Scuro, Lóren Semionatto  
Obtenção e estudo das propriedades de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-IL6 humana / Lóren Semionatto Scuro. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anticorpos monoclonais. 2. Hibridomas. 3. Técnicas imunoenzimáticas. 4. Anticorpos bloqueadores. I. Tamashiro, Wirla Maria da Silva Cunha. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Obtainment and study of properties of hybridomas producing anti-IL6 monoclonal antibody.

**Palavras-chave em inglês:** Monoclonal antibodies; Hybridomas; Immunoenzyme techniques; Blocking antibodies.

**Área de concentração:** Imunologia.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

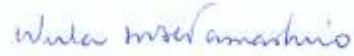
**Banca examinadora:** Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, Dagmar Ruth Stach-Machado, Maria Cristina Roque Barreira.

**Data da defesa:** 11/11/2005.

Campinas, 11 de Novembro de 2005.

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Roque-Barreira

Assinatura

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado



Assinatura

Prof. Dr. Edson Antunes

Assinatura

Profa. Dra. Maria Teresinha Serrão Peraçoli



Assinatura

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia Celular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, contando com bolsa de mestrado do CNPq.

*Aos meus pais, que sempre me  
ensinaram com muito amor a  
buscar os meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente à Profa. Dra. Wirla MSC Tamashiro, por me acolher em seu laboratório desde o meu primeiro ano de graduação, ensinando sempre a ter perseverança, dedicação e seriedade. Obrigada por acreditar na minha capacidade.
- Ao CNPq pela concessão de bolsa.
- Ao Prof. Dr. Fernando Q. Cunha (FMRP, USP) pela doação da IL6 humana recombinante.
- À Prof Dra. Elizabeth de Fátima Pires Augusto e sua equipe de pesquisa do Agrupamento de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), SP, pela colaboração e ajuda na realização de análises essenciais à conclusão deste trabalho.
- À Dirce Lima Gabriel, bióloga do nosso laboratório, pela imensa ajuda no desenvolvimento do trabalho e pelo exemplo de profissional e amiga que é.
- Ao pessoal do Lab 01: Patrícia, Carla, Ellen, Maristela e ao Luís pela bonita amizade que construímos nesses anos de convivência, além do apoio nas horas de stress.
- Aos amigos e amigas: Tiago, Mauchi, Lucianna, Carina e Michelinha pela amizade verdadeira e todo apoio e incentivo que sempre me deram.
- Ao Fábio, que desde que o conheci sempre me incentivou e acreditou em mim.
- E finalmente à minha Maravilhosa Família, meus pais Irene e Alex, meus irmãos Émerson e Élton e meus avós Isaura e Irineu pela educação, apoio, carinho e paciência que sempre tiveram comigo. Divido com vocês essa imensa alegria. Cada um de vocês de uma forma especial sempre me ensinam a ter coragem e espírito de luta. O amor e o carinho que tenho por vocês é indescritível!

## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIV</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
Revisão Bibliográfica.....	04
Aspectos gerais da produção de hibridomas.....	07
Aplicações dos Anticorpos Monoclonais.....	11
Interleucina-6.....	13
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
Delineamento Experimental.....	19
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
1. Animais .....	21
2. Imunização dos camundongos .....	21
3. Preparo do <i>Feeder Layer</i> de macrófagos .....	22
4. Preparo das células de mieloma .....	23
5. Obtenção dos hibridomas anti-IL6 .....	23
5.1. Seleção dos hibridomas secretores de anticorpos anti-IL6 .....	24
5.2. Clonagem por diluição limitante .....	25
5.3. Expansão e criopreservação das linhagens secretoras de anticorpos monoclonais anti-IL6.....	25
6. Determinação dos isotipos dos anticorpos monoclonais anti-IL6 .....	26
7. Produção dos ascites.....	26
8. Cromatografia de afinidade em Sepharose-proteína G .....	27
8.1. Conjugação dos anticorpos com biotina.....	28
9. Sequenciamento de aminoácidos da porção N-Terminal dos anticorpos monoclonais .....	28
10. Ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	29

10.1. ELISA para seleção e titulação dos anticorpos monoclonais anti-IL6.....	29
10.2. ELISA de captura de Interleucina-6 .....	30
10.3. ELISA para quantificação de IgG.....	31
11. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	32
12. Western Blotting.....	33
13. Obtenção de IL-6 murina nativa.....	34
14. Neutralização de IL-6.....	35
15. Quantificação de proteína total.....	36
16. Ensaio de cultivo dos hibridomas 1A6F10 e 3B1E4.....	36
16.1. Descrição dos Ensaio .....	37
17. Análise Estatística .....	38
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
1. Imunização de camundongos.....	40
2. Obtenção dos hibridomas anti-IL6.....	41
3. Produção dos ascites e purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade.....	43
4. Seqüenciamento do N-terminal dos anticorpos 1A6F10 e 3B1E4.....	44
5. ELISA para detecção de IL6.....	45
6. Western Blotting.....	49
7. Neutralização de IL-6.....	50
8. Cinéticas de crescimento, produção de AcMo e metabolismo dos hibridomas 1A6F10 e 3B1E4.....	52
<b>V. DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>VI. CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>

## ABREVIATURAS

AcMo	Anticorpo Monoclonal
ACTH	Corticotropina
Al (OH) <sub>3</sub>	Hidróxido de alumínio
APC	Célula apresentadora de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme linked immunoabsorbant assay</i>
HAMA	<i>Human Anti-Mouse Antibodies</i>
HAT	Hipoxantina aminopterina timidina
HGPRT	Hipoxantina Guanina Fosforibosil Transferase
hr	humana recombinante
HRPO	<i>Horseradish peroxidase</i>
i.p.	Intraperitoneal
Ig	Imunoglobulina
IL1	Interleucina 1
IL3	Interleucina 3
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 bromidio difeniltetrazolio

NGF	Fator de Crescimento Neuronal
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Salina Tamponada
PDGF	Fator Derivado de Plaquetas
PEG	Polietilenoglicol
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SP2 Ag14/10	SP2/0
TK	Timidina Quinase
TNF	Fator de Necrose Tumoral

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Fusão de linfócitos e mieloma para a obtenção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcMo) .....	07
Figura 2. <i>Western Blot</i> dos soros dos camundongos imunizados.....	40
Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (sob condições desnaturantes) dos AcMos purificados em Sepharose proteína G.....	44
Figura 4. Desempenho dos AcMos do grupo 1A6 em ELISA de captura para detecção de IL6 humana recombinante.....	47
Figura 5. Desempenho dos AcMos do grupo 3B1 em ELISA de captura para detecção de IL6 humana recombinante.....	48
Figura 6. <i>Western Blotting</i> dos AcMos anti-IL6.....	49
Figura 7. Ensaio de Neutralização da IL6.....	51
Figura 8. Cinética de crescimento dos hibridomas 1A6F10 e 3B1E4 em frasco <i>spinner</i> .....	53
Figura 9. Geração de metabólitos e de anticorpos durante o cultivo dos hibridomas 1A6F10 e 3B1E4 em frascos <i>spinner</i> .....	54
Tabela 1 Hibridomas anti-IL6 obtidos após dois experimentos de fusão celular.....	42
Tabela 2 Seqüenciamento N-terminal dos anticorpos 1A6F10 e 3B1E4.....	45

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a IL6 humana recombinante (hr) para serem empregados em ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) de detecção da IL6 humana nativa, presente em fluidos biológicos de pacientes portadores de quadros onde os níveis de IL6 encontram-se elevados, ou então produzida por monócitos humanos e murinos ativados *in vitro*.

Dois grupos de hibridomas (1A6 e 3B1) secretores de anticorpos monoclonais anti-IL6 foram obtidos pela fusão de células de mieloma da linhagem SP2 Ag14/0 com esplenócitos de camundongos BALB/c, previamente imunizados com a IL6 humana recombinante. Esses hibridomas foram selecionados com base em sua reatividade com a hrIL6, através de ensaios do tipo ELISA indireto. As imunoglobulinas (Igs) monoclonais produzidas pelos hibridomas dos dois grupos são do isotipo IgG1 *Kappa* e foram purificadas de líquidos ascíticos e dos sobrenadantes de cultura por cromatografia de afinidade. As proteínas purificadas foram conjugadas com biotina para uso em ensaios de ELISA de captura da hrIL6, de modo a se identificar um ou mais pares de anticorpos adequados a esse tipo de teste, bem como para definir a sensibilidade de detecção da citocina. O par de anticorpos monoclonais 3B1E4 x 1A6F10-biotinilado se mostrou mais promissor nos ensaios de ELISA, detectando a citocina recombinante entre 8 e 512 ng/mL, liberando densidades óticas mais elevadas. Todos os anticorpos monoclonais (AcMos) anti IL6 estudados foram capazes de neutralizar a atividade biológica da citocina em ensaios empregando o hibridoma B13.9, uma célula dependente de IL-6 para seu crescimento. Finalmente, o par de hibridomas anti IL6 3B1E4 e 1A6F10 foi estudado quanto às suas

principais características de cultivo: crescimento, produção *in vitro* dos anticorpos, consumo de glicose e produção de lactato e amônia. O seqüenciamento da porção N-terminal do par 3B1E4 e 1A6F10 revelou que as cadeias leves dos dois anticorpos apresentam seqüência idêntica de aminoácidos. Porém, a análise dos dez resíduos de aminoácidos presentes na região variável das cadeias pesadas resultou em seqüências completamente distintas nos dois monoclonais, sendo um forte indício de diferença nos sítios de ligação ao antígeno dos anticorpos estudados.

## ABSTRACT

In the present study we have developed monoclonal antibodies against human recombinant (hr) IL6, for the use in ELISA assays to detect the human native IL6 present in biological fluid of patients or in supernatant of activated human and rodent monocytes.

Two families of hibridomas (1A6 and 3B1) secreting MAb against-IL6 were obtained from the fusion of mieloma cells from SP2 Ag14/0 lineage with spleen cells from BALB/c mice, previously immunized with human recombinant IL6. Those hibridomas were selected on the basis of their reactivity with the hrIL6, through an ELISA indirect assay. The monoclonal immunoglobulins (Igs) produced by these hibridomas are from IgG1 Kappa isotype and were purified from ascitic fluid and culture supernatant by affinity chromatography. The purified proteins from the ascitic fluid were conjugated with biotin for the use in ELISA hrIL6 capture assay, to identify one or more pairs of antibodies appropriated to this kind of test, as well to define the sensibility of cytokine detection. The pair of MAbs 3B1E4 x 1A6F10-biotinilates was shown promising in ELISA assays, detecting the recombinant cytokine between 8 and 512 ng/mL, liberating elevated optical densities. All of the a-IL6 MAbs studied were capable to neutralize the biological activity of the cytokine in attempt employing the hibridoma B13.9 IL-6 dependent. Finally, the pair of hibridomas a-IL6 3B1E4 and 1A6F10 was studied as regards his main cultivation characteristics: growth, MAb production *in vitro*, lactate and ammonia production and glucose consumption. The N-Terminal portion sequence of 3B1E4 and 1A6F10 revealed that both light-chains present identical amino acid sequence. However, the analysis of the ten amino acid residues present in variable region of heavy-chains resulted in completely

distinct sequences in both antibodies, being a strong indication of difference in their ability to recognize the antigen.

## **I. INTRODUÇÃO**

A tecnologia de hibridomas, células obtidas da fusão de linfócitos B e células de mieloma, desenvolvida por KOHLER & MILSTEIN (1975), representou um enorme avanço na pesquisa biológica por permitir a preparação de reagentes de alta especificidade - os anticorpos monoclonais (AcMos). Os anticorpos monoclonais têm sido amplamente empregados na detecção e caracterização imunoquímica de diversos componentes celulares, em testes imunodiagnósticos e como agentes carreadores de drogas terapêuticas, entre outros usos (MILSTEIN, 1980).

Dentro do campo de pesquisa da Imunologia, o advento da tecnologia de hibridomas permitiu o estudo das moléculas expressas pelos linfócitos, envolvidas com os fenômenos de ativação, crescimento e diferenciação das células do sistema imune (BIERER *et al.*, 1989; SCOTT *et al.*, 1990). Com a ajuda dos AcMos foi possível caracterizar fenotipicamente as diferentes subpopulações de linfócitos T e de células acessórias do sistema imune, bem como detectar e quantificar os fatores biologicamente ativos, tais como as citocinas liberadas por células ativadas (PARNES, 1989; ARAI *et al.*, 1990; MICELI & PARNES, 1993). O *homing* de linfócitos e o recrutamento celular durante as respostas imunes e inflamatórias são outros exemplos de estudos que se beneficiaram do uso de anticorpos monoclonais específicos (BEVILACQUA, 1993).

Entretanto, o sucesso dessa tecnologia não se restringe apenas à área de imunologia. Ensaio baseados em AcMos são amplamente utilizados em outros ramos da medicina e biologia, por exemplo, em dosagens hormonais e na identificação de patógenos relacionados com doenças humanas, animais ou de plantas. Na indústria alimentícia, os anticorpos monoclonais têm sido importantes na detecção de alimentos adulterados. A purificação de diferentes substâncias biologicamente ativas também tem sido possível através da utilização desses reagentes (ZOLA, 1995). Mas, sem dúvida, a sua utilização na

detecção de produtos biológicos, através de ensaios imunoenzimáticos, resultou em enorme avanço em diversas áreas do conhecimento.

Alguns dos fatores biológicos produzidos pelas células do sistema imunológico controlam a proliferação e diferenciação de células de mamíferos. Fazem parte desse grupo de fatores as citocinas produzidas por linfócitos T ativados, macrófagos e outros tipos celulares, dentre os quais destaca-se a interleucina 6 (IL6).

A IL6 é uma citocina multifuncional, produzida em uma variedade de condições *in vivo*. A IL6 estimula a ativação e diferenciação de células B e linfócitos T, induz febre e regula a síntese das proteínas de fase aguda. Devido a sua função central na modulação da imunidade, a produção de IL6 é também altamente regulada. Assim, o nível de IL6 se eleva na exposição a estímulos inflamatórios, mas retorna ao nível basal logo após a resolução do processo. A desregulação da produção dessa citocina pode ter conseqüências patológicas severas. Por exemplo, a IL6 é um importante fator de crescimento de mielomas, além de estar aumentada na artrite reumatóide e em outras doenças inflamatórias crônicas (PATEL, *et al.* 2005). Portanto, a sua detecção em fluídos biológicos é de fundamental importância para o diagnóstico ou prognóstico de certas patologias. Embora, ensaios imunoenzimáticos com sensibilidade para detectar a presença de IL6 circulante tenham sido desenvolvidos e kits diagnósticos encontram-se disponíveis comercialmente, o acesso dos laboratórios nacionais a esses reagentes é dificultado pelos preços praticados e pelas dificuldades inerentes à obtenção de reagentes perecíveis por importação.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas secretadas por linfócitos B, quando estes entram em contato com substâncias antigênicas, acionando um conjunto de mecanismos responsáveis pela atividade do sistema imune de organismos superiores. Cada indivíduo possui entre  $10^7$  e  $10^9$  diferentes moléculas de anticorpo, cada uma delas com seqüências peculiares de aminoácidos nos sítios de combinação com os antígenos. A combinação do antígeno com o anticorpo desencadeia um processo que pode neutralizar a substância estranha (DAVIES & PADLAN, 1990).

Existe uma grande heterogeneidade mesmo em anticorpos formados contra um único determinante antigênico (epítipo), os quais podem ainda apresentar diferentes graus de afinidade na interação com o antígeno. Embora misturas de anticorpos policlonais específicos produzidos pela imunização humana ou animal tenham sido amplamente utilizadas no diagnóstico e na terapia de doenças, antes de 1975 não era possível produzir espécies únicas de anticorpos.

A tecnologia de hibridomas, células obtidas da fusão de linfócitos B normais com células de mielomas, desenvolvida por KOHLER & MILSTEIN (1975), representou um enorme avanço na pesquisa biológica por permitir a preparação dos anticorpos monoclonais (AcMo), reagentes biológicos de alta especificidade. Quase dez anos após a grande descoberta, em 1984, Milstein e Kohler dividiram com Niels Jerne o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina.

Entre outros usos, os anticorpos monoclonais têm sido largamente empregados na detecção e caracterização imunoquímica de diversos componentes celulares, em testes imunodiagnósticos (para detecção e quantificação de citocinas liberadas por células

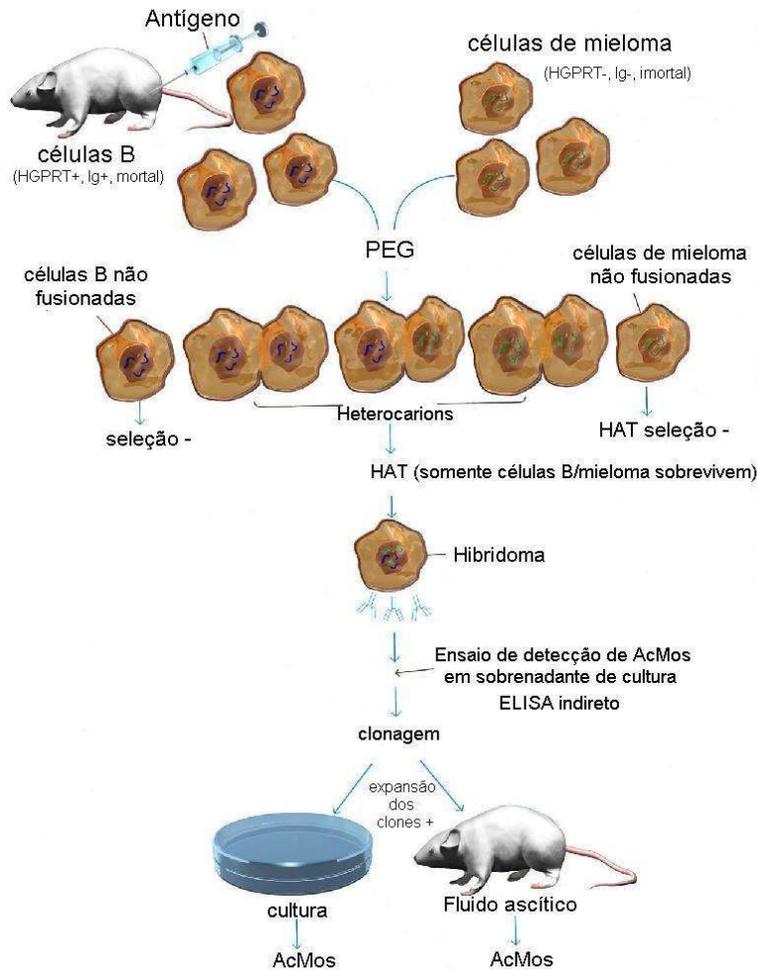
ativadas) e como agentes carreadores de drogas terapêuticas (ALKAN, 2004; MILSTEIN, 1980; PARNES, 1989; ARAI *et al.*, 1990; MICELI & PARNES, 1993).

A técnica para produção de hibridomas consiste da fusão de linfócitos normais com linfócitos tumorais (mielomas) com a obtenção de células híbridas, secretoras de anticorpos de especificidade única. Os mielomas usualmente empregados nas fusões são células que perderam a capacidade de produzir anticorpos, mas podem ser mantidos indefinidamente em cultura, enquanto que os linfócitos normais, extraídos do baço de camundongos imunizados, são produtores de anticorpos, mas sobrevivem poucos dias em cultura. Por outro lado, as células resultantes da hibridização entre linfócitos B e os mielomas podem crescer indefinidamente e secretar anticorpos monoclonais.

As linhagens de mielomas devem carregar um marcador genético, de forma que possam ser facilmente selecionadas após a fusão. Os mielomas mais empregados são os que carregam uma mutação nos genes que codificam as enzimas hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT) ou Timidina quinase (TK) (BUTLER, 1988), que os torna resistentes ao crescimento em meio contendo 8-azaguanina ou 6-tioguanina, análogos da hipoxantina, ou a 5-bromodeoxiuridina, um análogo da timidina, respectivamente. As enzimas HGPRT e TK são importantes para a síntese de DNA pela chamada via de salvação, na qual as células utilizam nucleotídeos pré-formados. As células de mieloma defectivas em uma dessas enzimas, se cultivadas em meio seletivo contendo a aminopterina, um antagonista do ácido fólico que inibe a síntese selvagem do DNA, são incapazes de utilizar a hipoxantina ou a timidina supridas externamente e morrem. Assim, um meio contendo Hipoxantina, Aminopterina e Timidina (meio HAT) selecionará positivamente apenas os hibridomas que receberam as enzimas HGPRT e/ou TK dos parentais normais (células esplênicas).

Para se obter os hibridomas, os mielomas mutantes e os linfócitos normais do baço são expostos ao agente de fusão, o polietilenoglicol (PEG), por um breve tempo (cerca de 3 minutos). Após a diluição e remoção do PEG por lavagem, as células que participaram da fusão são cultivadas no meio seletivo HAT, no qual apenas os hibridomas sobrevivem neste meio seletivo, por terem herdado a imortalidade das células de mieloma e por possuírem as enzimas) (por que está entre parênteses (seria e/ou depois HGPRT e TK herdadas das células normais. Alguns desses hibridomas mantêm a capacidade de sintetizar anticorpos, pelo que são identificados através de reações específicas. Após um processo de clonagem por diluição limitante, os hibridomas secretores dos anticorpos podem ser expandidos em cultura *in vitro* ou *in vivo* onde secretam o anticorpo monoclonal de interesse.

Dentro do campo de pesquisa da Imunologia, o advento da tecnologia de hibridomas permitiu o estudo das moléculas envolvidas com os fenômenos de ativação, crescimento e diferenciação das células do sistema imune (BIERER *et al.*, 1989; SCOTT *et al.*, 1990). Com a ajuda dos AcMos foi possível caracterizar fenotipicamente as diferentes subpopulações de linfócitos T e de células acessórias do sistema imune, bem como detectar e quantificar os fatores biologicamente ativos, tais como as citocinas liberadas por células ativadas (PARNES, 1989; ARAI *et al.*, 1990; MICELI & PARNES, 1993).



**Figura 1. Fusão de linfócitos e mieloma para a obtenção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcMo).** PEG (polietileno glicol); HAT (meio de cultura contendo hipoxantina, aminopterina e timidina).

## ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO DE HIBRIDOMAS

A produção de AcMos em grande escala pode ser realizada de duas maneiras: pela expansão das células *in vivo* em animais de laboratório ou pelo cultivo celular *in vitro*, seja estático (garrafas) ou em suspensão (*spinner* e biorreatores). A produção de AcMos *in vivo* se dá pela inoculação das células do hibridoma na cavidade peritoneal de animais de

laboratório, um procedimento que acarreta o crescimento de um tumor ascítico. Cerca de 10 dias após a injeção do hibridoma, cada animal libera ao redor de 5-10mL de líquido ascítico, contendo grandes concentrações de AcMos (1 a 10 mg/mL) (BUTLER, 1988). Entretanto, esse método não se mostra eficiente para obtenção de grande massa de AcMos, devido ao elevado número de camundongos que devem ser inoculados, além de ser condenado ou proibido em diversos países devido à questão da ética em experimentação animal. Este procedimento limita-se, portanto, a obtenção de AcMos em pequena escala, para fins de pesquisas laboratoriais.

Os hibridomas cultivados *in vitro* possuem exigências nutricionais elevadas, necessitando de meios de cultura apropriados, acrescidos de soro fetal bovino (SFB). O soro merece especial atenção por ser composto de um complexo de proteínas ideais para nutrição celular, adesão e crescimento de linhagens dependentes de suporte, para a proteção biológica (antioxidantes, antitoxinas, etc) e proteção mecânica em sistemas agitados e aerados. O soro contribui ainda para o transporte de glicose, fosfato e aminoácidos, além de aumentar a permeabilidade celular (BUTLER, 1988; STIEß & KRÜGER, 1993).

As técnicas de Engenharia Bioquímica, desenvolvidas para o cultivo submerso de microrganismos, contribuíram em grande medida para o avanço no estabelecimento da produção de anticorpos monoclonais em larga escala (BAILEY & OLLIS, 1977). Em contraste com a metodologia tradicional, a principal vantagem do cultivo submerso em biorreatores, é a possibilidade de se ampliar a escala do processo, tornando virtualmente ilimitado o suprimento de qualquer tipo de anticorpo monoclonal secretado por um dado hibridoma.

Os meios de cultura utilizados para o crescimento de células de mamíferos são bastante complexos. A literatura, freqüentemente, descreve variações na composição de um mesmo meio, na tentativa de otimizar o crescimento, a viabilidade celular e principalmente a concentração final do produto de interesse. As principais fontes de carbono e nitrogênio geralmente são a glicose e a glutamina. Em muitas situações práticas são esses dois compostos que determinam a produtividade dos biorreatores, não apenas por controlarem a geração de energia, mas igualmente por serem responsáveis pelo fornecimento de vários componentes intermediários do metabolismo celular (GLACKEN, 1988; MORO *et al.*, 1994). Na maioria dos casos, a glicose e a glutamina determinam a velocidade de produção de ATP, e conseqüentemente o processo total de crescimento e síntese de produtos, visto que essas fases do ciclo biológico dependem obrigatoriamente da disponibilidade de energia.

A glicose é necessária, na maioria das linhagens celulares, para a síntese de nucleosídeos, de glicosamina 6-fosfato e de gliceraldeído 3-fosfato e a glutamina é essencial para a síntese de purinas e de guanina, sendo também um doador primário de grupo amina para a síntese das pirimidinas, açúcares e aminoácidos. A glicose pode ser convertida a lactato através da oxidação do piruvato ou, então, a CO<sub>2</sub> e água, através da oxidação do NADH (na cadeia respiratória), gerando, respectivamente, 2 e 36 ATP por molécula de glicose consumida.

Em culturas de hibridomas, a produção de lactato e o consumo de glicose estão intimamente relacionados (HARIAGAE *et al.*, 1994). Os hibridomas utilizam preferencialmente a via glicolítica, mesmo sob condições aeróbias (LANKS & LI, 1988).

Os subprodutos liberados em culturas de células animais exercem um efeito tóxico significativo no crescimento celular, na produção e na qualidade dos produtos de interesse

gerados (YANG & BUTLER, 2000). Dentre eles os principais produtos do catabolismo celular são: amônia, lactato e CO<sub>2</sub>, podendo ser eliminados também no meio de cultivo, a alanina, aspartato, piruvato e citrato. A amônia e o lactato destacam-se como os principais responsáveis pela inibição no crescimento celular e da produção de metabólitos de interesse. Estudos sobre o efeito de elevada concentração de lactato na cinética de crescimento de hibridomas murinos e na produção de anticorpos em cultivo descontínuo mostraram que concentrações iniciais em torno de 3 g/L (33 mM) de lactato reduzem a velocidade específica de crescimento em 37% e aumentam a velocidade específica de produção de anticorpo em cerca de 2,6 vezes, em relação a uma cultura controle sem adição de lactato (KROMENAKER & SRIENC, 1994).

De acordo com a literatura, anticorpos produzidos em ascites e em cultura podem apresentar características físico-químicas distintas, podendo resultar em comportamentos farmacocinéticos diferentes (MOELLERING *et al.*, 1990). A composição do meio, as condições de cultivo ou o tipo de reator empregado podem alterar o processo de glicosilação do anticorpo, modificando suas propriedades (PATEL *et al.*, 1992; MONICA *et al.*, 1993). As características físico-químicas e a atividade biológica dos anticorpos devem ser cuidadosamente estudadas durante os processos de cultivo em grande escala, evitando possíveis mudanças que possam afetar a sua aplicação. É possível que uma condição específica ou técnica de cultivo seja mais favorável que outras para um dado hibridoma e seu produto. Entretanto, estudos com diferentes hibridomas e seus produtos ainda se fazem necessários. Portanto, é de grande importância que a produção de anticorpo seja sempre acompanhada por métodos adequados de detecção do mesmo.

Freqüentemente, a natureza do anticorpo dita o ensaio de detecção. Por exemplo, anticorpos para antígenos de superfície de células em suspensão podem ser empregados em ensaios de imunofluorescência, enquanto que técnicas imunoenzimáticas, do tipo ELISA, são excelentes para a detecção de antígenos solúveis. Além disso, o método de detecção deve refletir as técnicas nas quais se pretende utilizar o anticorpo monoclonal. Anticorpos que reagem contra tecidos fixados não necessariamente reagirão contra o tecido fresco. Em outras palavras, alguns anticorpos podem funcionar muito bem em alguns ensaios e não em outros.

## **APLICAÇÕES DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS**

Um dos métodos diagnósticos mais empregados para a detecção de antígenos em uma mistura complexa são os ensaios imunoenzimáticos ou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de captura, desenvolvidos na década de 1970 por ENGVALL e PERLMANN (1971, 1972) e VAN WEEMEN e SCHURS (1971, 1972) (*appud* VOLLER *et al.*, 1976). Nestes ensaios, um AcMo é geralmente usado para captura do antígeno e outro AcMo conjugado a biotina, específico para um epítipo diferente da mesma molécula, é utilizado para a detecção desses antígenos.

Os anticorpos policlonais purificados foram inicialmente empregados nos ensaios imunoenzimáticos, mas, após o advento da tecnologia dos hibridomas, estão sendo gradativamente substituídos pelos anticorpos monoclonais. Entre as vantagens dos AcMos nos ensaios do tipo ELISA destacam-se a sua alta especificidade para um certo epítipo presente na molécula do antígeno, e a sua produção ilimitada em cultura. Inúmeros ensaios imunoenzimáticos empregando AcMos estão disponíveis comercialmente para detecção de

uma infinidade de moléculas de interesse na clínica e na pesquisa biomédica, tais como: hormônios, fatores de crescimento, citocinas, epítomos de uma infinidade de patógenos, imunoglobulinas, etc.

A utilização de anticorpos monoclonais específicos para epítomos de antígenos presentes em vários tipos de tumores representa um avanço significativo na área de diagnóstico dos tumores. A realização de estudos imagenológicos munidos destes anticorpos possibilita a evidência específica de acúmulos tumorais, por vezes diminutos, que escapam à resolução dos métodos de imagem em uso corrente, além da identificação de metástases e envolvimento ganglionar. Adicionalmente, os AcMos estão sendo estudados intensamente para a terapia de tumores específicos (WILDER *et al.*, 1996).

O uso terapêutico dos AcMos durante muitos anos foi restrito devido ao grande potencial imunogênico desses Acs, geralmente produzidos em camundongos, podendo induzir uma resposta anti-idiotípica, que poderia interferir na terapia de interesse (CABILLY *et al.*, 1984), e ainda causar uma hipersensibilidade (ROTHSTEIN *et al.*, 1984). No entanto, com a possibilidade da humanização de anticorpos, preservando sua atividade biológica e eliminando ou reduzindo seu potencial imunogênico, esse problema foi equacionado (TSURUSHITA & VASQUEZ, 2004).

A estratégia da humanização de Acs consiste em substituir as regiões constantes da cadeia leve e pesada dos AcMos murinos por regiões constantes humanas, originando um anticorpo quimérico que permanecerá com a região variável (sítio combinatório) de ligação com o antígeno de interesse, não perdendo sua atividade biológica.

Desde a aprovação do Zenapax® em 1997, primeiro anticorpo monoclonal humanizado (anti-CD25, IgG1), usado no tratamento de rejeição em transplantes renais, um

total de quatorze anticorpos tiveram seu uso terapêutico aprovado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) (HUDSON & SOURIAU, 2003). Existem mais de 30 novos anticorpos humanizados ou quiméricos nas fases finais dos testes clínicos. Esse número ainda pequeno pode ser explicado pela dificuldade na produção de anticorpos monoclonais contra antígenos altamente conservados nos mamíferos, que apresentam baixa ou nenhuma imunogenicidade (TSURUSHITA *et al.*, 2004); além da engenhosidade necessária na humanização desses anticorpos, a fim de não desencadearem uma resposta imunológica e preservarem sua atividade biológica.

AcMos vêm sendo empregados para a detecção e quantificação de produtos biologicamente ativos, particularmente as citocinas, para a avaliação do prognóstico de doenças e no tratamento clínico direto de pacientes (SCHELLER *et al.*, 2004; DESSAIN *et al.*, 2004; KIDA *et al.*, 2005).

## **INTERLEUCINA-6**

A IL6 é uma citocina pleiotrópica, que desempenha um papel central no sistema imune, influencia as respostas imune antígeno-específicas e as reações inflamatórias, sendo um dos mais importantes mediadores da chamada reação de fase aguda iniciada no fígado (KAWANO *et al.*, 1989; HIRANO *et al.*, 1990). Devido ao seu envolvimento em inúmeros processos biológicos, a IL6 recebeu inicialmente uma variedade de nomes baseados em suas funções, tais como: fator estimulador de células B, fator diferenciador de células B, interferon- $\beta_2$ , proteína de 26 kDa, fator de crescimento de hibridomas, entre outros. A expressão dessa citocina é regulada por uma variedade de fatores, incluindo hormônios

esteroidais, tanto em níveis transcricionais como pós transcricionais (KISHIMOTO *et al.*, 1989).

A IL6 é liberada por diversos tipos celulares, em condições fisiológicas ou patológicas (HIRANO, 1998). Monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, granulócitos, células do músculo liso, condrócitos, osteoblastos, mastócitos e queratinócitos são exemplos de células que podem produzir IL6 quando ativadas por IL1, endotoxinas bacterianas, fator de necrose tumoral (TNF), fator derivado de plaquetas (PDGF) e Oncostatina M. Os glicocorticóides inibem a síntese de IL6 (RAY *et al.*, 1990), bem como o fazem as citocinas IL4 e TGF- $\beta$  (TE VELDE *et al.*, 1990; WALIA *et al.*, 2003).

A IL6 é um dos fatores que promovem a sobrevivência de neurônios colinérgicos em cultura e induz os astrócitos a produzir o fator de crescimento neuronal (NGF). Além disso, a IL6, bem como a IL1, estimula a síntese de ACTH (corticotropina) na hipófise. Os glicocorticóides sintetizados em resposta ao ACTH inibem a produção de IL6, IL1 e TNF *in vivo*, estabelecendo desta forma uma alça de *feedback* negativo entre as funções do sistema imune e do sistema neuroendócrino (SWEEP *et al.*, 1991).

A IL6 é um fator de diferenciação de linfócitos B *in vivo* e *in vitro* e um fator ativador de células T. A IL6 é também capaz de induzir a maturação final de linfócitos B em plasmócitos secretores de imunoglobulinas se essas células tiverem sido pré-ativadas com IL4, promovendo o aparecimento de altos níveis de IgG1 no plasma sanguíneo (CHEUNG & VAN NESS, 2002; KLEIN *et al.*, 2003).

Na presença de IL2, a IL6 produzida pelas células apresentadoras de antígeno (APC) induz a diferenciação de células T maduras e imaturas em células T efetoras superando os efeitos inibitórios de células T regulatórias (POWRIE & MALLOY, 2003).

Ainda, a IL6 também induz a proliferação de timócitos e desempenha provavelmente um papel importante no desenvolvimento dos linfócitos T no timo (HODGKIN *et al.*, 1988).

Devido aos seus efeitos sobre as células hematopoéticas, tem sido sugerida a utilização da IL6 no tratamento de certos tipos de anemia e trombocitopenia, tendo em vista que o seu uso combinado com o pré-tratamento com a IL3 induziu o aumento na contagem de plaquetas (CARRINGTON *et al.*, 1991; SUN *et al.*, 2001).

A atividade fisiológica da IL6 é complexa, estando envolvida em processos anti-inflamatórios e pró-inflamatórios. A elevação da produção da IL6 é provavelmente um dos principais fatores envolvidos em inúmeras patologias, tais como: doenças auto imune (por exemplo: a artrite reumatóide), mal de Alzheimer, mieloma múltiplo, certos linfomas, em doenças cardíacas, na cirrose hepática, osteoporose, tumores sólidos, câncer de próstata e bexiga, bem como em certos processos infecciosos (revisado em HEINRICH *et al.*, 2003). A IL6 é também um ativador ou inibidor das respostas de células T; a interação em processos anti e pró-inflamatórios sugere que esta citocina pode desenvolver um papel central na regulação das respostas fisiológicas às doenças.

O uso de AcMos anti-IL6, tanto na fase de diagnóstico como na terapia, vem sendo relatado na literatura como uma importante ferramenta no tratamento de diversas patologias, revelando grande potencial terapêutico. Porém, estudos ainda se fazem necessários no sentido de se obter testes mais sensíveis para a detecção da IL6 no soro desses pacientes. Investigações clínicas do uso de AcMo anti-IL6 no tratamento de câncer e algumas desordens linfoproliferativas têm sido relatadas desde 1991, apresentando resultados satisfatórios. Análises de vários tratamentos demonstraram que a maioria dos pacientes tratados com o AcMo tiveram níveis de proteína C reativa substancialmente reduzidos abaixo do limite de detecção, sintomas relacionados as doenças também foram

reduzidos (TRIKHA et al, 2003). A sepse destaca-se por desencadear a ativação de uma cascata de mediadores inflamatórios, dentre eles a IL6, IL1 e o TNF. A IL6 é liberada em resposta ao TNF e a IL1 (THIJS, 1995), sendo comumente detectada no soro de pacientes com sepse; níveis elevados desta citocina estão associados ao óbito dos pacientes (CASEY, 1993).

Estudos vêm sendo realizados na tentativa de se equilibrar os níveis dessas três citocinas envolvidas no processo inflamatório, a terapia isolada das citocinas não tem se mostrado vantajosa, estudos clínicos de neutralização do TNF não têm demonstrado resultados muito consistentes (ABRAHAM, 1999).

O uso de um AcMo recombinante anti-receptor de IL6 humana, no tratamento de crianças com artrite idiopática juvenil (JIA- *juvenile idiopathic arthritis*), indiretamente inibiu os efeitos da IL6, os pacientes apresentaram melhora clínica e níveis normalizados das proteínas de fase aguda, além de se mostrar um tratamento seguro e bem tolerado (YOKOTA *et al.*, 2005).

Assim, a determinação dos níveis de IL6 em fluídos biológicos pode ser muito útil no monitoramento de diferentes condições patológicas, sendo o desenvolvimento de anticorpos monoclonais anti-IL6 de grande interesse para uso no diagnóstico, prognóstico e tratamento de patologias de natureza inflamatória.

## **II. OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo central à obtenção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-IL6 e o estudo de suas propriedades de ligação à IL6 humana (recombinante e nativa), e murina, visando o seu aproveitamento em ensaios imunoenzimáticos de captura, bem como de neutralização da citocina.

## DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Através de experimentos de fusão celular pela tecnologia de hibridomas, serão obtidos anticorpos monoclonais anti-IL6 humana. Os anticorpos monoclonais obtidos serão analisados quanto à:

- Potencial para detectar a citocina em ensaios do tipo ELISA;
- Capacidade de neutralizar a atividade biológica da citocina empregando uma linhagem celular sensível;
- Sequência primária da porção N-Terminal dos AcMos anti-IL6;

Os hibridomas secretores dos anticorpos monoclonais anti-IL6 de maior interesse serão analisados quanto a cinética de crescimento em cultura em frasco *spinner* levando-se em conta os seguintes parâmetros:

- Crescimento e sobrevivência celular;
- Produção de anticorpos monoclonais
- Consumo de glicose
- Geração de metabólitos: lactato e amônio

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c fêmeas ou machos, com 8 semanas de idade. Os animais foram obtidos no Centro Multiinstitucional de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB/UNICAMP), com 4 semanas de idade e mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em condições *specific pathogen free* (SPF), em ambiente com temperatura e fotoperíodo controlados, com água e ração *ad libitum*, até sua utilização nos experimentos.

A utilização dos animais de laboratório foi feita de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo no. 674-2 – Anexo 1).

## 2. Imunização dos camundongos

Camundongos BALB/c, fêmeas ou machos, com 8 semanas de idade foram imunizados com IL6 humana recombinante (rh), preparada no *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) a partir de DNA recombinante da IL-6 humana e calibrada de acordo com padrões internacionais para IL-6 (código 89/548), foi cedida pelo Prof. Fernando Queiroz Cunha, FMRP/USP, Ribeirão Preto, SP, de acordo com esquemas clássicos de imunização com proteínas. Brevemente, os camundongos receberam uma dose de 50µg de rhIL6, emulsionada em 1mg de Hidróxido de Alumínio, por via intraperitoneal (i.p.). Após 30 dias, os animais receberam a segunda dose do antígeno em salina, por via i.p. e 7 dias depois foi realizada a sangria de prova. Os animais que apresentaram níveis de

anticorpos anti-IL6 elevados receberam novo desafio antigênico (50µg da proteína em salina) por via i.p. e 3 dias depois tiveram seus baços removidos assepticamente para preparo da suspensão de células a serem usadas nos procedimentos de fusão. Antes da remoção dos baços, os animais foram exangüinados pelo plexo orbital e os soros imunes foram separados por centrifugação.

### **3. Preparo do Feeder-Layer de macrófagos**

Macrófagos peritoneais residentes, obtidos de camundongos BALB/c com cerca de 4 semanas de idade, foram retirados assepticamente com meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) centrifugados a 1500rpm durante 10 minutos e ressuspensos em meio HAT [meio RPMI completo (RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino- (Nutricell), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 0,2 g/L de arginina, 0,036 g/L de asparagina, 0,012 g/L de ácido fólico, 2 g/L de HEPES ((N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), Sigma) e 2 µL/L de 2-mercaptoetanol, (Merck; München, Germany)], contendo 20% de soro fetal bovino, 0,136 mg/L de hipoxantina (Sigma), 0,03 mg/L de aminopterinina (Sigma) e 0,038 mg/L de timidina (Sigma). Após contagem em câmara de Neubauer, as suspensões foram ajustadas para  $4 \times 10^4$  células/mL e semeadas em placas de 24 poços e  $1 \times 10^3$  células/mL nas placas de 96mL. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, inclusive para avaliar a esterilidade da preparação.

#### **4. Preparo das células de mieloma**

As células de mieloma SP2 Ag14/10 (SCHULMAN *et al.*, 1978) foram descongeladas e cultivadas em meio RPMI completo contendo 10% de SFB, acrescido de 0,125 mg/L de 8-azaguanina (Sigma). A azaguanina foi adicionada para impedir a sobrevivência de possíveis revertentes para a mutação da enzima HGPRT. As garrafas de cultura foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem a densidade celular necessária para a fusão. Somente foram utilizadas para a fusão as suspensões celulares com viabilidade superior a 90%, conforme determinado pela contagem na presença de Azul de Trypan.

#### **5. Obtenção dos hibridomas anti-IL6**

Os hibridomas secretores de anticorpos anti-IL6 foram obtidos seguindo-se as indicações de FASEKAS DE ST. GROTH & SCHEIDGGER (1980), utilizando-se as células de mieloma SP2 Ag14/10 (SCHULMAN *et al.*, 1978) e as células esplênicas de camundongo BALB/c imunizados previamente com rhIL6.

Brevemente,  $3 \times 10^7$  células de mieloma SP2 e  $1 \times 10^8$  células esplênicas foram adicionadas a um tubo de centrífuga e sedimentadas a 1500rpm, por 15 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 1,0 mL da solução de polietilenoglicol (PEG) 1000 a 50%, contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). A suspensão foi mantida sob agitação, primeiramente por 1 minuto, à temperatura ambiente, e em seguida por 90 segundos em banho-maria 37°C. Em seguida,

foram adicionados 20 mL de salina Fasekas (PBS, pH 7,2, contendo 0,4 g/L de cloreto de potássio, 2 g/L de glicose e 0,01 g/L de vermelho de fenol), vagarosamente, ao longo de 2 min. Após completar o volume para 50 mL, a suspensão foi deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuscitado em 100 mL meio HAT e plaqueado em 4 placas de 24 poços contendo o *feeder-layer* de macrófagos, em um volume de 1,0 mL/poço. As culturas foram incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por aproximadamente duas semanas. Após uma semana, 1 mL de meio foi removido e substituído por meio HAT fresco. As culturas foram examinadas com a ajuda de microscópio para identificação dos poços contendo clones de híbridos e determinação do momento mais adequado à pesquisa de anticorpos específicos nos sobrenadantes.

### ***5.1. Seleção dos hibridomas secretores de anticorpos anti-IL6***

Aproximadamente 10-15 dias após o experimento de fusão celular, o sobrenadante de cada poço com crescimento de clones foi testado para detecção das culturas contendo híbridos secretores de anticorpos anti-IL6. Para esta finalidade foram realizados ensaios de ELISA, empregando-se a IL6 humana recombinante adsorvida às placas de poliestireno de 96 poços como será descrito mais adiante.

## ***5.2. Clonagem por diluição limitante***

As culturas positivas nos ELISA foram clonadas por diluição limitante (1 célula por poço) em meio RPMI completo, em placas de 96 cavidades, contendo *feeder layer* de macrófagos, previamente preparado como descrito no item 4.3. Após cerca de 12 a 15 dias, os sobrenadantes dos poços de cultura contendo 1 único clone foram testados por ELISA para identificação dos hibridomas secretores de anticorpos monoclonais anti-IL6.

## ***5.3. Expansão e criopreservação das linhagens secretoras de anticorpos monoclonais anti-IL6***

As culturas positivas foram expandidas por subcultivo em frascos T25 e T75 (Corning), na presença de meio RPMI completo e incubadas em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Após o crescimento, as culturas foram coletadas dos frascos e transferidas para tubos plásticos estéreis. Uma alíquota das suspensões foi utilizada para contagem em câmara de Neubauer. Após a centrifugação a 1500rpm por 10 minutos, o sedimento celular foi ressuspenso em solução de congelamento (Soro Fetal Bovino contendo 10% de DMSO) na concentração de 10<sup>6</sup> células/mL. As suspensões foram transferidas para frascos apropriados para o congelamento de células e transferidas para um Biofreezer (-70°C). Cerca de 24 horas após o congelamento a -70°C, os frascos foram transferidos para reservatórios de criopreservação, contendo nitrogênio líquido.

Foram criados dois bancos de células, sendo um de estoque com 6 ampolas de cada hibridoma obtido e um de trabalho contendo 15 ampolas de cada um dos hibridomas estudados no presente trabalho.

## **6. Determinação dos isotipos dos anticorpos monoclonais anti-IL6**

A determinação dos isotipos dos anticorpos monoclonais foi feita através de ensaios de ELISA, utilizando o kit *ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping kit I - HRP/ABTS* (Pierce, Rockford IL, USA), contendo anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo produzidos em coelhos (todos os tipos (exceto IgE) e cadeias leves *kappa* e *lambda*), de acordo com instruções do fabricante. Como fonte dos anticorpos monoclonais, foram empregados os sobrenadantes de cultivo dos clones expandidos em cultura.

## **7. Produção de ascite**

Os hibridomas anti-IL6 foram inoculados na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. Previamente (cerca de 7 dias antes da injeção das células), foi administrado a cada camundongo 0,5 mL de Nujol, por via intraperitoneal e então  $5 \times 10^5$  células de hibridomas anti-IL6 foram administradas pela mesma via, tendo sido empregados 5 camundongos para inoculação de cada hibridoma. Em tempos que variam de 7 a 12 dias, os líquidos ascíticos produzidos por estes camundongos foram retirados por punção peritoneal. O líquido ascítico, livre de células por centrifugação, foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

## 8. Cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína G

Os anticorpos monoclonais anti-IL6 das subclasses de IgG foram purificados dos líquidos ascíticos e dos sobrenadantes de cultura, previamente concentrados em sistema de ultrafiltração agitado com membrana YM10 (AMICOM, Beverly-MA, USA), através de cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína G (SIGMA), segundo protocolo descrito por EY *et al.* (1978), com modificações. Resumidamente, cerca de 5,0 mL de ascite ou do sobrenadante concentrado foram alimentados a uma coluna contendo aproximadamente 4,0 mL de gel de Sepharose-Proteína G previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,5. Após 30min de incubação à temperatura ambiente, com agitação ocasional, procedeu-se a remoção dos componentes não adsorvidos à matriz, utilizando-se como solução de lavagem o tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,5, em fluxo de 30 mL/hora e colhendo-se 5,0 mL por tubo. A lavagem foi acompanhada através da medida espectrofotométrica a 280 nm (Spectro UV - VIS RS, Labomed Inc., San Francisco, CA, USA), até que se obtivesse uma densidade óptica inferior a 0,05 nas amostras coletadas. Em seguida, o tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,8 foi aplicado à coluna para permitir a dessorção da IgG adsorvida à matriz. Os eluatos foram colhidos em tubos contendo um volume de tampão Tris-HCl 1M pH 8,5 suficiente para neutralizar 5,0 mL do tampão de eluição, em banho de gelo. A eluição das amostras foi feita com a coluna aberta (fluxo máximo) e a densidade óptica das amostras a 280 nm foi monitorada. Os tubos contendo a proteína eluída (com as densidades ópticas mais elevadas) foram reunidos em *pool*, dialisados em membrana de celofane (Sigma) contra PBS 0,05 M pH 7,2 e a concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford.

### **8.1. Conjugação dos anticorpos com biotina**

Os anticorpos anti-IL6, purificados dos ascites, foram conjugados à biotina segundo indicações de HEGGNESS & ASH, 1977. Resumidamente, 1,0 mg/mL de cada anticorpo a-IL6, foram inicialmente dialisados em membrana celofane (Sigma) contra tampão borato de sódio 0,2 M pH 8,5 e, a seguir, incubados com 100 µL de uma solução de 1 mg/mL de biotinasuccinamida (Sigma) em DMSO (Merck), à temperatura ambiente, no escuro, por 4 horas, com agitação ocasional. O conjugado obtido foi dialisado contra PBS pH 7,2, dividido em alíquotas, que foram estocadas a -70 °C até o momento do uso em ensaios de ELISA.

### **9. Sequenciamento de aminoácidos da porção N-Terminal dos anticorpos monoclonais**

Após a eletroforese por SDS-PAGE e transferência para membrana de PVDF realizadas como descrito nos itens 11 e 12, os aminoácidos da porção N-terminal dos anticorpos 1A6F10 e 3B1E4 foram seqüenciados através de reação de degradação automática de Edman, em um seqüenciador automático de proteínas Procise, Modelo 491 (Applied Biosystems, Foster City, CA), com detecção direta dos aminoácidos derivados para feniltioidantoína aminoácidos (PTH-AA), através de separação cromatográfica monitorada a 269 nm. A seqüência N-terminal da amostra foi determinada pela comparação dos cromatogramas de cada ciclo de reação com padrões externos de PTH-AA.

Esse seqüenciamento foi realizado no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, sob orientação do Professor Dr. José César Rosa.

## 10. Ensaio imunoenzimáticos (ELISA)

### *10.1. ELISA para seleção e titulação dos anticorpos anti-IL6*

Para a detecção de anticorpos anti-IL6 nos sobrenadantes de cultura, placas de poliestireno de 96 cavidades fundo chato (FALCON, Becton and Dickinson Labware, Oxnard, USA) são sensibilizadas pela adição a cada poço de 50µL de IL6 humana recombinante (5 µg/mL) em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,5 (a concentração ótima do antígeno para esse ensaio foi determinada por titulação com diferentes diluições da IL6 recombinante). As placas foram mantidas por 1 hora a 37°C em câmara úmida e, em seguida, por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfato de sódio 0,02M, pH 7,2) contendo 0,1% de Tween 20 (Sigma). Em seguida, os sítios livres foram bloqueados pela adição de PBS contendo 5% de leite desnatado (Molico - Nestlé, Araçatuba, SP) e incubação das placas por 1 hora a 37°C. Após 3 lavagens com PBS-Tween, 50µL dos sobrenadantes foram adicionados aos poços, em duplicata e as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após novo ciclo de lavagem, 50µL de uma diluição apropriada (1:6000) do conjugado Ig de coelho anti-IgG de camundongo-peroxidase (LÊO et al, 2000) foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas novamente por 1 hora a 37°C. Após a lavagem das placas, a reação foi revelada pela adição do substrato/cromógeno (0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) e 0,4 mg/mL de ortofenilenodiamina (OPD) (Sigma), em tampão citrato fosfato 0,05M pH 5,0) e incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente, na ausência de luz. A reação foi interrompida pela adição de 25µL de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N a cada

poço. A leitura espectrofotométrica das placas foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan II, MS Labssystem, Finlândia) em comprimento de onda de 492nm. Diluições de 1:100 do soro normal e do soro imune foram empregadas como controles negativo e positivo, respectivamente. Foram consideradas produtoras de anticorpos, as culturas que apresentaram densidade ótica (D.O.) igual ou superior a 4 vezes o valor obtido no controle negativo.

Para a titulação dos anticorpos monoclonais nos líquidos ascíticos ou nas frações purificadas/conjugadas foram empregados os procedimentos descritos acima, exceto que placas de alta adsorção (Greiner, Labortechnik GmbH, Frickenhausen - Germany) foram empregadas para sensibilização com IL6.

### ***10.2. ELISA “sanduíche” para Interleucina-6***

Os ensaios para detecção de IL6 foram realizados em placas de 96 poços (Greiner), sensibilizadas com os anticorpos monoclonais a-IL6 purificados, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,5, em concentrações variando entre 10 e 100 µg/mL. A sensibilização foi feita pela incubação das placas por 1 hora a 37°C, em câmara úmida, que a seguir foi mantida a 4°C, *overnight*. Diluições seriadas de IL6 humana recombinante, preparadas em PBS Molico 2%, foram adicionadas em quadruplicata aos poços e, a seguir as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C. Após mais um ciclo de lavagem, os anticorpos monoclonais conjugados a biotina foram adicionados às placas para a detecção da IL6 ligada, em concentrações de 40 e 80 µg/mL. As placas foram incubadas por 2 h a 37°C. Após a lavagem, o conjugado Streptoavidina/peroxidase (SIGMA) diluído

em PBS molico 2% foi adicionado na concentração de 2,5 µg/mL e as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. A revelação da reação e a leitura das placas foram realizadas conforme descrito anteriormente. Após a escolha do melhor par de anticorpos para a detecção da IL6 humana recombinante foram realizados ensaios para detecção de IL6 murina nativa (produzida em nosso laboratório) e humana nativa (cedida gentilmente pela Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta, FCM/UNICAMP, Campinas, SP).

### ***10.3. ELISA para quantificação de IgG***

Os ensaios para a determinação da quantidade de anticorpos monoclonais, secretados pelos hibridomas escolhidos, foram realizados no Laboratório de Fermentação Industrial do Agrupamento de Biotecnologia do IPT/SP, segundo protocolo de LÉO *et al.* (2000) modificado. Placas de microtitulação de 96 poços, foram sensibilizadas com 2 µg/mL de Ig de coelho anti-IgG de camundongo (SIGMA M-7023, EUA) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio (Merck) 0,05M, pH 9,2 (50µL/poço). Após incubação por 1 hora a 37°C em câmara úmida, as placas foram mantidas por mais 18 horas a 4°C. As etapas de lavagem das placas foram realizadas utilizando-se o equipamento M96V Washer (Titertek, EUA) e consistem em 4 ciclos de lavagem com PBS 0,05% Tween 20. O bloqueio foi realizado com PBS contendo 2% de caseína (Calbiochem 218682, Alemanha) e 2% de Soro Bovino (Nutricell, Brasil) (200µL/poço), após 1 hora de incubação as placas foram lavadas novamente e 50µL das amostras a serem dosadas, foram adicionadas aos poços em duplicata, diluídas em tampão PBS 1% caseína e 2% soro bovino. As amostras de IgG de camundongo padrão (Sigma M-5284, EUA) da curva de calibração, foram diluídas na faixa

de concentração de 1,56 a 200 ng/mL e adicionadas as placas que permaneceram incubadas por 1 hora a 37°C. Após novo ciclo de lavagem 50µL de Ig de carneiro anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (HRPO) (Sigma, A-5906), diluída em PBS 1% caseína e 2% soro bovino foi adicionado as placas as quais foram novamente incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida as placas foram lavadas e a revelação da reação foi possibilitada pela adição de 50µL do cromógeno (0,4 mg/mL de OPD (Sigma P-6787, EUA), 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma H1009, EUA)) diluídos em tampão Citrato – Fosfato (0,05M, pH 5,0). Após período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz, a reação foi bloqueada adicionando-se 25µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (Merck). Imediatamente após o bloqueio, procedeu-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 492nm.

## **11. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

A separação dos polipeptídeos contidos nas diferentes amostras foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo Dodecil sulfato de Sódio (SDS-PAGE - *Sodium Dodecylsulfate Poly(acrylamide) Gel Eletroforesis*), de acordo com as indicações de Laemmli, 1970, utilizando-se gel de resolução de 10% de acrilamida e gel de empacotamento de 3% de acrilamida. A eletroforese foi conduzida em equipamento MiniProtean<sup>®</sup> II (BioRad), de acordo com as recomendações do fabricante. A corrente foi ajustada para 25 mA e a corrida foi realizada em cerca de duas horas.

Como referência, foi utilizado o padrão de baixo peso molecular (*Low Molecular Weight Standard* – LMW, Bio Rad) contendo as proteínas: fosforilase (97 kDa), soro albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina

(21 kDa) e lisozima (14 kDa). As amostras foram diluídas v:v com tampão de amostra 2x (4% de SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol e 0,125M Tris-HCl pH6,8 - SIGMA), aquecidas durante 5 minutos a 95°C e aplicadas no gel. Os géis foram corados com uma solução de Comassie Blue (metanol 40%, ácido acético 10% e Comassie Blue 0,25%) por 30 min, e descorados em solução aquosa de metanol 40% e ácido acético 10%, até a completa visibilidade das bandas.

## **12. *Western blotting***

Ensaio de *Western blotting* foram realizados, de acordo com indicações de Towbin *et al.* (1979), para averiguar a capacidade dos anticorpos monoclonais detectarem a IL6 humana recombinante em condições desnaturantes.

Após eletroforese em géis de poliacrilamida, a IL6hr foi transferida para a membrana de nitrocelulose (BIO-RAD, USA) em Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, 1% de SDS e 18,4% de etanol através de eletroforese realizada em equipamento Mini transblotting (BioRad), aplicando-se uma corrente de 180 mA, por duas horas. A eficiência da transferência foi verificada pela coloração dos géis com 0.25% de Coomassie brilliant blue R (BioRad) em metanol/ácido acético/água (5/1/5, v/v/v) e das membranas de nitrocelulose com o Ponceau S em 5% de ácido acético.

Após a incubação das membranas com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé), para o bloqueio dos sítios ligantes a proteínas, a detecção da rhIL6 foi feita através de reação com os anticorpos monoclonais na concentração de 40 µg/mL, durante 1 h a 37°C e em seguida *overnight* a 4°C. Após a lavagem (3 vezes com PBS pH 7,2, contendo

0,005% de Tween 20, PBS-Tw), a fita de nitrocelulose foi incubada por 2 horas, a 37°C com anticorpo secundário Ig de coelho anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase, (preparado em nosso laboratório), na diluição 1/250 em PBS, pH 7,2. A reação foi revelada pela adição da mistura de substrato/cromógeno (0.003% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 1 mg/mL de diaminobenzidina -DAB- em tampão citrato-fosfato de Sódio 0,1M, pH 5,0) à fita de nitrocelulose, previamente lavada. A reação de revelação foi interrompida, logo após o aparecimento das bandas marcadas, pela lavagem da membrana em água corrente.

Em alguns experimentos, a transferência da IL6 foi feita para membranas de PVDF (Immobilon-P; BIO-RAD), utilizando-se o tampão CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid) (Sigma) pH 11, 10 mM, contendo 10% de metanol.

### **13. Obtenção de IL6 murina nativa**

Para a obtenção da IL6 murina nativa, macrófagos peritoneais de camundongos previamente elicitados pela administração de tioglicolato a 3% (3,0 mL/cavidade, 4 dias antes) foram coletados assepticamente com 3,0 mL de meio RPMI 1640 e depositados em tubos de plástico estéreis para centrifuga (CORNING) e mantidos em banho de gelo até o uso.

As concentrações celulares nas suspensões foram determinadas por contagem em câmara de Neubauer e ajustadas para 1x10<sup>6</sup> células/mL. As células foram então semeadas em placas de 24 poços (CORNING), na densidade de 1x10<sup>6</sup> céls/poço, e incubadas por 2 horas, a 37°C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS, pH 7,4.

Após as lavagens, as monocamadas de células aderentes (macrófagos, 90%) foram incubadas com 100 ng/mL de LPS (Lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*, DIFCO Laboratories, Detroit Michigan USA) e/ou 5 UI/mL de IFN- $\gamma$  (Genzyme), diluídos em meio RPMI contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab) a 37°C, por período de 48 horas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e centrifugados para remoção de células e utilizados nos ensaios imunoenzimáticos de captura de IL6.

#### **14. Neutralização de IL6**

A linhagem celular B9 (HELLE *et al.*, 1988), um hibridoma dependente de IL6 para seu crescimento e multiplicação, foi empregado para testar a capacidade neutralizante dos anticorpos monoclonais obtidos. As células B9, previamente cultivadas em meio RPMI contendo 5% de SFB e 50 pg/mL de rhIL6, foram coletadas das garrafas de cultura, centrifugadas a 1500rpm durante 10 minutos e lavadas com meio RPMI sem SFB. Após a contagem, as células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^4$  céls/poço em placas de cultura de 96 poços, na presença de 50 pg/mL de IL6 e diferentes concentrações (0,5; 5 e 50  $\mu$ g/mL) dos anticorpos monoclonais purificados e esterilizados. As placas foram então incubadas a 37°C, por período de 72 horas, em estufa umidificada, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram adicionados 10 $\mu$ l de MTT (5 mg/mL) 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 bromídeo difeniltetrazolio, a cada poço de cultura. As placas foram mantidas por mais 4 horas, a 37°C em estufa. Após esse período, as células foram lisadas pela adição de 100  $\mu$ l de SDS a 5% acidificado com HCl 0,01N a cada poço. As placas foram incubadas a 37°C, *overnight*, após o que foram realizadas leituras espectrofotométricas em leitor de ELISA no

comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (Erro padrão da média) das densidades óticas obtidas.

## **15. Quantificação de proteína total**

As concentrações protéicas nas diferentes amostras foram determinadas através do método de BRADFORD (1976), utilizando-se como padrão uma curva de 10 a 100  $\mu\text{g/mL}$  de albumina do soro bovino (BSA). As leituras das amostras foram feitas em espectrofotômetro a 595nm, utilizando-se como branco a solução de PBS 0,02M pH 7,2. As amostras foram corridas em quadruplicata e os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. das concentrações calculadas em função da curva padrão.

## **16. Ensaios de cultivo dos hibridomas.**

O comportamento dos hibridomas em cultura foi acompanhado seguindo-se os seguintes parâmetros: crescimento celular, viabilidade, produção de anticorpos, concentração de glicose e ácido láctico e amônio.

As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma) acrescido de 10% de SFB. O meio de cultura foi utilizado sem a adição de antibióticos e sem a adição extra de glutamina. O tempo máximo de estocagem do meio antes do uso foi de 2 semanas à 4°C.

Os cultivos celulares e as análises descritas a seguir foram realizados no Agrupamento de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) de São Paulo, sob orientação da Dra. Elizabeth de Fátima Pires Augusto.

### ***16.1. Descrição dos Ensaios***

Foram realizados ensaios de cultura celular em suspensão, em frasco de cultivo magnético, com volume útil de 500 mL (*spinner*, Bellco, Vineland, USA). Para tanto, utilizou-se volumes de 300 a 500 mL de meio de cultura/frasco, com agitação constante de aproximadamente, 150 rpm. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata à 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e de 95% de umidade. As concentrações celulares iniciais nos frascos de cultivos variaram de 1 a 2x10<sup>5</sup> células/mL.

A concentração celular necessária para o cultivo em frasco *spinner* foi obtida através de repiques sucessivos da cultura em frascos T25, originada de uma única ampola do banco de trabalho. Amostras foram retiradas em intervalos regulares de cultivo para determinação da concentração e da viabilidade celular, do consumo de glicose, da produção de lactato e amônio e da concentração de anticorpos secretados.

As determinações da concentração e viabilidade celular foram feitas no momento da amostragem. O número de células vivas foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer e apresentado como o valor médio de 4 contagens. A medida da viabilidade foi obtida simultaneamente, pelo método de exclusão do azul de Trypan a 0,4%.

Para as demais análises, as amostras foram centrifugadas (1800 x g, 4°C por 10 minutos), e os sobrenadantes foram armazenados a -20°C até o momento do uso. As determinações das concentrações de glicose e ácido láctico foram realizadas através de

cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) (Waters, Morristown, NJ) em amostras desproteinizadas por precipitação com ácido tricloroacético (TCA, Merck, EUA). Para a determinação de glicose 10 µL da amostra foram injetados no cromatógrafo, à temperatura de 72°C. Para a determinação de ácido láctico injetou-se 20 µL da amostra no cromatógrafo, à temperatura de 55°C. As curvas de calibração da glicose e do lactato foram preparadas na faixa de 0,1 a 3 g/L de glicose (Merck, Brasil) e lactato (Merck, Brasil), respectivamente, em água Milli Q.

Para a dosagem de amônia utilizou-se um eletrodo específico que detecta variações de mili voltagem quando da conversão de amônio em amônia. Amostras de 1 a 5 mL foram suavemente agitadas, com agitador magnético, o eletrodo foi inserido levemente inclinado (20°) no recipiente, 10 µL de uma solução 10 M de NaOH (Merck, Brasil) foi adicionado até que o multivoltímetro (modelo AS 720, Procyon, EUA) atingisse o valor mínimo. A curva de calibração foi preparada em concentrações na faixa de 1 a 100 mg/L.

## **17. Análise Estatística**

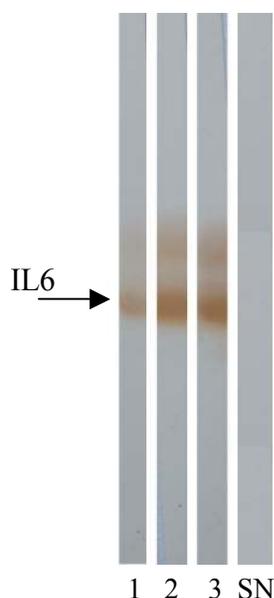
Para determinar se as variações são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), foi usado o teste t de “Student”. Os resultados foram apresentados utilizando-se o Software GraphPad Prism.

#### **IV. RESULTADOS**

## 1. Imunização de camundongos

A imunização dos camundongos BALB/c com três doses de 50µg de IL6 humana recombinante resultou na produção de anticorpos anti-IL6, em títulos que variaram entre 400 e 800, medidos por ELISA indireto, empregando-se a IL6 humana recombinante como antígeno. A reatividade dos soros imunes para a IL6 humana recombinante foi confirmada por *Western Blotting* (Figura 2).

Com base nesses resultados, todos os animais imunizados foram sacrificados após a terceira dose intraperitoneal do antígeno (desafio pré-fusão), para a remoção dos baços e obtenção das células esplênicas, que foram reunidas em *pool* e criopreservadas para uso posterior nos ensaios de fusão.



**Figura 2. *Western Blot* dos soros dos camundongos imunizados.** A IL6 foi empregada na concentração de 2µg/canal. Após a transferência eletroforética da citocina, a membrana de nitrocelulose foi incubada com o soro dos camundongos imunizados (Animal 1, 2 e 3), na diluição 1/100 e com soro normal (SN) como controle negativo.

## 2. Obtenção dos hibridomas anti-IL6

Células do mieloma SP2 Ag14/10 ( $3 \times 10^7$  células) e células esplênicas ( $1 \times 10^8$  células) de camundongo BALB/c imunizados previamente com IL6 humana recombinante foram utilizadas em dois experimentos de fusão celular, seguindo-se o protocolo desenvolvido por FASEKAS DE ST. GROTH & SCHEIDGGER (1980).

Aproximadamente 10 dias após cada experimento de fusão, verificou-se crescimento celular em 100% dos poços das placas de cultura, que apresentavam de 1 a 10 clones/poço sobrevivendo ao processo seletivo em meio HAT. Assim, nas duas fusões realizadas, foram obtidos um total de 442 clones de hibridomas. Os sobrenadantes das culturas foram testados para a presença de anticorpos anti-IL6, através de testes de ELISA nos quais empregou-se 5 µg/mL de IL6 humana recombinante como antígeno. Apenas um sobrenadante de cultura em cada uma das fusões realizadas continha anticorpos capazes de detectar a rhIL6 por ELISA indireto. Tendo em vista que os sobrenadantes reativos eram provenientes de poços de cultura nos quais havia 10 clones de hibridomas em crescimento, a taxa de positividade para o antígeno de interesse em cada fusão foi de 0,5% a 5%. As culturas positivas foram chamadas de 3B1 e 1A6, respectivamente, em função da posição que ocupavam nas placas de fusão.

Para a obtenção de clones isolados das culturas 3B1 e 1A6, utilizou-se a técnica de diluição limitante, lançando-se em placas de 96 poços 1 ou 2 células/poço. Após cerca de 15 dias, a clonagem das células coletadas do poço 1A6 resultou na obtenção de 14 culturas contendo um único clone positivo para IL6 e a da cultura 3B1 resultou em 15 poços contendo um clone secretor de anti-IL6 (Tabela 1).

Todos os clones obtidos foram expandidos, passando inicialmente por placas de 24 poços e subseqüentemente para frascos de cultura T25 e depois T75. A manutenção da capacidade de secretar o anticorpo de interesse foi acompanhada por ELISA indireto a cada passagem. Os 29 clones foram adequadamente criopreservados. Os sobrenadantes obtidos durante a expansão dos clones foram utilizados para determinação dos isotipos das imunoglobulinas secretadas, através de kit comercialmente disponível. Todos os clones obtidos das duas culturas originais secretam anticorpos anti-IL6 do isotipo IgG1 kappa.

Para a expansão, foram escolhidos aleatoriamente 4 clones de cada cultura original 1A6 e 3B1, constituindo-se um banco de estoque (5 a 6 ampolas) e um de trabalho (15 ampolas). Os clones selecionados foram denominados: 1A6F10, 1A6E12, 1A6C7, 1A6B12 e 3B1E4, 3B1H5, 3B1G7, 3B1D2, conforme a posição que ocupavam na placa de clonagem.

**Tabela 1. Híbridomas anti-IL6 obtidos após dois experimentos de fusão celular.**

<b>Fusão celular</b>	<b>Positividade após fusão</b>	<b>Grupos de híbridomas (clones)</b>	<b>Isotipos dos clones</b>
<b>I</b>	1 a 10/316	3B1  (A4, B8, C8, C10, D2, D8, D10, D11, E1, E4, F6, F9, G7, H5 e H9)	IgG1 <i>kappa</i>
<b>II</b>	1 a 10/126	1A6  (A2, A7, A9, B1, B2, B12, C1, C4, C7, C8, E12, F7, F10 e G5)	IgG1 <i>kappa</i>

Grupos de híbridomas, secretores de anticorpos monoclonais anti-IL6, obtidos após a fusão do mieloma SP2/0 com linfócitos do baço dos camundongos imunizados. Os híbridomas foram obtidos após clonagem por diluição limitante e selecionados através de ensaio imunoenzimático do tipo ELISA indireto, utilizando-se como controle positivo o soro dos camundongos imunizados e o soro normal como controle negativo.

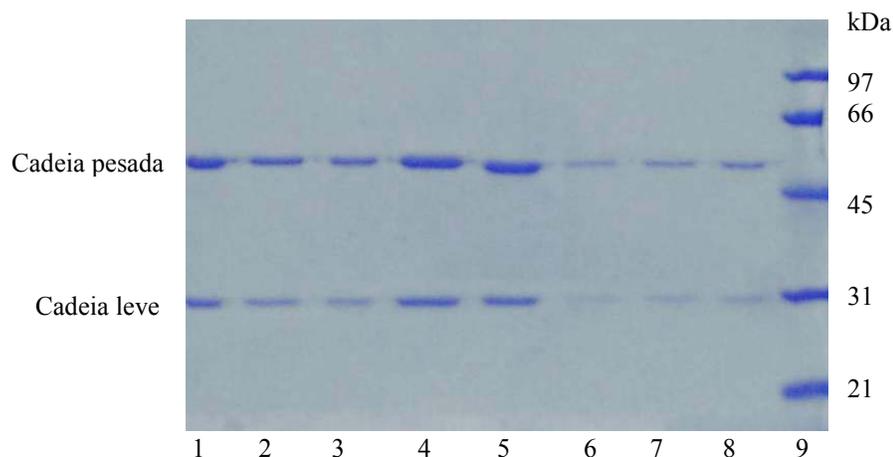
### **3. Produção dos ascites e purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade.**

Os hibridomas secretores de AcMos anti-IL6 (1A6F10, 1A6C7, 1A6E12, 1A6B12 e 3B1E4, 3B1H5, 3B1G7, 3B1D2) foram crescidos em cultura e inoculados na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL/camundongo BALB/c, para produção do líquido ascítico. Os títulos dos anticorpos presentes nos líquidos ascíticos variaram entre 51.200 e 204.800, dependendo do clone estudado.

Os anticorpos nos líquidos ascíticos foram purificados através de cromatografia de afinidade em Sepharose Proteína-G, resultando em preparações contendo anticorpos anti-IL6 em concentrações protéicas que variaram entre 0,4 e 1,3 mg/mL. O título de anticorpos obtidos após a purificação variou entre 6.400 e 25.600.

A homogeneidade das frações purificadas foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida e os resultados estão mostrados na Figura 3.

Parte dos anticorpos purificados foi conjugada com biotina e o título do conjugado, determinado por ELISA indireto, variou de 400 a 6.400.



**Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (sob condições desnaturantes) dos AcMos purificados em Sepharose proteína G. 1: 1A6F10, 2: 1A6E12, 3: 1A6C7, 4: 1A6B12, 5: 3B1E4, 6: 3B1H5, 7: 3B1G7, 8: 3B1D2 e 9: padrão de peso molecular (Low Molecular Weight - BioRad, contendo as proteínas: fosforilase 97,4 kDa, soro albumina 66 kDa, ovalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 31 kDa, inibidor de tripsina 21 kDa e lisozima 14,4 kDa). Coloração por Coomassie blue**

#### **4. Seqüenciamento do N-terminal dos anticorpos 1A6F10 e 3B1E4**

Os AcMos 1A6F10 e 3B1E4, purificados por afinidade, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições desnaturantes e, em seguida, eletrotransferidos para membrana de PVDF. Após a coloração das membranas com Coomassie blue, as tiras foram recortadas nas regiões correspondentes aos polipeptídios das cadeias leves e pesadas de cada AcMo, que foram diretamente submetidos ao seqüenciamento pelo método de Edman.

As cadeias leves dos dois anticorpos apresentaram a mesma seqüência de aminoácidos, enquanto que a análise das cadeias pesadas mostrou que esses monoclonais possuem seqüências distintas de aminoácidos em sua porção N-terminal, conforme observado na Tabela 2.

**Tabela 2. Seqüenciamento N-terminal dos anticorpos 1A6F10 e 3B1E4.**

<b>Cadeia leve</b>	<b>3B1E4</b>	Ciclos	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
		aa	<b>D</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>S</b>
		pmol	5,1	3,5	3,7	2,1	1,6	2,4	2,8	3,7	1,9	0,33
	<b>1A6F10</b>	Ciclos	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
		aa	<b>D</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>S</b>
		pmol	12,9	10,6	10,0	9,8	4,6	10,9	5,1	7,0	5,0	2,0
<b>Cadeia pesada</b>	<b>3B1E4</b>	Ciclos	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
		aa	<b>E</b>	<b>V</b>	<b>X</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
		pmol	3,0	3,4	ND	2,0	3,0	3,2	1,9	1,2	ND	ND
	<b>1A6F10</b>	Ciclos	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
		aa	<b>X</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>T</b>
		pmol	ND	10,0	8,0	7,0	5,0	5,0	2,0	8,0	4,0	1,0

O seqüenciamento dos aminoácidos (aa) foi realizado através do método de Edmann após separação eletroforética em condições desnaturantes dos AcMo e sua transferência para membrana PVDF. ND: não detectado; X: aminoácido não identificado.

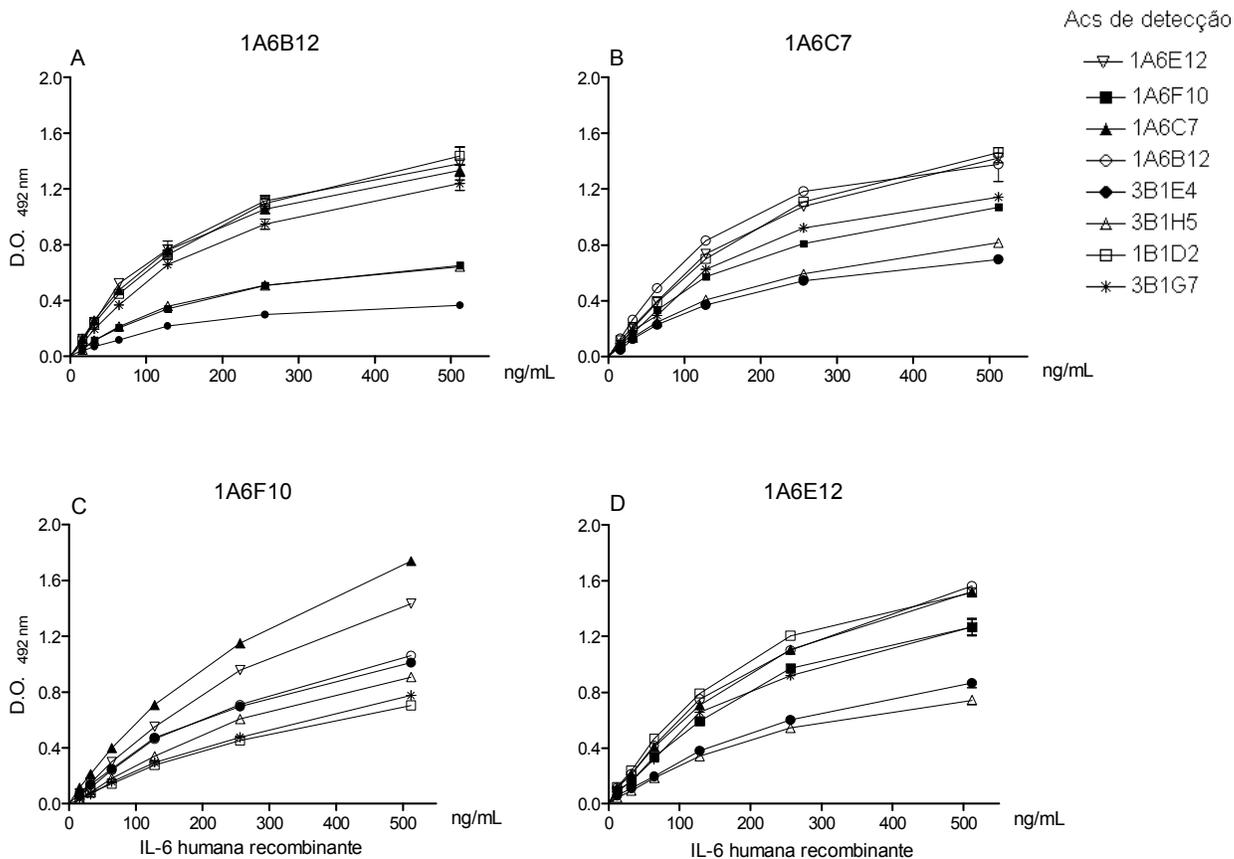
## 5. ELISA sanduíche para IL6

Para verificar a sensibilidade da interação dos anticorpos monoclonais anti-IL6 com a IL6 humana recombinante, foram realizados testes de ELISA de captura utilizando-se diferentes combinações dos anticorpos monoclonais purificados e biotinizados em

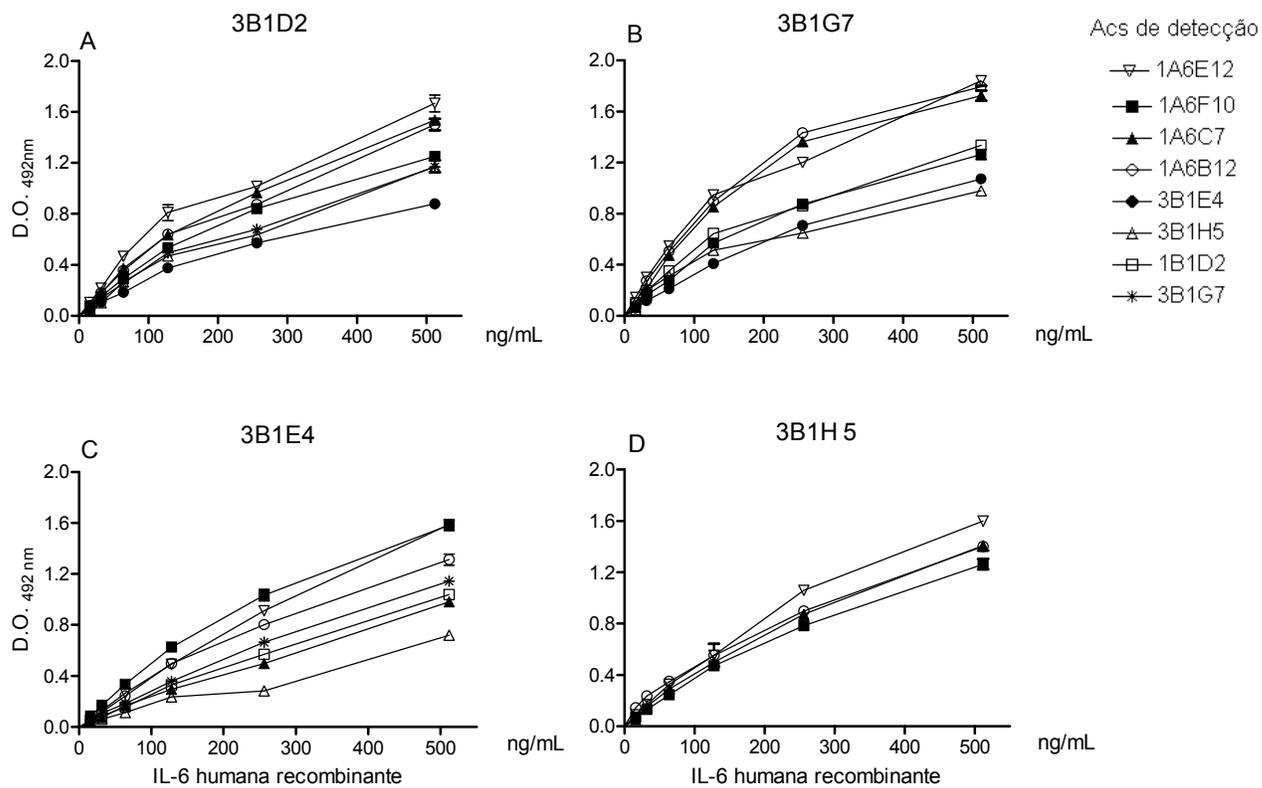
concentrações de 40 ou 80  $\mu\text{g/mL}$  para detectar a rhIL6 em concentrações entre 16 e 512  $\text{ng/mL}$ .

A Figura 4 resume os resultados obtidos quando os anticorpos de captura foram empregados na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$  e os anticorpos de detecção (anticorpos biotinilados) foram usados na concentração de 80  $\mu\text{g/mL}$ . A combinação 80  $\mu\text{g/mL}$  (captura) x 40  $\mu\text{g/mL}$  (detecção) apresentou resultados similares aos da Figura 4 (dados não mostrados).

Como é possível observar, os anticorpos do grupo 3B1 parecem ser mais adequados como anticorpos de captura e os do grupo 1A6 mais apropriados à detecção. Resultados similares aos apresentados na Figura 4 foram obtidos quando os clones do grupo 3B1 foram utilizados como anticorpos de captura (Figura 5).



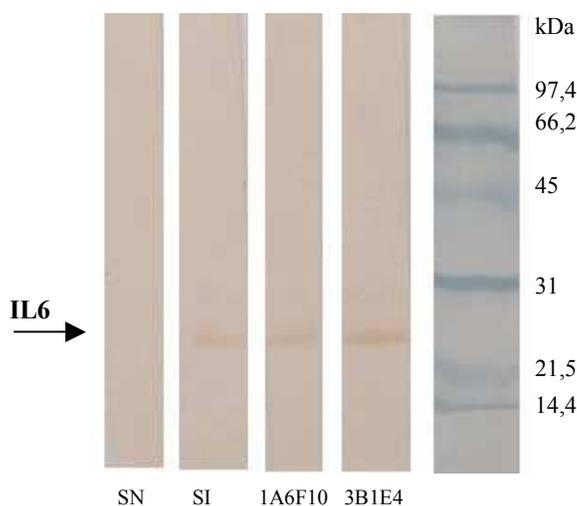
**Figura 4. Desempenho dos AcMos do grupo 1A6 em ELISA de captura para detecção de IL6 humana recombinante.** As placas foram sensibilizadas com 40  $\mu\text{g/mL}$  do AcMo anti-IL6 para a captura de concentrações crescentes da rhIL6 (16 a 512  $\text{ng/mL}$ ). Anticorpos monoclonais anti-IL6 conjugados com biotina foram empregados na concentração de 80  $\mu\text{g/mL}$  para a detecção da IL6 ligada. O conjugado streptoavidina-peroxidase foi empregado na concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Painel A: anticorpo de captura 1A6B12; painel B: anticorpo de captura 1A6C7; painel C: anticorpo de captura 1A6F10; painel D: anticorpo de captura 1A6E12.



**Figura 5. Desempenho dos AcMos do grupo 3B1 em ELISA de captura para detecção de IL6 humana recombinante.** As placas foram sensibilizadas com 40 µg/mL do AcMo anti-IL6 para a captura de concentrações crescentes da rhIL6 (16 a 512 ng/mL). Anticorpos monoclonais anti-IL6 conjugados com biotina foram empregados na concentração de 80 µg/mL para a detecção da IL6 ligada. O conjugado streptoavidina-peroxidase foi empregado na concentração de 2,5 µg/mL. Painel A: anticorpo de captura 3B1D2; painel B: anticorpo de captura 3B1G7; painel C: anticorpo de captura 3B1E4; painel D: anticorpo de captura 3B1H5.

## 6. Western blotting

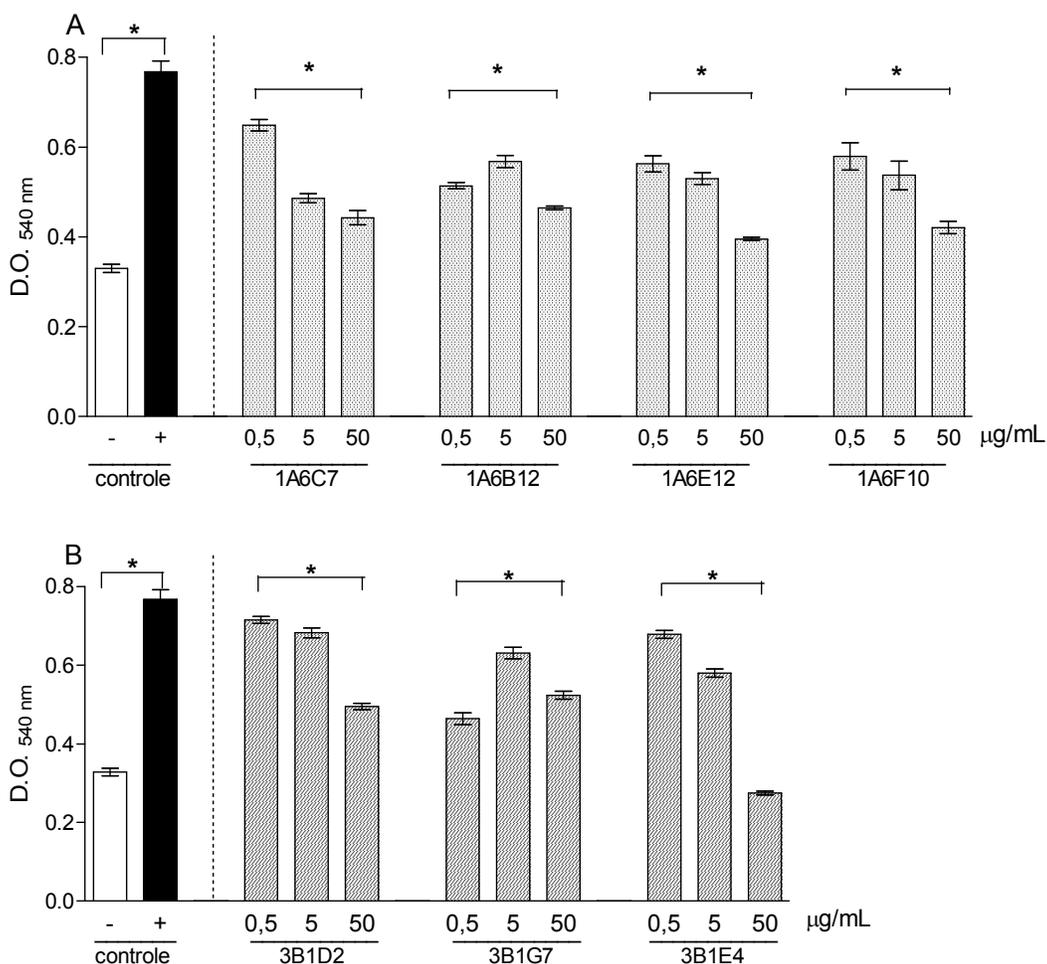
Os AcMos derivados dos hibridomas 1A6 (4 clones) e 3B1 (4 clones) foram empregados em ensaios de *Western blotting* para a detecção da rhIL6 em condições desnaturantes. Esses ensaios estão resumidos na Figura 6, que mostra os resultados obtidos com um representante de cada grupo de hibridoma estudado (1A6F10 e 3B1E4) e com o soro de camundongos imunizados com a citocina. Os blots mostram que os anticorpos poli e monoclonais detectam duas bandas protéicas na preparação da IL6 recombinante, entre 21 e 28 kDa, coincidentes com os pesos esperados das isoformas da IL6.



**Figura 6. Western Blotting dos AcMos anti-IL6.** Anticorpos monoclonais anti-IL6 purificados (1A6F10 e 3B1E4) foram empregados na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$  para a detecção da hrIL6 (2 $\mu\text{g/canal}$ ), após sua separação eletroforética em condições desnaturantes e transferência para membrana de nitrocelulose. O soro imune (SI) foi empregado como controle positivo e o soro normal (SN) de camundongo como controle negativo, ambos na diluição 1/50. Como marcador foi utilizado padrão de baixo peso molecular (LMW - BioRad). O peso molecular da IL6 varia entre 21 e 28 kDa.

## 7. Neutralização de IL6

A célula B9, dependente de IL6 para seu crescimento, foi utilizada em ensaios biológicos para verificar a capacidade neutralizante dos anticorpos monoclonais anti-IL6 obtidos no presente trabalho. Concentrações de 0,5; 5 e 50  $\mu\text{g/mL}$  dos AcMos foram utilizadas nos ensaios de neutralização da rhIL6, empregada na concentração de 50  $\text{pg/mL}$  na cultura das células B9 ( $5 \times 10^4$  células B9/poço). Os controles foram cultivados na presença (controle positivo) ou ausência (controle negativo) de IL6 humana recombinante. Todos os clones estudados apresentaram capacidade de bloquear a atividade da citocina em cultura, mesmo quando empregados nas concentrações de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . As diferenças foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle positivo (Figura 7).



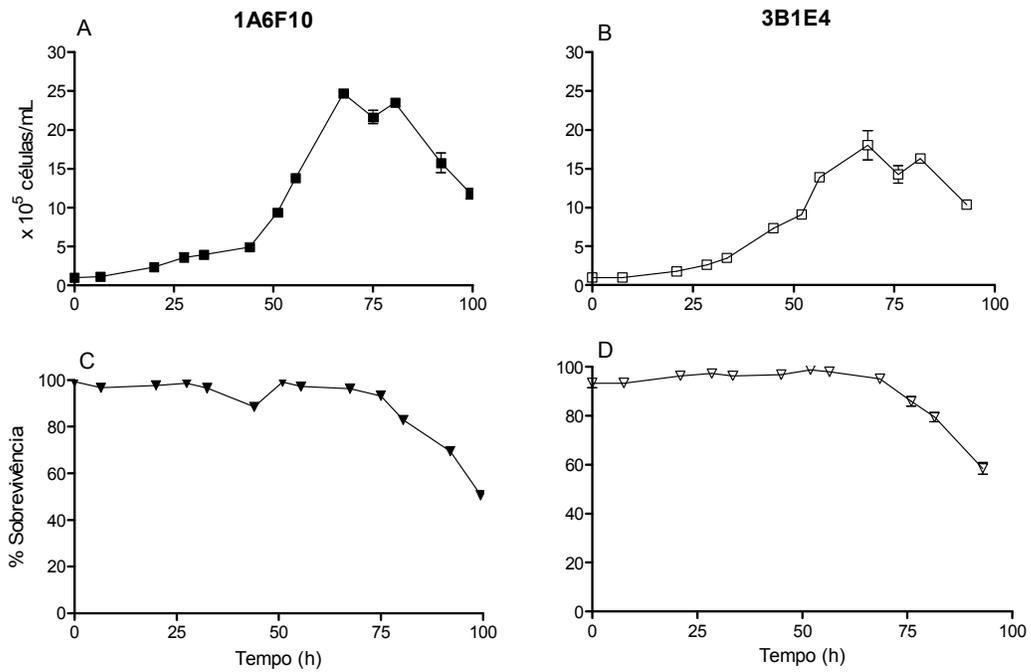
**Figura 7. Ensaios de Neutralização da IL6.** A linhagem celular dependente de IL6 (B13.29; B9) foi cultivada durante 72h, na presença de 50 pg/mL da IL6hr. As células foram cultivadas na presença de 0,5, 5 e 50 µg/mL dos AcMos do grupo 1A6 (Painel A) ou dos AcMos do grupo 3B1 (Painel B). Os asteriscos (\*) indicam valores de  $p < 0,05$  em relação ao controle positivo (+) no teste t de Student. Como controle negativo (-) foram empregadas células crescidas na ausência da citocina e dos anticorpos. Os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes.

## 8. Cinéticas de crescimento, produção de AcMo e metabolismo dos hibridomas 1A6F10 e 3B1E4

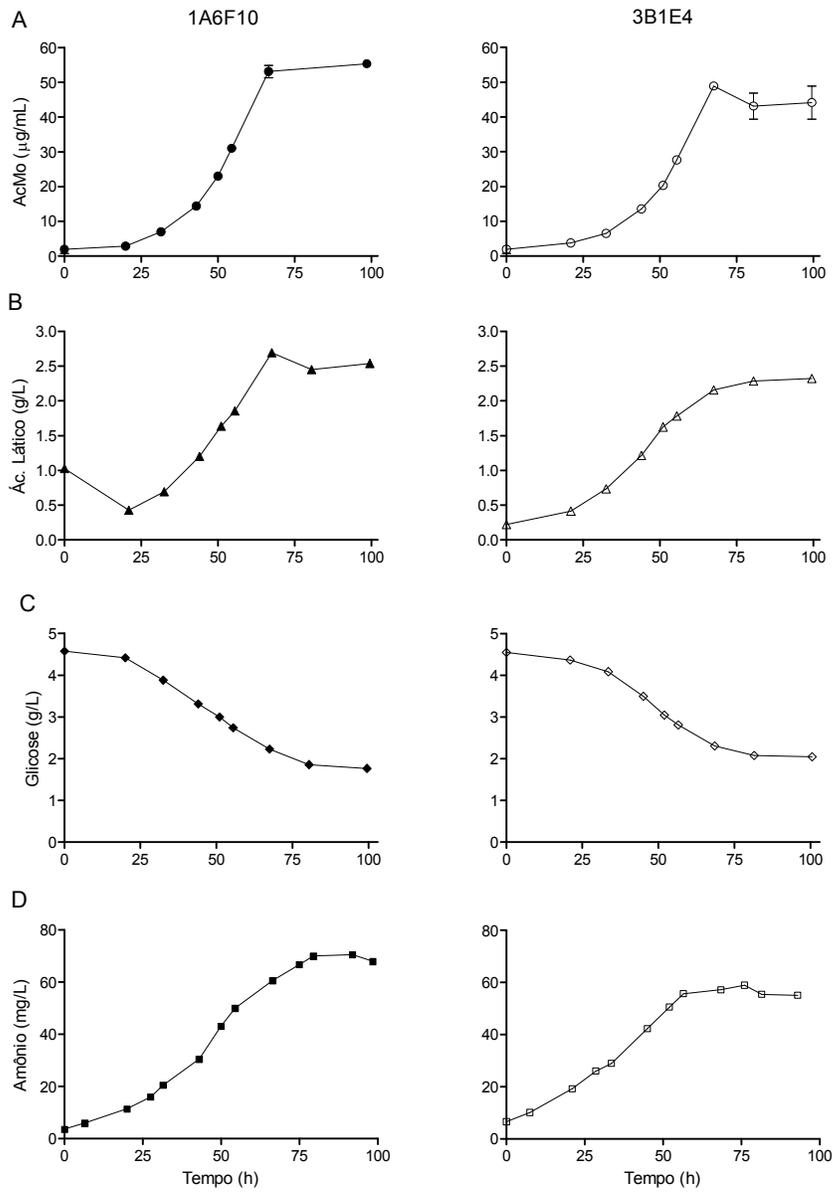
Foram realizados três ensaios para análise do comportamento dos hibridomas 1A6F10 e 3B1E4 em cultura sob agitação, conduzidos em frascos tipo *spinner*. O cultivo dos hibridomas foi iniciado em frascos T 25 até a obtenção da densidade necessária de células para inoculação em frascos *spinner* ( $5 \times 10^7$  células totais). Amostras foram coletadas para determinar o número de células na cultura, sua viabilidade, as concentrações de anticorpos, consumo de glicose e a produção dos metabólitos lactato e amônio. A Figura 8 ilustra os resultados obtidos em um dos três ensaios de cultivo representativo dos demais.

Os hibridomas 1A6F10 e 3B1E4 apresentaram cinéticas de crescimento similares, tendo atingido em aproximadamente 75h a concentração celular máxima de  $2,8 \times 10^6$  células/mL e  $2 \times 10^6$  células/mL, respectivamente (Figura 8). A viabilidade celular se manteve na faixa de 90% durante as primeiras 70 horas de cultivo, decaindo após este período. O tempo médio de duplicação celular dos dois hibridomas foi de 16 h (Figura 8, painéis C e D). Ao término da fase exponencial de crescimento, a concentração de anticorpo monoclonal nas culturas se manteve ao redor de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 9, painel A).

Após 75h de cultivo dos hibridomas 3B1E4 e 1A6F10, a concentração de glicose no meio era de cerca de 2,0 g/L (Figura 9, painel C) e a concentração de lactato de 2,2 e 2,5 g/L, respectivamente (Figura 9, painel B). O acúmulo de amônio no meio de cultura também acompanhou o crescimento celular e ao final da fase exponencial atingiu valores ao redor de 55 a 70 mg/L para os dois hibridomas (Figura 9, painel D).



**Figura 8. Cinética de crescimento dos hibridomas 1A6F10 e 3B1E4 em frasco *spinner*.** A concentração celular durante o cultivo dos hibridomas foi determinada por contagem em hemocitômetro (painéis A e B). A viabilidade celular foi determinada através da exclusão pelo azul de Trypan (painéis C e D).



**Figura 9. Geração de metabólitos e de anticorpos durante o cultivo dos hibridomas 1A6F10 e 3B1E4 em frascos *spinner*. Concentração de AcMo, painel A; Produção de lactato, painel B; consumo de glicose, painel C e produção de amônio, painel D.**

## **V. DISCUSSÃO**

A técnica de hibridomas através da qual se produz quantidades virtualmente ilimitadas de moléculas de anticorpo de especificidade pré-definida revolucionou a Imunologia e exerce grande influência na pesquisa básica e na clínica médica. O uso do AcMo como ferramenta permitiu detectar e quantificar fatores biologicamente ativos em patologias humanas, importantes tanto para a definição de prognóstico quanto para a orientação do tratamento de pacientes (PARNES, 1989; ARAI et al., 1990).

Dentre os diversos fatores biológicos envolvidos na diferenciação, ativação e multiplicação celulares, as citocinas têm um papel de destaque. As alterações dos níveis fisiológicos de produção dessas moléculas geralmente se correlacionam com o desenvolvimento de patologias. A IL6 desempenha papel central nos mecanismos de defesa do hospedeiro, na regulação da resposta imunológica, nas reações inflamatórias, na hematopoese, além de ser fator de diferenciação de linfócitos B e ativador de células T, entre outras (HIRANO, 1990). Devido a sua correlação com inúmeros eventos imunológicos a detecção e quantificação da IL6 são de grande interesse no diagnóstico e prognóstico de certas patologias, bem como o bloqueio da citocina tem se mostrado importante ferramenta terapêutica (TRIKHA, 2003).

Vários anticorpos monoclonais murinos anti-IL6 humana estão disponíveis comercialmente para uso na pesquisa e no diagnóstico clínico. Anticorpos murinos anti-IL6 humana foram empregados no tratamento de pacientes, principalmente nas décadas de 1980-90. Porém, o desencadeamento de respostas imunes contra o anticorpo de origem murina impossibilita o seu uso em humanos em terapias de médio ou longo prazos (BROCHIER, 1995). Para superar essas dificuldades, um anticorpo humanizado anti-IL6 humana foi produzido e vem sendo empregado, com sucesso parcial, no tratamento de

pacientes portadores de mieloma múltiplo em ensaios clínicos de fase I (VAN ZAAANEN et al., 1996; VAN ZAAANEN et al., 1998).

Devido ao grande interesse por um reagente específico anti-IL6, que fosse produzido e eventualmente comercializado no país, hibridomas secretores de anticorpos monoclonais anti-IL6 foram produzidos no presente trabalho e analisados quanto às suas propriedades ligantes à IL6 recombinante humana e IL6 nativa murina, para uso posterior em ensaios imunoenzimáticos de captura e de neutralização da citocina. Dois desses hibridomas foram estudados quanto ao seu comportamento em cultura.

A obtenção de hibridomas secretores de um anticorpo de interesse está estritamente relacionada com a eficiência do método de imunização utilizado para promover o aparecimento de linfócitos B, que secretem o anticorpo de interesse (KÖHLER, 1978). A imunização de camundongos com citocinas requer um cuidado adicional, tendo em vista que muitas delas apresentam-se bastante conservadas em toda a escala filogenética, exibindo graus de homologia bastante significativos. Este é o caso da IL6 humana e murina, que no nível do DNA apresentam 65% de homologia e 42% no nível das proteínas (SEHGAL *et al.*, 1986). Desta forma, embora os títulos dos soros obtidos nesse trabalho possam ser considerados baixos, indicam que o processo de imunização com a IL6 humana resultou na expansão de alguns clones de linfócitos B capazes de detectar as discretas diferenças presentes na molécula humana, comparando-se com a praticamente inexistência de reatividade dos soros pré-ímmunes, os quais foram negativos para IL6 humana recombinante mesmo em diluições tão baixas como 1:10, conforme os resultados obtidos através de ensaios de ELISA indireto.

O reduzido número de clones secretores de anticorpos anti-IL6 obtidos após os dois experimentos de fusão realizados no presente trabalho (apenas uma cultura positiva em

cada fusão, contendo 10 clones em um total de 442, representando de 0,5% à 5% de positividade) mostram que, de fato, a imunização dos camundongos com a IL6 recombinante humana resultou na expansão de poucos clones de linfócitos B específicos para a citocina.

Todos os clones anti-IL6 obtidos secretam anticorpos do isotipo IgG1 *kappa*, um resultado provavelmente influenciado pelo *background* genético do camundongo BALB/c e pelo hidróxido de alumínio, adjuvante empregado no esquema de imunização que direciona a resposta imune para o fenótipo Th2. Entretanto, os dois grupos de anticorpos obtidos nas duas fusões – 3B1 e 1A6 - diferem um do outro na seqüência primária de aminoácidos das suas cadeias pesadas, o que permitiu a análise da reatividade dos diferentes clones contra a IL6 em ensaios imunoenzimáticos.

Para a realização dos ensaios de ELISA de captura os AcMos anti-IL6 foram purificados e biotinizados. Uma acentuada redução dos títulos desses anticorpos pode ser observada após a sua purificação e pode ser atribuída às drásticas condições de eluição das proteínas (em pH 2,8). Além disso, é conhecido que células de mieloma e hibridomas secretam IL6 como fator de crescimento autócrino (KAWANO *et al.*, 1989). Assim, os anticorpos anti-IL6 secretados podem ser bloqueados pela citocina produzida na cultura ou liberada durante o crescimento do hibridoma como tumor ascítico. A conjugação dos anticorpos com a biotina implica em procedimentos prévios de concentração e diálise. Embora não sejam procedimentos dramáticos, também pode levar à redução da atividade biológica da proteína conjugada.

Nos ensaios de ELISA, os monoclonais de captura foram empregados na concentração de 40 µg/mL e os anticorpos biotinizados de detecção foram usados na

concentração de 80 µg/mL. Esses ensaios mostraram-se eficazes para a detecção da citocina recombinante em concentrações que variaram entre 8 e 512 ng/mL (Figura 4). Tendo em vista que as concentrações de IL6 em fluidos biológicos atingem valores situados na faixa de pg/mL (VAN ZAAZEN *et al.*, 1996), o ensaio ideal deveria ser capaz de detectá-la nesses níveis. Entretanto, em situações tais como no choque séptico, a IL6 pode alcançar concentrações de até 2 mg/L de sangue (GARDLUND, 1995; WAAGE, 1989), sendo então facilmente detectável por um ensaio como o mostrado no presente trabalho. Entretanto, há perspectivas de melhora da sensibilidade do teste imunoenzimático com esses anticorpos, otimizando-se as técnicas empregadas para purificação e conjugação dos anticorpos. Ensaio de ELISA visando otimizar a detecção da IL6 em fluidos biológicos, empregando-se anticorpos policlonais anti-IL6 humana para captura e os monoclonais obtidos no presente trabalho para a detecção, estão sendo conduzidos em nosso laboratório.

Os anticorpos monoclonais anti-IL6 obtidos também foram capazes de detectar a IL6 recombinante em condições desnaturantes em ensaios de *western blot*, indicando a estabilidade do(s) epitopo(s) por ele(s) reconhecido(s). Os AcMos anti-IL6 também se mostraram capazes de detectar a IL6 humana nativa presente no soro de pacientes com quadros inflamatórios, tais como o mixoma cardíaco e mielomas, bem como em culturas de macrófagos peritoneais murinos, estimulados com LPS e/ou IFN (dados não mostrados). Esses resultados nos levaram a investigar a capacidade neutralizante desses anticorpos em ensaios de cultura de células B9, uma linhagem celular dependente de IL6 para crescimento e multiplicação (BATAILLE, 1989). A linhagem B9 tem se mostrado um bom modelo para a verificação da capacidade neutralizante de anticorpos anti-IL6, assim como para estimar os níveis de IL6 e sua atividade biológica em diversas preparações. Todos os AcMos anti-

IL6 testados neste trabalho foram eficazes em neutralizar a atividade da citocina, empregada nos ensaios em concentrações que variaram de 0,5 a 50 µg/mL, condizendo com resultados relatados na literatura (KLEIN *et al.*, 1991; HINSON, 1996). Esses resultados apontam no sentido da eventual utilização terapêutica dos anticorpos anti-IL6 ora obtidos.

Anticorpos monoclonais anti-IL6 têm sido estudados quanto a sua adequação ao tratamento de diversas patologias humanas nas quais os níveis de IL6 estão aumentados e se correlacionam com o quadro da doença. Inicialmente, anticorpos monoclonais murinos anti-IL6 foram aplicados diretamente em pacientes portadores de mieloma múltiplo, em estágio avançado dessa doença. O sucesso desses tratamentos foi apenas parcial, além de induzir respostas imunes indesejáveis nos pacientes contra as imunoglobulinas murinas (*HAMA* - Human Anti-Mouse Antibodies). Respostas imunes adversas podem ser evitadas pelo uso de anticorpos monoclonais humanizados, através das técnicas de DNA recombinante. Desde a aprovação do primeiro anticorpo monoclonal humanizado para uso terapêutico, cerca de quatorze novos anticorpos recombinantes surgiram no mercado, constituindo uma classe de medicamento promissora para a indústria farmacêutica (HUDSON & SOURIAU, 2003). Um único anticorpo monoclonal anti-IL6 humanizado foi produzido pela Centocor (Leiden, The Netherlands) e vem sendo testado, sem muito sucesso, em pacientes portadores de mieloma múltiplo (VAN ZAAANEN *et al.*, 1998). Um anticorpo monoclonal humanizado anti-receptor da IL6 também foi testado em pacientes com a doença de Castleman (NISHIMOTO, 2000), artrite reumatóide (CHOY *et al.*, 2002) e artrite idiopática juvenil sistêmica (YOKOTA *et al.*, 2005), mostrando-se eficaz e seguro no tratamento dessas patologias, reduzindo significativamente os níveis das proteínas inflamatórias como a Proteína C-Reativa, com melhora geral do quadro clínico. Até o

momento, o conjunto de resultados obtidos indica que os hibridomas secretores dos anticorpos monoclonais anti-IL6 produzidos neste trabalho podem se prestar ao isolamento de genes de imunoglobulina, para a futura clonagem e a humanização de anticorpos reativos para a citocina.

Um dos grandes problemas enfrentados pela indústria no preparo de reagentes ou fármacos baseados em anticorpos monoclonais é o escalonamento da sua produção, *in vivo* ou *in vitro*. Anticorpos monoclonais podem ser produzidos por hibridomas crescidos como tumores ascíticos no peritônio de animais histocompatíveis. O emprego dos anticorpos obtidos de ascites é geralmente restrito à pesquisa ou ao diagnóstico clínico que, dependendo do ensaio, demandam uma pequena massa de anticorpo. A utilização dos monoclonais como agentes terapêuticos ou aqueles cuja demanda é alta são preferencialmente preparados a partir do cultivo *in vitro* dos respectivos hibridomas. Entretanto, até se chegar a escalonar o cultivo celular para grandes volumes, é necessário conhecer as diversas características de crescimento, de consumo de nutrientes e geração de metabólitos inibidores produzidos durante o cultivo do hibridoma.

Um estudo piloto do comportamento *in vitro* dos hibridomas 3B1E4 e 1A6F10 revelou que as duas células apresentam características similares de crescimento, isto é, concentração máxima atingida em 75 h, viabilidade igual ou maior que 90% até as 70 h de cultivo, tempo médio de duplicação de 16 h e cerca de 50 µg/mL de anticorpo secretado. O consumo de nutrientes e geração de metabólitos também se mostrou similar nessas duas linhagens celulares. O lactato, produto do metabolismo da glicose, alcançou seus valores máximos (2,2 a 2,5 g/L, respectivamente) por volta das 70 h de cultivo. O amônio, produto da degradação de proteínas/aminoácidos, particularmente da glutamina, também atingiu

valores máximos (55-70 mg/mL) ao redor das 70 h de cultivo. Esses níveis de lactato e de amônio representam valores compatíveis com a manutenção do crescimento e da viabilidade celular (NAYVE, 1991), de modo que a queda de viabilidade que se observa a partir de 70-75 horas de cultivo deve ser devida a outros fatores ainda não determinados, mas provavelmente relacionados à redução de algum dos nutrientes mais importantes (FITZPATRICK *et al.*, 1993). Essas características se assemelham às de outros hibridomas produzidos em nosso laboratório (LÉO *et al.*, 2000 e CHANG *et al.*, 2004) e parecem se correlacionar com as características de crescimento do próprio mieloma empregado na fusão (SCHULMAN *et al.*, 1978).

Visando prosseguir o estudo desses anticorpos anti-IL6, um representante de cada grupo de hibridomas obtidos foi cedido para a equipe de Células Animais do Agrupamento de Biotecnologia do IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas) de São Paulo, coordenado pela Dra. Elisabeth de Fátima P Augusto, que aprofundará o conhecimento dos seus requisitos de crescimento e viabilizará a produção dos anticorpos *in vitro*. As mesmas células também foram cedidas para o grupo de pesquisas liderado pelo Dr. Stephen Poole, do National Institute for Biological Standards and Control – NIBSC, South Mimms, Hertfordshire, UK, que avaliará o potencial dos anticorpos anti-IL6 produzidos em ensaios de ELISA de captura, empregando um painel de outros monoclonais específicos para a IL6 humana, lá disponível.

## **VI. CONCLUSÕES**

- Os experimentos de fusão celular para a geração de hibridomas resultaram na obtenção de dois grupos distintos de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais anti-IL6, conforme mostrado pela seqüência primária das cadeias pesadas das Igs.
- Os anticorpos monoclonais anti-IL6 produzidos neste trabalho são capazes de reconhecer epítipo(s) da IL6 humana e murina em ensaios do tipo ELISA e *Western blotting*, indicando o seu possível aproveitamento em ensaios de detecção da citocina em fluídos biológicos.
- Em ensaios de cultivo de célula B9 na presença da IL6 a adição dos anticorpos monoclonais resultou na neutralização da citocina, indicando uma importante capacidade desses anticorpos para eventual uso terapêutico.
- Em ensaios de cultivo em frascos do tipo *spinner* os hibridomas do grupo 1A6 e 3B1 apresentaram a mesma cinética de crescimento, atingindo a concentração celular máxima em 75h de cultivo e produção de anticorpos ao redor de 50µg/mL, consumo de nutrientes e geração de metabólitos com o lactato atingindo concentração inibitória (2,8g/L) de crescimento após 75h de cultura.

## **VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med*; 25:556–66, 1999.
- Alkan S S. Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nature Reviews Immunology* , 4:153-156, 2004.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Méd*, 29:1303–1310, 2001.
- Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Review of Biochemistry* 59:783-836,1990.
- Bailey JE, Ollis DF *Biochemical/ Engineering Fundamentals*. New York: McGraw Hill, 753p, 1977.
- Bataille R, Jourdan M, Zhang X, Klein B. Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *Journal of Clinical Investigation* 84: 2008-2011, 1989.
- Bevilacqua MP Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.*, 1: 767-804, 1993.
- Bierer BE, Sleckman BP, Ratnofsky SE, Bukaroff SJ The biologic roles of CD2, CD4 and CD8 in T-cell activation. *Annual Review of Immunology* 7:579-600, 1989.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254, 1976.
- Brochier J, Legouffe E, Liautard J, Gaillard JP, Mao LQ, Bataille R, Rossi JF, Klein B Immunomodulating IL6 activity by murine monoclonal antibodies. *Int J. Immunopharmacol.* 17(1):41-8, 1995.
- Butler M. Process with animal cell and tissue cultures. In REHM, H.J., REED, G., *Biotechnology*. Germany, VCH, 1988.
- Cabilly S, Riggs A D, Pande H, Shively J E, Holmes W E, Rey M, Perry L J, Wetzel R, Heyneker H L. Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 81(11):3273, 1984.
- Carrington PA, Hill RJ, Stenberg PE, Levin J, Corash L, Schreurs J, Baker G, Levin FC Multiple *in vivo* effects of interleukin-3 and interleukin-6 on murine megakaryocytopoiesis. *Blood* 77(1):34-41, 1991.

- Casey L, Balk R, Bone R. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*; 119:771–778, 1993.
- Cheung WC, Van Ness B. Distinct IL6 signal transduction leads to growth arrest and death in B cells or growth promotion and cell survival in myeloma cells. *Leukemia* 16(6):1182-8, 2002.
- Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Hazleman B, Price R, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T, Panayi GS. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum.*46(12):3143, 2002.
- Davies DR, Padlan EA Antibody-antigen complexes. *Annual Review of Biochemistry* 59: 439-473, 1990.
- Dessain S.C., Adekar S.P., Stevens J.B., Carpenter K.A., Skorski M.L., Barnoski B.L., Goldsby R.A., Weinberg R.A. High efficiency creation of human monoclonal antibody-producing hybridomas *Journal of Immunological Methods* 291:109-122, 2004.
- Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR Isolation of pure IgG, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein-A Sepharose. *Immunochemistry* 15: 429-436, 1978.
- Fasekas De St.Groth S, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategies and tactics. *Journal of Immunological Methods*, 35:1-21, 1980.
- Fitzpatrick L, Jenkins HA, Butler M Glucose and glutamine metabolism of a murine B-Lymphocyte hybridoma grown in batch culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 43: 93-116, 1993.
- Gardlund B, Sjolin J, Nilsson A, Roll M, Wickerts C, Wretlind B Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity *Journal Infec. Dis.* 172: 296-301, 1995.
- Glacken MW Catabolic control of mammalian cell culture. *Bio/Technology*, 6: 1041-1050, 1988.
- Harigae M, Matsumura M, Kataoka H Kinetic study on HBs-Mab production in continuous cultivation. *J Biotech*, 34(3): 227-235, 1994.
- Heggeness MH, Ash JF Use of the avidin-biotin complex for the localization of actin and myosin with fluorescence microscopy. *Journal of Cell Biology* 73: 783-788, 1977.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem Journal* 15(374):1-20, 2003.

- Helle M, Boeije L, Aarden LA Functional discrimination between interleukin 6 and interleukin-1. *European Journal Immunology*, 18(10):1535-40, 1988.
- Hinson RM, Williams JA, Shacter E Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E<sub>2</sub> in a urine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 4885-4890, 1996.
- Hirano T, Akita S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunology Today* 11:443-449, 1990.
- Hirano T Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16(3-4):249-84, 1998.
- Hodgkin PD, Bond MW, O'Garra A, Frank G, Lee F, Coffman RL, Zlotnik A, Howard M. Identification of IL6 as a T cell-derived factor that enhances the proliferative response of thymocytes to IL-4 and phorbol myristate acetate. *Journal of Immunology* 141(1):151-7, 1988.
- Hudson P J, Souriau C Engineered Antibodies. *Nature Medicine* 9(1): 129-134, 2003.
- Kawano M, Kuramoto A, Hirano T, Kishimoto T Cytokines as autocrine growth factors in malignancies. *Cancer Surv* 8(4):905-19, 1989.
- Kida H, Yoshida M, Hoshino S, Inoue K, Yano Y, Yanagita M, Kumagai T, Osaki T, Tachibana I, Saeki Y, Kawase I Protective effect of IL6 on alveolar epithelial cell death induced by hydrogen peroxide. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 288, 2005.
- Kishimoto T, Taga T, Yamasaki K, Matsuda T, Tang B, Muraguchi A, Horii Y, Suematsu S, Hirata Y, Yawata H. Normal and abnormal regulation of human B cell differentiation by a new cytokine, BSF2/IL6. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 254: 135-143, 1989.
- Klein B, Tarte K, Jourdan M, Mathouk K, Moreaux J, Jourdan E, Legouffe E, De Vos J, Rossi JF Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *Int Journal Hematology* 78(2):106-113, 2003.
- Klein B, Wijdenes J, Zhang X, Jourdan M, Boiron J, Brochier J, Liautard J, Merlin M, Clement C, Fournier B, Lu Z, Mannoni P, Sany J, Bataille R Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. *Blood*, 78 (5):1198-1204, 1991.
- Köhler G, Milstein C Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Köhler G, Shulman MJ Cellular and molecular restrictions of the lymphocyte fusion, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 81: 143-148, 1978.

- Kromenaker SJ, Srienc F Effect of lactic acid on the kinetics of growth and antibody production in a murine hybridoma: secretion patterns during the cell cycle. *J. Biotechnology*, 34: 13-34, 1994.
- Laemmli U K Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680–685, 1970.
- Lanks KW, Li PW End products of glucose and glutamine metabolism by cultured cells. *J. Cell Physiol.*, 135: 151, 1988.
- Lee CY Estratégias para otimização da produção de anticorpo monoclonal anti-TNP (trinitrofenil) em sistema de biorreator agitado: fortificação do meio e processo descontínuo alimentado. 2003 p.190. Dissertação de Mestrado, USP/IPT. São Paulo.
- Leo P, Ucelli P, Augusto EFP, Oliveira MS, Tamashiro WMSC Anti-TNP monoclonal antibodies as reagents for enzyme immunoassay (ELISA). *Hybridoma* 19(6): 473-479, 2000.
- Miceli MC, Parnes JR The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology* 53:59-122, 1993.
- Milstein C Monoclonal antibodies-cells that secrete antibodies can be made immortal by fusing them with tumour cells and cloning the hybrids. Each clone is a long-term source of substantial quantities of a single highly specific antibody. *Scientific American*, 233: 56-64, 1980.
- Moellering BJ, Tedesco JL, Townsend RR, Hardy MR, Scott RW, Prior CP Electrophoretic differences in a Mab expressed in three media. *BioPharmaceutical*, 3: 30-8, 1990.
- Monica TJ, Goochee CF, Maiorella BL Comparative biochemical characterization of a human IgM produced in both ascites and *in vitro* cell culture. *Biotechnology*, 11: 512-15, 1993.
- Moro AM, Rodrigues MTA, Gouvea MN, Silvestri MLZ., Kalil JE Raw I Multiparametric analyses of hybridoma growth on glass cylinders in a packed-bed bioreactor system with internal aeration. Serum-supplemented and serum-free media comparison for MAb production. *J Immunol Methods*. 176(1): 67-77, 1994.
- Nayve FRJr, Motoki M, Matsumura M, Kataoka H Selective removal of ammonia from animal cell culture broth *Cytotechnology*. 6(2):121-130, 1991.
- Nishimoto N, Sasai M, Shima Y, Nakagawa M, Matsumoto T, Shirai T, Kishimoto And Yoshizaki K Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood*. 95(1):56-61, 2000.
- Parnes JR Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Advances in Immunology*, 44:265-311, 1989.

- Patel NSA, Chatterjee PK, Di Paola R, Mazzon E, Britti D, Sarro A, Cuzzocrea S, Thiernemann C Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction and inflammation caused by Ischemia/Reperfusion. *J. Pharmacology and Exp Therapeutics* 312(3): 1170-1178, 2005.
- Patel TP, Parekh RB, Moellerlng BJ, Prior CP Different culture methods lead to differences in glycosilation of a murine IgG monoclonal antibody. *Biochem. J.*, 285: 839-45, 1992
- Powrie F, Maloy KJ Immunology. Regulating the regulators. *Science* 299(5609):1033-6, 2003.
- Ray A, Laforge KS, Sehgal PB On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Molecular Cellular Biology* 10: 5736-46, 1990.
- Rothstein TL, Vastola AP Homologous monoclonal antibodies induce idiotope-specific suppression in neonates through maternal influence and in adults exposed during fetal and neonatal life. *J Immunol.* 133(3):1151-4, 1984.
- Scheller J, Kovaleva M, Rabe B, Eicher J, Kallen KJ, Rose John S Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoasorbent assay for the binding of gp130 to the IL6/IL6R complex and its competitive inhibition *Journal of Immunological methods* 291: 93-100, 2004.
- Schulman M, Wilde CD, Köhler G A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276:269-270, 1978.
- Scott DE, Gause WC, Finkelman FD, Steinberg AD Anti-CD3 antibody induces rapid expression of cytokine genes *in vivo*. *Journal of Immunology*, 145(7): 2183-2188, 1990.
- Sehgal PB, Zilberstein A, Ruggieri RM, May LT, Ferguson-Smith A, Slate DL, Revel M, Ruddle FH Human chromosome 7 carries the  $\beta_2$  interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:5219-5222, 1986.
- Stieß R, Krüger B Mammalian cell culture media – Overview and application. The source – the latest technical and product news from sigma cell culture, vol 9, p 1-8, 1993.
- Sun L, Liu X., Qiu L, Wang J, Liu M, Fu D, Luo Q Administration of plasmid DNA expressing human interleukin-6 significantly improves thrombocytopoiesis in irradiated mice. *Annual Hematology* 80(10):567-72, 2001.
- Sweep F, Rijnkels C, Hermus A Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by cytokines. *Acta Endocrinol (Copenh)* 125(1):84-91, 1991.

- Te Velde AA, Huijbens RJF, Heije K, De Vries JE, Figdor CG Interleukin-4 inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL6 by human monocytes. *Blood* 76(7): 1392-1397, 1990.
- Thijs LG, Hack CE Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive Care Med*; 21:S258–S263, 1995.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad Sci* 76(9): 4350-4354, 1979.
- Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: A review of the rationale and clinical evidence. *Clinical Cancer Research* 9:4653-4665, 2003
- Tsurushita N, Park M, Pakabunto K, Ong K, Avdalovic A, Fu H, Jia A, Vasquez M, Kumar S Humanization of a chicken anti-IL-12 monoclonal antibody. *Journal of Immunological Methods*. 295(1-2):9-19, 2004.
- Tsurushita N, Vasquez M Humanization of monoclonal antibodies. *Molecular Biology of B cells*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, p. 533, 2004.
- Van Zaanen HCT, Koopmans RP, Aarden LA, Rensink HJAM, Stouthard JML, Warnaar SO, Lokhorst HM, Van Oers MHJ Endogenous interleukin 6 production in multiple myeloma patients treated with chimeric monoclonal anti-IL6 antibodies indicates the existence of a positive feed-back loop. *Journal of Clinical Investigation*, 98(6):1441-1448, 1996.
- Van Zaanen HCT, Lokhorst HM, Aarden LA, Rensink HJAM, Warnaar SO, Van Der Lelie J, Van Oers MHJ Chimeric anti-interleukin-6 monoclonal antibodies in the treatment of advanced multiple myeloma: a phase I dose-escalating study. *British Journal of Haematology* 102: 783-790, 1998.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bull. *World Health Organ*. 53:55-65, 1976.
- Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock: association between interleukin-6, interleukin-1, and fatal outcome, *J. Exp. Med.*, 169: 333-338, 1989.
- Walia B, Wang L, Merlin D, Sitaraman SV TGF-beta down-regulates IL6 signaling in intestinal epithelial cells: Critical role of SMAD-2. *FASEB J*. Sep 18, 2003.
- Wilder RB, Denardo GL, Denardo S Radioimmunotherapy: recent results and future directions. *J Clin Oncol* 14:1383-1400, 1996.

- Yang M, Butler M Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production and glycosylation. *Biotchnology. Bioeng.* 68(4): 370-380, 2000.
- Yokota S, Myamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T. Therapeutic Efficacy of humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with Systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 52(3): 818-825, 2005.
- Zola H Introduction. In: Zola, H. (ed) *Monoclonal Antibodies: The Second Generation*. Oxford: BIOS *Scientific Publ*, 1995.

## **ANEXOS**

- 1. Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal**
- 2. Meios e soluções especiais utilizadas na fusão celular**



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

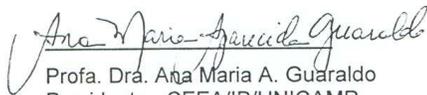
Certificamos que o Protocolo nº 674-2, sobre "OBTENÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE HIBRIDOMAS PRODUTORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-IL6 HUMANA" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro / Lóren Semionatto Scuro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 03 de Junho de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 674-2, entitled "PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RECOMBINANT HUMAN IL6", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on June 3, 2004.

Campinas, 10 de agosto de 2005.

2ª. VIA

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

  
Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

## MEIOS E SOLUÇÕES ESPECIAIS UTILIZADAS NA FUSÃO CELULAR

### 1. Solução estoque de 8-azaguanina (100x)

Dissolver 125mg de 8-azaguanina em 10 mL de NaOH 0,1M, sob agitação. Acrescentar 40 mL de água, ajustar o pH para 8,5 – 8,8 com ácido acético 1N. Completar o volume para 100 mL. Esterilizar por filtração. Congelar alíquotas a -20°C. (Ao descongelar, dissolver a 70-80°C, sob agitação).

### 2. Solução estoque de Aminopterin (100x)

Dissolver 1,5 mg de aminopterin em cerca de 5 mL de água. Acrescentar NaOH 1 N até a completa dissolução ( $\pm$  2mL). Acrescentar 10 mL de água e ajustar o pH para 7,5-7,8 com ácido acético 1 N. Completar o volume para 50 mL com água. Esterilizar por filtração. Congelar alíquotas a -20°C. (Ao descongelar, dissolver a 70-80°C, sob agitação).

### 3. Solução estoque de HT (100x)

Timidina .....	30 mg
Hipoxantina .....	136 mg
Água pura (qsp) .....	100 mL

Dissolver em banho-maria (37°C). Preparar alíquotas. Esterilizar em autoclave. Estocar a -20°C.

#### 4. Meio de cultura enriquecido

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Chemica).....	10,4 g
Bicarbonato de Sódio (Sigma).....	2,0 g
Arginina .....	0,2 g
Ácido fólico.....	0,012 g
Asparagina .....	0,036 g
HEPES (Sigma).....	2,97 g
2-Mercaptoetanol (Sigma).....	2,0 µL
Gentamicina (Sigma) 50 mg/ml.....	100 µL
Água pura (qsp).....	1.000 mL

Após a dissolução dos constituintes, a mistura foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore), e mantida a 4<sup>0</sup> C.

#### 5. Meio HAT

Soro Fetal Bovino (HyClone).....	15 mL
Solução de Hipoxantina-Timidina (100x) .....	1,0 mL
Solução de Aminopterina (100x) .....	1,0 mL
Meio de cultura enriquecido (qsp) .....	100 mL

Esterilizar por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore), e manter a 4<sup>0</sup> C.

## 6. Salina Fasekas

Cloreto de Sódio .....	8 g
Cloreto de Potássio .....	0,4 g
Fosfato monobásico de Sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) ..	3,58 g
Fosfato bibásico de Sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) .....	0,67 g
Glicose .....	2,0 g
Vermelho de Fenol .....	0,01 g
Ajustar o pH para .....	7,2
Água pura (qsp) .....	1.000 mL

Autoclavar por 20 min/120<sup>0</sup>C. Estocar a 4<sup>0</sup>C.