

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS<sup>1</sup>

FLÁVIO ROCHA<sup>2</sup>, KEILA MARIA RONCATO DUARTE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 26/07/11. Aceito para publicação em 02/12/11.

<sup>2</sup>Laboratório de Química Ambiental, Departamento de Ciências Exatas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo (USP), Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Centro de Nutrição Animal e Pastagem (CNAP), Instituto de Zootecnia (IZ), Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), Rua Heitor Pentead, 56, Centro, Caixa postal 60, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil.

**RESUMO:** Desde a criação das primeiras células capazes de manter a produção contínua de anticorpos, por Köhler e Milstein em 1975, já despontava seu potencial uso na medicina e na indústria. Novas pesquisas foram então desenvolvidas na finalidade de potencializar o uso destas células, incluindo: imunização, células de mieloma, metodologia de fusão, técnicas de triagem, isolamento celular, meios de cultura, e tantos outros detalhes quanto fossem necessários para maximizar e ampliar o uso desta tecnologia. Hoje, os anticorpos monoclonais são ferramentas bem estabelecidas para investigação proteômica e com enorme aplicação em diversas áreas, principalmente no diagnóstico de enfermidades, veterinárias e/ou humanas e na identificação e rastreamento de compostos alergênicos em alimentos e resíduos das mais diversas fontes no ambiente. Esta revisão pode ser de interesse para profissionais, pesquisadores e estudantes, por se tratar de uma compilação de alguns trabalhos que contribuíram para o aperfeiçoamento da tecnologia de anticorpos monoclonais, hoje utilizada em diferentes áreas do conhecimento, como diagnóstico de doenças humanas, doenças e desordens em toda cadeia do agronegócio.

Palavras-chave: antígeno-anticorpo, imunoenaios, soro.

### **MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCTION TECHNOLOGY**

**ABSTRACT:** Since the first cells were capable of maintain a continuous antibody supply, developed by Köhler and Milstein in 1975, its use in medicine and industry showed a great potential. New researches were developed to enhance the use of such cells, including immunizations, mieloma cells, fusion methodology, screening techniques, cloning, culture media, among several details which enable and optimizes its use. Nowadays, monoclonal antibodies are a well-established tool for proteomics research and it have countless applications on several knowledge areas, mainly human and/or animal disease diagnostic, identification and tracking of allergenic compounds in food and residues in the environment. This review can be used by professionals, researches and students searching for a compiled papers contributing to the improvement of the monoclonal antibodies technology, used at different knowledge areas such as human diseases and diseases and disorders in agriculture and livestock chain.

Key words: antigen- antibodies, immunoassays, serum.

### **INTRODUÇÃO**

Desde que Edward Jenner (1798) provou ser possível imunizar uma pessoa com injeções de patógenos atenuados, confirmado em 1870 por Louis Pasteur e Robert Koch (<http://webpages.fc.ul.pt/~mcgomes/>

[vacinacao/historia/index.html](http://webpages.fc.ul.pt/~mcgomes/vacinacao/historia/index.html) - Manuel Carmo Gomes), os imunoenaios tem sido aprimorados e seu desenvolvimento chegou ao ápice com o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais, por KOLHER e MILSTEIN em 1975. Desde então, a produção de anticorpos monoclonais tem sido aplicada para fins

de diagnóstico de doenças humanas e animais, identificação de moléculas, identificação viral, autenticidade e veracidade de organismos geneticamente modificados, entre outros. Nesta revisão, a técnica de produção será desenvolvida passo a passo, com a finalidade de elucidar de forma simples, o avanço desta tecnologia tão revolucionária.

## PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

### Imunógeno

Um imunógeno é uma molécula capaz de excitar uma resposta imune quando injetada em um animal, este não pode ser confundido com antígeno, que é capaz de ligar-se ao anticorpo, mas não necessariamente estimular uma resposta imune. O imunógeno pode conter diferentes sítios de ligação onde o anticorpo pode se ligar, estes são chamados de epítomos ou determinantes antigênicos. As principais características do imunógeno relacionada à sua capacidade de estimular uma resposta imune são: o tamanho e natureza da molécula, o tempo de exposição às células do sistema imune, e ser reconhecido pelo hospedeiro como estranho. Os mais potentes imunógenos compreendem as proteínas e os polissacarídeos, porém lipídios, ácidos nucléicos, e polipeptídeos sintéticos também podem ser imunogênicos. Em geral apenas proteínas de massa molecular superior a 2000 Daltons são capazes de estimular uma resposta imune. No entanto, moléculas de menor massa molecular e não imunogênicas (haptenos) podem se tornar imunogênicas se conjugadas a carreadores, como albumina e hemocianina (LIDDEL, 2005).

O sistema imune da maioria dos mamíferos possui mais de  $10^{11}$  populações clonais de linfócitos, caracterizadas pela especificidade de seus receptores de antígeno. Os órgãos linfóides secundários (baço, linfonodos, tonsilas) constituem-se em sítios de produção de anticorpos por linfócitos B estimulados. Cada linfócito B produz anticorpos específicos para um único epítomo do antígeno, que pode ser menor que 5-6 aminoácidos (DUARTE, 2007).

### Adjuvante

O sistema imunológico de mamíferos e aves pode se comportar de maneira diferente e única frente aos diferentes tipos de adjuvantes. Os mesmos mecanismos que o organismo utiliza para proteção contra

infecções podem, em determinadas situações, causar doenças. Desta forma, o estudo individual de cada adjuvante a ser usado e a necessidade de se ter uma substância efetiva quanto ao antígeno deve ser realizada a priori de seu uso (RESENDE *et al.*, 2004).

Qualquer molécula que auxilie na resposta imune pode ser considerada adjuvante. O uso de adjuvante na resposta imune é modulada, geralmente pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e celular do tipo "helper", auxiliando na resposta a patógenos intracelulares, como vírus, bactérias e parasitas. Tal resposta não é observada para antígenos de peptídeos (GUPTA e SIBER, 1995).

Diversos autores tem proposto uma classificação para os tipos de adjuvantes (MOTA *et al.*, 2006), mas muitas destas classificações apresentam inúmeras desvantagens e uma das mais frequentes é a inclusão de um composto em mais de uma das categorias classificatórias. Os imunoadjuvantes representam numerosos compostos com larga variedade de conformação e que agem em diferentes mecanismos da célula e da resposta imune (AUDIBERT e LISE, 1993).

Dentre os compostos mais atuais que podem ser utilizados como adjuvantes, estão hidróxido de Alumínio, Avridine (amido lipídico sintético), Algamulin (composto por gama inulina [b-D-(2@1) polifrucofuranosil- $\mu$ -D-glicose linear, como partículas na configuração polimórfica gama, em geral composta de 50 a 75 subunidades e uma pequena porção de hidróxido de alumínio, suspensos em NaCl 0,8% e conservados com nitrato fenilmercúrico), a b-Glucana (microcápsula de carboidrato altamente purificada, composta por duas cadeias laterais de glicose (b 1,3/ b 1,6) ligadas à cadeia de glicose principal. É extraída principalmente a partir de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*) e o SEPPIC-I E SEPPIC-II, que são formulações adjuvantes novas, não oleosas, produzidas pela empresa SEPPIC (Paris, França) cujas formulações são consideradas segredos industriais (RESENDE *et al.*, 2004).

Para uso animal, ainda se utilizam muito os adjuvantes de Freund (completo e incompleto) agindo pela liberação lenta do antígeno no ponto de administração e também estimulando a formação de granuloma rico em macrófagos e outras células imunocompetentes; o Adjuvante bacteriológico, contendo *Bordetella pertussis* e dipeptídeos muramil, que parecem estimular diretamente os macrófagos; os

Adjuvantes anfipáticos e surfactantes, tal como saponinas e lipossomos. Sendo este último usado particularmente para administração de compostos tóxicos (LIDDEL, 2005). Há indícios de que o uso de adjuvantes também pode influenciar na classe do anticorpo produzida (GODING, 1986).

É comum o uso de igual volume de antígeno, em solução aquosa, e adjuvante. Também é indicado o uso de emulsão água-óleo, por apresentar melhores resultados, quando 2 à 4 volumes de óleo são usados para cada volume do imunógeno em solução aquosa (GODING, 1986). Em relação ao conforto animal, deve-se ter cuidado na escolha do adjuvante, pois este pode causar estresse, inflamação e dor localizada (DUARTE, 2007).

Para regulamentar o uso e lançamento de novos adjuvantes, O *Comitee for Proprietary Medicinal Products* (CPMP) formulou um "Guia para Testes Pré-clínicos, Farmacêutico e Toxicológico de Vacinas", onde os principais requisitos para o desenvolvimento de novas vacinas são abordados. No caso dos adjuvantes, são abordados a necessidade de demonstrar a compatibilidade com os antígenos, adsorção estável e eficaz para os antígenos desta categoria e, toxicidade dentro dos limites estabelecidos (CPMP, 1997). Além destes requisitos, cada modelo animal deve ser testado e seu perfil de segurança, levando em conta a combinação antígeno-adjuvante e via de administração escolhida avaliadas de forma prudente (CPMP, 1997).

## Animais

Para produção de anticorpos em escala comercial, muitos animais domésticos podem ser utilizados, em teoria qualquer mamífero ou ave pode ser utilizado para essa finalidade. No entanto, na prática, os coelhos são mais utilizados para produção de anticorpos policlonais e os camundongos para produção de anticorpos monoclonais. No caso das aves, estas são imunizadas e os anticorpos extraídos da gema de seu ovo, em particular a galinha tem sido utilizada com sucesso nesse processo. Em geral, o imunógeno é mais efetivo quando injetado em espécies filogeneticamente mais distantes de seu doador (DUARTE, 2007; LIDDEL, 2005).

O animal selecionado deve ser livre de patógenos, ser geneticamente selecionado. Geralmente se usa animais singênicos (a resposta imunológica pode

variar entre as linhagens) e devem ser mantidos em ambiente livre de situações estressantes (LINDBLAD, 1995).

Os animais podem ser mantidos individualmente, ou em grupos, porém, nesses casos deve-se evitar um tempo prolongado de cativeiro por facilitar a transmissão de patógenos. Quando mantidos em gaiolas coletivas recomenda-se que os machos sejam castrados (LEENARS *et al.*, 1999).

A idade do animal também pode interferir na resposta imunológica, sendo os animais jovens mais adequados para uma maior resposta (HANLY, 1995). Quanto ao sexo, as fêmeas são preferidas por apresentarem maior docilidade, facilidade de manejo, menor agressividade quando contidas em grupo, e resposta imunológica superior a dos machos (DUARTE, 2007).

## Imunização

O local de injeção pode ser responsável por uma lenta ou rápida liberação do antígeno, ou mesmo seu desaparecimento do organismo. Geralmente, injeções subcutâneas em múltiplos locais próximos aos linfonodos são preferíveis, por causar um mínimo desconforto ao animal. Outras rotas que podem ser utilizadas são por via intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, e a almofada da pata. Rotas intravenosas são normalmente utilizadas como um reforço (Booster) na proliferação dos linfócitos (LIDDEL, 2005), sendo comum o uso conjunto do adjuvante Freund incompleto, para prevenir uma possível reação de hipersensibilidade à bactéria. No entanto, questiona-se o uso de rotas intravenosas como booster final, pois o animal pode morrer por anafilaxia. Um booster final intraperitoneal demonstra ser mais seguro (GODING, 1986).

O momento das injeções é baseado no que se sabe sobre os níveis de anticorpos circulantes no soro em resposta a um estímulo imunológico. Após a primeira injeção, ocorre resposta imune primária onde anticorpos IgM são predominantemente produzidos, mas se uma segunda injeção é administrada, 3 à 4 semanas depois, ocorrerá a resposta imune secundária, onde o nível de IgM é superado pela alta produção de anticorpos IgG de maior afinidade pelo antígeno, chegando à um pico de produção 10 à 14 dias depois, seguido de um gradual declínio. Um reforço ("booster") final é geralmente administrado

como forma de garantir o pico de produção de anticorpos antes do sacrifício do animal (ABBAS, 2007, LIDDEL, 2005).

A dose ideal de antígeno pode variar dependendo de sua imunogenicidade. Doses mínimas são preferíveis na indução de uma resposta imune, pois doses altas podem inicialmente induzir uma forte resposta no animal e também produzir uma grande quantidade de anticorpos circulantes, mas estes apresentarão uma baixa afinidade pelo antígeno e podem até dar início a uma tolerância imune. Doses múltiplas de pequenas quantidades do antígeno mostram-se suficientemente adequadas para uma eficiente produção de anticorpos de alta afinidade (NAKASHIMA *et al.*, 1974). No entanto, às múltiplas injeções podem causar estresse ao animal, e uma alternativa à este método é a utilização de uma única injeção de antígeno junto de um adjuvante capaz de manter sua liberação por um longo período, como micropartículas, polímeros, lipossomos e partículas virais (AUCOUTURIER *et al.*, 2001). Uma resposta imune estimulada pela liberação do antígeno por um longo período, pode ser comparada à uma resposta imune secundária induzida pela mesma quantidade de antígeno, emulsificado em um forte adjuvante (PREIS; LANGERS, 1979).

Outra técnica de imunização é a baseada em DNA (imunização genética), este método permite criar anticorpos contra proteínas que não precisaram ser previamente purificadas para realização da imunização. A proteína é sintetizada *in vivo* em sua forma nativa, permitindo a produção de anticorpos de alta especificidade (BARRY *et al.* 1994). Estes vetores para expressão de DNA são normalmente administrados nos animais por bombardeamento de partículas intradermicamente, ou por injeções intramusculares (CHEN *et al.*, 2000; WOLFF *et al.*, 1990). Uma única injeção de DNA por rota intra-esplênica demonstra ser a forma mais eficiente para produção de anticorpos de alta especificidade, outras rotas também podem ser utilizadas e com resultados satisfatórios (BOHN *et al.*, 1996; KASINREK *et al.*, 2002).

Os anticorpos produzidos pela imunização genética são superiores em vários aspectos, primeiro devido a síntese *in vivo* do antígeno que gera anticorpos de alta especificidade, em segundo por que a técnica apresenta grande flexibilidade pois a estabilidade da molécula de DNA permite a inserção de vários genes, e em terceiro pelo alto rendimento. A aplicabilidade da imunização genética tem sido estendida também

para produção de anticorpos monoclonais (KILPATRICK *et al.*, 1998; NY *et al.*, 2004).

Outra técnica que se mostra promissora para produção anticorpos policlonais e principalmente monoclonais, baseia-se na inoculação de mais de um antígeno em um único camundongo durante a mesma imunização, sendo chamado de imunização multiplex (DE MASI *et al.*, 2005; LARSSON *et al.*, 2006).

Para produção de anticorpos monoclonais, a imunização multiplex minimiza o número de animais necessários e também o número de culturas de células para geração de hibridomas. DE MASI *et al.* (2005), imunizaram um único camundongo contra cinco diferentes antígenos, com isso, hibridomas secretores de anticorpos contra todos os cinco antígenos foram produzidos e isolados com sucesso, comprovando a eficiência da imunização multiplex. Outros oito camundongos foram imunizados contra dez antígenos cada, nesse caso, a produção de hibridomas apresentou uma eficiência de 83% (DE MASI *et al.*, 2005). Estes resultados mostram que, um número muito grande de antígenos injetados no mesmo camundongo pode levar a uma diminuição na variedade de hibridomas produzidos contra cada antígeno, indicando que a injeção de um número elevado de antígenos não se mostra adequada quando o principal objetivo é obter um amplo painel de anticorpos funcionais e capazes de reconhecer diferentes epítopos (CHIARELLA; FAZIO, 2008).

### Produção do hibridoma

Anticorpos policlonais são produtos de milhares de linfócitos B, cada um destes secretando um único tipo de anticorpo contra determinado epítipo do mesmo antígeno. O número elevado de sítios de ligação favorece o reconhecimento de outras moléculas que apresentem regiões semelhantes. Quando um único linfócito B é isolado e cultivado *in vitro*, obtém-se um produto homogêneo (monoclonal) de anticorpos contra apenas um único epítipo do antígeno. Este processo de produção de anticorpos monoclonais permite que, na imunização, o imunógeno não necessite ser tão purificado quanto o é necessário ser para produção de anticorpos policlonais (LIDDEL, 2005).

Os anticorpos monoclonais apresentam uma extrema especificidade ao antígeno, contudo, esta característica pode se tornar uma desvantagem quando, por qualquer razão, o epítipo contra o qual o anticorpo foi desenvolvido for alterado, o que aconte-

ce freqüentemente com os vírus e com os micro-organismos em situação de estresse (GUARTE, 2007).

O processo de produção de anticorpos monoclonais não é tão simples, visto que culturas de linfócitos B morrem com o tempo e com isso a fonte de anticorpos altamente específicos. Para resolver tal problema KÖHLER e MILSTEIN (1975), fusionaram células de mieloma, já conhecidas por sua infinita proliferação em meio de cultura, com linfócitos B, obtendo assim, células de infinita proliferação secretoras de anticorpos (hibridomas) (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). O isolamento de um único hibridoma produtor de anticorpo possibilitou, finalmente, o fornecimento contínuo de anticorpos monoclonais.

Na prática, as células mais utilizadas para fusão são de camundongo, em especial a linhagem BALB/c, mas qualquer célula animal pode ser utilizada, sendo que a fusão de células de espécies diferentes passa a ser chamada de heterohibridoma. No entanto, se a intenção é cultivar estas células em fluido ascítico, recomenda-se que a linhagem animal fornecedora de linfócitos B seja a mesma da célula de mieloma. A fonte mais comum de linfócitos para produção de hibridomas é o baço, mas linfonodos também podem ser utilizados. Um baço de camundongo contém aproximadamente  $10^8$  células, 50% destas sendo linfócitos B. Em geral, fusões bem sucedidas podem ser realizadas usando uma suspensão completa do baço sem qualquer pré-seleção de células B ou expressão de anticorpos específicos (LIDDEL, 2005).

### Célula de mieloma

Em 1959, foi descoberto experimentalmente que "irritantes" peritoneais podem causar o desenvolvimento de mielomas em camundongos BALB/c. Subseqüentemente foi achado que, óleo mineral ou pristane são potentes indutores de mieloma em camundongos, acarretando aproximadamente 40% dos camundongos BALB/c tratados (GODING, 1986).

Apesar de ser possível gerar experimentalmente células de mieloma em camundongos ou ratos, é muito difícil gerar células de mieloma que secretem anticorpos de especificidade pré-definida. Uma grande variedade de células adaptadas para sobreviver em meio de cultura e susceptíveis a fusão podem ser obtidas de grandes coleções internacionais (American Type Culture Collection e European Collection of Animal Cell Cultures). Há dois requisitos básicos para

que células de mieloma possam ser usadas na produção de hibridomas: primeiro, elas devem possuir uma deficiência enzimática que permita separar células fusionadas das não fusionadas; segundo, não secretar qualquer tipo de imunoglobulina (LIDDEL, 2005).

KÖHLER e MILSTEIN, em seu trabalho, utilizaram uma linhagem de célula de mieloma secretora de imunoglobulina. Contudo, deve-se considerar que uma linhagem não secretora de imunoglobulina possivelmente ainda não havia sido estabelecida nesta época (LIDDEL, 2005; KÖHLER; MILSTEIN, 1975).

A maioria das linhagens de células de mieloma são deficientes da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT), porém há outras linhagens que são deficientes da enzima timidina kinase (TK), ou ouabaína, que inibe a proliferação de linfócitos (LIDDEL, 2005).

A geração de células de mieloma HGPRT negativa é relativamente fácil devido à enzima ser codificada por um único cromossomo X ativo (GODING, 1986). O isolamento dessas células ocorre ao adicionar bases análogas tóxicas, 8-azaguanina ou 6-tioguanina, no meio de cultura, as células que possuem HGPRT irão incorporar essas bases ao DNA e morrerão sobrevivendo as células HGPRT negativa (ABBOTT; POVEY, 1995).

A geração de células TK negativa é um pouco mais difícil, visto que se trata de uma enzima de origem autossômica, portanto, exigindo duas raras mutações simultaneamente (GODING, 1986). A enzima timidina kinase permite a célula incorporar timidina do meio de cultura em seus nucleotídeos. Com isso, meios de cultura contendo a base análoga 5-bromodeoxiuridina (BrdU), permitirão a sobrevivência apenas das células TK negativa, por utilizarem uma rota alternativa de síntese de nucleotídeos (ABBOTT; POVEY, 1995).

Células de mieloma crescem muito bem em meio de cultura se certas características forem atendidas, como não estender o crescimento por longos períodos ou densidades maiores do que  $5 \times 10^6$  células por mL, para evitar um sobre crescimento, uma vez que em concentrações maiores, há uma sobreposição de células, dificultando o crescimento normal. Quando as células são colocadas sob estresse aumenta a probabilidade de mutações espontâneas ocorrerem. Para evitar problemas de mutações e contaminação, reco-

menda-se o congelamento de estoques de células de mieloma. Também é aconselhável adicionar periodicamente nas culturas de células de mieloma, 8-azaguanina ou 6-thioguanina, para eliminar qualquer reversão para HGRPT positivo (LIDDEL, 2005).

### Fusão

A metodologia de fusão pode ser realizada através do vírus Sendai, como feito por KÖHLER e MILSTEIN (1975), ou por altas concentrações de PEG (Polietileno Glicol) (ABBOTT; POVEY, 1995; KÖHLER ; MILSTEIN, 1975).

Apesar de agora o PEG ser universalmente empregado, existe uma grande variação nos protocolos em função de seu peso molecular. Em geral, PEG de menor peso molecular é mais tóxico. (ABBOTT; POVEY, 1995).

A produção de hibridomas mediada por PEG ocorre quando células de mieloma em fase de crescimento exponencial (log), e uma única suspensão celular de linfócitos do baço ou de linfonodos, são misturadas num tubo estéril, na proporção de  $10^7$ - $10^8$  mieloma:  $10^8$  esplenócitos e centrifugados. Ao sedimento adiciona-se o PEG (40-50%), lentamente por 1-2 min, seguido de uma diluição lenta em meio de cultura, e uma nova centrifugação e ressuspensão do sedimento em meio de cultura fresco. Nesta metodologia, o tempo é crucial para evitar o efeito tóxico do PEG sobre as células. A mistura de células resultante é distribuída numa placa de cultura de 96 poços e colocada para crescer em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (LIDDEL 2005), essencial para manutenção do pH já que participa do sistema tampão fosfato, presente no meio de cultura (GODING, 1986).

Atenção especial deve-se ter na concentração do PEG, pois abaixo de 30% formará poucos hibridomas, e acima de 50% o efeito passa a ser tóxico para as células (GODING, 1986).

A Fusão por meio de PEG não seleciona tipos celulares, pois, ele funde qualquer célula presente na mistura. Portanto, na mistura de células de mieloma e baço, pode ocorrer fusão na forma: mieloma/mieloma, baço/baço, mieloma/baço, e híbridos de mais de duas células. As fusões baço/baço, mieloma/mieloma, e as células não fusionadas não sobreviveram em meio de cultura HAT (ver adiante), apenas sobreviverão as fusões mieloma/baço (LIDDEL, 2005).

As células fusionadas inicialmente podem conter dois ou mais núcleos de diferentes tipos celulares (heterokarions). Estes heterokarions mostram ativa síntese de RNA em todo o núcleo e em muitos casos um simultâneo padrão de síntese de DNA é gradualmente estabelecido entre os núcleos. Após contínuas divisões celulares, um eixo nuclear pode ser formado e então cada célula resultante da próxima divisão passa a conter um único núcleo constituído de cromossomos de ambas as células fusionadas. No entanto, alguns cromossomos podem ser perdidos nas primeiras divisões. Foi observado que híbridos intraespecíficos (Ex: camundongo-camundongo) perdem cromossomos muito facilmente, e híbridos interespecíficos (Ex: camundongo-humano) cromossomos de apenas um dos pais é perdido (ABBOTT; POVEY,, 1995).

### Seleção dos Híbridomas

O mecanismo pela qual o meio HAT seleciona os híbridos se deve que a síntese de ácidos nucléicos pode seguir duas rotas: a *de novo* e a selvagem. Todas as células normais utilizam a rota *de novo*, mas se ela for bloqueada a célula passa a utilizar a rota selvagem. A rota selvagem para sintetizar purinas usa hipoxantina e guanina como substrato que são formados por ribose fosfato-inosínico e guanina ácido-ribose fosfato, respectivamente, com ajuda da enzima HGPRT. Similarmente, a rota selvagem para síntese de piridina usa o substrato deoxitimidina para formar timidina monofosfato usando a enzima timidina kinase (TK). Caso ambas as rotas forem bloqueadas, ocorrerá morte celular (LIDDEL, 2005).

HGPRT e TK são enzimas essenciais para síntese de DNA e RNA, a carência destas enzimas impede a sobrevivência das células de mieloma em meio HAT, meio de cultura no qual as células resultantes do processo de fusão são colocadas para crescer. O meio HAT é constituído de hipoxantina, aminopterina e timidina, de onde vem sua abreviação. A aminopterina inibe a enzima ácido fólico redutase e bloqueia totalmente a rota de biosíntese de nucleotídeos "*de novo*", na célula. Devido sua contínua divisão neste meio, as células são forçadas a utilizar a rota selvagem de síntese de nucleotídeos, que usa hipoxantina e timidina. Células normais podem crescer nesse meio, mas células TK negativa e HGPRT negativa não conseguem, e morrem (ABBOTT; POVEY, 1995). As células fusionadas são capazes de crescer nesse meio por suprirem sua carência enzimática pela fusão com os linfócitos B. Após cinco dias de crescimento em meio HAT, a mai-

oria das células originais morrem, as células sobreviventes são híbridos mieloma/baço. Sensibilidade natural à ouabain é uma propriedade de uso particular na seleção de heterohibridomas de origem humano/camundongo. Células humanas normalmente morrem na presença de ouabain  $10^7$  M, o que não acontece com as células de roedores. Dessa forma células humanas não fundidas podem ser excluídas (LIDDEL, 2005).

### Clonagem do hibridoma.

Com a identificação da cultura celular contendo o anticorpo desejado, cada célula dessa colônia precisará ser isolada por um método conhecido como "limite de diluição". Neste método a suspensão celular é diluída a níveis que aumentem a probabilidade de semear apenas uma única célula por poço, cada célula semeada irá se proliferar e formará colônias individuais (LIDDEL, 2005). Dessa forma, todas as células de uma mesma colônia serão clones, da célula semeada, e secretarão o mesmo anticorpo.

Nos estágios iniciais de formação da cultura, as células devem ser suplementadas por outras células ("feeder cells" - FC) que fornecem fatores (citocinas, adipócitos, antinflamas, entre outros) importantes para o crescimento dos clones, portanto, é ideal que estas sejam previamente preparadas (LIDDEL, 2005). No entanto, se as condições do meio de cultura estiverem ótimas, estas células podem fazer pouca diferença (GODING, 1986). As FC podem ser suspensões de tímócitos, macrófagos peritoniais ou esplenócitos (LIDDEL, 2005), estes não precisam ser necessariamente histocompatíveis com as células cultivadas (GODING, 1986). Dentro de duas semanas, a colônia terá crescido o suficiente e terá secretado anticorpos em nível adequado para os testes. Após os testes, as colônias que se mostrarem positivas e também "monoclonais" serão transferidas para poços maiores (placa de 24 poços), e após crescimento, novamente é realizado testes para definir qual das colônias secreta o anticorpo de maior especificidade (LIDDEL, 2005).

### Testes de Seleção do Anticorpo

Dentro de duas semanas após a fusão, as células híbridas irão crescer rapidamente (dobrando a cada 12 ou 24h) e as colônias crescerão o suficiente para serem transferidas para frascos maiores. Caso isto não seja feito, as células poderão se aglomerar e começarão a morrer. Relativamente poucas destas células serão produtoras do anticorpo desejado. Para identi-

ficar quais células são relevantes, testes de seleção de sobrenadante secretado pela cultura são necessários. Os testes de seleção devem ser realizados com o antígeno em sua forma original, na qual o anticorpo foi desenvolvido, a razão para isto é que o epítipo é composto por uma seqüência de aminoácidos, e esta seqüência é passiva de alterações por adição de aminoácidos ou por sobreposição de cadeias devido mudança conformacional. Se a conformação for alterada o epítipo pode ser destruído e o anticorpo não se ligará. Se o anticorpo é construído para o epítipo de uma proteína em sua forma nativa, ele pode não reagir com proteínas desnaturadas ou vice-versa (LIDDEL, 2005).

Devido ao rápido crescimento das culturas de hibridoma, os testes de seleção devem ficar prontos em 24 horas no máximo, e é ideal que sejam capazes de analisar várias amostras ao mesmo tempo. O método mais adequado para a seleção de anticorpos monoclonais, para a maioria dos critérios, é o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Centenas de amostras podem ser analisadas em poucas horas, reagentes e marcadores podem ser encontrados facilmente no mercado, e não requer muitos equipamentos (LIDDEL, 2005; CROWTHER, 2009).

Um fator a ser considerado durante os testes ELISA é a taxa de reação cruzada, ela é definida como reação do anticorpo contra um antígeno não presente durante a imunização, geralmente é uma manifestação de similaridades estruturais entre o imunógeno e outro antígeno de reação cruzada (GODING, 1986).

CERVINO *et al.* (2008), mostraram que para triagem de anticorpos monoclonais, desenvolvidos contra um antígeno conjugado com albumina, o ELISA indireto (CROWTHER, 2009) pode apresentar em torno de 50% de falsos positivos, caso a concentração de anticorpos no sobrenadante seja muito elevada. Já o ELISA direto (CROWTHER, 2009) mostra menos de 1% de falsos positivos, no entanto, a sensibilidade deste teste é baixa quando comparada ao ELISA indireto, podendo apresentar falsos negativos mesmo que mínimos. Portanto, eles descreveram em seu artigo um ELISA indireto modificado, que mostra-se mais apto aos testes (CERVINO, (2008).

### Armazenamento e propagação

Em vários estágios durante a produção de hibridomas é importante congelar as amostras de clones para prevenir qualquer infecção ou outros even-

tos que resulte em perda da linhagem celular (GODING, 1986). Quando uma linhagem celular é estabelecida recomenda-se passar essas culturas para pequenos frascos contendo aproximadamente  $10^7$  células para que possa ser congelada em freezer  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  ou em nitrogênio líquido. O meio de congelamento deve conter 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) ou equivalente para prevenir cristalização da água dentro das células. As células podem ser propagadas em grandes frascos para produzir um sobrenadante contendo uma maior concentração de anticorpos. No entanto, quanto maior o recipiente para produção de anticorpos mais caro se torna o processo devido a grande quantidade de soro necessário. Já existem meios de cultura que não utilizam soro, mas algumas linhagens de hibridoma não são capazes de crescer em meio totalmente isento (LIDDEL, 2005).

O soro é de particular importância por fornecer aos hibridomas transferrina (uma proteína transportadora de ferro), hormônios (insulina, tiroxina), e possíveis elementos como o selênio (GODING, 1986).

As vantagens de um meio livre de soro são: o custo, alta estabilidade, ausência de contaminação por vírus provenientes do soro, e imunoensaios com menor interferência protéica (NILSANG *et al.*, 2008; SOMMERFIELD; STUB, 2005). Visto isso, o soro tem sido substituído por algumas proteínas, e também já foram desenvolvidos meios que contêm componentes químicos definidos, sendo livre de qualquer proteína de origem animal, neste caso, uma única formulação de meio não é suficiente para todas as linhagens celulares, pois cada linhagem apresenta uma diferente exigência, portanto, a formulação deve ser adaptada para cada uma delas (LEFLOCH *et al.*, 2006; OZTURK; PALSSON, 1991).

Alguns subprodutos gerados pelo metabolismo celular, como a amônia e o lactato, apresentam um efeito cumulativo que pode chegar a níveis potencialmente tóxicos. A glicose, fonte de carbono e energia, e a glutamina, também fonte de energia, geram os subprodutos lactato e amônia, respectivamente (GAMBHIR *et al.*, 2003; AUSSEL, *et al.*, 1996). Por isso, recomenda-se manter estes dois componentes à níveis baixos, evitando assim seu consumo excessivo pela célula (LEE *et al.* 2003; LI *et al.* 2005). NILSANG *et al.* (2008) mostraram que substituir a glutamina por alfa-cetoglutarato, em meio livre ou contendo soro, pode aumentar a viabilidade e a densidade celular e também a taxa de produção de anticorpos pelo hibridoma.

No entanto, o acúmulo de amônia também se manteve elevado o que pode, em uma produção de larga escala, vir a ser uma preocupação. Outros autores apresentaram como forma de manter baixo o nível de amônia, uma substituição da glutamina por piruvato (GENGEL *et al.*, 2005), por glutamato e 2-oxoglutarato (HASSEL; BUTLER, 1990), ou usar um meio livre de glutamina (MCDERMOTT; BUTLER, 1993) e também melhorar o crescimento celular pela suplementação com tripeptídeo Gly-Lys-Gly em meio basal (FRANEK *et al.*, 2003).

Entre os diversos meios de propagação de hibridomas, para obtenção de alta concentração de anticorpos, o método mais fácil e barato consiste em injetar intraperitonealmente  $2 \times 10^6$  células em um camundongo histocompatível e que tenha sido pré-tratado com Pristane (0,5 mL intraperitonealmente, 10-60 dias antes da injeção celular), por esse método é possível obter um sobrenadante com uma concentração de anticorpos variando entre 5 à 10 mg mL<sup>-1</sup> (LIDDEL, 2005).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tecnologia dos anticorpos monoclonais se mostra ainda muito promissora, e as novas pesquisas querem torná-la o mais viável possível e acessível à todas as áreas, possibilitando o diagnóstico de múltiplas doenças. Alguns exemplos podem ser citados como na indústria farmacêutica, o uso de anticorpos monoclonais recombinantes possibilita a identificação de substâncias de interesse na flora e fauna (PUCCA *et al.*, 2011); na medicina veterinária, PENHA *et al.* (2010) tem utilizado anticorpos monoclonais para produção de anti-fragmentos Fc ovino, anticorpos muito utilizados nas análises de doenças e que até hoje são importados, onerando o custo das análises; na saúde pública. ALBAS *et al.* (2011) têm utilizado anticorpos monoclonais para mapear abrigos de morcegos e conseqüentemente, identificar variantes antigênicas para diagnóstico laboratorial da raiva em regiões do Estado de São Paulo. Muitos avanços já foram feitos no intuito de minimizar gastos, o uso de animais e o desconforto animal, tornando assim, uma metodologia passível de aceitação em cada vez mais laboratórios. Outras pesquisas vêm aumentando a sensibilidade dos testes baseados em anticorpo, assim como a confiança em seus resultados, tornando-o uma ferramenta de uso preferencial para diagnósticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 2. ed. Amsterdam: Saunders Elsevier, 2007. 267p.
- ABBOTT, C. ; POVEY, S. **Somatic Cell Hybrids : - The Basics**. IRL Press, 1995. p. 9-73.
- ALBAS, A. et al. Os morcegos e a raiva na região oeste do Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 201-205, 2011.
- AUCOUTURIER, J. ; DUPUIS, L. ; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 2666-2672, 2001.
- AUDIBERT, F. M. ; LISE, L. D. Adjuvants: Current Status, Clinical Perspectives and Future Prospects. **Immunology Today**, v. 14, p. 281-284, 1993.
- AUSSEL, C. et al. Alpha-Ketoglutarate uptake in human fibroblasts. **Cell Biology International**, v. 20, p. 359-363, 1996.
- BARRY, M. A.; BARRY, M. E.; JOHNSTON, A. S. Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. **Biotechniques**, v. 16, p. 616-620, 1994.
- BOHM W. et al. DNA vector constructs that prime hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice after intramuscular injection. **Journal of Immunological Methods**, v. 193, p. 29-40, 1996.
- CERVINO, C. et al. Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity hapten-specific monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 329, p. 184-193, 2008.
- CHAMBERS, R. S.; JOHNSTON, A. S. High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization**. *Nature Biotechnology*, v. 21, p. 1088-1092, 2003.
- CHEN D. et al. Epidermal immunization by a needle-free powder delivery technology - immunogenicity of influenza vaccine and protection in mice. **National Medicine**, v. 6, p. 1187-1190, 2000.
- CHIARELLA, P.; FAZIO, V. M. Mouse monoclonal antibodies in biological research - strategies for high-throughput production. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1303-1310, 2008.
- CPMP, Committee for Proprietary Medicinal Products.
- Note for Guidance on the Pre-clinical, Pharmaceutical and Toxicological Testing of Vaccines** (CPMP/SWP/465.95). 1997. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu>> Acesso em: 09 maio 2012.
- CROWTHER, J. R. **The ELISA Guidebook**. 2nd. New Jersey: Humana Press, 2009. 566p. (Series Springer Protocols. Methods in Molecular Biology, v. 516)
- De MASI, F. et al. High-throughput mouse monoclonal antibodies using antigen microarrays. **Proteomics**, v. 5, p. 4070-4081, 2005.
- DUARTE, K. M. R. Protocolo e Normas para Uso de Animais de Laboratório para Produção de Anticorpos e Soros. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 64, n. 2, p. 167-177, 2007.
- FRANEK, F.; ECKSCHLAGER, T.; KATINGER, H. Enhancement of monoclonal antibody production by lysine-containing peptides. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 169-174, 2003.
- GAMBHIR, A. et al. Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p. 317-327, 2003.
- GENZEL, Y. et al. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 58-69, 2005.
- GODING, J. W. **Monoclonal antibodies: principles and practice**. 2. ed. London: Acad. Press, 1986. 315p.
- GUPTA ,R. K.; SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, p. 1263-1276, 2005.
- HANLY, W. C.; ARTWOHL, J. E.; BENNETT, B. T. Review on polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. **ILAR Journal**, v. 37, p. 93-118, 1995.
- HASSEL, T. J.; BUTLER, M. Adaptation to non-ammoniogenic medium and selective substrate feeding lead to enhanced yields in animal cell cultures. **Journal of Cell Science**, v. 96, p. 501-508, 1990.
- KASINRERK, W.; MOONSOM, S.; CHAWANSUNTATI, K. Production of antibodies by single DNA immunization: comparison of various immunization routes. **Hybrid Hybridomics**, v. 21, p. 287-293, 2002.
- KILPATRICK, K. E. et al. Gene gun delivered DNA-based

- immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Flt-3 receptor. **Hybridoma**, v. 17, p. 569-576, 1998.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.
- LARSSON, K. et al. Multiplexed PREST immunization for highthroughput affinity proteomics. **Journal of Immunological Methods**, v. 315, p. 110-120, 2006.
- LEE, Y. Y. et al. Low glutamine fed-batch cultures of 293-HEK serum-free suspension cells for adenovirus production. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 501-509, 2003.
- LEENAARS, P. P. A. M. et al. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. **ATLA**, v. 27, p. 79-102, 1999.
- LE FLOCH F. et al. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. **Cytotechnology**, v. 52, p. 39-53, 2006.
- LI, L. et al. Increasing culture efficiency of hybridoma cell by integrated metabolic control of glucose and glutamine at low level. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 42, p. 73-80, 2005.
- LIDDEL, E. Antibodies. In: WILD, D. **The Immunoassay Handbook**. 3. ed. London: Elsevier, 2005, p. 4-39.
- LINDBLAD, E. B. Aluminium Adjuvantes. In: STEWART-TULL, D. E. S. (ed). **The theory and practical application of adjuvantes**. Hohn Wiley & Sons, 1995. p. 21-25.
- McDERMOTT, R. H.; BUTLER, M. Uptake of glutamate, not glutamine synthetase, regulates adaptation of mammalian cells to glutamine-free medium. **Journal of Cell Science**, v. 104, p. 51-58, 1993.
- MOTA, E. F. et al. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, v. 16, n. 2, p. 79-88, 2006.
- NAKASHIMA, I. et al. The effect of antigen doses and time intervals between antigen injections on secondary, tertiary and quaternary antibody responses. Establishment of hyperimmunization with bovine serum albumin in mice treated with capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. **Immunology**, v. 26, p. 443-454, 1974.
- NY, Y. S. A rapid and simple approach to preparation of monoclonal antibody based on DNA immunization. **Cell Molecular Immunology**, v. 1, p. 295-299, 2004.
- NILSANG, S.; KUMAR, A.; RAKSHIT, S. K. Effect of  $\alpha$ -Ketoglutarate on Monoclonal Antibody Production of Hybridoma Cell Lines in Serum-Free and Serum-Containing Medium. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 151, p. 489-501, 2008.
- OGAWA, A.; TAKADA, N.; TERADA, S. Effective Antibody Production by Reusing Culture Medium Previously Used in Antibody Purification. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, v. 3, p. 719-721, 2009.
- OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. **Biotechnology Progress**, v. 7, p. 481-494, 1991.
- PENHA, T. R. et al. production and characterization of monoclonal ANTIBODIES ANTI FRAGMENT Fc of bovine IgG. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v. 53, n. 1, p. 105-114, 2010.
- PREIS, I.; LANGER, R. S. A single-step immunization by sustained antigen release. **Journal of Immunological Methods**, v. 28, p. 193-197, 1979.
- PUCCA, M. B. et al. Therapeutic monoclonal antibodies: scFV patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals. **Brazilian Journal of Pharmaceutic Science**, v. 47, n. 1, p. 31-38, 2011.
- RESENDE, F. C. B. et al. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais **Revista Brasileira de Alergia Imunopatológica**, v. 27, n. 3, p. 116-124, 2004.
- SOMMERFELD, S.; STUBE, J. Challenges in biotechnology production-generic processes and process optimization for monoclonal antibodies. **Chemical Engineering and Processing**, v. 44, p. 1123-1137, 2005.
- WOLFF, J. A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, v. 247, p. 1465-1468, 1990.